



**HAL**  
open science

# Exploration de la réponse moléculaire à l'inhibition des protéines BET dans les lymphomes B réfractaires

Loris Delrieu

► **To cite this version:**

Loris Delrieu. Exploration de la réponse moléculaire à l'inhibition des protéines BET dans les lymphomes B réfractaires. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV023 . tel-04166728

**HAL Id: tel-04166728**

**<https://theses.hal.science/tel-04166728v1>**

Submitted on 20 Jul 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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biologie cellulaire

Unité de recherche : IAB : Epigenetics, Environment, Cell Plasticity, Cancer (UGA / Inserm U1209 / CNRS UMR 5309)

## Exploration de la réponse moléculaire à l'inhibition des protéines BET dans les lymphomes B réfractaires

Présentée par :

**Loris DELRIEU**

#### Direction de thèse :

**Anouk EMADALI**  
INGENIEUR HDR, CHUGA

Directrice de thèse

**Jérôme GOVIN**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse

#### Rapporteurs :

**Pierre-Antoine DEFOSSEZ**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, UMR7216 - Épigénétique et Destin Cellulaire

**Romain GUIÈZE**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, CHU de Clermont-Ferrand, Université Clermont Auvergne

#### Thèse soutenue publiquement le 27 mars 2023, devant le jury composé de :

**Anouk EMADALI**  
INGENIEUR HDR, Institut pour l'Avancée des Biosciences - CHU Grenoble Alpes

Directrice de thèse

**Pierre-Antoine DEFOSSEZ**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, UMR7216 - Epigénétique et Destin Cellulaire

Rapporteur

**Romain GUIÈZE**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, CHU de Clermont-Ferrand, Université Clermont Auvergne

Rapporteur

**Marie-Odile FAUVARQUE MARRAS**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA Grenoble

Examinatrice

**Sarah HUET**  
MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, Université Claude Bernard Lyon 1

Examinatrice

**Claire VOURC'H**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UGA

Présidente

#### Invités :

**Jérôme Govin**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, Institut pour l'Avancée des Biosciences





# Remerciements

Nous y voilà. Cette thèse aura été une longue aventure qui se finit au cœur des Alpes françaises à Grenoble mais qui a tout d'abord commencé en Normandie. Alors pas d'inquiétude à avoir, je ne vais pas remonter l'histoire de ma vie jusqu'à l'écriture de ce texte, mais je vais mentionner certains faits et personnes marquantes qui m'ont amené à écrire ces lignes. J'ai très jeune développé une véritable fascination pour le monde vivant au sens large. De l'extraction d'ADN de banane dans ma chambre, aux cours de SVT donnés à mes frères et sœur (encore désolé de vous avoir traumatisé), à la lecture de l'origine des espèces de Darwin, j'ai toujours voulu comprendre le fonctionnement du monde vivant. Et à vrai dire j'étais un vrai geek... et j'ai poussé le bouchon jusqu'à l'intégration d'une licence à Angers, puis d'un master à Paris et enfin d'une thèse en biologie à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences de Grenoble. Je tenais donc à remercier toutes les personnes, qui se reconnaîtront, et qui m'ont d'une façon ou d'une autre poussé à poursuivre ma passion pour la science et pour la biologie.

Je tiens dans un premier temps à adresser des remerciements à mes directeurs de thèse. Merci Jérôme de m'avoir accueilli au sein de l'équipe TransEpi et de m'avoir accompagné dans ce parcours initiatique au monde de la recherche. Entre science, meeting, barbecues, j'ai pu apprendre beaucoup à tes côtés. Merci Anouk d'avoir accepté d'encadrer et de partager cette aventure de thèse avec moi. Merci pour tous tes conseils aussi bien professionnels que personnels qui m'ont permis de mieux appréhender mes faiblesses et de renforcer mes qualités. Et bien évidemment merci pour toutes ces discussions, plus ou moins longues, à discuter de tout et de rien (le pipelettage une vraie passion pour nous !).

Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'apporter leur regard critique et d'avoir évalué ces travaux de thèses. Mes remerciements donc au Dr. Pierre-Antoine Defossez, au Pr. Romain Guièze, au Dr. Marie-Odile Fauvarque, au Dr. Sarah Huet et au Pr. Claire Yourc'h. Merci également aux membres de mon Comité de Suivi de thèse de m'avoir guidé et de m'avoir apporté leurs lumières expertes pendant ces années de thèse. Merci Laurent, Olivier et Saadi. Vos conseils ont été très précieux.

Tous ce travail réalisé pendant ces trois dernières années n'aurait pas été possible sans le soutien inconditionnel de l'ensemble de l'équipe TransEpi. Marie, une lab manager en or et non en fer qui joue les méchantes alors qu'en réalité c'est une vraie tendre. Merci d'avoir été présente pour moi toutes ces années. Thierry B., un vrai génie de la modélisation statistique et un passionné également de biologie. Une vraie amitié s'est nouée entre nous, que ce soit dans nos petites session Modfit ou au cytomètre. Merci pour ta bonne humeur et nos tranches de

rigolade. Merci à Thierry G., le bon vivant de l'équipe, toujours prêt à partager un moment convivial avec ses collègues. Merci à Patricia, la championne de RStudio. Ton aide aura été très précieuse sur ce projet. Merci à Camille S., la scientifique modèle de l'institut avec les mains vertes. Discrète, mais toujours là pour aider ses collègues et toujours avec des avis et conseils très pertinents. Merci à Jordan L., naviguant entre jeux vidéo, pop-culture et blind-tests, merci pour tous ces bons moments passés ensemble. Merci à Émilie M., promis je ne te spoilerai pas la fin de One Piece. Merci à toi de m'avoir autant aidé sur mes heatmaps. Des couleurs dans tous les sens on en pouvait plus. Je souhaite un très bon courage à Anna et Andréa pour leur thèse. Anna, bon courage avec tes petites spores. Andréa, un esprit rêveur dans le corps d'une championne. Bon courage à vous deux. Raphaël, il faudrait un nombre de pages indécent afin de lister le nombre de blagues que cet homme possède en tête. On est arrivé ensemble à l'IAB en 2019, et on a su s'entraider dans les moments difficiles et aussi partager de bons moments de rigolades autour d'un ou plusieurs verres. Un pharmacien, biochimiste, dessinateur, musicien et qui purifie des complexes dans du pain (Casanova et al. 2021). Le boss en somme (tu penseras néanmoins à checker les  $-80^{\circ}\text{C}$  avant de partir de l'IAB <3). Une tendre mention à Camille T et Fabien. Vous avez été une vraie bouffée d'air frais, au labo comme à l'extérieur. Merci pour cette belle amitié nouée, je vous kiffe. Merci également à Christine L., capable de reconnaître tous les chromosomes humains même avec un bandeau sur les yeux. Grâce à toi j'ai découvert le merveilleux monde de la cytogénétique. Merci à Sylvain, un super collègue, un super onco-hématologue, un super scientifique. Merci énormément pour tous nos échanges de qualités, je te souhaite le meilleur. Je voulais également remercier tous les alumni avec qui j'ai pu collaborer au début de ma thèse : Sara, Julie, Kaiyao et Morgane. Enfin j'aimerais remercier extrêmement chaleureusement ma binôme d'aventure : Sieme. Tu as été pour moi, un vrai soutien sur tous les niveaux. Entre nos partages de ragots avec Dalenda, de chansons de Whitney Houston à fond sur nostalgie en culture cellulaire, nos tranches de rigolade pour tout et rien. On a su apprendre à se compléter au point où on avait même plus besoin de faire des phrases pour se comprendre. Je te souhaite vraiment tout le meilleur dans ta vie pro et perso, et bien évidemment si je repasse par le rond-point de Voiron je passerai faire un arrêt.

Cette thèse n'aurait pas pu être menée à bien sans le soutien de nombreuses autres personnes. Un grand merci à Dalenda (la patronne et la maman de l'IAB), Michaelis (le grand Zorba), Alexandre (le mécano), Roseline (MacGyver de l'administratif) et Véronique (la « problem solver » de l'IAB). Merci à vous tous pour votre gentillesse et votre grand cœur. Merci à toute l'équipe du IAB PhD Student Committee : Camila, Emma, Julie, Éléonora, Jana et Caroline. Vive les apéros, la fête et le fun. Je voudrais ensuite remercier Clovis, Amir, Paul R.,

Jordan A., Sophie B, Mylène, Christiane et Patrice pour toutes nos interactions de qualités aussi bien à la paillasse, que dans les couloirs, qu'en TP à la fac ou ailleurs dans le donut de l'IAB.

Voilà ici un ensemble de personnes qui ont été plus que des collègues pendant ces années et qui ont tous, à leur échelle, participé à mon maintien debout, jour après jour de cette thèse. Un grand merci à Mariam, le soleil libanais de l'IAB qui a monté le western blot au rang d'art. Et bien évidemment « je s'appelle Groot ». Saly, une énergie débordante et un franc parlé pur et sincère. Bonne continuation à toi au pays du Soleil qui ne se lève jamais. Émilie C., on s'est rencontré à l'IAB avec Camille et on a très vite partagé un certain sens de l'humour. Toujours chaud pour notre stand-up à l'Olympia. Mohamed, une personne unique, chef cuisinier de l'IAB, avec un cœur énorme débordant de gentillesse. Merci d'avoir partagé tous ces bons moments en ma compagnie, merci pour ton soutien à toutes épreuves et ton amitié. Domenico, un ovni dans le paysage scientifique. Ta sagesse a guidé de nombreuses personnes qui ont eu la chance de te côtoyer. Merci pour tout. Tristan, le grimpeur fou. Merci pour tous ces bons moments de partage et bon courage pour ton nouveau poste. Ariadni, l'oiseau nocturne de l'institut toujours le sourire, positive, et toujours là pour fermer le bâtiment. Merci énormément aussi pour ta gentillesse. Tanveer, l'homme le plus doux au monde. Merci pour toute cette gentillesse et ces bons moments de partage. Toujours la bonne humeur et toujours là pour ses collègues. Une personne unique. Alex, l'homme au T-shirt short en toutes saisons. Merci beaucoup pour ton écoute infailible et ton amitié, tu es quelqu'un d'exceptionnel aussi bien scientifiquement que personnellement. A nos innombrables craquages de fin de journée avec Tanveer et Ludivine (le labo KMT s'en souvient !). Enfin j'aimerais remercier Ludivine. Pas vraiment de bureau fixe dans l'IAB et toujours à 100 à l'heure. La queen du queendom de l'IAB, une scientifique et une amie exceptionnelle. Merci de m'avoir supporté tout ce temps aussi bien à l'IAB que lors de nos trajets quotidiens IAB-Ile Verte (grâce à toi maintenant je m'impose sur les passages piétons du pont de l'hôpital). Je te souhaite une superbe thèse, tous mes vœux de réussite.

Des remerciements spéciaux à Jérôme Lacoste et Sophie Louvet-Vallée. Vous avez été des enseignants et des mentors exceptionnels. Vous avez toujours été d'une extrême bienveillance à mon égard et vous m'avez fait comprendre ce que voulait vraiment dire le terme « Pédagogie ». Votre dévotion pour les étudiants est pour moi un véritable modèle. Un grand merci à Geneviève Almouzni, qui m'a donné envie de poursuivre sur la voie de l'épigénétique et de la chromatine. Merci Geneviève de m'avoir également toujours soutenu pendant ces 5 dernières années, depuis mon arrivée en M1 à Paris jusqu'à l'écriture de ce manuscrit. Une

scientifique passionnante et passionnée qui a à cœur de diffuser son expérience et sa passion de la science (et du chocolat !) aux gens qui l'entoure.

Enfin j'aimerais conclure ces remerciements par remercier les personnes qui m'ont poussé à poursuivre mes rêves, qui m'ont vu douter, qui m'ont vu au plus bas et également au plus haut. Merci à tous mes amis proches, Thomas S., Pierre, Charlie, Jordan, Natacha, Thomas A. Si je devais exprimer tous ce que j'éprouve pour vous je devrais au moins faire une thèse pour chacun. Merci d'être dans ma vie. Merci à ma famille, mes parents Guénaëlle et Alain, ma sœur Siobhane, mes frères Llewellyn et Jaylee. Merci de toujours m'avoir soutenu, et merci pour votre amour inconditionnel. Enfin, j'aimerais remercier Solène qui me supporte déjà depuis bientôt 6 ans et sans qui je n'aurais jamais pu vivre cette aventure de la même façon. Le temps passe si vite, on a appris tellement de choses ensemble et j'espère pouvoir continuer à apprendre beaucoup et à vivre de belles choses à tes côtés.

# Table des matières

Remerciements .....	1
Liste des abréviations .....	6
Liste des figures .....	14
Liste des tableaux... ..	16
INTRODUCTION .....	17
I. Lymphocyte B : développement normal et cancéreux .....	18
1. Différenciation et activation des lymphocytes B .....	18
2. Le rôle du centre germinatif dans la physiologie des lymphocytes B .....	19
3. Régulations moléculaires physiologique et pathologique du centre germinatif .....	24
II. Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (LBDGC) .....	32
1. Diagnostic et prise en charge thérapeutique .....	32
2. Classification des LBDGC.....	34
3. Les principales voies de signalisation dérégulées dans les LBDGC .....	42
III. La chromatine, les protéines BET et leur inhibition dans les LBDGC.....	52
1. Structure de la chromatine .....	52
2. Dynamique de la chromatine .....	58
3. La famille des protéines BET : structure et fonction.....	73
OBJECTIFS DE LA THÈSE .....	90
RÉSULTATS.....	93
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	130
RÉFÉRENCES .....	141
RÉSUMÉS .....	175

# Liste des abréviations

## A

---

ABC : Activated B-cell

ac-CoA : acétyl-Coenzyme A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AID / AICDA : Activation-Induced cytidine Deaminase

ALT : Alternative Lengthening of Telomeres

AML : Acute Myeloid Leukemia

APE : APurinic/APyrimidinic Endonuclease

AR : Androgen Receptor

ARHGEF1 : Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 1

ARHH : Ras HOmolog family member H (RHOH)

ARID1A : AT-Rich Interaction Domain 1A

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ASCT : Autologous Stem Cells Transplantation

ATRX : Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked

AURKA : AURora Kinase A

## B

---

BATF : Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor

BCL11A : B-Cell Lymphoma 11A

BCL6 : B-Cell Lymphoma 6 protein

BCOR : BCL6 CORepressor complex

BCR : B-Cell Receptor

BER : Base Excision Repair pathway

BID : Basic residue-enriched Interaction Domain

BRD/BD: Bromodomain

BRD2 : BRomoDomain-containing protein 2

BRD3 : BRomoDomain-containing protein 3

BRD4 : BRomoDomain-containing protein 4

BRDT : BRomoDomain Testis associated

brm : brahma

BTK : Bruton Tyrosine Kinase

## C

---

CAM : Calmoduline

CARD11 : CAspase Recruitment Domain family member 11

CAR-T : Chimeric Antigenic Receptor - T

CBM : CARD11, BCL10, MALT1

CBP : CREB Binding Protein

CBX8 : ChromoBoX 8

CCG1 : Cell Cycle Gene 1

CD40R : Cluster of Differentiation 40 Receptor

CDK6 : Cyclin-Dependant Kinase 6

CDKN1A : Cycline-Dependant Kinase iNhibitor 1A

CDKN1B : Cycline-Dependant Kinase iNhibitor 1A

CENP-A : CENtromere Protein A

CG : Centre Germinatif

CHOP : Cyclophosphamide Hydroxyadriamycine Oncovin Prednisone

CK2 : Caséine Kinase 2

c-KIT : proto-oncogene KIT

CLP : Common Lymphoid Precursor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

c-MYC : cellular MYeloCytomatosis viral oncogene homolog

CNV : Copy Number Variant

CoREST : co-repressor of Repressor Element1 Silencing Transcription Factor

COVID-19 : COronaVirus Disease 2019

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

CREBBP : CREB Binding Protein

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSR : Class Switch Recombination

CTCF : CCCTC-binding Factor

C-Ter : Carboxy-terminale

CTM : C-Terminal Motif

CXCL12 : C-X-C motif chemokine Ligand

12 CXCR4 : C-X-C motif chemokine

Receptor 4

CYCLON : Cytokine-Induced Protein With Coiled-Coil Domain

## D

---

DA-EPOCH-R : Dose Adjusted Etoposide Prednisone Oncovin Cyclophosphamide Hydroxyadriamycine Rituximab

dC : désoxyCytidine

DIGIT : Divergent to GSC, Induced by TGF- $\beta$  family signaling

DIPG : Diffuse Intrinsic Pontine Glioma

DNMT : DNA MethylTransferases

Double PH : Double Pleckstrin Homology domain

Double PHD : Double Plant HomeoDomain

dU : désoxyuridine

## E

---

E2A : transcription factor E2-Alpha

E-P : Enhancer et Promoteurs

EP300 : E1A Binding Protein P300

EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2

## F

---

FDC : Follicular Dendritic Cell

FISH : Fluorescent In-Situ Hybridization

FOSL1 : FOS Like Antigen 1

FOXO1 : Forkhead bOX O1

FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

fsh : female sterile homeotic

## G

---

GATA1 : Globin Transcription Factor 1

GCB : Germinal Center B-cell

GCTB : Giant Cell Tumor of Bone

GNAT : GCN5-related N-AcetylTransferases family

## H

---

H3K18ac : acétylation de la lysine 18 de l'histone H3

H3K27ac : acétylation de la lysine 27 de l'histone H3

H3K27me3 : tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3

H3K4me1 : mono-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3

H3K4me3 : tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3

H3K9me3 : tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3

H4K16ac : acétylation de la lysine 16 de l'histone H4

HAT : Histone AcetylTransferase

HDAC3 : Histone DeAcetylase 3

HDACi : HDAC inhibitor

HEXIM1 : HEXamethylene bis-acetamide-Inducible protein 1

HGBL : High Grade B-cell Lymphoma

HJURP : Holliday Junction Recognition Protein

HUCA : HIRA/UBN1/CABIN1/ASF1 $\alpha$

|

---

iBET : inhibiteur des protéines BET IDR

: Intrinsically Disordered Region IFN $\gamma$  :

InterFéroN  $\gamma$

IG : Immunoglobuline

IGH : ImmunoGlobulin Heavy chain locus

IgM : Immunoglobuline M

Ikk : Inhibitor of nuclear factor kappa B Kinase complex

IL-8 : Interleukine 8

IPI : International Prognostic Index IRF4

: Interferon Regulatory Factor 4 IRF8 :

Interferon Regulatory Factor 8

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

## J

---

JAK : Janus Kinase

## K

---

KMT2D : Lysine (K) MethylTransferase 2D

KO : Knock-Out

KRAS : Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene homolog

## L

---

LB : Lymphocytes B

LBDGC DH/TH : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules Double-Hit/Triple-Hit

LBDGC : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules

LPS : LipoPolySaccharide

LSD1 : Lysine-Specific Demethylase 1 LT

CD4+ : Lymphocytes T CD4+

LTFH : Lymphocyte T Folliculaire Helper

LYAR : LY-1 Antibody Reactive clone

LYN : Lck/Yes-Related Novel Protein Tyrosine Kinase

## M

---

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAX : Myc Associated factor X

MCL1 : Myeloid Cell Leukemia sequence 1

MCM : Mini-Chromosome Maintenance complex

MED1 : MEDiator subunit 1

MEF2B : Myocyte Enhancer Factor 2B

MEF2C : Myocyte Enhancer Factor 2C

MHC-II : Major Histocompatibility Complex II

Mi-2/NuRD : Nucleosome Remodelling Deacetylase

MLL2/MLL4/ALR : Mixed Lineage Leukemia 2/ Mixed Lineage Leukemia 4/ ALL1-Related protein

MMR : MisMatch Repair pathway

MOF : Males absent On the First

mSCF : membrane bound Stem Cell Factor

MTA3 : MetasTasis Associated 1 family member 3

MYD88 : MYeloid Differentiation primary response gene 88

MYST : Moz, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60

## N

---

NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NANOG : Nanog Homeobox  
NCOR : Nuclear receptor CO-Repressor complex  
NELF : Negative ELongation Factor  
NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa B  
NHEJ : Non-Homologous End Joining  
NMC : NUT-Midline Carcinoma  
NOS : Not-Otherwise Specified  
NPS : N-Terminal Phosphorylation Site  
N-Ter : N-terminale  
NUT : NUclear protein in Testis

## O

---

OCA-B : Oct Co-Activator from B cells  
ORFX : Open Reading Frame X

## P

---

P2RY8 : P2Y Receptor Family Member 8  
PAF : Polymerase Associated Factors  
PAX5 : PAired boX 5  
PCAF : P300/CBP-Associated Factor  
PEST : proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T) rich domain  
PIM1 : Proviral Integration site for Moloney murine leukemia virus-1 protein kinase  
PIM2 : Serine/Threonine-Protein Kinase Pim-2  
PLK1 : Polo Like Kinase 1  
PRC1 : Polycomb Repressive Complex 1  
PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2  
PRDM1/BLIMP-1 : PR DoMain zinc finger protein 1/ B Lymphocyte-Induced Maturation Protein- 1  
PROTAC : PROteolysis TArgeting Chimeras  
P-TEF $\beta$  : Positive Transcription ELongation Factor  $\beta$   
PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog

## R

---

R-ACVBP : Rituximab Adriblastine Cyclophosphamide Vindésine Bléomycine Prednisone

RAG1/2 : Recombination Activating Gene 1/2

R-CHOP : Rituximab Cyclophosphamide Hydroxyadriamycine Oncovin Prednisone

RCHP : Rituximab Cyclophosphamide Hydroxyadriamycine Prednisone

REL : REticuloendotheliosis viral oncogene homolog

RING3 : Really Interesting New Gene 3 protein

## S

---

S : Switch

S1PR2 : Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2

SAGA : Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferase

SARS-CoV-2 : Severe Acute Respiratory Syndrome COronaVirus 2

SDF-1 : Stromal Cell-Derived Factor 1

SE : Super-Enhancer

SEC : Super Elongation Complex

SEED : Sérine-Glutamate-Glutamate-Aspartate

SET1 : Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax protein 1

SETD2 : SET domain containing 2

SETDB1 : SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1 SFK

: Src Family Kinases

SHM : Somatic HyperMutation

SIRT1 : SIRTuin 1

SMARCA4 : SWI/SNF related Matrix associated Actin dependent Regulator of Chromatin subfamily A member 4

SMRT : Silencing Mediator for Retinoid or Thyroid-hormone receptors

SNAIL : Zinc finger protein SNAI1

Snf2 : SWI/SNF chromatin remodeling complex subunit 2

SPOP : Speckle Type BTB/POZ Protein

Spt7 : Suppressor of Ty 7

SRC : V-Src Avian Sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) Viral Oncogene Homolog

STAT3/5 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3/5

Suv39H1/2 : SUPpressor of Variegation 3-9 Homolog 1

SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable

## T

---

TAD : Topologically Associated Domain

TAF1 : TATA-Box binding protein Associated Factor 1

TBP : TATA-box Binding Protein et de plusieurs sous-unités

TET2 : Ten Eleven Translocation 2

TLR : Toll-Like Receptor

TNFAIP3 : TNF Alpha Induced Protein 3

TNFRSF14 : TNF Receptor SuperFamily member 14

TP53 : Tumor Protein p53

TWIST : Twist Family BHLH Transcription Factor

## U

---

UNG : Uracil DNA Glycolase

## X

---

XBP1 : X-Box Protein 1

## Y

---

YEATS : Yaf9, ENL, AF9, Taf14 et Sas15

## Autres

---

5hmC : 5-hydroxymethylcytosine

5mC : 5-méthylcytosine

# Liste des Figures

Figure 1. Développement et activation des lymphocytes B.....	19
Figure 2. Dynamique de la réaction du centre germinatif dans la création de clones de lymphocytes B de haute affinité et spécificité pour l'antigène (De Silva et al. 2015).....	20
Figure 3. Modèle du mécanisme d'hyper-mutation somatique médié par AID au sein de la zone sombre du centre germinatif (Peled et al. 2008) .....	21
Figure 4. Modèle du mécanisme de commutation de classe au sein de la zone claire du centre germinatif (Stavnezer et al. 2008).....	23
Figure 5. Vagues d'expression des facteurs de transcription impliqués dans la régulation des cellules du centre germinatif (Basso et al. 2015) .....	27
Figure 6. Origine des lymphomes dérivés du centre germinatif et liste des différentes dérégulations associées (Basso et al. 2015) .....	31
Figure 7. Nouvelles avancées et perspectives sur les procédures de diagnostic et d'analyses moléculaires des LBDGC (Campo et al. 2022).....	32
Figure 8. Bénéfice du R-CHOP comparé au CHOP et mode d'action du rituximab (Adapté de Coiffier et al. 2002 et Moloney et al. 2012) .....	33
Figure 9. Classification par profils d'expression de gènes de patients atteints de LBDGC et impact pronostique (Rosenwald et al. 2002).....	35
Figure 10. Algorithme de Hans basé sur l'analyse de marqueurs moléculaires en immunohistochimie (Hans et al. 2004).....	36
Figure 11. Classification des LBDGC par sous-types génétiques, et correspondance avec la cellule d'origine et d'autres types d'hémopathies malignes (Morin et al. 2022).....	36
Figure 12. Classification des LBDGC par sous-types génétiques selon l'algorithme « LymphGen » (Wright et al. 2020).....	37
Figure 13. Impact pronostic des réarrangements de c-MYC dans les LBDGC. DH/TH = Double-Hit/Triple-Hit, SH =Simple-Hit (Rosenwald et al. 2019) .....	39
Figure 14. Ciblage thérapeutique de l'activité oncogénique de MYC dans les cancers (Chen et al. 2018).....	41
Figure 15. Voie de signalisation du récepteur des cellules B (BCR) (Young et Staudt 2013).....	42
Figure 16. Activation chronique et tonique du BCR dans le contexte de LBDGC ABC et GCB (Young et Staudt 2013).....	43
Figure 17. Régulation du positionnement cellulaire au sein du centre germinatif par le geranylgeranyl glutathione (GGG) (Ngo et al. 2019) .....	45

Figure 18. Dérégulations épigénétiques majeures retrouvées dans les LBDGC (Mlynarczyk et al. 2019).....	49
Figure 19. Organisation structurale du nucléosome et des histones de cœurs H2A, H2B, H3 et H4, et mécanisme d'assemblage avec l'histone de liaison H1 nécessaire à la formation du chromatosome.....	53
Figure 20. Distribution chromosomique des histones de cœur, de leurs variants et association avec les protéines chaperonnes et de remodelage de la chromatine (Martire et Banaszynski 2020) .....	55
Figure 21. Oncohistones dans le développement tumoral.....	57
Figure 22. Dynamique du paysage épigénétique par modifications post-traductionnelles au niveau des histones par les protéines éditrices, effaceuses et lectrices (Arrowsmith et al. 2012) .....	59
Figure 23. Diversité et nature des modifications post-traductionnelles au niveau des histones de cœur H2A, H2B, H3 et H4 (Millán-Zambrano et al. 2022).....	61
Figure 24. Régulation de l'acétylation des protéines par les HATs et les HDACs.....	64
Figure 25. Les protéines à bromodomains et la reconnaissance des lysines acétylées.....	66
Figure 26. Organisation 3D de la chromatine au sein du noyau (Modifié de Zheng et Xie 2019) .....	69
Figure 27. Réorganisation 3D au niveau des loci IGH et c-MYC lors du processus de translocation (Méchalí 2022).....	71
Figure 28. Régions super-enhancers au sein des chaînes lourdes des immunoglobulines .....	72
Figure 29. Organisation structurale de la famille des protéines BET chez l'Homme.....	74
Figure 30. Schéma simplifié du mécanisme de transcription médié par le recrutement à la chromatine des BET et du complexe Mediator favorisant le recrutement du facteur d'élongation P-TEF $\beta$ permettant de phosphoryler le facteur NELF et la polymérase II pour libérer cette dernière de son état de pause et l'activer (Eischer et al. 2022) .....	76
Figure 31. Interaction et structure de JQ1 (en haut) et I-BET (en bas) avec le BD1 (bleu foncé) et le BD2 (cyan) de BRD4 .....	81
Figure 32. Modèle du rôle des bromodomains BD1 et BD2 des protéines BET et impact de leur inhibition spécifique (Filippakopoulos et Knapp 2020) .....	84

# Liste des Tableaux

Tableau 1. Essais cliniques avec les iBETs (Spriano et al. 2020).....	86
Tableau 2. Interactions synergiques entre les iBETs et d'autres composés en approches combinatoires (Spriano et al. 2020) .....	88

# INTRODUCTION

## I. Lymphocyte B : développement normal et cancéreux

Notre système immunitaire se compose d'une multitude de cellules et molécules assurant la protection de notre organisme contre des infections et des maladies, et ce tout au long de notre vie. Parmi ces cellules, les lymphocytes B jouent un rôle crucial dans l'immunité dite adaptative, par la reconnaissance d'antigènes présents au sein des différents tissus de l'organisme. En effet, ces cellules vont, suite à une succession de processus finement régulés, permettre la création d'un répertoire clonal et d'une mémoire immunitaire opérationnelle dans la lutte contre les agents pathogènes.

### 1. Différenciation et activation des lymphocytes B

Comme l'ensemble des cellules du système immunitaire, les lymphocytes B (LB) sont issus de la différenciation initiale au niveau de la moelle osseuse, des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Au sein de la moelle osseuse, les CSH captent et intègrent différents signaux solubles (comme les chimiokines IL-8 ou SDF-1/CXCL12) et membranaires (comme l'interaction entre les récepteurs mSCF et c-KIT) provenant des cellules stromales composant le micro-environnement hématopoïétique. Cela engendre l'expression de plusieurs facteurs de transcription spécifiques qui vont, à leur tour, réguler le programme d'expression génique et conduire à l'engagement vers différentes lignées dont la lignée lymphoïde. Une fois engagés, les précurseurs lymphoïdes communs B (CLP) subissent plusieurs étapes de différenciation dont certaines impliquent des réarrangements des segments V(D)J au niveau des loci des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines. Ces derniers vont conduire à l'expression des récepteurs B de membranes (BCR) dans la moelle pour produire des clones de LB immatures. Ces réarrangements sont une étape essentielle à la création d'une diversité clonale, nécessaire à la reconnaissance de nombreux antigènes (*Figure 1*).

Les LB immatures quittent ensuite la moelle osseuse sous la forme de LB transitionnels, naïfs vis-à-vis de la rencontre avec des antigènes, pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques et la rate. Après les phases de sélection positive et négative dans la moelle osseuse, la circulation dans les organes périphériques permet une seconde vague de sélection négative des LB matures auto-réactifs (reconnaissant des antigènes de l'hôte) ou poly-réactifs (reconnaissant plusieurs antigènes différents). Les LB naïfs positivement sélectionnés auront alors la possibilité d'être activés par la reconnaissance d'antigènes circulants ou présentés à la membrane des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (*Figure 1*).

*In fine*, l'activation des LB conduit à leur différenciation en plasmocytes, ayant pour rôle la production d'anticorps, ou en LB mémoires, persistant plusieurs années. Suite à une infection par exemple, les LB activés engendrent une première réponse rapide par la différenciation de plasmocytes qui vont sécréter des anticorps de faible affinité (IgM). Puis dans un second temps, suite à la co-activation par les lymphocytes T (LT) CD4+ il va y avoir formation d'une structure appelée centre germinatif (CG) qui va permettre la mise en place d'une réponse plus spécifique et d'augmenter l'affinité des BCR (Murphy & Weaver, 2017) (Figure 1).

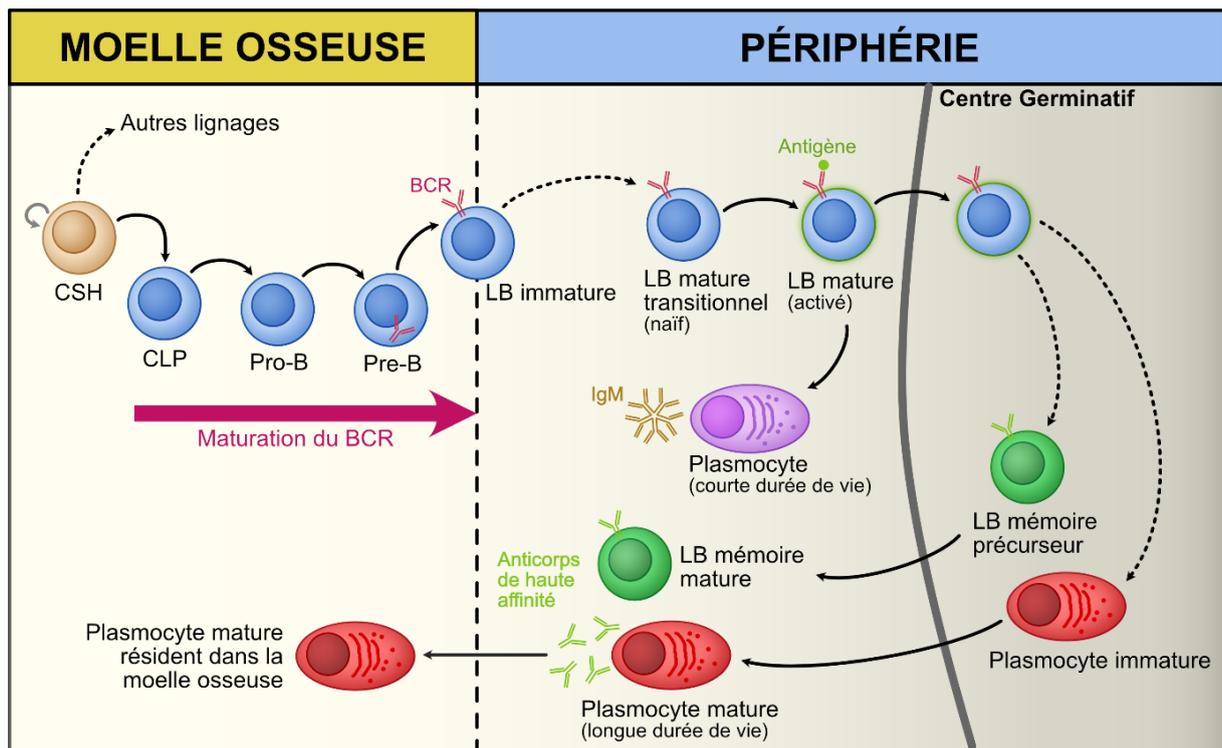


Figure 1. Développement et activation des lymphocytes B

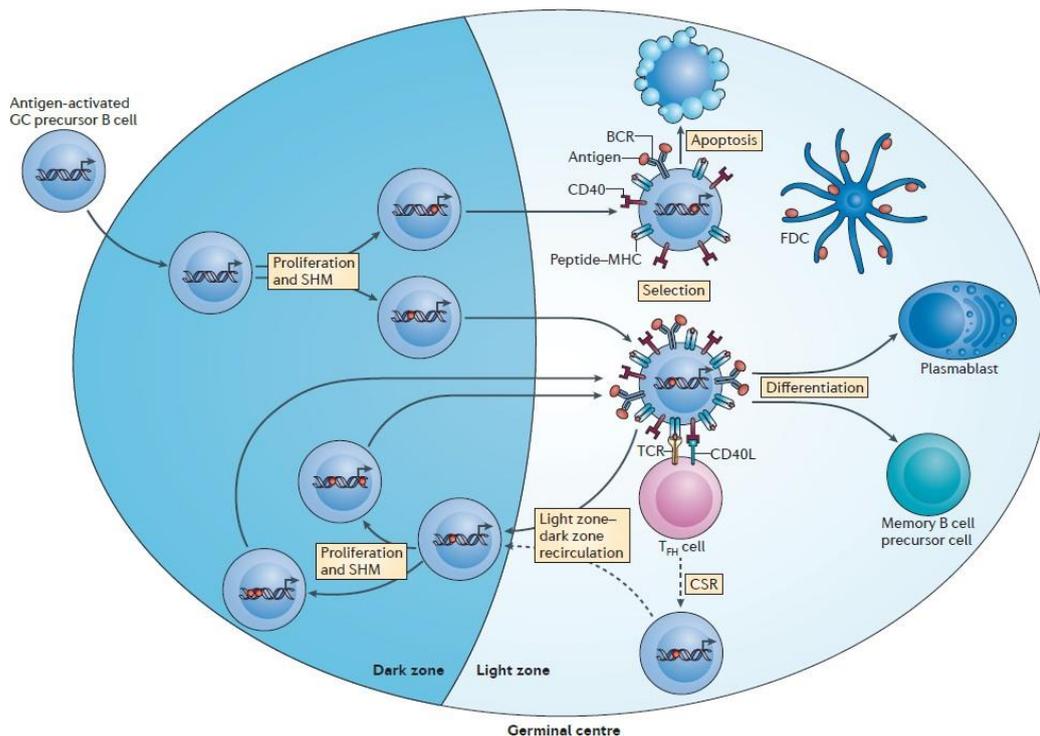
## 2. Le rôle du centre germinatif dans la physiologie des lymphocytes B

Après avoir été sélectionnés au niveau de la moelle osseuse, puis dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes B activés par la rencontre avec un antigène vont créer une structure appelée centre germinatif. Ces CGs sont des regroupements locaux, pluristratifiés, et polarisés de plusieurs types de cellules immunitaires, que l'on retrouve au sein des organes lymphoïdes secondaires. Ce sont des structures cellulaires dynamiques qui se créent en plusieurs semaines après le contact antigénique. Au sein de celles-ci, les LB activés subissent plusieurs processus différents ayant pour but la génération de clones de plasmocytes et de LB mémoires de haute spécificité, à même de produire des anticorps de forte affinité pour l'antigène détecté (Murphy & Weaver, 2017).

### a) Phase de prolifération et d'hyper-mutations somatiques

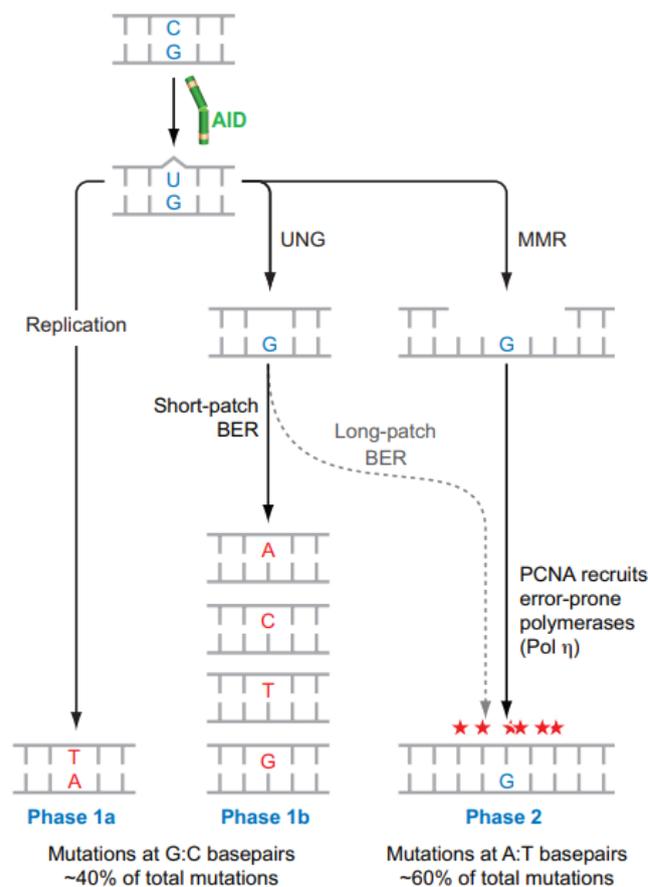
Les LB activés par la rencontre avec un antigène vont pouvoir être co-stimulés positivement au niveau membranaire par des LT-CD4+ présents en périphérie externe des futurs CG, dans la zone du manteau. Cette co-stimulation initie une phase de prolifération cellulaire T-dépendante et permet la création de CGs. Notons que tous les LB activés n'entrent pas forcément dans la réaction du centre germinatif. En effet, seuls ceux interagissant fortement avec les LT-CD4+ seront sélectionnés. La zone folliculaire, composant le cœur du CG, est polarisée en deux zones : la zone sombre et la zone claire. C'est au niveau de la zone sombre que l'on retrouve le réservoir de LB hyperproliférant, alors nommés centroblastes.

Au cours de cette phase de forte prolifération, les centroblastes subissent des hyper-mutations somatiques (SHM) au niveau des régions variables des loci codant pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (IG) (De Silva & Klein, 2015) (Figure 2).



*Figure 2. Dynamique de la réaction du centre germinatif dans la création de clones de lymphocytes B de haute affinité et spécificité pour l'antigène (De Silva et al. 2015)*

Ce mécanisme consiste en la création de mutations ponctuelles qui vont introduire des altérations au niveau de la structure protéique des IG, conduisant ainsi à la modification de la spécificité et de l'affinité du BCR pour l'antigène. Ce mécanisme est notamment médié par la déamination des désoxycytidines (dC) en désoxyuridines (dU) par l'enzyme AID (Activation-Induced cytidine Deaminase). L'expression et l'activité d'AID est très contrôlée au sein des cellules, aussi bien au niveau du locus codant l'enzyme (*AICDA*) que d'un point de vue post-transcriptionnel ou post-traductionnel. La première phase du mécanisme d'hyper-mutation somatique dépend donc de l'activité mutagène d'AID. Il s'appuie ensuite sur la réparation des erreurs par excision des bases mutées (BER) et par réparation des « mismatch » d'association entre bases (MMR). C'est donc l'association de deux systèmes antagonistes, conduisant à la création de mutations et à leur réparation, qui est à l'origine de la diversité au sein des loci des IG (Peled et al., 2008) (*Figure 3*).

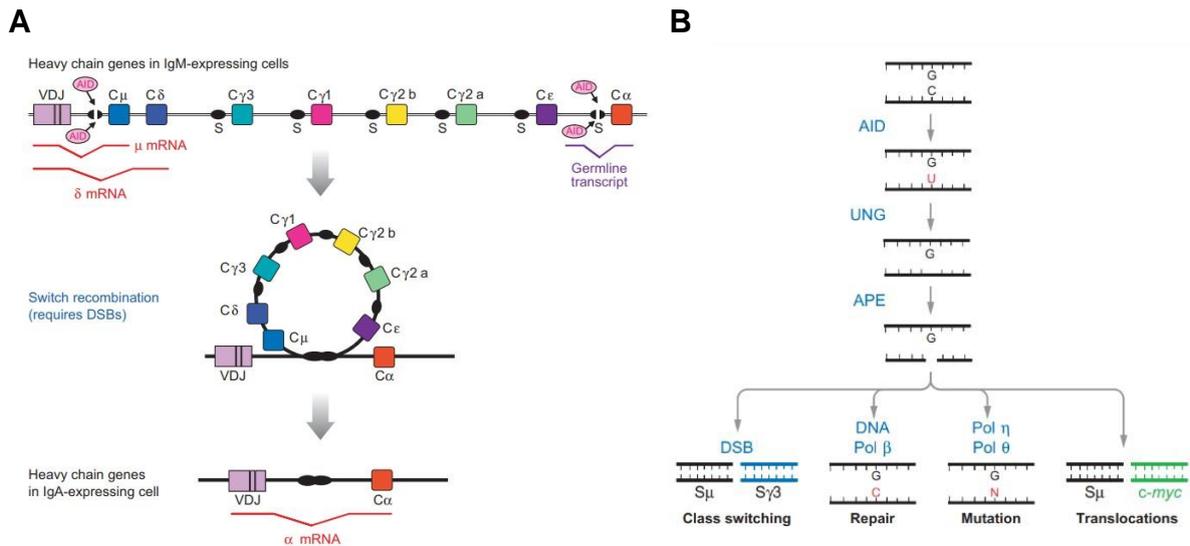


*Figure 3. Modèle du mécanisme d'hyper-mutation somatique médié par AID au sein de la zone sombre du centre germinatif (Peled et al. 2008)*

## b) Phase de sélection et de commutation de classe

Une fois que les centroblastes de la zone sombre ont proliféré et subi diverses hypermutations somatiques, la spécificité ainsi que l'affinité de liaison de ces derniers pour l'antigène immunisant vont être testées au sein de la zone claire du CG. Les LB de la zone claire sont alors qualifiés de centrocytes. D'autres types cellulaires sont présents au sein de cette zone comme les cellules folliculaires dendritiques (FDC) et les LT folliculaires « helper » ( $LT_{FH}$ ). Les FDC sont des cellules présentatrices d'antigènes qui vont, comme leur nom l'indique, présenter de nouveau l'antigène immunisant aux centrocytes ayant préalablement subi des SHM. Si le centrocyte présente une forte affinité pour l'antigène, il va pouvoir l'internaliser par endocytose et le présenter en surface par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'antigène pourra alors être reconnu par interactions membranaires par les  $LT_{FH}$  qui, à leur tour, induiront des signaux de survie et, ainsi, sélectionneront positivement ces clones. Les clones de centrocytes qui n'auront pas réussi à reconnaître de façon efficace l'antigène immunisant, de même que les clones auto-réactifs, engageront un programme de mort par apoptose (De Silva & Klein, 2015) (*Figure 2*).

Pour adapter la fonction effectrice des anticorps aux antigènes rencontrés, les centroblastes de la zone claire réarrangent, par des cassures double brin de l'ADN (recombinaison par excisions intrachromosomiques), la région codant pour la partie constante des chaînes lourdes des IG ( $C_H$ ). C'est ce que l'on appelle la commutation de classe (CSR). Ce mécanisme est dépendant de la régulation par l'enzyme AID. Cette dernière va avoir pour rôle de désaminer la région appelée « switch » (S) située en amont des gènes  $C_\mu$ ,  $C_\delta$ ,  $C_\gamma$ ,  $C_\epsilon$  et  $C_\alpha$ . Cela va conduire à l'excision des désoxyuridine générées, et ce par l'Uracil DNA Glycolase (UNG), rendant les sites S vulnérables aux endonucléases comme APE (APurinic/aprimidinic Endonuclease) qui vont induire des cassures double-brin. Les sites de ces cassures vont être recombinés par mécanisme de NHEJ (Non-Homologous End Joining) par plusieurs acteurs protéiques différents non détaillés ici. Des erreurs non réparées lors des mécanismes de commutation de classe peuvent conduire à des mutations ou encore des translocations chromosomiques, et *in fine* induire un développement pathologique des cellules B du centre germinatif (Stavnezer et al., 2008) (*Figure 4*).



**Figure 4.** *Modèle du mécanisme de commutation de classe au sein de la zone claire du centre germinatif (Stavnezer et al. 2008)*

**A.** *Détail du mécanisme moléculaire conduisant au réarrangement des régions constantes du locus des chaînes lourdes des immunoglobulines*

**B.** *Implication des enzymes AID et UNG dans la formation de cassures de l'ADN et conséquences génomiques*

### c) Maintien du centre germinatif par recirculation dans la zone sombre et différenciation terminale

Après avoir passé les différentes sélections au niveau de la zone claire, une fraction de centroblastes, d'affinité intermédiaire pour l'antigène, va pouvoir recirculer au niveau de la zone sombre du CG, afin d'engager à nouveau un programme de prolifération et d'hypermutations somatiques. Cette recirculation permet, à la fois, de maintenir le centre germinatif actif, par le maintien du pool proliférant de LB au niveau de la zone sombre, et de parfaire l'affinité pour l'antigène. À la suite de ces différents cycles de sélection dynamiques au sein du CG, les cellules de haute affinité alors sélectionnées pourront se différencier en plasmocytes immatures ou en LB mémoires précurseurs. Ces cellules de haute affinité matureront, ensuite, en dehors du CG et résideront dans différentes niches pendant plusieurs années. Ceci garantit, à l'organisme infecté, une réponse immunitaire plus rapide et donc plus efficace contre de potentielles réinfections (De Silva & Klein, 2015).

### 3. Régulations moléculaires physiologique et pathologique du centre germinatif

Les processus cellulaires impliqués dans la création et le maintien du centre germinatif sont contrôlés par divers types de signaux, à la fois extra-, inter- et intra-cellulaires. Ces signaux sont finement orchestrés dans le temps et dans l'espace, ce dernier correspondant au microenvironnement des cellules B rencontrant un antigène. Dans cette partie, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux signaux intra-cellulaires coordonnant le devenir des cellules du centre germinatif. Nous ferons d'abord lumière sur les réseaux de facteurs de transcription contrôlant l'identité et la fonction des cellules B au sein des différentes zones du CG. Nous nous intéresserons ensuite aux régulateurs épigénétiques coordonnant l'activation ou la répression des gènes impliqués dans les processus de réponse à l'activation des LB par un antigène.

#### a) Les facteurs de transcription

##### MYC

MYC est un proto-oncogène connu pour être dérégulé dans de nombreux types de cancers. Le gène *c-MYC* code pour un facteur de transcription qui va, par hétérodimérisation avec un autre facteur de transcription MAX, se fixer sur des éléments de régulation (motifs E-box) au niveau de gènes cibles codant pour des régulateurs métaboliques, du cycle cellulaire, de la maintenance du génome ou encore de l'apoptose. Ces régulations transcriptionnelles peuvent aussi bien être activatrices qu'inhibitrices, en fonction des cofacteurs interagissant avec MYC-MAX. En plus de son activité de facteur de transcription, régulant un ensemble précis de gènes cibles, plusieurs études décrivent des fonctions « non-canoniques » de MYC. Ces fonctions incluent notamment un rôle dans la division cellulaire grâce à l'interaction de MYC avec des protéines de la famille MCM, faisant partie du complexe de pré-réplication (Dominguez-Sola et al., 2007), ou plus généralement dans la régulation de la transcription indépendamment de ses gènes cibles en participant, par exemple, au décrochage des ARN polymérases II bloquées au niveau de structures appelées R-loop qui se forment dans un contexte de stress réplicatif (Balupuri et al., 2020). MYC est exprimé de façon précoce lors de la formation du CG, dans les cellules activées par la reconnaissance antigénique. Paradoxalement, il est rapidement réprimé au niveau de la zone sombre par le facteur BCL6. Il est réexprimé au sein de la zone claire dans les cellules circulantes vers la zone sombre qui vont subir une nouvelle vague de SHM afin d'induire un phénotype pro-prolifératif (*Figure 5*). Son expression est notamment médiée par la voie du BCR et NF- $\kappa$ B, ainsi que par la voie de CD40R et FOXO1 (Luo et al., 2018). L'importance de MYC dans la formation et le maintien du CG a été montrée par des expériences de délétion conditionnelle dans des souris, où une

délétion précoce de *c-MYC* conduit à l'absence de formation de CG, et où une délétion tardive, après formation du CG, conduit à un effondrement de ce dernier (Calado et al., 2012).

## **BCL6**

Appelé également le « master régulateur » du centre germinatif, BCL6 est un facteur de transcription répresseur de beaucoup de gènes clés dans la réaction du CG. Sa capacité de répression vient principalement du fait que ce facteur, en s'homodimérisant et en reconnaissant ses séquences cibles au niveau du génome, va pouvoir recruter différents complexes répresseurs comme SMRT/NCOR, BCOR/CBX8 ou encore Mi-2/NuRD. Ces complexes induisent un remodelage épigénétique par la présence de sous-unités ayant des activités catalytiques de dé-acétylation (ex : HDAC3) ou de méthylation et déméthylation de la chromatine environnante (ex : PRC1 et LSD1), conduisant ainsi à un changement d'expression de leurs gènes cibles (H. Yang & Green, 2019) . On peut également noter que la protéine BCL6 est régulée de façon post-traductionnelle par acétylation de la lysine K379 du motif KKYK présent dans son domaine PEST, par un acteur important du CG qu'est l'acétyltransférase EP300. Cette modification intervient notamment lors de la différenciation terminale des LB en plasmocytes et LB mémoires, pour lever la répression de BCL6 sur les gènes impliqués dans la différenciation comme, par exemple, *PRDM1/BLIMP-1* (Bereshchenko et al., 2002). *BCL6* est exprimé de façon précoce dans les LB naïfs mais seulement sous forme d'ARNm, suggérant ainsi une régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle dans ces cellules. Dans les LB naïfs de la zone interfolliculaire, *BCL6* est exprimé grâce à l'intervention des facteurs de transcription IRF8, IRF4 et MEF2B (*Figure 5*). Cependant les signaux d'induction conduisant à l'activation des voies de signalisation de ces facteurs ne sont pas clairement identifiés. L'un des rôles principaux de *BCL6* est le maintien, dans les LB de la zone sombre du CG, de la répression transcriptionnelle de gènes intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire et dans les mécanismes de réparation de l'ADN. En effet, lors des phases de SHM, ces cellules doivent pouvoir tolérer un certain niveau de stress génotoxique et passer sous les radars des checkpoints cellulaires. Ainsi, le gène *TP53*, connu pour être une cible de BCL6, va voir son expression réprimée dans les centroblastes de la zone sombre qui, justement, présentent un fort niveau de BCL6 (Phan & Dalla-Favera, 2004). De plus, les expériences de KO pour *BCL6* ont montré un développement normal des LB mais une incapacité à former des CG suite à l'activation des LB par un antigène (Dent et al., 1997), démontrant l'importance de ce facteur dans la création et le maintien du CG.

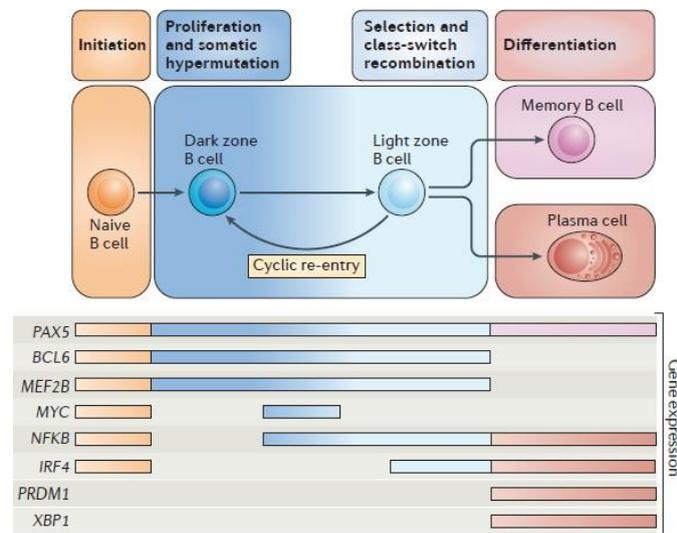
## L'axe NF- $\kappa$ B – IRF4 – BLIMP1

La répression de *BCL6* est, comme nous l'avons vu un peu plus haut, une étape cruciale de la différenciation terminale des LB du CG. En plus d'une répression post-traductionnelle opérée par différents acteurs tels EP300 ou la voie MAPK (Niu et al., 1998), d'autres facteurs de transcription coopèrent afin de réprimer le gène *BCL6*. Cela se produit notamment via l'activation du facteur NF- $\kappa$ B au niveau de la zone claire de certains centrocytes après ré-exposition à l'antigène, suite à l'interaction avec les LT-F<sub>H</sub> et les FDC des récepteurs BCR, CD40R et TLR. Ce facteur de transcription est composé de combinaisons de sous-unités de manière dimériques (c-REL/RELA(p65)/RELB/p52/p50) qui sont naturellement inhibées par le facteur I $\kappa$ B et relarguées grâce à l'activation de I $\kappa$ K, en aval des récepteurs membranaires, qui va phosphoryler I $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B va à son tour pouvoir induire l'expression d'un set de gènes dont le facteur de transcription IRF4 normalement réprimé dans la zone sombre par *BCL6* (*Figure 5*). Des forts taux de IRF4 au niveau des centrocytes de la zone claire vont induire la répression de *BCL6* et conduire à l'expression de PRDM1/BLIMP-1, lui-même inhibé par *BCL6* (De Silva et al., 2012). Cela va donc conduire à l'activation du programme transcriptionnel de terminaison de la réaction du CG et à la différenciation en plasmocytes et LB mémoires. L'importance de NF- $\kappa$ B dans la différenciation des centrocytes est, quant à elle, démontrée par délétion de la sous-unité RELA dans des modèles animaux qui conduit au blocage de la différenciation plasmocytaire (Heise et al., 2014).

## PAX5

Il s'agit sûrement de l'un des facteurs clé de la définition de l'identité du lignage lymphoïde. Même si ce facteur joue un rôle plus global visant le maintien de l'identité lymphocytaire en dehors de la réaction du CG, il participe également à plusieurs processus clés au sein de cette structure. PAX5, par ses interactions avec d'autres facteurs comme CBP, SAGA (protéines à activité acétyltransférase) ou encore des protéines de la famille Groucho (protéines à activité désacétylase). Au sein du CG, PAX5 joue deux rôles majeurs. Le premier réside dans la capacité de PAX5 à lier des éléments de régulation au niveau du locus IGH et à permettre, par le recrutement d'autres protéines, la contraction et le « looping » des segments V<sub>H</sub>. Ce processus permet, par la suite, la recombinaison de ces segments par les enzymes RAG1 et RAG2. Le second rôle de PAX5 est son implication dans la répression des facteurs de différenciation PRDM1/BLIMP1 et XBP1. On le retrouve, cependant, exprimé dans les LB mémoires, ce qui suggère que PAX5 opère un contrôle spécifique dans le choix d'engagement lors de la différenciation (Cobaleda et al., 2007) (*Figure 5*).

En plus des différents facteurs cités ci-dessus, nous pouvons noter l'importance du rôle joué par les facteurs, non décrits ici, MEF2B, MEF2C, E2A, FOXO1, XBP1, IRF8, MTA3, STAT3/5 dans le contrôle de l'identité des cellules et des réactions au sein du CG.



**Figure 5.** Vagues d'expression des facteurs de transcription impliqués dans la régulation des cellules du centre germinatif (Basso et al. 2015)

## b) Les facteurs épigénétiques

### EZH2

EZH2 est une histone méthyltransférase faisant partie du complexe de répression de la famille polycomb PRC2. Cette sous-unité catalyse, grâce à son domaine SET, la tri-méthylation de l'histone H3 au niveau de sa lysine en position 27 (H3K27me3), constituant l'une des marques majeures de l'hétérochromatine facultative. Le rôle d'EZH2 est donc critique dans la régulation du programme d'expression génique au sein des cellules. Au cours du développement de la lignée lymphoïde, EZH2 est spécifiquement exprimé dans le CG où il crée des promoteurs bivalents. Ces promoteurs bivalents correspondent à la présence, au niveau des nucléosomes et des régions promotrices, de marques répressives H3K27me3 et activatrices H3K4me3 de la transcription. Ces structures permettent de rapides « shift » d'activation et de répression de plusieurs gènes contrôlant la réaction du CG (Pasqualucci, 2019). Au niveau de la zone sombre, EZH2 coopère avec BCL6, afin de recruter le complexe non-canonique PRC1-BCOR-CBX8. Ce recrutement localisé va conduire à la répression de nombreux gènes et notamment des inhibiteurs du cycle cellulaire comme *CDKN1A* et *CDKN1B*, ou encore les facteurs de transcription *IRF4* et *PRDM1* et ainsi réguler la différenciation terminale et la sortie du centre germinatif (Béguelin et al., 2016). De plus, la délétion de *EZH2* conduit à une absence de formation du CG, montrant ainsi le rôle clé de ce facteur épigénétique au sein du CG.

## CREBBP/EP300

CREBBP et EP300 sont des acétyltransférases paralogues de la grande famille des protéines à bromodomains (poche hydrophobe pouvant lier des motifs de lysines acétylées), participant à l'acétylation de nombreuses protéines et jouant un rôle de cofacteur dans diverses régions génomiques. Au niveau des histones, CREBBP et EP300 vont participer au dépôt des marques H3K18ac et H3K27ac. Ces marques sont enrichies au niveau des promoteurs et des enhancers de plusieurs loci actifs d'un point de vue transcriptionnel. En plus de leur rôle dans la régulation de la transcription via l'acétylation des histones, CREBBP et EP300 vont pouvoir acétyler des protéines clés du CG comme BCL6, bloquant ainsi son interaction avec des complexes répresseurs HDAC, ou encore p53, en induisant son activation (Gu et al., 1997). Au sein du CG, CREBBP et EP300 vont contrôler l'expression de gènes cibles communs, mais également spécifiques à l'une ou l'autre enzyme. Il est ici intéressant de noter que CREBBP module l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation BCR/CD40R, IRF4, du traitement des antigènes et de leur présentation au MHC-II (Meyer et al., 2019).

## KMT2D (MLL2)

KMT2D, aussi appelée MLL2/MLL4/ALR, est une histone méthyltransférase de la famille SET1 qui catalyse la mono-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me1) au niveau de régions enhancers, démontrant d'un état actif de ces éléments de régulation. Une étude publiée en 2015 a mis en évidence l'implication de cette méthyltransférase dans la régulation de l'apoptose, la signalisation via CD40R, la prolifération et la migration cellulaire au cours du développement des LB. Les auteurs ont notamment montré qu'une délétion conditionnelle précoce de *KMT2D* conduisait à une augmentation de la prolifération de LB du centre germinatif, suggérant un rôle de suppresseur de tumeur (Zhang et al., 2015).

## DNMT3 & TET2

En plus de régulations épigénétiques au niveau des histones, et plus globalement de la chromatine, les motifs de méthylation de l'ADN jouent également un rôle crucial dans l'identité phénotypique des cellules B. Aussi, plusieurs études ont montré l'importance de deux familles de protéines, aux effets antagonistes, que sont les DNMT (DNA MethylTransferases) et les TET (Ten Eleven Translocation). Ces protéines ont respectivement un effet de méthylation et de déméthylation de l'ADN. L'état de méthylation de l'ADN constitue un autre niveau de régulation de l'expression des gènes. Ainsi, de forts niveaux de méthylation vont plutôt conduire à la répression de certains loci, tandis que de faibles niveaux de méthylation conduiront à une

activation. Dans les cellules du CG, on observe des différences de régulation par méthylation de l'ADN au cours de la réaction d'activation et de différenciation des LB. On peut noter, par exemple, que l'activation et la différenciation plasmocytaire est réprimée par la hausse *de novo* du taux de méthylation des centroblastes du CG (Barwick et al., 2018). Cette répression a également été observée dans le cas de la perte de TET2 qui conduit à une hyperméthylation de l'ADN, se traduisant par des perturbations de sorties du CG et de la différenciation terminale (Dominguez et al., 2018). De même, des études complémentaires ont été menées pour mieux comprendre l'implication de différents membres de la famille DNMT dans le contrôle phénotypique des cellules du CG (Shaknovich et al., 2011).

### c) Les dérégulations et lésions génomiques

La réaction du centre germinatif est un ensemble de mécanismes se mettant en place rapidement et ayant pour but de contrôler le devenir cellulaire des LB. Ces changements phénotypiques nombreux sont aussi bien à l'origine de la fine sélection des clones de forte affinité pour l'antigène immunisant, que de la création de points de fragilité génomique pouvant conduire, dans certaines conditions, à un développement pathologique que l'on appelle lymphome. Ces hémopathies malignes constituent un ensemble d'entités distinctes et hétérogènes, chacune caractérisée par la combinaison de plusieurs dérégulations et lésions génomiques (*Figure 6*). Ces perturbations peuvent aussi bien impacter le niveau d'expression de facteurs de transcription de façon temps et dose-dépendante, que le niveau d'activité de complexes épigénétiques, conduisant à un remodelage aberrant de la structure 3D du génome.

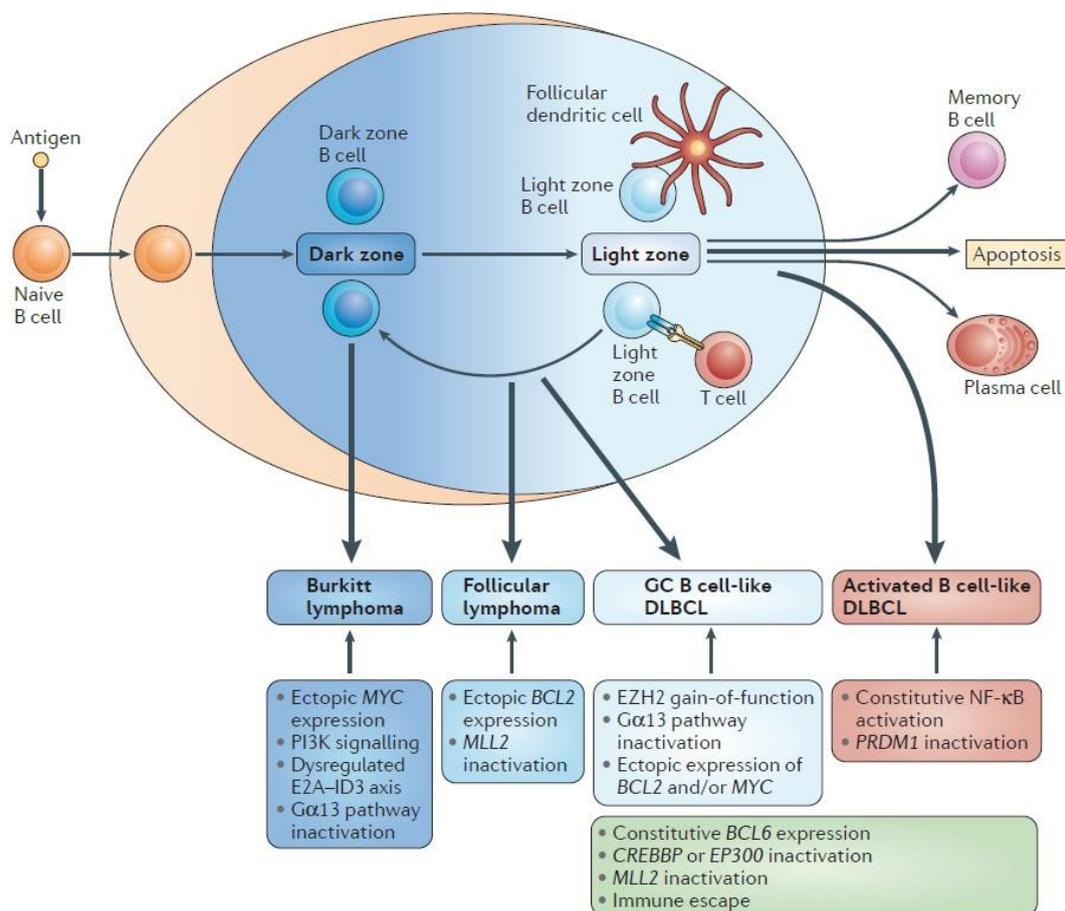
Les hypermutations somatiques, comme vu dans un précédent chapitre, conduisent à la modification de l'affinité de l'antigène par le BCR grâce à l'introduction de points de mutations au niveau des régions variables des loci codants pour les chaînes lourdes (H) et légères ( $\kappa$  et  $\lambda$ ) des immunoglobulines. Ce mécanisme médié par AID n'est pas sans risque pour les cellules. En effet, dans certains contextes, encore mal compris, l'activité mutagène d'AID conduit à l'introduction de mutations non-sens ou faux sens dans des exons codant pour des régulateurs non-IG du CG. Ceci a, par exemple, pu être observé sur les proto-oncogènes *MYC*, *PIM1*, *ARHH* ou *PAX5* (Pasqualucci et al., 2001). Ces mutations peuvent induire un gain ou une perte de fonction du produit du gène impacté. Selon le ou les gènes impactés, ces mutations peuvent favoriser la survie, les « switch » métaboliques, l'échappement au système immunitaire ou encore la résistance à l'apoptose. Par exemple, la mutation sur le résidu T58, codé au niveau de l'exon 2 de *MYC*, conduit à l'hyper-stabilisation de la protéine ce qui promeut son pouvoir oncogénique en augmentant son temps de demi-vie par blocage de son adressage au

protéasome (Harrington et al., 2019). De récentes études ont montré que dans certains sous-types spécifiques de lymphomes, les SHM aberrantes affectent des régions du génome, appelées « super-enhancer », contrôlant l'activité transcriptionnelle de certains régulateurs essentiels du CG. Les descriptions structurelle et fonctionnelle de ces régions génomiques feront l'objet d'un chapitre de cette introduction.

Les mécanismes de SHM et de CSR médiés par AID conduisent, dans un contexte physiologique, à la création de lésions de l'ADN qui sont prises en charge par différents complexes de réparation. Ceci a pour but de maintenir l'intégrité de l'ensemble du génome tout en permettant l'introduction ponctuelle d'une certaine diversité nécessaire à la lutte contre les pathogènes rencontrés tout au long de notre vie. Cependant, il existe des situations dans lesquelles les lésions génomiques introduites par ces mécanismes ne sont pas, ou partiellement, réparées, conduisant alors à la modification de la structure 3D du génome. Ces remaniements peuvent être de différents types. Parmi ceux-ci, on retrouve les variations du nombre de copies (CNV) correspondant à la duplication, l'inversion ou la délétion d'un segment d'ADN contenant un ou plusieurs gènes. Également, les translocations chromosomiques intervenant lors d'erreurs du processus de recombinaisons V(D)J médié par les enzymes RAG1/2 comme, par exemple, les translocations t(14;18) faisant intervenir les loci *IGH* sur le chromosome 14 et *BCL2* sur le chromosome 18. Enfin, les translocations chromosomiques induites par erreurs des processus de SHM ou de CSR médié par AID comme, par exemple, les translocations t(8;14) faisant intervenir les loci *MYC* sur le chromosome 8 et *IGH* sur le chromosome 14. Ces translocations mettent à proximité des régions de fortes activité transcriptionnelle avec des oncogènes, conduisant *in fine* à la dérégulation des programmes géniques contrôlé par ces derniers (Basso & Dalla-Favera, 2015).

Nous pouvons également noter qu'en plus des dérégulations internes aux LB du CG, impactant leur programme d'expression, des délétions chromosomiques peuvent toucher des gènes codants pour des molécules de surface. Par exemple, la protéine TNFRSF14 peut être affectée et alors impacter l'interaction avec les cellules du micro-environnement, comme les cellules stromales et les LT-F<sub>H</sub> en provoquant leur forte activation, et conduisant ainsi à la création d'un environnement cellulaire favorable pour le développement tumoral (Boice et al., 2016).

Au sein du CG, de nombreux types de lymphomes peuvent donc se développer lorsque les processus maintenant l'intégrité du génome sont perturbés et causent la dérégulation de voies de signalisation essentielles à la formation et au maintien du CG (*Figure 6*). Ces perturbations touchent principalement des acteurs moléculaires contrôlant ces voies aux niveaux génétique et épigénétique, à différents stades de maturation des LB dans le CG. Dans la suite de cette introduction, nous allons plus particulièrement faire lumière sur un type de lymphome dérivé du CG, appelé lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC). Il existe cependant divers types de lymphomes dérivés du CG, comme représentés Figure 6, que nous ne détaillerons pas au cours de cet exposé.

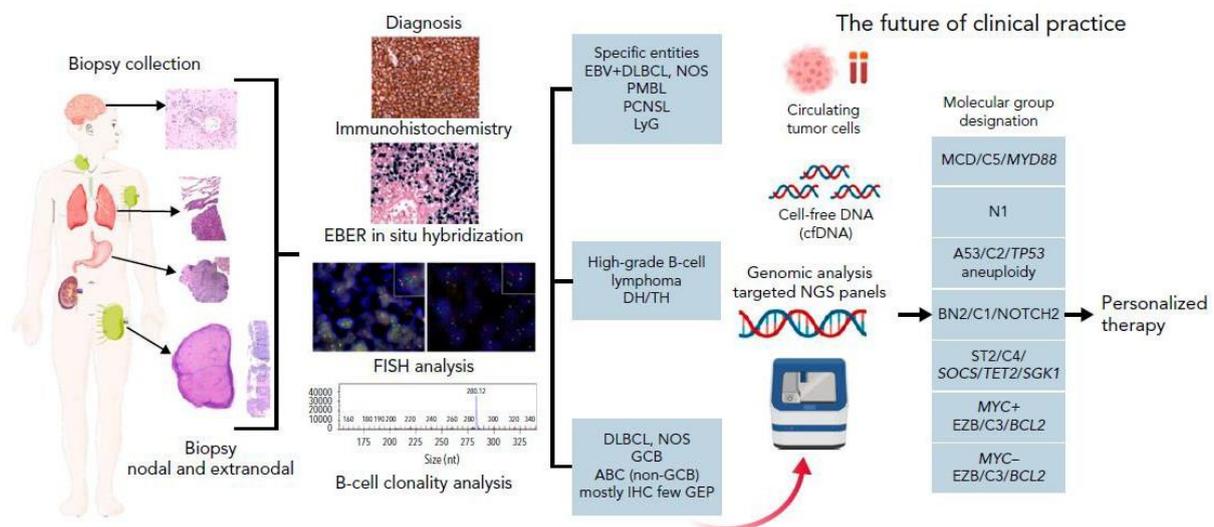


*Figure 6. Origine des lymphomes dérivés du centre germinatif et liste des différentes dérégulations associées (Basso et al. 2015)*

## II. Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (LBDGC)

### 1. Diagnostic et prise en charge thérapeutique

Les Lymphomes B diffus à grandes cellules sont des hémopathies malignes lymphoïdes faisant partie du grand sous-groupe des lymphomes B Non-Hodgkiniens. Ce sont les lymphomes non-Hodgkiniens les plus fréquents chez l'adulte. Les patients avec ce type de lymphomes présentent des adénopathies et développent des tumeurs au niveau de sites nodaux (ganglions lymphatiques) ou extra-nodaux. Ces tumeurs sont des proliférations anormales et diffuses de clones de cellules B matures de taille importante. Après biopsie des tissus lésés, plusieurs tests sont effectués afin de définir des caractéristiques morphologiques, génétiques ou encore moléculaires, afin de classifier au mieux la pathologie, en fonction de la détection ou non de certains biomarqueurs spécifiques (*Figure 7*) (Campo et al., 2022).

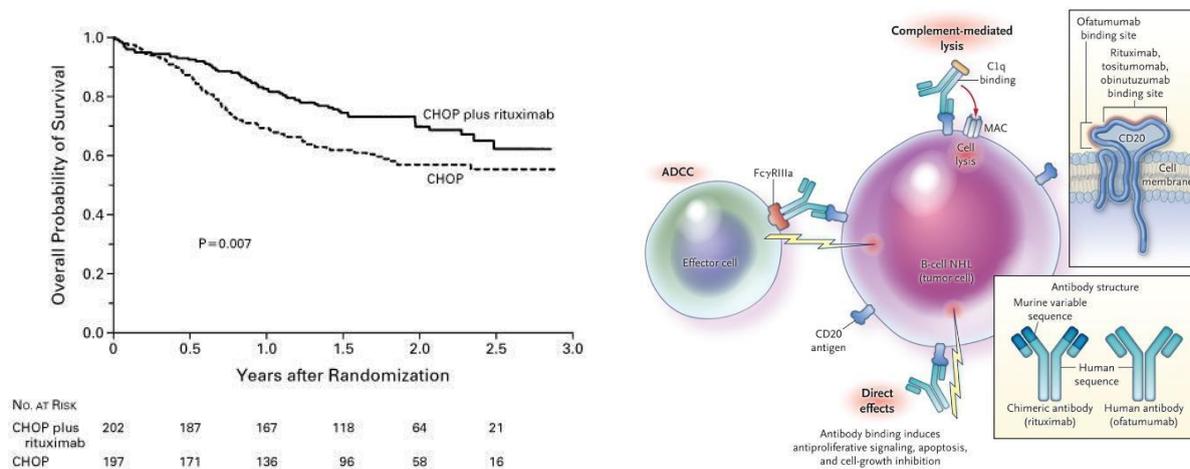


*Figure 7. Nouvelles avancées et perspectives sur les procédures de diagnostic et d'analyses moléculaires des LBDGC (Campo et al. 2022)*

Toutes ces analyses se basent donc sur la complémentarité d'expertises entre les services de cytologie, d'anatomopathologie, de cytogénétique, de biologie moléculaire ou encore d'immunophénotypage, afin de pouvoir proposer la meilleure option thérapeutique à chaque patient.

Avant les années 2000, le traitement mis en place pour ces lymphomes agressifs était une polychimiothérapie appelé le CHOP. Ce traitement était composé : d'un agent alkylant (la cyclophosphamide), d'un intercalant de l'ADN (l'hydroxyadriamycine), d'un poison des fuseaux mitotiques de microtubules (vincristine) et d'un corticoïde (la prednisone) (DeVita et al., 1975). En 2002, une étude a comparé l'effet du CHOP seul et celui du CHOP combiné à un anticorps chimérique monoclonal anti-CD20, le rituximab, sur une cohorte de patients atteints de LBDGC

(Figure 8) (Coiffier et al., 2002). Ces résultats significatifs et très encourageant sur la survie globale et la survie sans progression ont, depuis, conduit à introduire le R-CHOP comme traitement de référence pour cette pathologie.



**Figure 8.** Bénéfice du R-CHOP comparé au CHOP et mode d'action du rituximab (Adapté de Coiffier et al. 2002 et Moloney et al. 2012)

Il faut cependant noter que malgré une très bonne efficacité du R-CHOP dans environ 70% des cas, 30% des patients y sont réfractaires ou rechutent rapidement après l'initiation du traitement (Coiffier et al., 2010).

Pour ces patients, réfractaires ou rechutant, mais présentant un certain niveau de sensibilité à la chimiothérapie, des transplantations autologues de cellules souches (ASCT) peuvent être proposées en seconde ligne de traitement. Cependant, seul un quart des patients éligibles répond à cette approche. Depuis quelques années, la thérapie par cellules T à récepteur d'antigène chimérique (CAR-T) est également proposée en seconde ou troisième ligne de traitement et montre des rémissions durables pour plusieurs patients (Westin & Sehn, 2022). Malgré tout, l'espérance de vie des patients réfractaires reste faible. De nombreuses études ont, depuis, également tenté de trouver des alternatives au R-CHOP en tant que traitement curatif de première ligne et cela sans vraiment net succès. Le schéma R-CHOP 14 ou 21 (cycles de 14 ou 21 jours de traitement) reste donc prépondérant mais reste adaptable selon certains paramètres comme le score IPI (International Prognostic Index), l'état général et l'âge du patient. On peut noter, pour exemple, parmi les polychimiothérapies alternatives le R-ACVBP (Récher et al., 2011) ou le DA-EPOCH-R (Bartlett et al., 2019), et parmi les combinaisons du R-CHOP avec des petites molécules, le R-CHOP + Ibrutinib (inhibiteur de la voie BTK) (Younes et al., 2019) ou le R-CHOP + Bortezomib (inhibiteur du protéasome) (Davies et al., 2019). Malgré les différentes tentatives pour « challenger » le R-CHOP, seul deux essais ont montré un

modeste bénéfique en terme de réponse tumorale : le R-ACVBP (qui s'accompagne d'un excès de toxicité) et l'essai POLARIX (RCHP + polatuzumab-vedotin) (Tilly et al., 2022). Ceci montre donc la difficulté, aujourd'hui, de trouver de nouveaux traitements efficaces malgré les progrès de la médecine moderne et le développement des approches personnalisées.

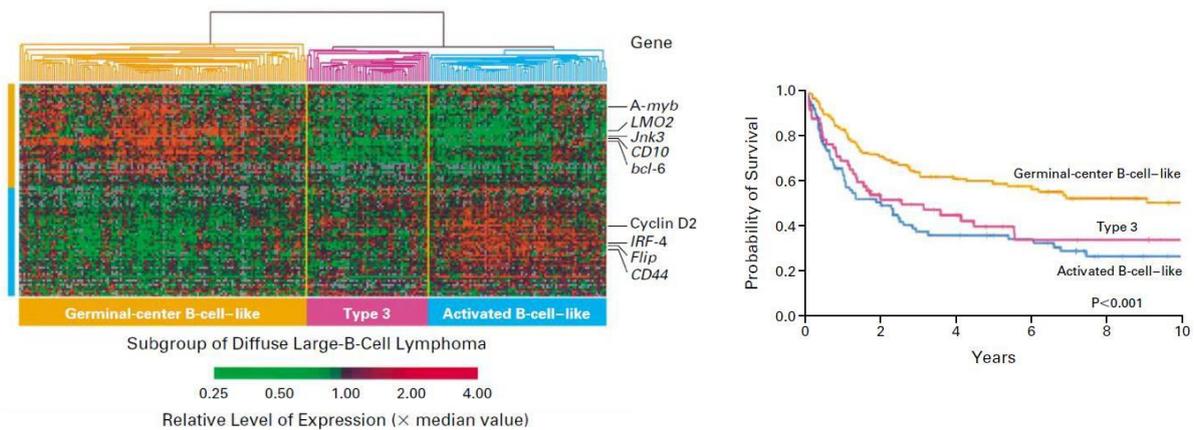
## **2. Classification des LBDGC**

Selon le consensus international de classification des tumeurs lymphoïdes matures récemment publié en 2022, les LBDGC dits NOS (Not-Otherwise Specified) correspondent à un regroupement de pathologies différentes des points de vue clinique, morphologique et génétique. En plus de ces entités, il existe des LBDGC dits de haut grade qui sont une forme particulièrement agressive ayant pour caractéristique la présence de réarrangements chromosomiques touchant les loci *c-MYC*, *BCL2* et/ou *BCL6*. Nous nous intéresserons tout particulièrement à la biologie de ces formes de LBDGC au cours de cette étude.

### **a) Les sous-types par cellule d'origine GCB et ABC**

Les LBDGC sont connus pour être des pathologies avec un fort niveau d'hétérogénéité tumorale. Pour prédire la réponse des patients atteints de LBDGC, des analyses d'expression de gènes ont été mises en place sur de larges cohortes de patients à travers le monde, afin de mieux classifier et ainsi prédire la réponse au traitement de ces derniers. Au début des années 2000, l'équipe de Louis M. Staudt a développé une puce à ADN (la « lymphochip ») contenant les séquences de gènes préférentiellement exprimés dans les cellules lymphoïdes, ainsi que des gènes connus ou bien suspectés d'avoir des rôles importants dans la régulation du système immunitaire et dans le développement de cancers. Ils ont ainsi analysé plusieurs ganglions de patients LBDGC dans le but d'identifier de nouveaux types de lymphomes B, alors non reconnus par l'ancien système de classification, et d'associer à chaque échantillon tumoral un stade physiologique de développement des lymphocytes B (cellule d'origine) en comparant avec les profils d'expression génique de cellules saines à différents niveaux de maturation. Ils ont donc pu définir deux nouveaux sous-groupes : le sous-type s'apparentant aux cellules B du CG (GCB) et le sous-type s'apparentant aux cellules B périphériques activées *in vitro* (ABC). Il est intéressant de noter que, déjà à cette époque, les auteurs de cette étude avaient relevé plusieurs limites à leur système de classification comme le fait qu'il existe une hétérogénéité au sein des deux sous-groupes, impliquant d'augmenter le nombre d'échantillons afin d'affiner la classification (Alizadeh et al., 2000). C'est d'ailleurs ce que l'équipe de Staudt a réalisé quelques années plus tard en étudiant les profils moléculaires d'un plus grand nombre de patients avec des LBDGC, afin de trouver des prédicteurs de la survie suite à un traitement par

CHOP. Cette seconde étude a démontré la robustesse de leur système d'analyse, ainsi que la possibilité de prédire la probabilité de survie en fonction de la classification dans les sous-groupes GCB, ABC ou du type 3, ce dernier regroupant les cas non-classifiés (*Figure 9*) (Rosenwald et al., 2002). Cette étude a également permis d'identifier des acteurs moléculaires jouant un rôle prépondérant dans la réponse à la chimiothérapie, comme, par exemple, les facteurs BCL2 et NF- $\kappa$ B. En 2008, la même équipe a publié une étude comparative entre des patients ayant reçu un traitement CHOP et des patients ayant reçu un traitement de R-CHOP, en essayant de trouver des signatures moléculaires pronostiques d'une réponse favorable ou non aux différents traitements.



**Figure 9.** Classification par profils d'expression de gènes de patients atteints de LBDGC et impact pronostique (Rosenwald et al. 2002)

### b) Algorithme de Hans

Malgré la puissance de screening des puces à ADN, leur utilisation et accessibilité en clinique reste extrêmement limitée. C'est pour cela que d'autres systèmes ont été mis en place et notamment en immunohistochimie (IHC) afin de discriminer les sous-types moléculaires déterminés par les puces à ADN. En 2004, une étude publiée par Christine P. Hans et collègues a démontré la robustesse du marquage en IHC de trois marqueurs (CD10, BCL6 et MUM1/IRF4) dans la discrimination des cas GCB versus non-GCB (*Figure 10*). Les cas ABC et de type 3 ayant des signatures proches d'un point de vue d'expression de gènes ont été regroupé dans la catégorie non-GCB. Les résultats ont montré une forte similarité avec les données des puces ADN, sur la survie globale entre les sous-groupes GCB et non-GCB, en confirmant que les LBDGC GCB étaient de meilleur pronostic que les LBDGC non-GCB. Cette étude a donc grandement contribué à la généralisation de l'utilisation de cet algorithme d'analyse en routine dans les hôpitaux, tout en se rapprochant, en terme de prédiction, avec les techniques d'analyses par puces à ADN (Hans et al., 2004).

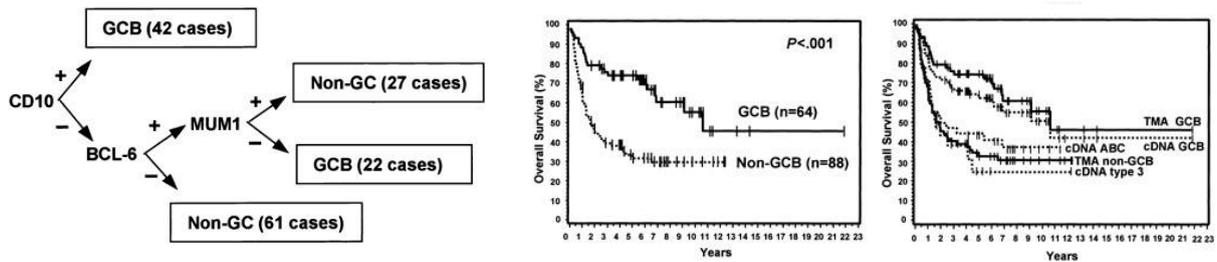
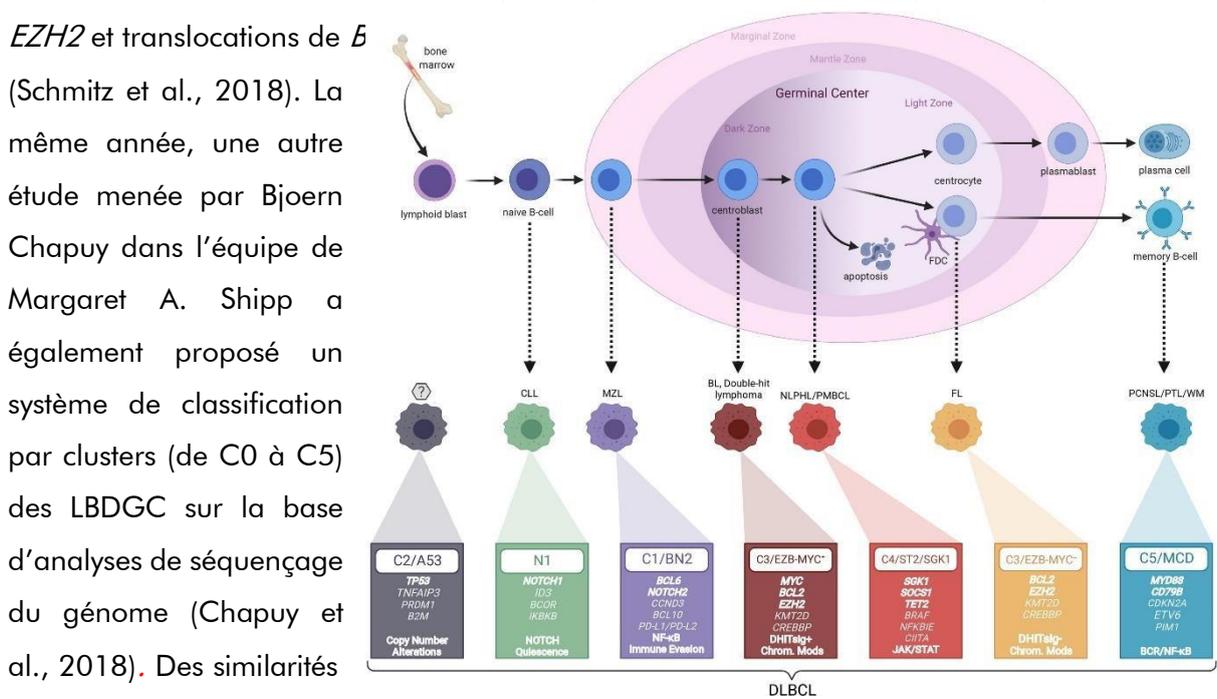


Figure 10. Algorithme de Hans basé sur l'analyse de marqueurs moléculaires en immunohistochimie (Hans et al. 2004)

### c) La classification par sous-types génétiques

Plus récemment, le développement des méthodes de séquençage à haut-débit a permis de proposer de nouvelles classifications basées sur des altérations génétiques. L'équipe de Louis M. Staudt a publié, en 2018, une étude visant à identifier des sous-types génétiques au sein d'échantillons de LBDGC sur la base de la présence de différentes anomalies génomiques, et d'évaluer si elles étaient associées à une potentielle vulnérabilité thérapeutique de ces sous-types. Plusieurs types d'anomalies, aussi bien structurales que ponctuelles, ont donc été analysées (variants du nombre de copies (CNV), translocations chromosomiques ou statut mutationnel). Les auteurs ont ainsi identifié 4 sous-types génétiques différents : MCD (co-occurrence de mutations *MYD88*<sup>L265P</sup> et *CD79B*), BN2 (fusion au niveau du locus *BCL6* et présence de mutations de *NOTCH2*), N1 (mutations de *NOTCH1*) et EZB (mutations de *EZH2* et translocations de *B*

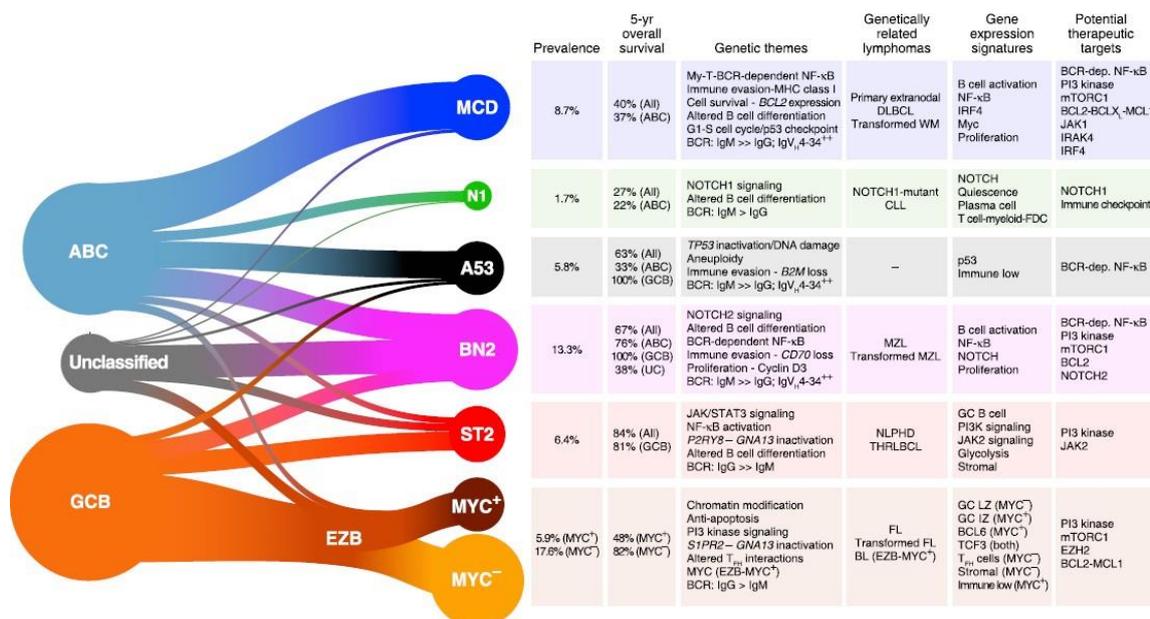


ont pu être observées dans les deux systèmes

Figure 11. Classification des LBDGC par sous-types génétiques, et correspondance avec la cellule d'origine et d'autres types d'hémopathies malignes (Morin et al. 2022)

de classification (*Figure 11*). Ces méthodes de « clustering » ont récemment été mises à jour, en 2020, suite au développement de nouveaux algorithmes de classification des sous-types génétiques, comme celui de l'étude menée par Stuart E. Lacy (Lacy et al., 2020) ou encore celui de George W. Wright avec le modèle « LymphGen ». Ce dernier outil permet de classer individuellement chaque tumeur en se basant sur la probabilité d'appartenir ou non à un sous-type génétique particulier (*Figure 12*). De façon très intéressante, les auteurs ont pu relier, en analysant plusieurs sous-types génétiques différents de LBDGC, certains de ces sous-types avec d'autres tumeurs lymphoïdes (lymphomes du système nerveux central, lymphomes primaires cutanés ou encore d'autres types de lymphomes non-Hodgkiniens). En plus de ces analyses algorithmiques, les auteurs ont pu effectuer des criblages fonctionnels par perte de fonction, avec la méthodologie CRISPR-Cas9, de plusieurs acteurs clés de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dépendante de l'activation du BCR ou d'autres régulateurs (comme BCL2 ou le complexe PRC2) définissant l'identité des différents sous-types génétiques. Ces criblages ont donc permis d'identifier de potentiels facteurs et voies de signalisation à cibler en fonction du sous-type génétique (*Figure 12*). Il est à noter que ce nouvel algorithme a, quant à lui, pu différencier 7 sous-types génétiques différents (Wright et al., 2020). Ceci nous laisse à penser que ces classifications vont encore évoluer et seront affinées grâce à l'essor de nouvelles techniques d'analyse des variants structuraux et d'analyses mathématiques de plus en plus performantes.

Ces classifications ouvrent donc la voie à de potentielles thérapies ciblées contre des protéines impliquées dans des processus divers comme la survie (exemple de BCL2), la prolifération (exemple de PI3K) ou encore la régulation épigénétique (exemple de EZH2) des LBDGC.



*Figure 12. Classification des LBDGC par sous-types génétiques selon l'algorithme « LymphGen » (Wright et al. 2020)*

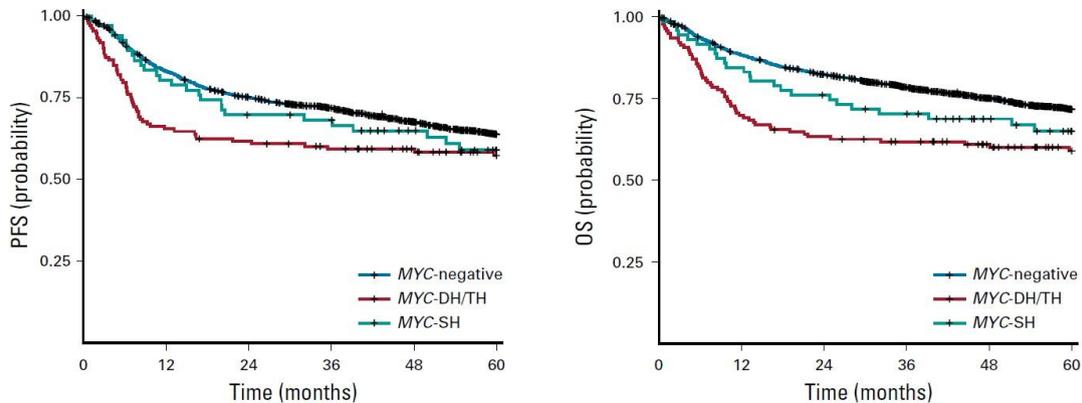
#### d) LBDGC de haut grade avec réarrangements de *c-MYC*, *BCL2* et/ou *BCL6*

Une entité de LBDGC se caractérise par la présence de réarrangements chromosomiques caractéristiques au niveau des loci *c-MYC*, *BCL2* et/ou *BCL6*. Ces lymphomes, qualifiés de « haut grade » (HGBL) dans la classification OMS de 2008, sont également connus sous la dénomination double-hit et triple-hit (DH/TH). Ce sont des lymphomes de pronostic défavorable et considérés comme particulièrement agressifs et réfractaires au traitement. Les HGBL sont à distinguer des lymphomes dits « double-expresser » qui présentent des surexpressions des oncogènes MYC et BCL2, détectables en immunohistochimie sans forcément être associées à la présence de réarrangements chromosomiques au niveau de ces loci (Sarkozy et al., 2015). Selon le consensus international, ces entités ne sont d'ailleurs que des variants phénotypiques résultant de la dérégulation de signalisations moléculaires et ne reflètent pas de réels sous-groupes biologiques (Campo et al., 2022).

##### ➤ Réarrangements chromosomiques

Les réarrangements des loci *c-MYC*, *BCL2* et *BCL6* sont détectables par la réalisation de caryotypes, et de façon plus précise par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) à l'aide de sondes spécifiques de ces loci. On peut ainsi détecter différentes translocations impliquant le gène *c-MYC* comme les translocations t(8;14)(q24;q32), t(2;8) ou t(8;22), et des translocations de *BCL2* comme la t(14;18)(q32;q21) avec des partenaires immunoglobuline ou non-immunoglobuline. La translocation t(8;14) est un événement primaire caractéristique d'un sous-type de lymphome appelé lymphome de Burkitt. On retrouve également des translocations de cet oncogène dans différents types de lymphomes. Dans les LBDGC, plusieurs partenaires IG et non-IG sont retrouvés en association avec *c-MYC* comme les gènes *BCL11A*, *BCL6*, *PAX5* ou encore *IKAROS* (Sarkozy et al., 2015). De cette observation, une étude a été publiée, montrant que des réarrangements de *c-MYC* avec des partenaires IG étaient un indicateur de mauvais pronostic de survie après traitement par immunochimiothérapie (Copie-Bergman et al., 2015). En 2019, une autre étude menée sur des cohortes de patients présentant un LBDGC au diagnostic et traités avec du R-CHOP, s'est intéressée à corrélérer le pronostic de ces patients avec la présence ou non de réarrangements, ainsi qu'avec les partenaires de réarrangement associés à *c-MYC* détectés par FISH. Cette étude a démontré que 11% des échantillons de patients analysés présentaient des réarrangements de *c-MYC*, et que cela était associé à une survie sans progression et survie globale significativement plus courtes (*Figure 13*). De plus, la présence concomitante de réarrangements de *BCL2* et/ou de *BCL6* avec la présence de partenaires IG était en lien avec un pronostic plus défavorable (Rosenwald et al., 2019). Les translocations de *BCL2* sont, quant à elles, principalement observées dans les lymphomes

folliculaires, comme la t(14;18)(q32;q21) qui met à proximité de *BCL2* une portion du locus des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGH).



**Figure 13.** Impact pronostic des réarrangements de *c-MYC* dans les LBDGC. DH/TH = Double-Hit/Triple-Hit, SH = Simple-Hit (Rosenwald et al. 2019)

La dérégulation de ces trois loci va avoir pour effets majeurs un échappement à l'apoptose et une prolifération accrue, donnant un avantage sélectif considérable aux cellules B présentant ce type de réarrangements. La plupart de ces événements de translocations mettent en jeu les régions régulatrices des IG. De ce fait, il est supposé que ces remaniements proviennent d'une dérégulation des mécanismes de recombinaison V(D)J, de mutations hypersomatiques (SHM) ou de commutation de classes (CSR). Il est, de plus, intéressant de noter que des analyses faites à la fin des années 90, dans certains clones B murins et humains, montrent la présence de translocations *IGH-MYC* ou *IGH-BCL2* dans des cellules non malignes (Küppers & Dalla-Favera, 2001). Cela supporte l'hypothèse selon laquelle les translocations chromosomiques seules ne suffisent pas à causer un développement tumoral.

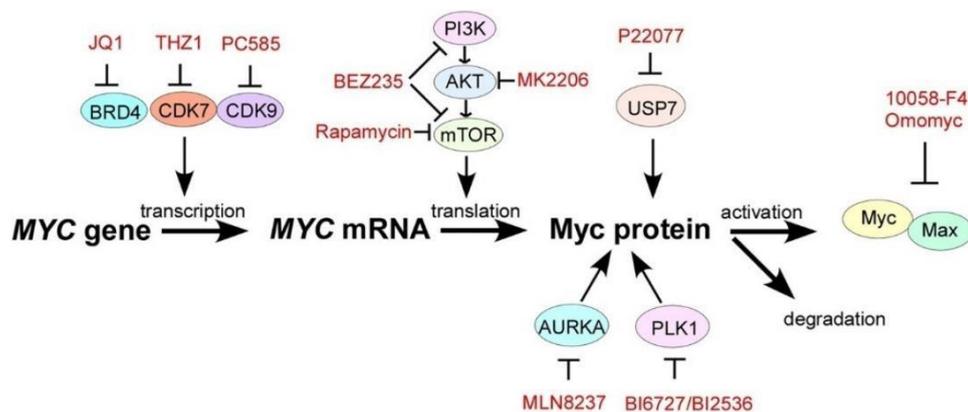
➤ Ciblage thérapeutique de *c-MYC*, *BCL2* et *BCL6*

Depuis plusieurs années, plusieurs schémas thérapeutiques ont été utilisés pour le traitement des LBDGC DH/TH. En effet, comme décrit plus haut, le R-CHOP ne donne pas de bons résultats dans différentes séries de patients DH/TH. Les effets d'autres thérapies plus intensives, comme le DA-EPOCH-R, ont ainsi été évalués et montrent un bénéfice comparativement au R-CHOP (Dunleavy et al., 2018). En plus des différentes études menées sur des schémas thérapeutiques d'intensification et de consolidation, la recherche s'est également orientée vers des traitements plus ciblés. Étant donné l'implication et l'importance des gènes *c-MYC*, *BCL2* et *BCL6* dans les LBDGC DH/TH, et plus généralement dans la lymphomagenèse, de nombreux travaux se sont intéressés au ciblage direct ou indirect de ces gènes.

BCL2 est un membre clé de la famille du même nom, regroupant un ensemble de protéines anti- et pro-apoptotiques. C'est un régulateur majeur dans le contrôle de la balance entre survie et mort cellulaire programmée qui permet l'inhibition de la mort par apoptose. Ce facteur est souvent retrouvé surexprimé dans le cas d'hémopathies malignes comme les lymphomes ainsi que certaines leucémies. C'est d'ailleurs dans le contexte de leucémies lymphoïdes chroniques réfractaires qu'a, en premier lieu, été testé l'inhibiteur de BCL2 appelé venetoclax (ou ABT-199), développé par le laboratoire Abbvie (Aj et al., 2013). Fortes des résultats obtenus, plusieurs études se sont donc intéressées à tester ce composé en clinique dans les LBDGC, en combinaison avec du R/G-CHOP, comme l'étude CAVALLI (Morschhauser et al., 2021; Zelenetz et al., 2019). Des essais ont également été réalisés sur des modèles de xénogreffes murines de LBDGC DH (*c-MYC/BCL2*) et ont pu montrer l'effet synergique de l'inhibition pharmacologique de BCL2 et d'un membre de la même famille MCL1 (L. Li et al., 2015). En effet, il a été démontré, dans différentes études dans d'autres sous-types de lymphomes, que des résistances au venetoclax pouvaient survenir suite à la surexpression d'autres membres de la famille BCL2, notamment de MCL1, ainsi qu'à une reprogrammation mitochondriale (Guièze et al., 2019).

BCL6, comme vu dans un précédent chapitre, est considéré comme l'un des régulateurs clé du centre germinatif. Étant essentiel lors des processus de réarrangements, SHM et CSR, des forts niveaux de BCL6 (induits en général par amplification du locus) peuvent conduire à l'accumulation de dommages de l'ADN, favorisant le développement tumoral (Cardenas et al., 2016). Au vu de l'importance de BCL6 dans les lymphomes du centre germinatif, des recherches de composés inhibant son activité ont été menées. Ainsi, des peptides mimétiques et de petites molécules ciblant le domaine BTB d'interaction protéine-protéine de BCL6, notamment avec d'autres partenaires co-répresseurs, ont pu être développés. Deux études, publiées en 2010 et 2016 par l'équipe d'Ari Melnick, ont démontré l'efficacité des composés 79-6 et FX1 sur l'inhibition de la prolifération de lignées de LBDGC. FX1 a notamment montré des effets anti-tumoraux sur des xénogreffes de lignées de LBDGC des sous-types GCB et ABC. De façon tout à fait intéressante, cette étude a également mis en évidence que les lignées de LBDGC de sous-type ABC, exprimant BCL6 à de plus faibles niveaux que les LBDGC de sous-type GCB, semblent être dépendantes de l'activité de cette protéine (Cardenas et al., 2016; Cerchietti et al., 2010). Malgré les différents rationnels à l'utilisation d'inhibiteurs de BCL6 dans le cas de LBDGC et LBDGC DH/TH réarrangés au niveau de BCL6, d'autres études sont nécessaires afin de mieux caractériser les réponses moléculaires et ces composés.

MYC est sûrement l'un des oncogènes les mieux caractérisés et dont la régulation de l'expression est particulièrement bien décrite dans de nombreux types de pathologies, dont les lymphomes. Cependant, malgré plusieurs essais visant à développer de petites molécules ciblant directement la dimérisation de MYC avec son partenaire MAX (H. Han et al., 2019), aucune étude n'a pu réellement démontrer l'utilité et les effets de ces molécules dans des modèles pré-clinique. L'intérêt de la communauté scientifique s'est donc porté sur le ciblage des régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de *c-MYC*. Il a notamment été montré que la transcription de cet oncogène est en partie contrôlée par une famille de protéines, les BET, faisant partie de la grande famille des protéines à bromodomaines. Ces protéines possèdent des domaines hydrophobes de reconnaissance de marques d'activation de la transcription au niveau de la chromatine, et peuvent être ciblées par de petites molécules (iBET) (Delmore et al., 2011b). A noter que la description exhaustive de cette famille de protéines et de leurs inhibiteurs fera l'objet d'un chapitre dédié dans la suite de ce manuscrit. Les différentes études menées depuis plusieurs années sur ces composés, dans le contexte des LBDGC, ont permis de démontrer l'impact sur la régulation transcriptionnelle de *c-MYC* et de son réseau génique dans des cancers où ce dernier est dérégulé. L'efficacité de ces molécules a notamment été démontrée dans la médiation de la réponse anti-tumorale par l'activation de l'apoptose, la régulation de la prolifération et de la sénescence. Plusieurs autres stratégies ont été développées afin de réprimer l'activité oncogénique de MYC. On peut noter le développement d'inhibiteurs ciblant la voie PI3K/AKT/mTOR qui est essentielle dans la traduction de MYC, ou encore de molécules ciblant des protéines intervenant dans la régulation de la stabilité de MYC comme les kinases PLK1 et AURK1 (*Figure 14*) (H. Chen et al., 2018). De par son caractère oncogénique, MYC reste donc une cible de choix dans les LBDGC DH/TH. Des études ont également montré le bénéfice de la combinaison de l'inhibition de MYC par des iBET et de BCL2 par venetoclax dans des modèles cellulaires de DH/TH (Cinar et al., 2015).



*Figure 14. Ciblage thérapeutique de l'activité oncogénique de MYC dans les cancers (Chen et al. 2018)*

Cependant, ces lymphomes ne peuvent être réduits à la présence de ces réarrangements : ils restent très hétérogènes en termes d'expression génique, ce qui doit être pris en compte dans la définition de nouvelles stratégies thérapeutiques.

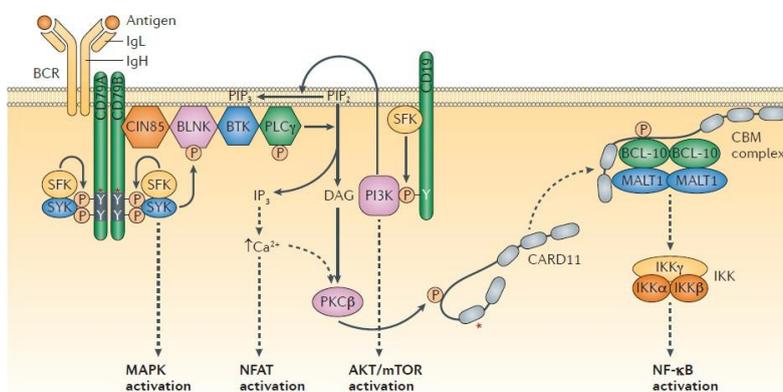
### 3. Les principales voies de signalisation dérégulées dans les LBDGC

Nous avons vu, au cours des derniers chapitres, que les LBDGC sont des cancers présentant de nombreuses anomalies, comme des réarrangements chromosomiques ou encore des mutations, de protéines clés dans la régulation du développement physiologique des lymphocytes B. Nous avons également pu voir que ces entités peuvent être classifiées en fonction de caractéristiques génétiques et de profils d'expression de certains gènes. Cette partie s'appliquera donc à détailler plus précisément deux voies de signalisation dérégulées dans les LBDGC.

#### a) Dérégulation de la signalisation membranaire

Les lymphocytes B sont des cellules capables d'intégrer un grand nombre de signaux provenant de leur environnement afin d'adapter leur phénotype. Cela est notamment dû à la présence, à leur surface, d'un grand nombre de récepteurs qui vont pouvoir activer de nombreuses voies de signalisation conduisant à la survie, la prolifération ou la différenciation lymphocytaire. Parmi les nombreux récepteurs que possèdent les LB, le BCR (B-Cell Receptor) définit l'identité de ces cellules. Comme décrit au début de ce manuscrit, le BCR mature dans la moelle osseuse et les récepteurs les plus affins et spécifiques des antigènes reconnus sont sélectionnés lors de la réaction du centre germinatif.

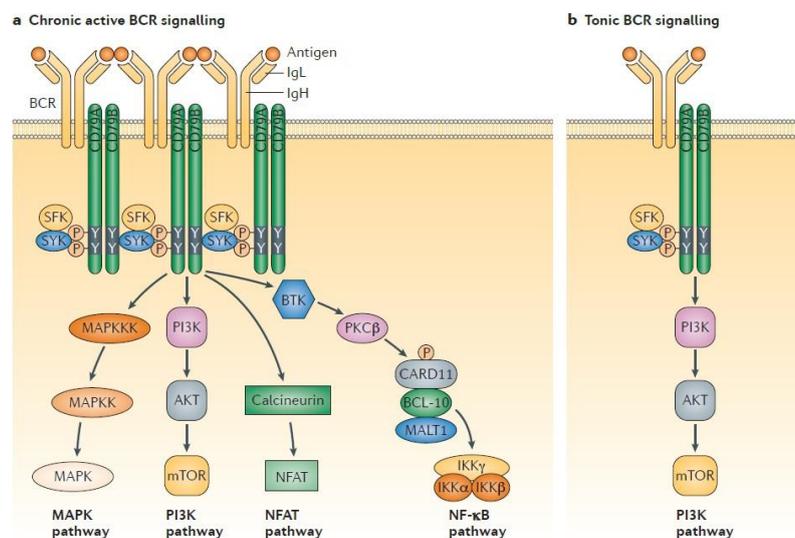
Ces récepteurs sont des immunoglobulines membranaires enchâssées dans la bicouche lipidique, composées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. En plus de ce complexe immunoglobuline, on retrouve un module de transduction du signal composé des protéines transmembranaires Igα (CD79A) et Igβ (CD79B), possédant sur leur partie intracellulaire des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) qui



**Figure 15.** Voie de signalisation du récepteur des cellules B (BCR) (Young et Staudt 2013)

seront reconnus par des protéines tyrosines kinase de la famille SRC (SFK, Src Family Kinases) comme LYN, activées par la reconnaissance antigénique au niveau de l'immunoglobuline membranaire. On peut également noter l'importance des co-récepteurs activateurs (CD19) ou répresseurs (FCγRIIB). Suite à l'activation du BCR, plusieurs cascades moléculaires vont conduire à l'activation de voies de signalisation effectrices comme les voies MAPK, PI3K/AKT, NF-κB ou de la calmoduline (CAM). L'ensemble de ces signaux permet la régulation de programmes géniques régulant la survie ou la différenciation cellulaire (*Figure 15*) (Young & Staudt, 2013).

Depuis plusieurs années, beaucoup d'études se sont intéressées à la régulation ainsi qu'au ciblage de ces voies de signalisation dans les LBDGC. Les modalités d'activation du BCR peuvent se distinguer en deux types : l'activation chronique (dépendante de la reconnaissance antigénique) et l'activation tonique (indépendante de la reconnaissance antigénique) (*Figure 16*). Les LBDGC du sous-type GCB semblent présenter une activation tonique du BCR, conduisant à l'activation de la voie de survie PI3K/AKT. Ces sous-types présentent également des mutations de régulateurs de cette voie comme le suppresseur de tumeur PTEN (Pasqualucci, 2019). Le sous-type ABC semble, quant à lui, présenter une activation chronique due à la présence de mutations gain de fonction au niveau des motifs ITAM des protéines de transduction du signal CD79A et CD79B. Ceci tend à créer des regroupements de BCR en micro-domaines membranaires par blocage de leur endocytose, ainsi qu'à perturber la rétroaction négative de la kinase LYN (Xu et al., 2005), conduisant *in fine* à l'activation de plusieurs voies comme la voie MAPK, PI3K/AKT, NFAT et NF-κB. On peut également noter la présence de certaines mutations de CARD11 dans le contexte du sous-type ABC, une protéine du complexe CBM (CARD11, BCL10, MALT1) et un acteur essentiel dans la régulation de la signalisation par NF-κB dont dépendent les lymphomes de ce sous-type.



**Figure 16.** Activation chronique et tonique du BCR dans le contexte de LBDGC ABC et GCB (Young et Staudt 2013)

MYD88 est une autre protéine adaptatrice impliquée dans la régulation de la signalisation membranaire médiée par les récepteurs de la famille TLR (Toll-Like Receptors) et de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) (J. Han, 2006). Il a été montré que les LBDGC du sous-type ABC présentent, dans 30% des cas, une mutation caractéristique touchant le résidu L265 de MYD88 et conduisant ainsi à une suractivation des voies de signalisation en aval comme les voies NF- $\kappa$ B ou JAK/STAT3 (Ngo et al., 2011). De plus, on peut noter que les signalisations du BCR et des TLR convergent vers un acteur clé qu'est la tyrosine kinase de Bruton (BTK). Ceci a conduit à de nombreuses études essayant de cibler la BTK, notamment avec de petites molécules comme l'ibrutinib, des LBDGC. Cependant, la réponse à l'ibrutinib semble être en partie conditionnée par l'état mutationnel de CD79A/B et de MYD88. En effet, la présence de mutations de MYD88 en l'absence de mutations de CD79A/B semble rendre les cellules résistantes au traitement par ibrutinib. Cette molécule paraît donc plus adaptée dans le cas de LBDGC dépendant de la signalisation par le BCR (Wilson et al., 2015).

Les lymphocytes B sont des cellules capables de migrer dans l'organisme afin d'acquérir différents phénotypes associés à des fonctions diverses. Cependant, les lymphocytes B du centre germinatif restent, quant à eux, confinés dans les organes lymphoïdes secondaires et ce via des mécanismes de reconnaissance de gradients chimiques de ligands spécifiques de récepteurs membranaires à travers le CG (*Figure 17*) (Ngo & Müschen, 2019). Parmi les nombreux régulateurs de la migration cellulaire, on peut noter l'implication de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des petites protéines G, comme les récepteurs S1PR2 ou P2RY8. Ces protéines sont impliquées dans l'activation, suite à différents stimuli, des sous-unités protéiques G $\alpha$ 13 qui sont, à leur tour, responsables de l'activation de la voie de remodelage du cytosquelette médiée par les protéines à activité GTPasique RHO. Dans le cas de LBDGC de type GCB, on peut retrouver, dans environ 30% des cas, des anomalies touchant les loci codants pour ces deux récepteurs et touchant également des gènes codants pour la sous-unité G $\alpha$ 13 et le facteur d'échange nucléotidique ARHGEF1, qui régule les protéines de la famille RHO, conduisant à des pertes de fonctions de ces loci. Une étude a notamment montré que la perte de signalisation G $\alpha$ 13 conduit à une déstructuration des centres germinatifs et à une augmentation de la dissémination dans la circulation sanguine de lymphocytes B (*Figure 17*) (Muppidi et al., 2014).

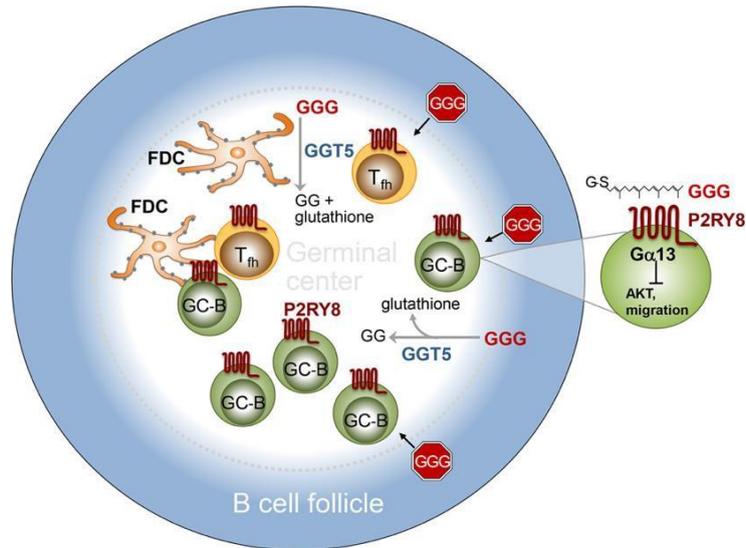


Figure 17. Régulation du positionnement cellulaire au sein du centre germinatif par le geranylgeranyl glutathione (GGG) (Ngo et al. 2019)

## b) Dérégulation de la signalisation épigénétique

Les LBDGC présentent également, dans certains cas, des mutations au niveau de gènes codant pour des régulateurs épigénétiques, ayant pour rôle le contrôle de l'expression des gènes. Ces dérégulations vont donc grandement impacter la plasticité cellulaire en modifiant la signalisation chromatinienne de façon globale et au niveau de loci critiques impliqués dans la lymphomagenèse. Le séquençage des génomes de cellules de LBDGC des dernières décennies ont montré, de façon tout à fait intéressante, la présence de mutations dans des régulateurs épigénétiques clés contrôlant la réaction du centre germinatif comme *EZH2*, *CREBBP*, *KMT2D* ou *MEF2B* (Morin et al., 2011).

### ➤ Perte de fonction de CREBBP

Parmi ces différentes altérations génétiques, on peut noter le rôle de l'inactivation de l'acétyltransférase CREBBP (et plus rarement EP300) (Pasqualucci et al., 2011). Les mutations de ce gène sont plus souvent retrouvées dans les sous-types GCB. Nous avons vu dans un précédent chapitre que CREBBP avait un rôle dans le dépôt des marques d'acétylation H3K18/27ac au niveau des régions promotrices et enhanceurs de loci transcriptionnellement actifs, mais également dans la régulation de l'état d'activité de BCL6 et de p53. Il doit être mentionné que les altérations touchant CREBBP sont le plus souvent de deux natures : 1) des mutations de troncation mono-alléliques conduisant à la perte de fonction de la protéine, 2) des mutations faux-sens avec des effets divers sur les fonctions de la protéine. Une majorité de

ces mutations sont retrouvées au niveau du domaine HAT de CREBBP et plus particulièrement au niveau de la poche de liaison au substrat (l'acétyl-CoA), conduisant directement à l'altération de son activité enzymatique. Plusieurs études se sont alors intéressées à décortiquer les mécanismes impliqués dans le développement tumoral suite à l'inactivation de CREBBP. L'une de ces études a démontré que les mutants de CREBBP conduisent, comme suspecté, à une perte d'acétylation de BCL6 et de p53 due à une inactivité enzymatique. BCL6 se retrouve alors stabilisé quand le niveau d'activation de p53 se retrouve, lui, diminué (Pasqualucci et al., 2011). Une autre étude a, quant à elle, montré l'effet suppresseur de tumeur de CREBBP en démontrant la nécessité de cette protéine dans le maintien de la balance du niveau d'acétylation (H3K27ac) au niveau d'enhancers de loci impliqués dans la différenciation terminale de la réaction du centre germinatif et dans la signalisation immunitaire (*Figure 18B*). La perte de cet équilibre conduit à la désacétylation, médiée par le complexe BCL6/SMRT/HDAC3, de ces régions enhancers, induisant ainsi un blocage de la différenciation terminale et un maintien des cellules dans un état de prolifération actif (Jiang et al., 2017). Cependant, il a été montré que la perte hétérozygote seule de CREBBP lors de l'initiation de la réaction du centre germinatif ne conduit pas au développement tumoral alors que son inactivation couplée à des dérégulations de *BCL2* entraîne une transformation maligne. CREBBP apparaît donc comme un gène suppresseur de tumeur haplo-insuffisant qui, lors de sa perte, conduit à la création d'un environnement épigénétique permissif à l'activation d'oncogènes, et donc au développement tumoral (Zhang et al., 2017).

➤ Perte de fonction de KMT2D

La lysine méthyltransférase *KMT2D* (ou *MLL2*) est, avec *CREBBP*, l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans les LBDGC (Morin et al., 2011). Les mutations non-sens de ce locus conduisent à la troncation de la protéine en amont de son domaine catalytique SET, et par conséquent à la perte de fonction de celle-ci. On retrouve également, dans certains cas, une perte d'expression protéique due à une inactivation épigénétique du locus. Comme vu dans un précédent chapitre, *KMT2D* est une méthyltransférase catalysant la mono-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, préférentiellement au niveau des régions enhancers (Zhang et al., 2015). La perte mono-allélique de *KMT2D* conduit à une forte diminution du niveau global de H3H4me1 et plus particulièrement au niveau de loci impliqués dans le maintien de la prolifération et de la survie cellulaire (signalisation via CD40R, JAK/STAT, TLR ou BCR). Les mutations de *KMT2D* ont également été associées à la perturbation de l'expression de plusieurs gènes suppresseur de tumeur comme par exemple *TNFAIP3* ou encore *ARID1A*. De plus, il a

été montré que la perte de *KMT2D* *in vivo* conduit à la persistance anormale de centres germinatifs ainsi qu'à des défauts dans les mécanismes de commutation de classe et de différenciation terminale. L'ensemble de ces résultats ont montré que la perte de *KMT2D* conduit à une expansion de centres germinatifs due à une perturbation de l'environnement épigénétique des régions régulatrices de gènes impliqués dans la prolifération et dans la différenciation terminale. De façon encore plus intéressante, le rôle suppresseur de tumeur de ce gène a été confirmé par des expériences *in vivo* montrant que l'inactivation seule de *KMT2D* pouvait conduire à un développement tumoral (Ortega-Molina et al., 2015). Au même titre que la balance entre CREBBP et BCL6/SMRT/HDAC3, il est raisonnable de penser qu'un même mécanisme existe dans le contexte de la perte de *KMT2D* (Figure 18C). Cela a notamment été confirmé dans une récente étude montrant l'intérêt de l'inhibition de la famille des lysines déméthylases KDM5, en rétablissant, par cette inhibition, la méthylation de H3K4 et restaurant ainsi l'expression des gènes réprimés lors de la perte de *KMT2D* (Heward et al., 2021).

➤ Gain de fonction de EZH2

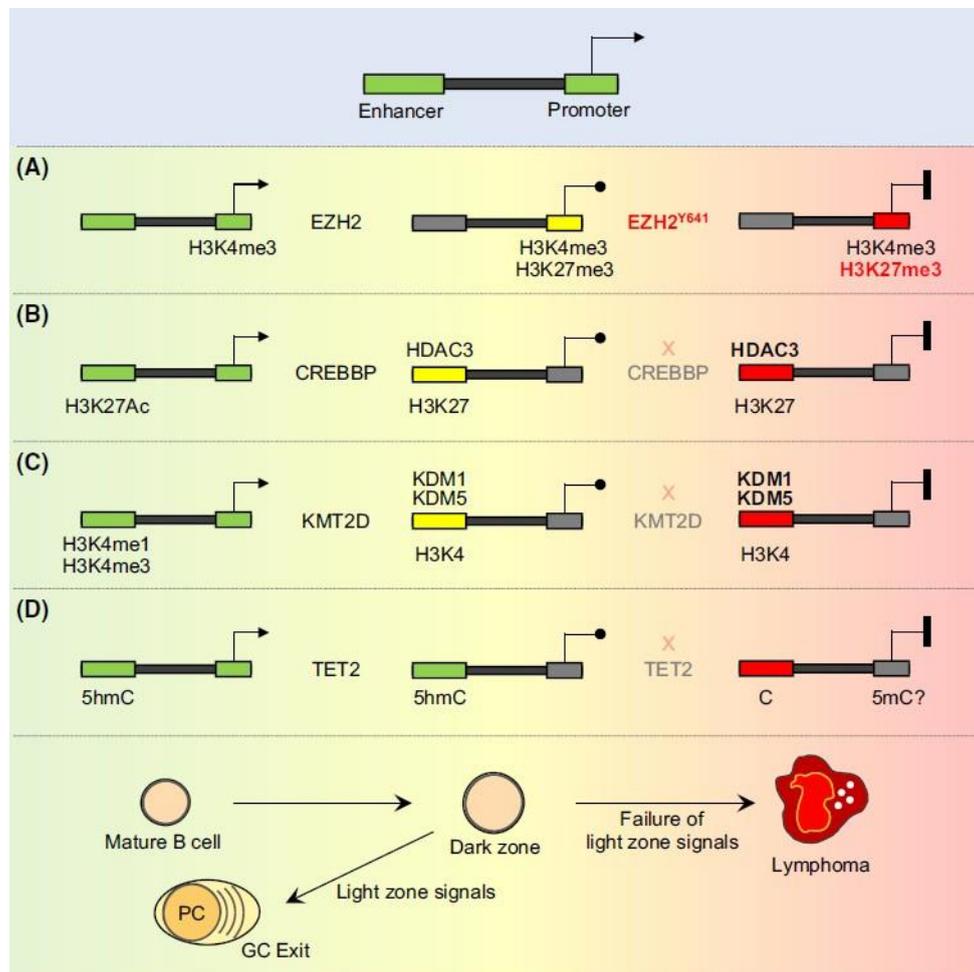
Cette sous-unité du complexe PRC2 qui catalyse la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 conduit à la formation de territoires d'hétérochromatine. PRC2 est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Il a notamment été montré que, dans la zone sombre du centre germinatif, EZH2 participe à la régulation de gènes impliqués dans le contrôle négatif du cycle cellulaire ou encore dans la sortie du centre germinatif. En déposant des marques répressives au niveau de régions riches en nucléosomes bivalents (présentant des marques activatrices H3K4me3 et répressives H3K27me3 au niveau des histones), EZH2 fait pencher la balance en faveur d'une inhibition du programme transcriptionnel des gènes concernés (Figure 18A). Ces mécanismes de répression sont médiés de concert avec BCL6, recruté en association avec des co-répresseurs comme BCOR. Une étude publiée en 2010 a mis en lumière la présence de mutations dans le domaine SET de EZH2 et notamment une mutation hétérozygote récurrente au niveau du résidu Y641 composant le site actif de la protéine dans le contexte de lymphomes folliculaires et de LBDGC du sous-type GCB. Les auteurs ont également montré que cette mutation impacte fortement la capacité de EZH2 à catalyser la tri-méthylation de H3K27 *in vitro* (Morin et al., 2010). Quelques mois après cette première publication, une autre étude a démontré que la copie WT de *EZH2* avait une activité supérieure pour les premières étapes de méthylation et non pour l'étape de tri-méthylation, alors qu'à l'inverse la copie *EZH2*<sup>Y641mut</sup> présentait une activité accrue pour la tri-méthylation mais n'était pas capable de catalyser les premières étapes de méthylation. Ces travaux

démontrent la coopérativité entre les deux copies de *EZH2* dans un contexte pathologique (Sneeringer et al., 2010). Suite à ces travaux ayant permis de mieux comprendre l'impact de la mutation Y641 de *EZH2* en termes biochimiques, d'autres études, menées par l'équipe d'Ari Melnick, se sont intéressées à caractériser l'impact de cette mutation sur les mécanismes de lymphomagenèse. Il a notamment été observé, grâce à des expériences d'expression conditionnelle de mutants de *EZH2* dans des souris, que ces dernières développaient des hyperplasies provenant des CG et un blocage de la différenciation terminale. De plus, il a été démontré que la présence de mutations gain de fonction d'*EZH2*, dans le contexte de lymphomes folliculaires, est responsable du développement tumoral par reprogrammation du micro-environnement du centre germinatif (Béguelin et al., 2020). De façon intéressante le groupe d'Ari Melnick a également montré l'efficacité de l'inhibition de *EZH2*, *in vitro* et *in vivo*, spécifiquement dans le contexte de LBDGC du sous-type GCB et non ABC (Béguelin et al., 2013). Récemment, un effet synergique a été montré entre le tazemetostat (inhibiteur d'*EZH2*) et le venetoclax (inhibiteur de *BCL2*) grâce à l'augmentation de l'expression de gènes pro-apoptotiques de la famille *BCL2* dans le contexte de LBDGC, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Scholze et al., 2020). L'ensemble de ces études montre l'implication d'*EZH2* dans la lymphomagenèse, ce qui a conduit à la mise en place de plusieurs essais cliniques afin d'évaluer le potentiel des inhibiteurs d'*EZH2*. On peut noter, par exemple, que des essais menés chez des patients atteints de lymphomes folliculaires ou de LBDGC réfractaires ou en rechute ont montré une efficacité du tazemetostat de façon prolongée que ce soit chez des patients présentant ou non des mutations de *EZH2* (Italiano et al., 2018; Morschhauser et al., 2020).

➤ Perte de fonction de *TET2*

En hématologie, les dérégulations de *TET2* ont tout d'abord été observées dans des pathologies myéloïdes. Cependant, plusieurs études ont également montré la présence de mutations conduisant à la perte de fonction de *TET2* dans des hémopathies lymphoïdes dont les LBDGC. Cela suggère un rôle précoce crucial de cette enzyme dans le développement hématopoïétique, ainsi que dans les hémopathies malignes (Quivoron et al., 2011). *TET2* est une méthylcytosine dioxygénase qui catalyse la transformation au niveau de l'ADN des 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC). Cette transformation chimique conduit à la levée de répression de plusieurs régions du génome, riches en cytosines et guanines, contrôlant l'expression de nombreux gènes et appelées îlots CpG (*Figure 18D*). Des études publiées au cours des cinq dernières années ont investigué l'impact de la perte de *TET2* au sein du centre germinatif et particulièrement dans le développement des LBDGC. Ces études

ont montré que la perte de *TET2* conduit au développement d'hyperplasies au sein des CG ainsi qu'à un blocage dans les mécanismes de commutation de classe et de différenciation terminale. De façon intéressante, il a été observé que les enhancers des gènes impactés par cette augmentation de 5mC étaient également contrôlés par CREBBP. De plus, les mutations de *TET2* et *CREBBP* se sont révélées mutuellement exclusives, suggérant ainsi une coopération entre ces deux protéines (Dominguez et al., 2018). L'hyper-méthylation induite par la perte de *TET2* conduit à l'altération de l'interaction entre plusieurs facteurs de transcription clés impliqués dans la réaction du CG comme BATF, IRF4 ou encore NF- $\kappa$ B. De plus, les auteurs de cette étude ont également montré que la perte de *TET2* impacte la déméthylation médiée par l'enzyme AID, suggérant une coopération entre ces deux partenaires (Rosikiewicz et al., 2020).



**Figure 18.** Dérégulations épigénétiques majeures retrouvées dans les LBDGC (Mlynarczyk et al. 2019)

➤ Autres dérégulations notables

On retrouve, dans plusieurs cas de LBDGC, des mutations du gène *MEF2B* qui code pour un activateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de divers gènes (Potthoff & Olson, 2007). Il a été montré, dans différentes études, que des mutations de ce gène pouvaient conduire à une dérégulation directe de l'expression de *BCL6* (Ying et al., 2013). *MEF2B* a également été identifié comme un régulateur du centre germinatif et comme un acteur contribuant à la lymphomagenèse via la régulation de gènes impliqués dans la prolifération, le contrôle de l'apoptose et du cycle cellulaire, ou encore de la réplication. L'un des mécanismes identifiés du rôle du mutant principalement retrouvé dans les LBDGC, *MEF2B<sup>D83V</sup>*, est la perte d'interaction de ce mutant avec le complexe co-répresseur HUCA (HIRA/UBN1/CABIN1/ASF1 $\alpha$ ) et des protéines HDAC de classe IIa (HDAC4,5,7 et 9) (Brescia et al., 2018).

Dans les LBDGC, des mutations sont également retrouvées au niveau d'acteurs de l'organisation 3D du génome et plus spécifiquement de l'organisation de la structure de la chromatine. On peut alors retrouver des mutations dans des sous-unités du complexe SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) comme *ARID1A* ou *SMARCA4* (*BRG1*). Ce complexe a un rôle crucial dans le positionnement des nucléosomes, régulant ainsi l'accessibilité de la chromatine à divers régulateurs. Ces sous-unités ont également été montrée comme étant impliquées dans la répression du cycle cellulaire, par la répression de promoteurs contrôlés par le facteur de progression du cycle E2F, ou encore par la transactivation de p53 induisant une expression de l'inhibiteur du cycle p21 (*CDKN1A*), et ce dans plusieurs types de cancers (Lunning & Green, 2015). De récentes études ont également mis l'accent sur l'effet de mutations dans les gènes codant pour l'histone de liaison H1, impliqué dans la stabilisation des nucléosomes et dans la compaction de la chromatine. Ces études ont pu notamment montrer que des mutations de cet histone induisaient une dérégulation de la compaction de vastes territoires chromatiniens et une réorganisation drastique du génome des lymphocytes conduisant au développement tumoral (Willcockson et al., 2021; Yusufova et al., 2021).

Dans ce chapitre, nous venons de voir que les LBDGC sont des entités hétérogènes, associées à des dérégulations spécifiques dans plusieurs voies de signalisation essentielles à la survie cellulaire des LB, dont font parties les voies de régulation épigénétiques. Nous avons notamment vu l'importance et l'impact des réarrangements chromosomiques, mettant en jeu les loci *c-MYC*, *BCL2*, *BCL6* et *IG* dans les sous-types agressifs de LBDGC DH/TH. Dans le prochain chapitre, plus directement lié à mon projet de recherche, après avoir introduit la structure de la chromatine et les mécanismes de régulation épigénétique, je décrirais les perturbations d'une voie de signalisation chromatinienne particulière affectée dans le contexte des LBDGC DH/TH qui implique les protéines BET et comment des altérations peuvent être ciblées par de petites molécules thérapeutiques.

Ce nouveau chapitre s'intéressera donc dans un premier temps plus en détails à la structure de la chromatine, support dynamique essentiel à la régulation de l'expression des gènes, puis nous nous intéresserons à mettre en lien l'implication des protéines BET avec l'organisation spatiale de la chromatine, et ce dans un contexte physiologique et pathologique. Enfin nous concluons sur les inhibiteurs de la famille des protéines BET, et l'intérêt porté depuis ces dernières années à ces molécules dans les hémopathies malignes.

### III. La chromatine, les protéines BET et leur inhibition dans les LBDGC

#### 1. Structure de la chromatine

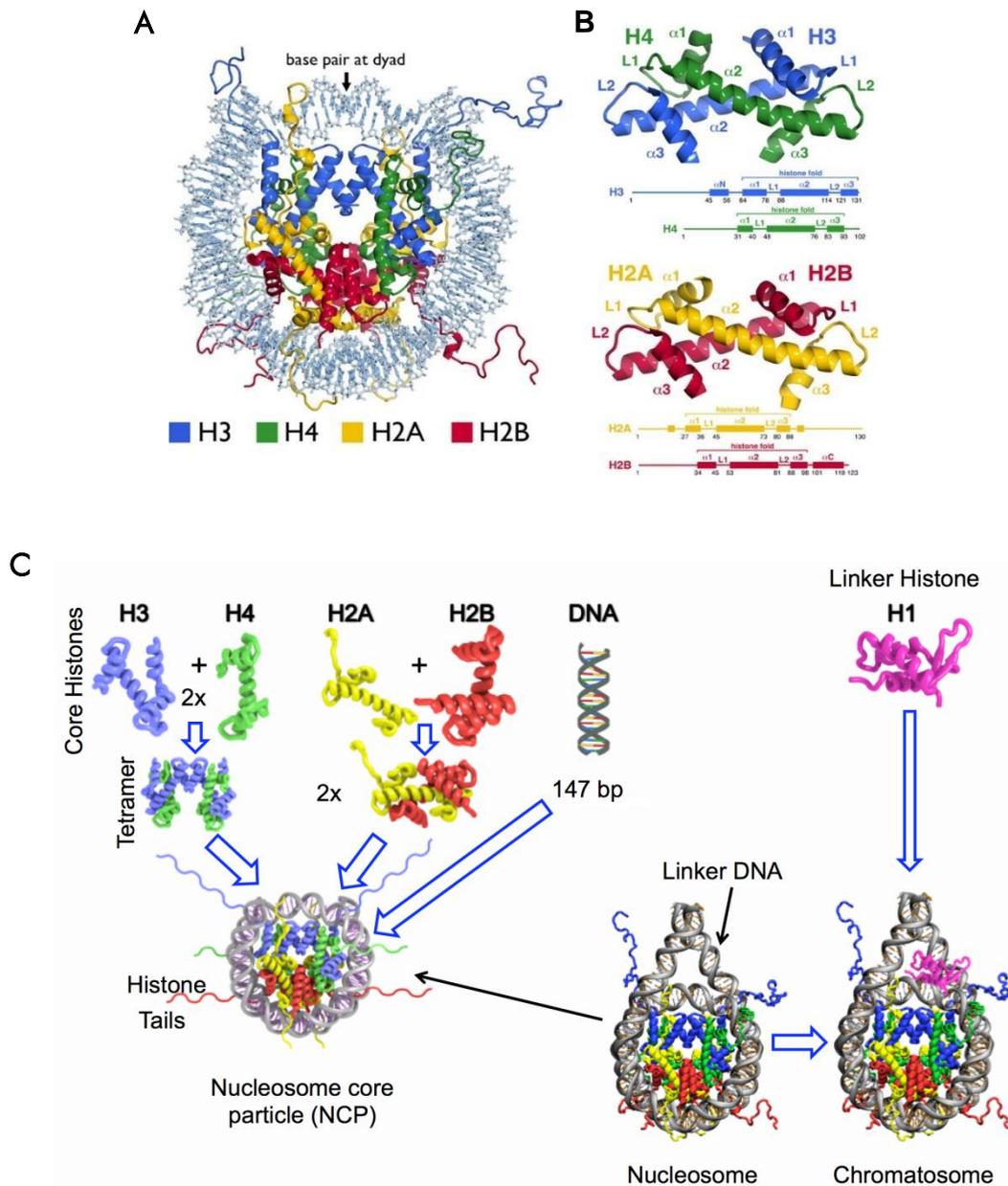
Au sein des noyaux des cellules de notre organisme se trouve le support de l'information génétique, codé par plusieurs milliards de paires de bases chimiques (les nucléotides A, T, C et G) le long d'une molécule appelée ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Cette molécule comporte l'ensemble des instructions permettant l'établissement de la totalité des types cellulaires de notre organisme. Pourtant, bien que chaque type cellulaire soit distinct, chaque cellule renferme la même information génétique. Ce paradoxe s'explique par la présence de plusieurs niveaux d'organisation de l'ADN dans le noyau, offrant ainsi un vaste répertoire d'informations supplémentaires, non-codé par notre génome et héritable au cours des divisions cellulaires, régulé par de nombreuses molécules de nature différente et ce de façon distincte dans l'ensemble de nos cellules. C'est ce que l'on appelle l'épigénome.

#### a) Le nucléosome et les variants d'histones

L'ADN est une molécule double-brin organisée en hélices chargées négativement. Cette nature biochimique lui permet d'interagir de façon forte avec de petites protéines basiques : les histones. Ces histones font partie des protéines les plus abondantes de nos cellules et possèdent une forte affinité pour l'ADN. Elles forment une vaste famille composée de nombreux membres, parmi lesquels on peut distinguer les histones dites de cœur et les histones de liaison. Les histones de cœur sont à l'origine d'une structure constituant l'unité de base de la chromatine, appelée le nucléosome (*Epigenetics*, 2015).

Ce dernier est un assemblage octamérique entre deux dimères d'histones H2A et H2B, et un tétramère d'histones H3 et H4. L'enroulement de l'ADN autour du nucléosome, sur 147 paires de bases, constitue le premier niveau d'organisation structural de la chromatine (Luger et al., 1997). Les histones sont des protéines formées de trois hélices alpha ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ ) et de deux boucles (L1 et L2) organisées entre elles pour former le domaine de repliement (« histone fold »). Ce domaine permet leur dimérisation et est nécessaire à l'assemblage du nucléosome. Elles présentent également, en leurs extrémités amino-terminales (N-Ter) et carboxy-terminales (C-Ter), des portions plus ou moins longues et flexibles émergeant de la structure du nucléosome et qui sont les sites de nombreuses modifications post-traductionnelles (*Figure 19*). Ces modifications chimiques créent un environnement électrostatique différent au sein et entre les nucléosomes adjacents, induisant ainsi une compaction ou une relaxation locale de la chromatine selon la nature chimique de la modification apposée (McGinty & Tan, 2015).

Ce sont ces modifications et leur régulation qui sont à l'origine de la plasticité chromatinienne. Il faut noter qu'en plus des histones de cœur, constituants centraux du nucléosome, les histones de liaisons assurent le maintien et la compaction de l'ADN avec les octamères d'histones, créant ainsi un nouveau niveau d'organisation par la formation de chromosomes (*Figure 19*).



**Figure 19.** Organisation structurale du nucléosome et des histones de cœurs H2A, H2B, H3 et H4, et mécanisme d'assemblage avec l'histone de liaison H1 nécessaire à la formation du chromatosome

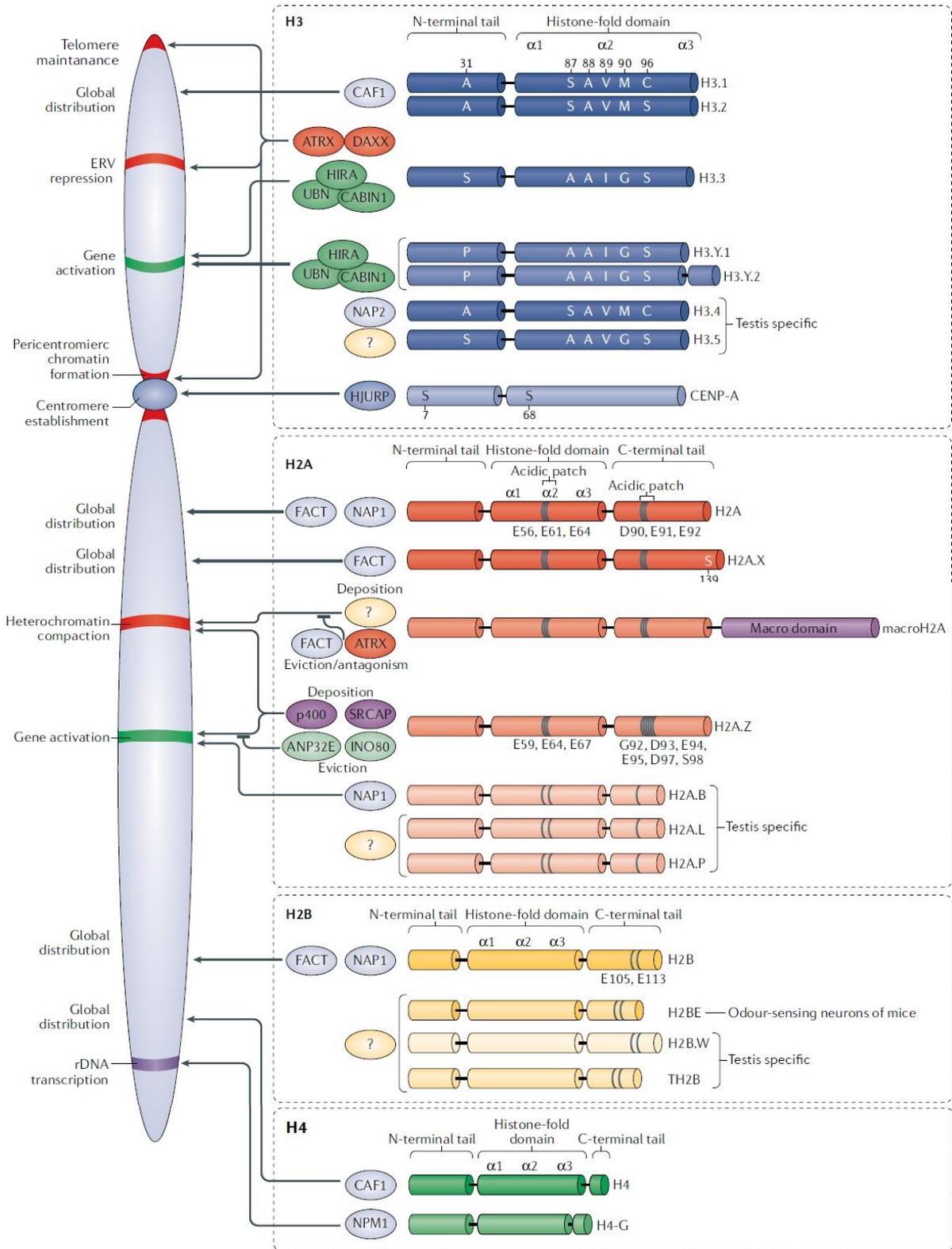
**A.** Structure cristallographique du nucléosome avec l'ADN enroulé autour des différentes histones de cœur H2A, H2B, H3 et H4 (McGinty et Tan 2015)

**B.** Organisation structurale des domaines protéiques des différentes histones de cœur (McGinty et Tan 2015)

**C.** Mécanisme général d'assemblage entre les histones de cœur et l'ADN afin de former le nucléosome. Et assemblage du nucléosome avec l'histone de liaison H1 au niveau de l'axe de dyade pour former le chromatosome (Figure adapté de Shaytan et al. 2015 par Histone DB 2.0)

L'histone de liaison H1 diffère, en termes de structure, des histones de cœur. Il présente un domaine globulaire à proximité de sa partie N-Ter et une longue partie C-Ter non repliée. Le domaine globulaire de H1 interagit avec le nucléosome au niveau de l'axe de dyade (axe de symétrie) et avec l'ADN de liaison entrant et sortant du nucléosome. H1 est impliquée dans de nombreux processus de régulation de l'organisation chromatinienne comme, par exemple, par son interaction avec plusieurs modificateurs épigénétiques comme la désacétylase SIRT1 ou encore la protéine HP1. H1, en plus de réguler et d'être régulée par des protéines associées à un environnement chromatinien répressif, peut inhiber l'association à la chromatine de facteurs activateurs de la transcription comme PCAF, MOF ou SET7/9. Cette histone a également été associée à la régulation des processus de réplication de l'ADN ainsi qu'au maintien de la stabilité génomique par la régulation de signalisation des facteurs de réparation de l'ADN (Fyodorov et al., 2018).

Tous les nucléosomes d'une cellule ne sont pas identiques le long des fibres chromatiniennes. En effet, même si une grande proportion des nucléosomes possède une structure canonique (H2A-H2B et H3-H4) il existe un grand nombre de nucléosomes constitués de variants des histones de cœur. Ces variants d'histones diffèrent des formes canoniques par leur séquence en acides aminés, mais également par leur association avec des protéines chaperonnes jouant le rôle d'architectes et qui assurent leur prise en charge et leur incorporation dans le génome, de façon hautement régulée et spécifique. Ces nucléosomes composés de variants d'histones vont alors délimiter des territoires chromosomiques particuliers (Martire & Banaszynski, 2020) (*Figure 20*). On peut noter, par exemple, que les nucléosomes composés du variant d'histone de la famille H3 CENP-A définissent les régions centromériques des chromosomes. Ce variant est exprimé pendant les phases G2/M du cycle cellulaire et incorporé à la chromatine, en association avec H4, par la chaperonne HJURP durant la fin de la télophase de la mitose et le début de la phase G1 (Mendiratta et al., 2018). On voit donc, avec cet exemple, que la dynamique d'incorporation des variants d'histones au sein de la chromatine de façon précise dans le temps et l'espace constitue un mécanisme essentiel à la plasticité du génome et à son expression. Il faut également préciser que plusieurs de ces variants sont exprimés de façon tissu-spécifique. En effet, si la majorité des variants sont retrouvés dans les cellules somatiques, certains d'entre eux comme les variants H2A.B et H2A.L1/2, faisant partie de la famille H2A, sont présents dans le tissu germinatif mâle (Chadwick & Willard, 2001; Govin et al., 2007). De plus, il reste un ensemble de nouveaux variants et de nouvelles chaperonnes d'histones à découvrir. L'expression différentielle en fonction du type cellulaire ajoute, ainsi, un niveau supplémentaire de régulation de l'épigénome.



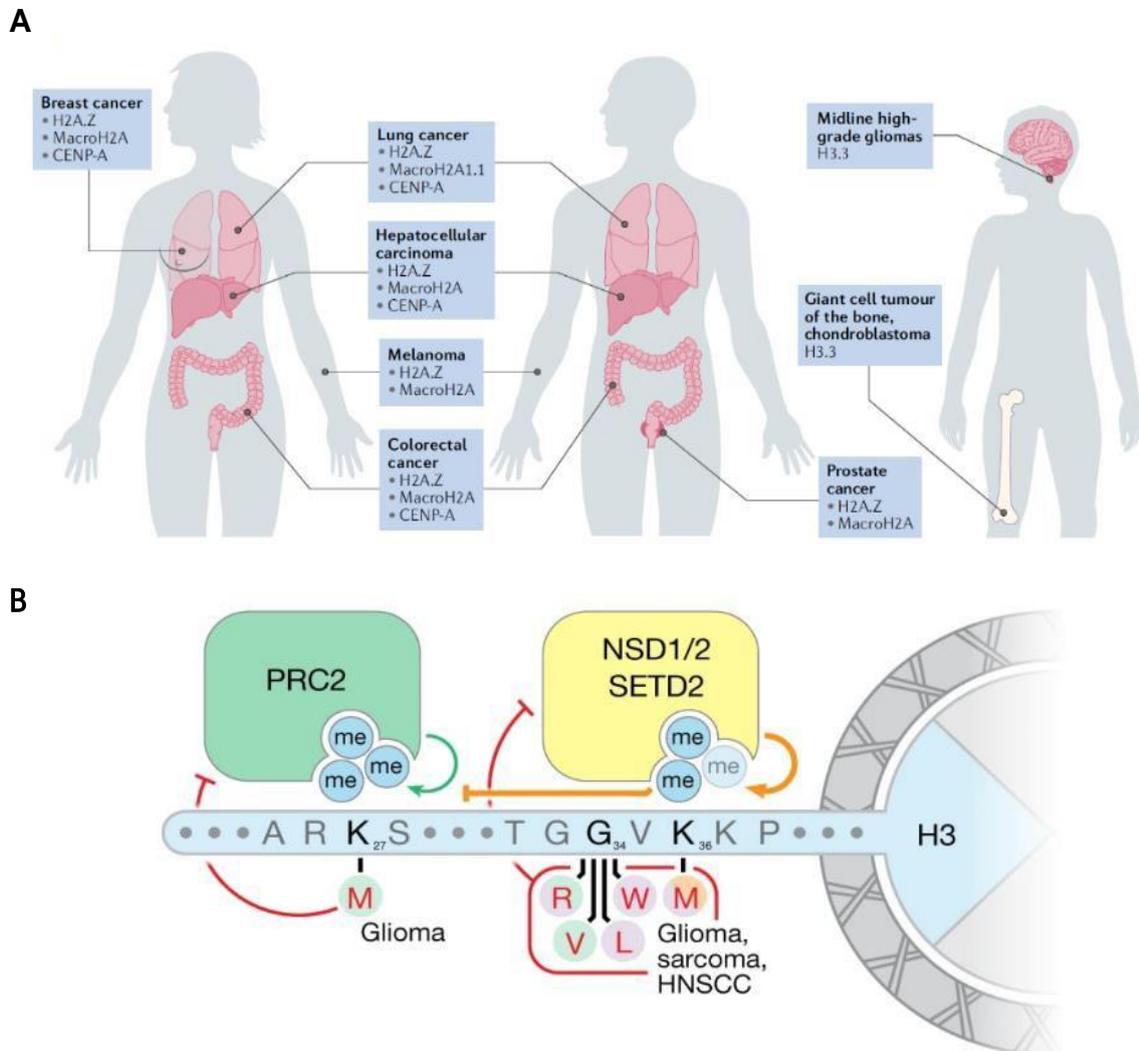
**Figure 20.** Distribution chromosomique des histones de cœur, de leurs variants et association avec les protéines chaperonnes et de remodelage de la chromatine (Martire et Banaszynski 2020)

## b) Les oncohistones : le cas des mutations de H3.3 dans les tumeurs cérébrales

Nous venons de voir l'importance des variants d'histone ainsi que celle de la régulation de leur incorporation par les protéines chaperonnes dans la dynamique chromatinienne. Plusieurs études ont montré la présence de mutations impactant différents variants d'histones et des chaperonnes dans le contexte de plusieurs cancers (*Figure 21A*). L'étude des mécanismes dérégulés dans ces pathologies a conduit à une meilleure compréhension de la biologie des histones (Ghiraldini et al., 2021). Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux mutations impactant le variant d'histone H3.3.

Récemment, le dépistage d'une large cohorte de gliomes (tumeurs cérébrales) de divers grades et histologies, a permis d'identifier des mutations somatiques récurrentes de gènes codant des histones dans les glioblastomes de l'enfant et du jeune adulte (Schwartzentruber et al., 2012). Depuis, des mutations spécifiques des gènes codant pour le variant d'histone H3.3 (*H3F3A* et *H3F3B*) ont été identifiées dans différents types de cancers chez l'Homme. Par exemple, des mutations de *H3F3B* ont été détectées dans des cas de chondroblastomes (tumeurs osseuses) et de carcinomes squameux de la tête et du cou (substitution K36M). Pour *H3F3A*, des mutations ont été détectées dans des cas de tumeurs osseuses à cellules géantes (GCTB, substitution G34W/L), de gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG, substitution K27M) et de glioblastomes pédiatriques et de l'adulte (GBM, K27M et G34R/V) (Kallappagoudar et al., 2015; Papillon-Cavanagh et al., 2017). Les mécanismes moléculaires dans le cas des mutations K36M et K27M ont été très largement étudiés et décrits dans la littérature. En effet, les résidus K27 et K36 sont situés dans la partie N-terminale du variant H3.3 et sont des sites spécifiques ciblés par des méthyltransférases comme les sous-unités EZH1/2 du complexe PRC2, induisant la méthylation de la lysine 27, et SETD2, induisant la méthylation de la lysine 36 (*Figure 21B*) (Nacev et al., 2019). Concernant la mutation G34R de l'histone H3.3, il a été démontré que l'interaction des déméthylases de la famille KDM4 avec l'histone H3.3<sup>G34R</sup> induit une inhibition de leur activité enzymatique, conduisant à des perturbations de la déméthylation des marques H3K9me3 et H3K36me3 (Voon et al., 2018). En plus des dérégulations impactant directement H3.3, des mutations sont retrouvées dans le contexte de plusieurs gliomes et touchent ATRX, l'une des chaperonnes ayant pour rôle l'incorporation de H3.3 à la chromatine télomérique et péri-centromérique. Ces mutations conduisent à une maintenance des télomères par mécanisme d'ALT (Alternative Lengthening of Telomeres), ainsi qu'à une perturbation de la réparation des dommages à l'ADN (Koschmann et al., 2016).

La découverte de l'ensemble de ces mutations touchant les histones et leurs chaperonnes ont permis de mieux comprendre leur implication dans la biologie des cancers, avec l'idée de développer des solutions thérapeutiques dans ces différents contextes.



**Figure 21.** *Oncohistones dans le développement tumoral*

**A.** *Altération de variants d'histones dans le contexte de tumeurs solides (Ghiraldini et al. 2021)*

**B.** *Mécanismes impliqués dans le développement tumoral par des mutations touchant le variant H3.3 (Nacev et al. 2019)*

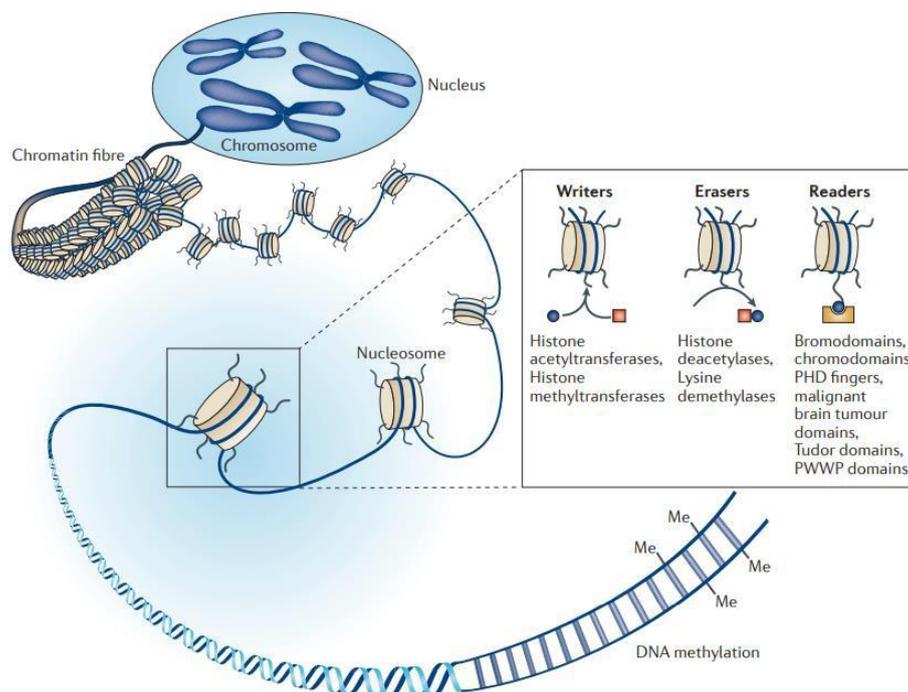
## 2. Dynamique de la chromatine

Si l'ADN joue le rôle de support de l'information génétique alors la chromatine quant à elle joue le rôle de support de l'information épigénétique. L'épigénome apparaît alors comme le chef d'un orchestre symphonique constitués de plusieurs régulateurs lisant chacun la même partition mais ne s'exprimant pas de la même façon et au même moment donnant ainsi à chacune de nos cellules une identité qui lui est propre. À l'inverse de la séquence d'ADN, qui reste globalement stable dans le temps et au cours des divisions, la chromatine est quant à elle une structure mobile, dynamique et qui évolue au fur et à mesure des divisions cellulaires. Dans cette partie nous allons nous intéresser aux mécanismes régulant la dynamique chromatinienne et nous mettrons l'emphase sur une étape essentielle dans l'expression de nos gènes qu'est la transcription. Nous verrons également que la chromatine est en fait une structure 3D correspondant à l'association de plusieurs compartiments interagissant entre eux dans le noyau et pouvant conduire dans le cas de dérégulations à des remaniements drastiques de l'organisation globale de notre génome impactant l'expression de nombreux gènes.

### a) Les modifications post-traductionnelles des histones

Parmi les différentes modifications que peut subir la chromatine, les modifications post-traductionnelles des histones eux-mêmes correspondent à des mécanismes essentiels à la délimitation d'éléments fonctionnels de notre génome. Il est communément admis que la chromatine existe dans nos cellules sous deux formes l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine correspond à une forme relâchée et présentant des marques épigénétiques activatrices de la transcription. L'hétérochromatine quant à elle correspond à une forme compacte et présentant des marques épigénétiques répressive de la transcription. Il est cependant important de noter que cette vision binaire de la chromatine est un peu simplifiée. Nous verrons en effet que la chromatine existe sous beaucoup plus de formes qui sont structurées au sein de différents compartiments. Depuis plusieurs années de nombreuses études ont tenté de mieux comprendre la dynamique de ces compartiments nucléaires et ont pu mettre en évidence une large diversité de formes que pouvait prendre la chromatine en se basant sur son état de compaction, sa densité en nucléosomes, sur les marques présentes au niveau des histones et également sur la présence de différents acteurs de la régulation épigénétique. Par exemple les régions de chromatine péricentrique denses en nucléosomes présentant les marques de triméthylation au niveau de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) et associés aux facteurs de la famille HP1 (HP1 $\alpha$  et  $\beta$ ) et les lysines méthyltransférases SETDB1 et Suv39H1/2, correspondent à des zones d'hétérochromatine dites « constitutives » responsables de la répression de l'expression des gènes présents dans ces régions (Loyola et al., 2009).

Un large répertoire de modifications post-traductionnelles de nature chimique différentes sont retrouvés à travers la chromatine. Ces modifications sont finement modulées par un ensemble de régulateurs protéiques. Ces protéines régulatrices font partis de trois grandes classes : les éditrices (« writers »), les lectrices (« readers ») et les effaceuses (« erasers »). Les protéines éditrices vont avoir pour principal rôle d'apposer les modifications post-traductionnelles au niveau des histones alors que les effaceuses auront quant à elles le rôle de les enlever. Les protéines lectrices ont pour rôle de reconnaître et de se lier aux différentes marques épigénétiques. La capacité de l'ensemble de ces familles de protéines à modifier le paysage épigénétique réside dans la présence de domaines protéiques particuliers avec des affinités pour différents substrats (Arrowsmith et al., 2012) (Figure 22).

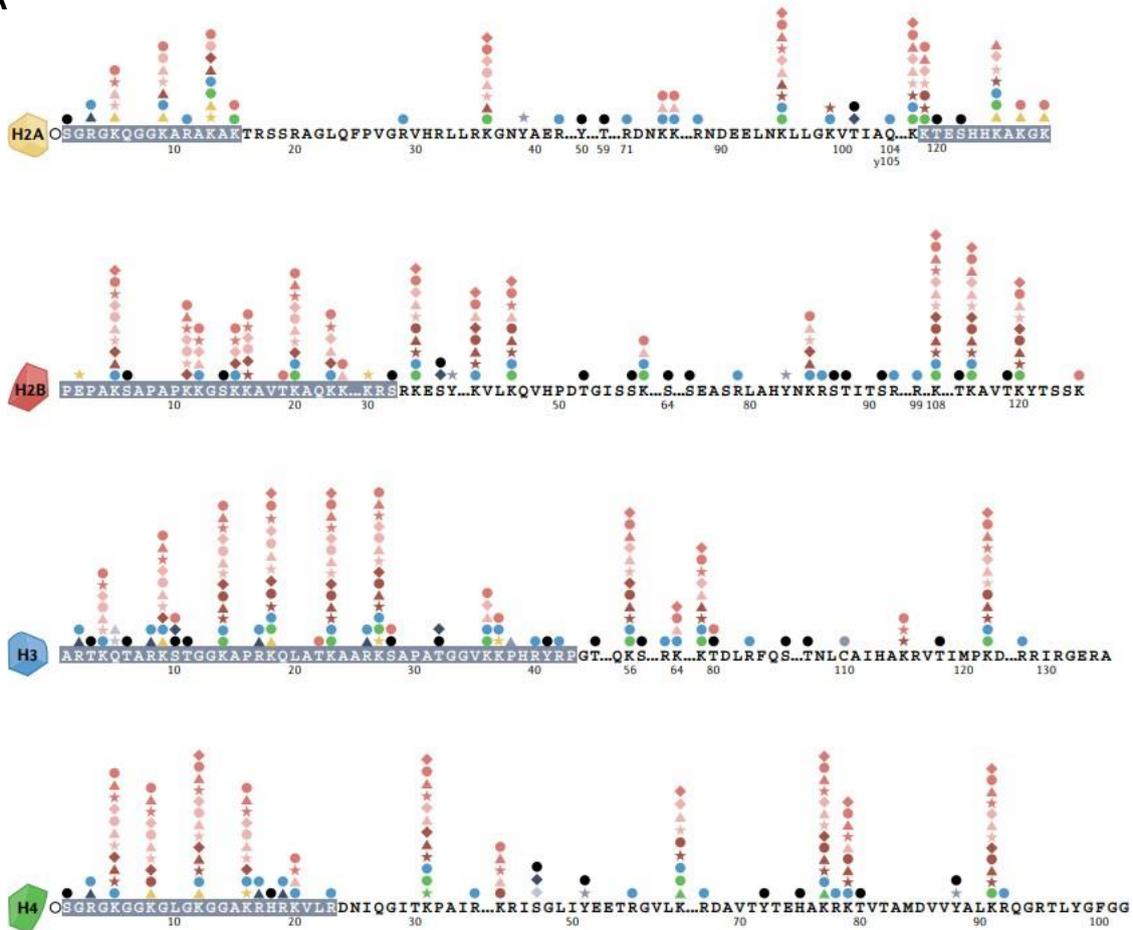


**Figure 22.** Dynamique du paysage épigénétique par modifications post-traductionnelles au niveau des histones par les protéines éditrices, effaceuses et lectrices (Arrowsmith et al. 2012)

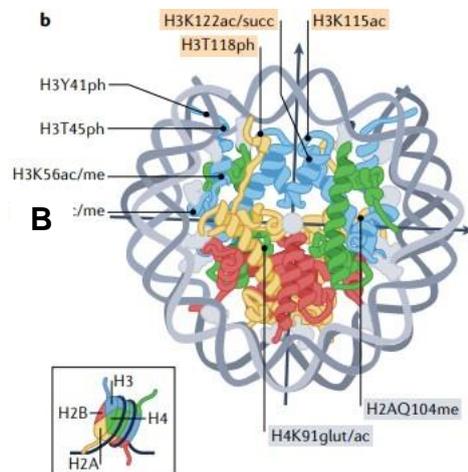
Il existe ainsi un large panel de modifications chimiques telles que la méthylation, l'acétylation ou encore la phosphorylation. Ces modifications covalentes sont principalement retrouvées au niveau des résidus de lysine (K), présents au niveau des queues d'histones et parfois au niveau du domaine de repliement (Millán-Zambrano et al., 2022) (Figure 23). Chacune de ces modifications joue un rôle précis dans la signalisation chromatiniennne, comme vu précédemment grâce à l'exemple de la triméthylation de la lysine en position 9 de la queue de l'histone H3. Nous ne détaillerons pas ici l'impact de l'ensemble de ces marques, mais nous concentrerons plus particulièrement sur l'acétylation des lysines et son rôle dans la régulation

de la transcription. Nous verrons également que, depuis la découverte de mutations touchant des protéines régulant les modifications post-traductionnelles au niveau des histones (comme CREBBP et EZH2 dans les LBDGC), et particulièrement dans le contexte du cancer, de nombreuses études se sont penchées sur la résolution des structures des domaines de ces protéines afin de développer des stratégies thérapeutiques inhibitrices. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la famille BET, regroupant des protéines lectrices de l'acétylation des lysines.

A



Lysine PTMs (and other aa as indicated)		
<b>Acylations</b>		
◆ Formylation (K)	◆ Crotonylation (K)	◆ Lactylation (K)
● Acetylation (K, S, T)	● Benzoylation (K)	● Malonylation (K)
▲ Propionylation (K)	▲ 2-Hydroxyisobutyrylation (K)	▲ Succinylation (K)
★ Butyrylation (K)	★ Hydroxybutyrylation (K)	★ Glutarylation (K)
<b>Ubiquitin-like</b>		
● Ubiquitylation (K)		
▲ Sumoylation (K)		
★ Ufmylation (K)		
<b>Others</b>		
● Methylation (K, R)		
▲ Biotinylation (K)		
★ ADP ribosylation (K, E)		
<b>Non-lysine PTMs</b>		
▲ Serotonylation (Q)	● S-palmitoylation (C)	◆ O-GlcNAcylation (S, T)
★ Dopaminylation (Q)	▲ Isomerization (P)	▲ Deimination (R)
◆ O-palmitoylation (S)	★ Hydroxylation (Y)	
● Phosphorylation (S, T, Y, H)	○ N-terminal acetylation (S)	
Amino acids in histone tails		



**Figure 23.** Diversité et nature des modifications post-traductionnelles au niveau des histones de cœur H2A, H2B, H3 et H4 (Millán-Zambrano et al. 2022)

**A.** Localisation des principales modifications post-traductionnelles retrouvées au niveau des histones de cœur

**B.** Positionnement schématique de modifications post-traductionnelles localisées au niveau du cœur du nucléosome

## b) Rôle de l'acétylation des histones dans la régulation du processus de transcription

Depuis la découverte par Vincent Allfrey, en 1964, que les queues d'histones peuvent être modifiées chimiquement et que cela impacte l'état d'activité des cellules, de nombreuses études se sont portées vers la compréhension des mécanismes biologiques impactés par des modifications telles que l'acétylation des histones. Dans cette étude de 1964, Allfrey et collègues ont démontré que l'acétylation des histones conduisait à l'altération de l'interaction ADN-histones, influençant ainsi le niveau de transcription (Allfrey et al., 1964). Les enzymes régulant l'acétylation et la désacétylation des lysines des histones sont respectivement appelées les HAT (Histone Acetyl-Transferase) et les HDAC (Histone DeAcetylase). Parmi les enzymes modifiant les histones, elles sont les premières à avoir été découvertes.

### ➤ Les Histones Acétyl-Transférases (HAT)

Ces enzymes sont classifiées en plusieurs groupes et sous-groupes selon leur homologie de structure. Les HAT sont ainsi classées en fonction de leur localisation subcellulaire, au sein de deux groupes (HAT-A et HAT-B) ayant des séquences assez divergentes. Les HAT-B ont une localisation cytoplasmique et acétylent les histones libres. Les HAT-A sont regroupées en trois groupes (GNAT, MYST et p300/CBP) et ont, elles, une localisation nucléaire. Les HAT-A présentent de fortes divergences de séquences et des motifs plus ou moins conservés. On pense donc que ces différentes enzymes doivent, malgré leur fonction commune de transformation de l'acétyl-Coenzyme A (ac-CoA) en groupement acétyle ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) et en Coenzyme A, avoir des rôles dans des processus biologiques différents (Bannister & Kouzarides, 2011; Hodawadekar & Marmorstein, 2007). L'acétylation des protéines est un processus dépendant de l'état métabolique des cellules. En effet, l'ac-CoA est un substrat provenant de processus métaboliques comme la décarboxylation oxydative du pyruvate, le catabolisme d'acides aminés ou encore la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Le niveau d'acétylation des protéines est donc intimement lié à la disponibilité de l'ac-CoA et de la régulation de son réservoir. Les HATs sont donc à même de lier l'ac-CoA libre et catalyser le transfert du groupement acétyle, principalement sur les chaînes latérales chargées positivement des lysines (*Figure 24*). L'addition du groupement acétyle va neutraliser la charge des lysines et par conséquent perturber les interactions électrostatiques avec d'autres macromolécules. Il a également été démontré que certaines marques d'acétylation, comme la marque H4K16ac, venait perturber l'interaction entre nucléosomes adjacents, conduisant ainsi à une répulsion électrostatique. Ce mécanisme est dû au fait que la chaîne latérale de la lysine 16 de l'histone H4 interagit avec une surface acide formée au niveau de l'histone H2A du nucléosome adjacent

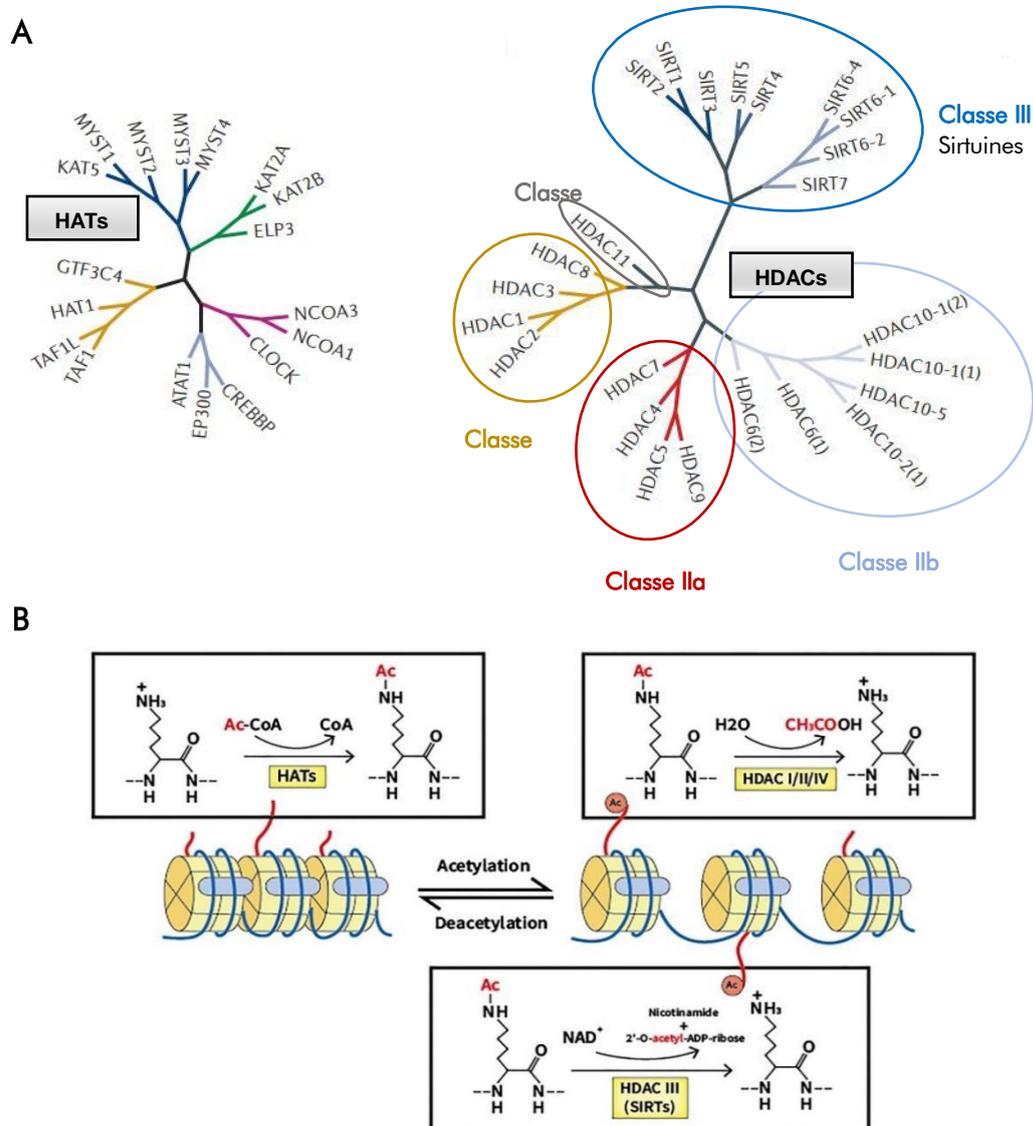
(Kalashnikova et al., 2013). Cependant, cette observation ne se retrouve pas forcément être vraie pour l'acétylation d'autres lysines d'autres histones. Cela suggère donc que l'acétylation des lysines ne conduit pas automatiquement à une décompaction chromatinienne, mais que ce mécanisme de décompaction par acétylation repose plutôt sur des lysines spécifiques de certains histones.

➤ Les Histones Désacétylases (HDAC)

Les HDACs constituent la famille d'enzymes dont les effets sont antagonistes aux HATs. Ces HDACs catalysent donc la désacétylation des lysines de diverses protéines. Elles sont divisées en deux familles, les désacétylases d'histones et les régulateurs homologues à l'enzyme HDAC de la levure Sir2, et regroupées en quatre classes distinctes de I à IV. Les classes I, II et IV font partie des désacétylases d'histones et la classe III regroupe les HDACs de la famille des Sirtuines. La différence entre ces deux familles réside dans leur mode de désacétylation des lysines. En effet, les HDACs de la famille des histones désacétylases possèdent un domaine désacétylase et un domaine « arginase-like amidino hydrolases » dépendant d'ions métalliques pour enlever, par hydrolyse, les groupements acétyles. Les HDACs de la famille des Sirtuines possèdent, elles, une activité désacétylase dépendante du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) (*Figure 24*) (*Epigenetics*, 2015). Ces protéines sont régulées par plusieurs processus et notamment par leur complexation avec d'autres protéines. En effet, la création de complexes multiprotéiques, utilisant les activités de chacune des sous-unités, permet d'influer sur de nombreux paramètres cellulaires comme l'état de compaction de la chromatine. Les HDAC1 et HDAC2, par exemple, sont des protéines inactives, ou ne démontrant qu'une très faible activité, si elles ne sont pas associées au sein de complexes multiprotéiques. Ainsi, on retrouve ces protéines préférentiellement associées aux complexes Sin3, NuRD ou encore CoREST (Ayer, 1999). Les HDACs sont également régulées par des modifications post-traductionnelles, impactant fortement leur niveau d'activité. Par exemple, la phosphorylation, par la Caséine Kinase 2 (CK2), de la HDAC1 sur ses résidus S421 et S423, conduit à son activation (Pflum et al., 2001). Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, l'acétylation des histones par les HATs est un moyen pour la cellule de réguler le niveau de transcription en induisant une décompaction des nucléosomes. Les HDACs effectuent donc le processus inverse en rendant leurs charges positives aux lysines des queues d'histones, augmentant ainsi l'interaction ADN-histones et, par conséquent, le niveau de compaction de la chromatine. La désacétylation de lysines particulières par des HDACs spécifiques peut donc créer des sites d'interaction particuliers au niveau de la chromatine, induisant ainsi le recrutement de facteurs essentiels à

la régulation positive ou négative des gènes (*Epigenetics*, 2015). L'ensemble des mécanismes d'action de ces enzymes demande cependant à être mieux caractérisé.

Il est également important de noter que depuis plusieurs années, de nombreux composés sont développés dans l'optique d'inhiber l'action des HATs et des HDACs pour moduler le niveau d'acétylation des histones et d'autres protéines. Plusieurs de ces composés sont aujourd'hui en phase d'essais clinique dans le contexte de certains cancers. Le Vorinostat (SAHA) est le premier inhibiteur d'HDAC (HDACi) à avoir été approuvé par la FDA, en 2006, pour le traitement de lymphomes T cutanés. L'hyperacétylation de la chromatine et d'autres protéines, engendrée par l'utilisation de HDACi, permet l'expression d'acteurs majeurs de l'apoptose dans les cellules tumorales, déstabilisant ainsi leur homéostasie (Bolden et al., 2006).



**Figure 24.** Régulation de l'acétylation des protéines par les HATs et les HDACs

**A.** Arbres phylogénétiques des HATs (à gauche) et des HDACs (à droite) (Arrowsmith et al. 2012)

**B.** Mécanisme d'action des HATs et des HDACs dans la régulation de l'acétylation des histones (Ding et al. 2022)

➤ Acétylation des histones et recrutement de régulateurs de la transcription

Il existe, chez l'Homme, plusieurs familles de protéines pouvant reconnaître et lier les lysines acétylées. Ces protéines sont composées de modules spécifiques comme les domaines YEATS (Yaf9, ENL, AF9, Taf14 et Sas15), Double PHD (Double Plant HomeoDomain), Double PH (Double Pleckstrin Homology domain) et BRD (Bromodomain) (Shvedunova & Akhtar, 2022). Parmi ces différents domaines, les bromodomaines sont des modules protéiques spécialisés dans la reconnaissance des lysines acétylées. Ce domaine a été découvert en 1999 par Dhalluin et collègues au sein de l'histone acétyltransférase PCAF. Ce domaine est constitué de quatre hélices ( $\alpha Z$ ,  $\alpha A$ ,  $\alpha B$  et  $\alpha C$ ) et de deux boucles reliant les hélices  $\alpha Z$  et  $\alpha A$  (ZA), et  $\alpha B$  et  $\alpha C$  (BC), le tout formant une poche hydrophobe responsable de la reconnaissance des lysines acétylées (Dhalluin et al., 1999) (*Figure 25*). Deux résidus de tyrosine, situés respectivement sur la boucle ZA et sur la partie carboxy-terminale de l'hélice  $\alpha B$ , sont conservés au sein des bromodomaines de différentes protéines. Chez l'Homme, les protéines possédant des bromodomaines sont divisées en 8 familles différentes (*Figure 25*). Ces protéines sont ensuite classifiées selon leurs fonctions biologiques. On retrouve ainsi des protéines à activité méthyltransférase comme MLL, des protéines faisant partie de complexes de remodelage de la chromatine comme SMARCA4, ou encore des coactivateurs transcriptionnels comme les BET, auxquels nous consacrerons une prochaine partie (Zaware & Zhou, 2019). Nous ne détaillerons pas ici toutes les fonctions que jouent ces protéines à bromodomaines dans la modulation de la dynamique chromatinienne. Afin d'illustrer l'interconnexion entre acétylation de la chromatine et régulation de la transcription, nous nous attarderons néanmoins sur l'exemple de la sous-unité TAF1 du complexe d'initiation de la transcription TFIID.

La transcription des gènes est un processus finement régulé et orchestré au sein de nos cellules, nécessitant le recrutement séquentiel, au niveau de la région promotrice des gènes actifs, de plusieurs régulateurs spécifiques. Au sein du génome, la transcription est initiée au niveau de sites accessibles à la machinerie transcriptionnelle qui sont déplétés en nucléosomes. Ces régions euchromatiniennes présentent de l'ADN libre pouvant être reconnu par des facteurs de transcription spécifiques, et des nucléosomes ornés de diverses marques dont des marques activatrices. La protéine TAF1 est la plus grande sous-unité du complexe TFIID qui est composé de la protéine TBP (TATA-box Binding Protein) et de plusieurs sous-unités TAF (TBP Associated Factors). Ce complexe va pouvoir reconnaître des motifs spécifiques au niveau de l'ADN et de la chromatine, au niveau de sites d'initiation de la transcription, et recruter de façon séquentielle les complexes TFIIA, TFIIIB, l'ARN polymérase II, TFIIH et TFIIIE. Au niveau de la chromatine, il a été montré que la sous-unité TAF1 pouvait reconnaître, grâce à ses deux bromodomaines, des



### c) Organisation spatiale de la chromatine

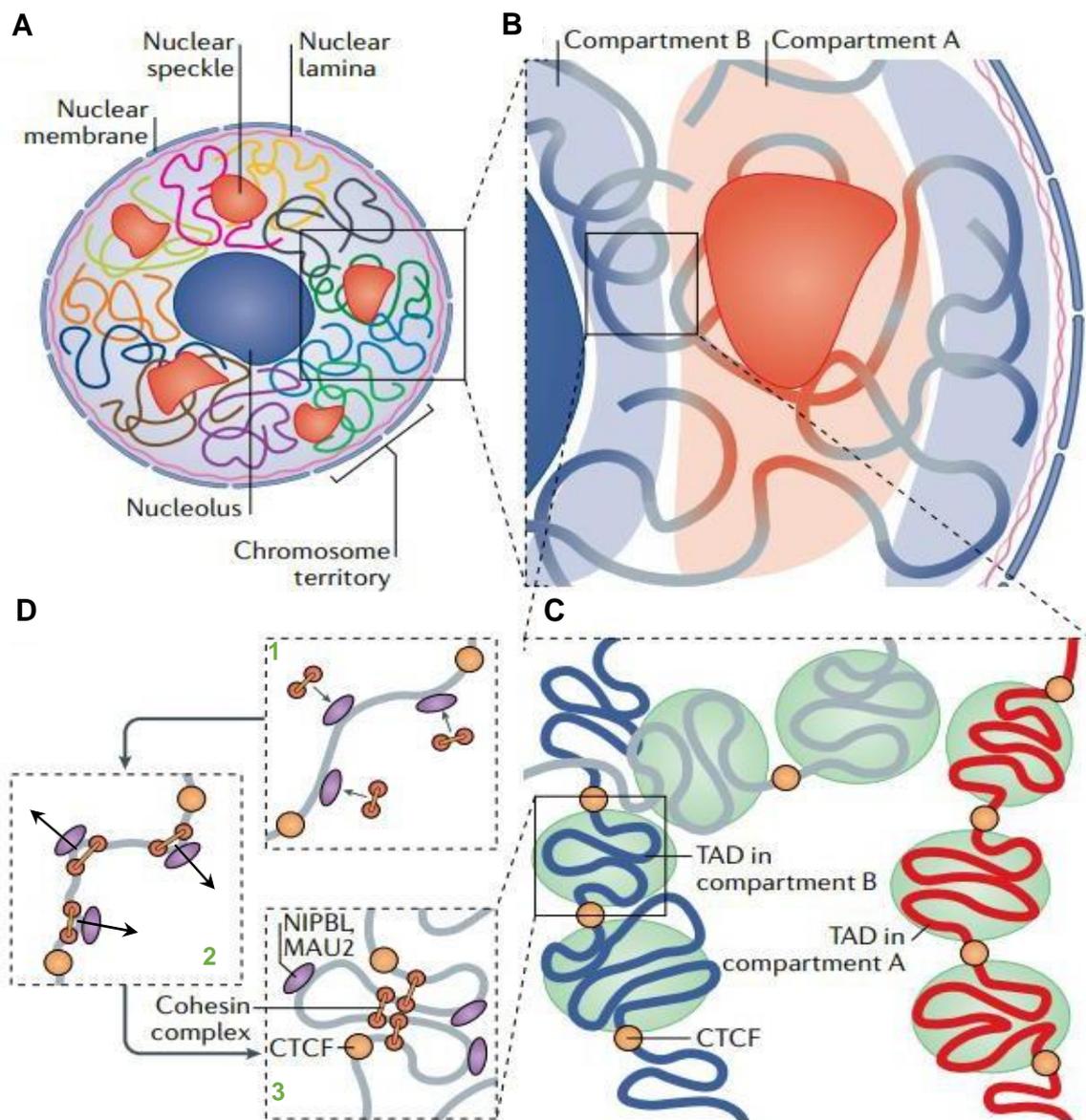
Dans la partie précédente, nous avons pu voir que la structure de la chromatine, de même que les protéines qui interagissent avec elle et régulent sa plasticité, sont des éléments majeurs de la régulation du génome. Au cours du développement des lymphocytes B, de nombreux processus biologiques se mettent en place au sein du noyau, et ce d'une façon contrôlée dans le temps et dans l'espace comme c'est le cas de la recombinaison V(D)J des loci des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines. La régulation de l'organisation spatiale de la chromatine tout au long de la vie du lymphocyte est donc un mécanisme primordial, contrôlé par de nombreux acteurs chromatiniens aux fonctions diverses. Nous verrons, dans cette partie, les différents niveaux d'organisation 3D de la chromatine dans le noyau ainsi que le rôle de ces différents compartiments dans la régulation du développement des lymphocytes B. Nous verrons également que des dysfonctionnements de l'organisation de la chromatine peuvent conduire à la dérégulation de gènes impliqués dans la lymphomagenèse.

#### ➤ Les différents niveaux d'organisation spatiale de la chromatine

Nous savons maintenant depuis plusieurs années, grâce à de nombreuses études menées sur la structure du génome ainsi qu'au développement de techniques de pointe en imagerie et en biologie moléculaire, que des gènes, ou des éléments de régulation distants de plusieurs kilo- voire mégabases le long de l'ADN, peuvent être mis à proximité par des changements de conformation de la chromatine. Ces changements de conformation sont responsables de l'activation ou la répression de différents loci, ainsi que de processus tels que la ségrégation des chromosomes lors de la mitose et de la méiose (Bonev & Cavalli, 2016). Nous avons précédemment vu que l'enroulement de l'ADN autour des histones, formant ainsi les nucléosomes, constitue le premier niveau d'organisation de la fibre de chromatine grâce à un enchaînement de ces unités de base. Différentes fibres de chromatine peuvent interagir entre elles, et certaines de ces fibres forment des contacts locaux appelés les domaines topologiquement associés (TAD). Ces nanodomains chromatiniens sont bornés par la présence de protéines spécifiques comme les facteurs CTCF et les cohésines. Ces protéines, en association avec d'autres partenaires, vont, en plus de délimiter les TADs, permettre la création de boucles de chromatine par mécanisme d'extrusion, créant ainsi des contacts au sein même des TADs. Ces domaines vont donc pouvoir regrouper un ensemble de plusieurs gènes et éléments de régulation. C'est ainsi que des régions dites « enhancer » se retrouvent à proximité de promoteurs de gènes participant à la nucléation de facteurs de transcription, recrutant à leur tour d'autres facteurs participant à la stabilisation et l'activation de la machinerie de transcription (Zheng & Xie, 2019).

Cependant, tous les TADs ne sont pas actifs d'un point de vue transcriptionnel, et certains se créent afin de réprimer l'expression de gènes. Nous pouvons ainsi distinguer, au sein du noyau, deux compartiments majeurs reflétant l'activité transcriptionnelle de différentes régions de la chromatine. Le compartiment A, localisé plus au cœur du noyau et à proximité de structures appelées les taches nucléaires (« nuclear speckles »), correspond au compartiment actif. Le compartiment B, localisé plus en périphérie du noyau, au niveau des couches de lamines et du/des nucléole(s), correspond, lui, au compartiment inactif. Certaines études montrent également la présence de compartiments intermédiaires (I) de transition (riches en marques H3K27me3 et en complexes PRC2) entre les compartiments A et B, traduisant des changements globaux de l'organisation de la chromatine qui conduisent eux-mêmes à des modifications majeures d'expression de gènes (Vilarrasa-Blasi et al., 2021 ; Zheng & Xie, 2019).

Enfin, on retrouve un dernier niveau d'organisation de la chromatine qui correspond aux territoires chromosomiques. Dans les cellules interphasiques, les chromosomes possèdent tous des positions nucléaires définies (Zheng & Xie, 2019). Les différents chromosomes du noyau sont donc capables de former des contacts intra- et interchromosomiques. Ainsi, le noyau est un organite présentant un très haut niveau d'organisation, de compaction, et est lui-même composé de sous-compartiments non délimités physiquement par des membranes. Ces compartiments sont dynamiques et organisés entre eux et peuvent créer des interactions. Depuis plusieurs années, le terme de séparation de phase sert à décrire ces différents compartiments composés de nombreuses macromolécules diverses.



**Figure 26.** Organisation 3D de la chromatine au sein du noyau (Modifié de Zheng et Xie 2019)

**A.** Répartition des territoires chromosomiques à l'intérieur du noyau en interphase (les chromosomes sont représentés par différentes couleurs)

**B.** Interaction des régions transcriptionnellement actives entre elles formant le compartiment A et des régions transcriptionnellement inactives entre elles formant le compartiment B

**C.** Formation de domaines de contact appelés TADs et délimités les uns des autres par la présence des facteurs CTCF (CCCTC-binding Factor)

**D.** Mécanisme d'extrusion de boucles de chromatine par le recrutement des complexes de cohésines par NIPBL et MAU2 (1), extrusions des boucles (2) et reconnaissance de motifs CCCTC orientés bloqués par CTCF

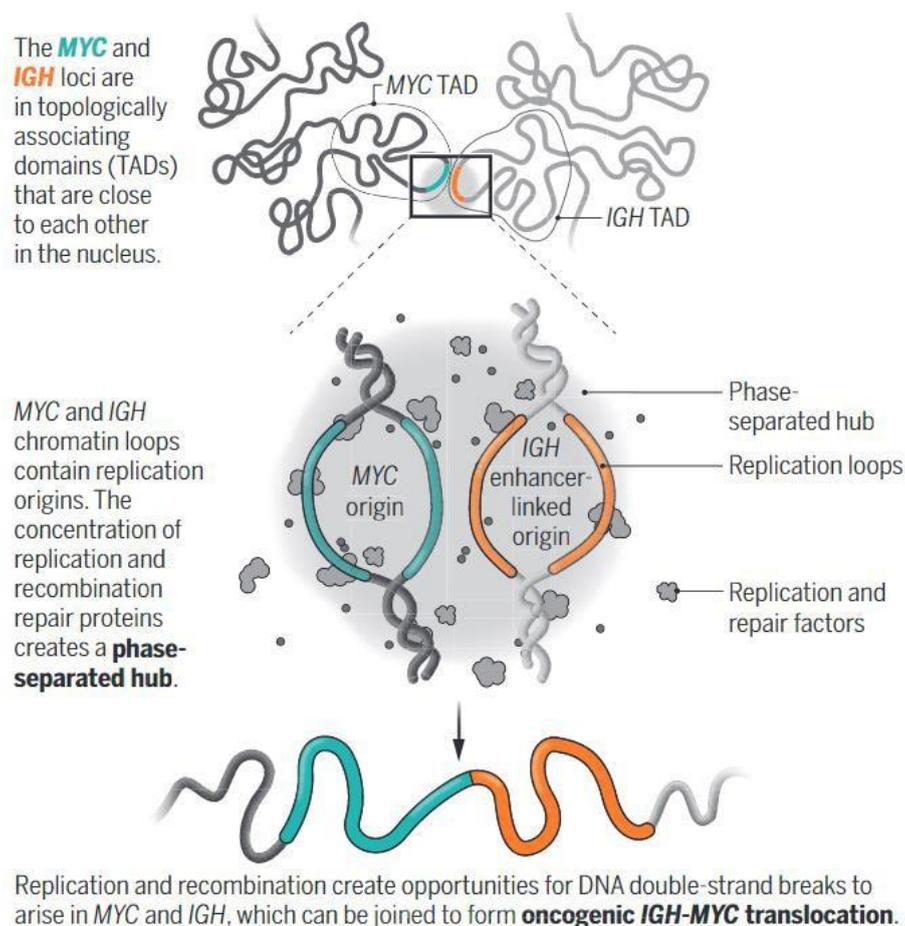
➤ Super-enhancers et réarrangement *IGH-MYC*

Nous nous intéresserons, dans cette partie, au mécanisme de réorganisation de la chromatine lors des réarrangements des loci des IG impliquant des régions appelées Super-Enhancers (SE). Nous verrons que l'organisation 3D de la chromatine dans l'espace et dans le temps peut donner lieu à des remaniements drastiques pouvant conduire au développement de lymphomes.

Les loci des IG sont présents au sein de différents territoires chromosomiques dans le noyau. Chez l'Homme, le locus des chaînes légères  $\lambda$  se situe sur le chromosome 22, le locus des chaînes légères  $\kappa$  se situe sur le chromosome 2, et le locus des chaînes lourdes H se situe sur le chromosome 14. Ces loci vont subir, pendant la phase de maturation du BCR (voir *Figure 7*), des réarrangements des segments V, (D) et J permettant la formation d'un répertoire de BCR qui seront ensuite testés pour leur spécificité de reconnaissance avec les antigènes (Murphy & Weaver, 2017). Les segments V, (D) et J sont présents sur plusieurs mégabases le long des loci des IG. La réorganisation 3D de la chromatine dans ces régions, lors de ces événements de réarrangement, est donc essentielle afin de pouvoir mettre à proximité les différents segments entre eux, alors physiquement séparés de plusieurs mégabases (van Schoonhoven et al., 2020). Une étude publiée en 2016 a pu caractériser la structure topologique du locus *Igh* chez la souris et a démontré que ce dernier était constitué de plusieurs sous-domaines chromatiniens organisés en TADs. L'étude a également pu montrer que c'est par la coordination de l'ensemble de ces domaines médiée par PAX5 que la contraction du locus, nécessaire pour l'assemblage des IG, a lieu (Montefiori et al., 2016). De plus, des analyses de FISH et marquage par immunofluorescence ont montré que durant la transition entre la phase de précurseur lymphoïde commun (CLP) et de cellule pro-B, le locus des IGH passe d'un compartiment B inactif en périphérie du noyau, vers un compartiment A actif au centre du noyau (Kosak et al., 2002).

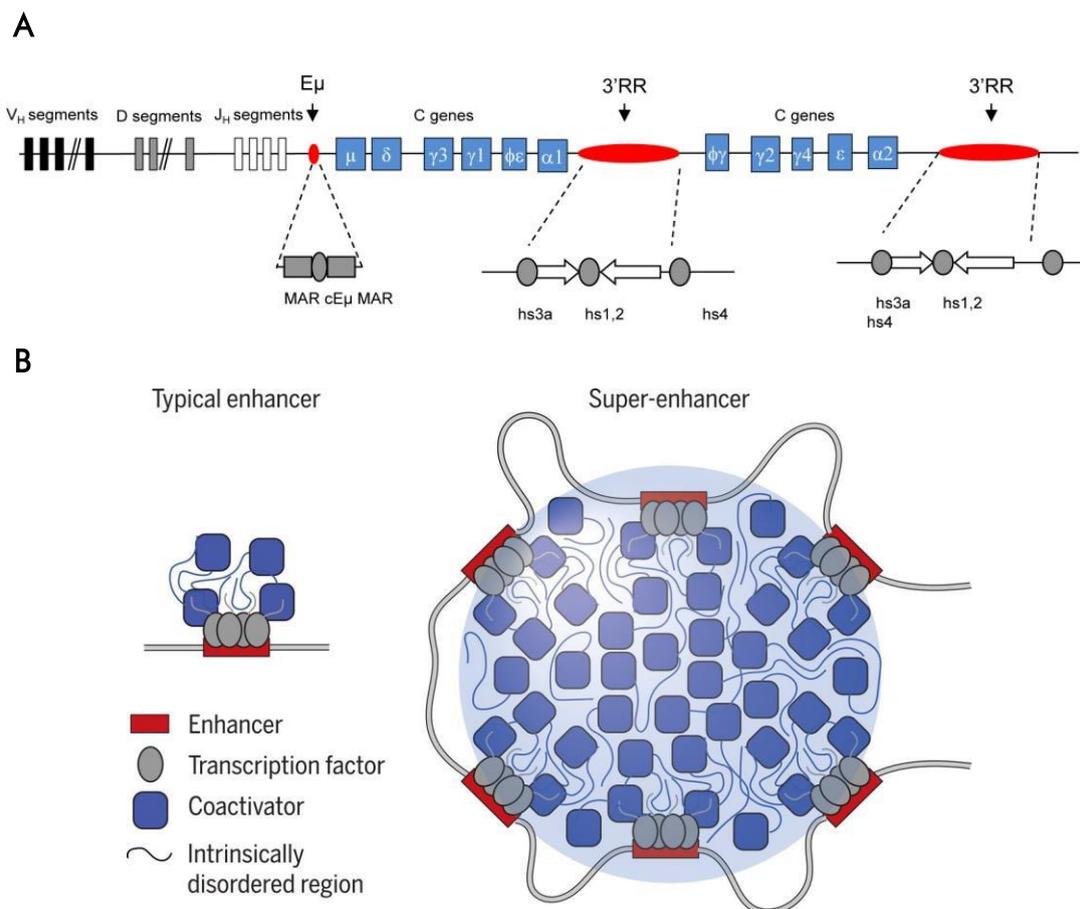
La commutation de classe (CSR) médiée par AID va conduire à la formation de cassures double-brins au niveau du locus *IGH*. Nous avons vu que dans un contexte physiologique ces cassures étaient réparées, alors que, dans un contexte pathologique, des défauts de réparation conduisent à des réarrangements inter-chromosomiques par translocation, comme par exemple la t(8;14) conduisant à un réarrangement *IGH-MYC*. Cet événement nécessite la création de deux cassures double-brins : l'une au niveau du locus *IGH* et l'autre au niveau du locus *c-MYC* (Scourzic et al., 2021). Une étude publiée en 2022 a démontré que le timing de réplication (RT) des origines de réplication présentes au niveau des TADs contenant les loci *Igh* et *c-Myc* est à l'origine de l'interaction spatiale, sous forme d'un « hub » regroupant de

nombreux facteurs de la réplication (Figure 27), de ces deux loci (Méchali, 2022). Cela favorise ainsi les événements de recombinaison. Pour confirmer leur hypothèse sur l'implication du timing de réplication dans les événements de translocation entre les loci *Igh* et *c-Myc*, les auteurs ont réalisé des délétions de l'origine de réplication de *c-Myc*. Ceci a eu pour effet de diminuer fortement les translocations *Igh-Myc*, sans affecter la transcription et la fréquence de mutation de *c-Myc* (Peycheva et al., 2022). En résumé, la mise à proximité spatiale des TADs de *c-MYC* et *IGH* conduit à la création d'un compartiment par séparation de phase enrichi en facteurs de réplication et de réparation. Ceci conduit, lorsque le lymphocyte subit le processus de CSR, à des cassures double-brin des deux loci, dépendantes d'AID, qui vont pouvoir recombiner ensemble. Cet événement de translocation est responsable du développement pathologique de nombreux lymphomes comme les lymphomes de Burkitt et les LBDGC. Néanmoins, les éléments de régulation génétiques et épigénétiques conduisant à la formation des séparations de phase entre ces loci demandent encore à être élucidés.



**Figure 27.** Réorganisation 3D au niveau des loci *IGH* et *c-MYC* lors du processus de translocation (Méchali 2022)

Une question reste cependant en suspens : en quoi la translocation *IGH-MYC* peut-elle conduire à une dérégulation de l'oncogène ? La réponse se trouve en partie dans la structure du locus *IGH*. En effet, ce locus est composé de nombreux éléments de régulation qui vont pouvoir influencer sur l'état d'activité du locus recombiné. Parmi ces éléments, on peut retrouver, chez l'Homme, les éléments  $E\mu$ , 3'RR1 et 3'RR2.  $E\mu$  est un enhancer et les éléments 3'RR1 et 3'RR2 sont tous deux composés de trois enhancers différents (hs3a, hs1,2 et hs4) séparés de séquences répétées inversées. Les éléments 3'RR sont qualifiés de super-enhancers (Figure 28). Ces super-enhancers sont communément définis comme un regroupement de plusieurs enhancers qui vont permettre la nucléation de facteurs de transcription et de co-activateurs transcriptionnels présentant des régions intrinsèquement désordonnées (IDR) capables de créer des séparations de phase. Parmi les facteurs clés régulant l'activité des super-enhancers, on peut noter l'implication du complexe Mediator qui est un ensemble multiprotéique interagissant avec plusieurs facteurs de transcription afin de recruter la machinerie de transcription au niveau des régions de contact entre enhancers et promoteurs (E-P).



**Figure 28.** Régions super-enhancers au sein des chaînes lourdes des immunoglobulines

**A.** Organisation du locus *IGH* chez l'Homme (Ghazzawi et al. 2016)

**B.** Modèle de la structure et de la composition d'un super-enhancer comparé à celle d'un enhancer « classique » (Sabari et al. 2018)

### 3. La famille des protéines BET : structure et fonction

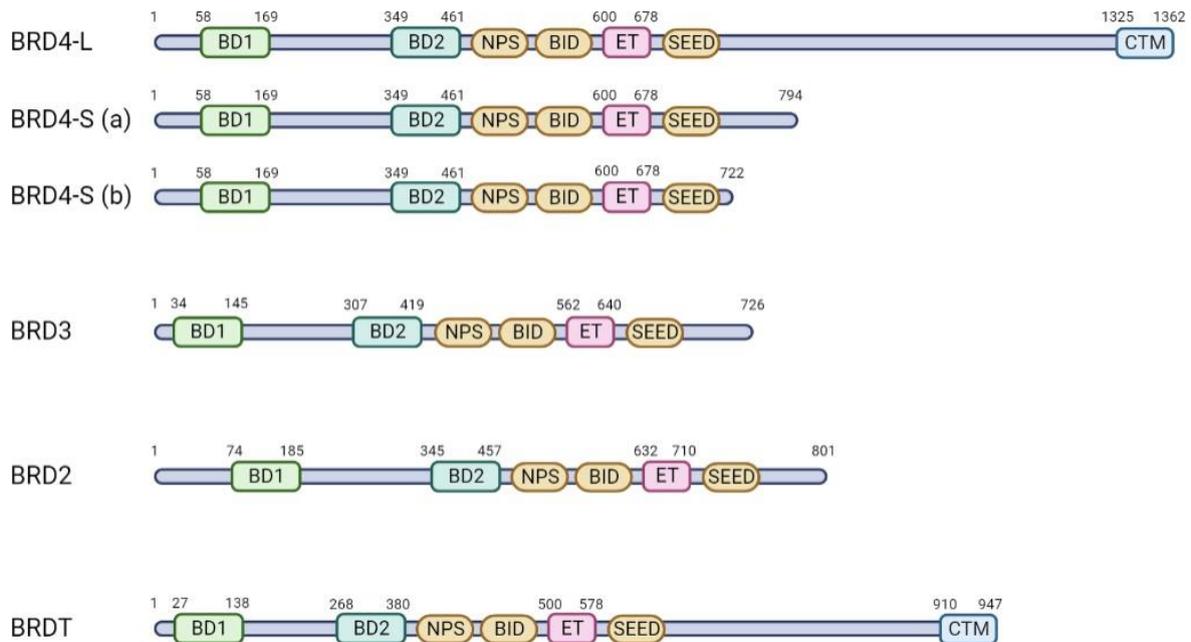
Dans une précédente partie, nous avons pu voir que les protéines contenant des bromodomains chez l'Homme étaient regroupées en différentes familles distinctes. Le point commun de ces familles et la présence d'un ou plusieurs modules de lecture de l'acétylation des lysines, des histones et d'autres protéines, organisé pour former une poche hydrophobe capable de lier ces motifs. Dans cette partie, nous allons nous concentrer sur la famille des protéines à bromodomains et domaine extra-terminal (BET). Nous détaillerons, dans un premier temps, la structure et la fonction de ces protéines dans des contextes physiologique et pathologique, puis nous présenterons l'intérêt et les applications du développement d'inhibiteurs de cette famille de protéines, et plus spécifiquement dans le contexte des LBDGC.

#### a) Structure et fonction de la famille des protéines BET chez l'Homme

La découverte de cette famille de protéines a commencé au début des années 90 lorsque des chercheurs ont identifié, par comparaison de séquences, des similarités entre les produits des gènes *fsh*, *brm* (drosophile), *Spt7*, *Snf2* (levure), *CCG1* et *RING3* (Homme), présentant tous des motifs de bromodomains (Haynes et al., 1992). A cette époque les produits des gènes *CCG1* et *RING3* étaient très peu caractérisés. Le gène *RING3* (codant pour BRD2) a été localisé sur le chromosome 6 au niveau de la région du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, mais ne semblait pas avoir de rôle dans la régulation de l'immunité. *RING3* présentait des homologies avec le gène *fsh* impliqué dans le processus de segmentation chez la drosophile (Beck et al., 1992). Ces différentes études ont également montré que le motif de bromodomaine était présent en tandem chez *fsh* et *RING3*. C'est ainsi qu'a été caractérisé le membre pionnier de la famille BET chez l'Homme : BRD2. Une autre étude, publiée en 1994, vient compléter cette caractérisation grâce à l'étude de la structure du produit du gène *Bdf1* chez la levure, présentant des homologies avec les gènes *fsh*, *RING3* et *ORFX*. Il s'avère que tous les quatre présentent deux bromodomains en tandem et un domaine extra-terminal. C'est ainsi qu'est introduit le terme de protéines à bromodomains et domaine extra-terminal (BET) (Lygerou et al., 1994).

Il existe chez l'Homme 4 membres de la famille des protéines BET : BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT. Alors que les trois premiers membres de cette famille sont exprimés de façon ubiquitaire, l'expression de BRDT est, quant à elle, restreinte au tissu germinatif (Fujisawa & Filippakopoulos, 2017). Les loci codant pour ces protéines sont respectivement retrouvés sur les chromosomes 6, 9, 19 et 1. Ces protéines sont caractérisées par la présence de : deux bromodomains (BD1 et BD2) qui reconnaissent les motifs de lysines acétylées, d'un domaine de phosphorylation (NPS) et d'un domaine enrichi en résidus basiques (BID), ces deux derniers

tous deux impliqués dans le repliement et l'activité des BET (S.-Y. Wu et al., 2013), un domaine extra-terminal (ET) impliqué dans des interactions protéine-protéine (Konuma et al., 2017; Rahman et al., 2011) et d'un motif riche en Sérine-Glutamate-Aspartate (SEED) sans fonction connue. En plus de ces différents éléments de structure, les isoformes longues de BRD4 (BRD4-L) et BRDT possèdent un motif C-Terminal (CTM) impliqué notamment dans la régulation de la transcription par recrutement d'autres partenaires co-activateurs (Bisgrove et al., 2007; Jang et al., 2005) (*Figure 29*).



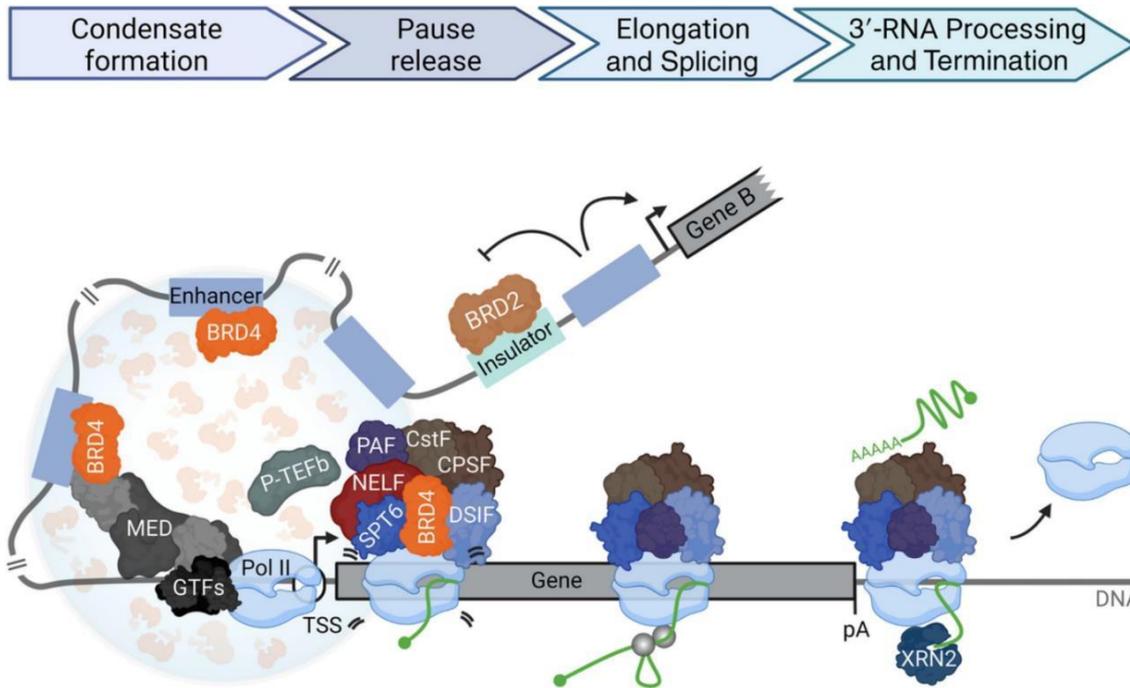
**Figure 29.** Organisation structurale de la famille des protéines BET chez l'Homme.

BD1 = Bromodomaine 1, BD2 = Bromodomaine 2, NPS = N-Terminal cluster of Phosphorylation Sites, BID = Basic residue enriched Interaction Domain, ET = Extra-Terminal domain, SEED = Ser/Glu/Asp-rich region, CTM = C-Terminal Motif

Les bromodomaines BD1 et BD2 de ces protéines sont très conservés au sein de différentes espèces. Au sein d'une même espèce, les BD1, comme les BD2, sont également très proches l'un de l'autre. Nous nous concentrerons ici sur les formes ubiquitaires BRD2, BRD3 et BRD4.

Les protéines BET sont des acteurs majeurs de la signalisation chromatinienne. En effet, ces protéines peuvent lire différents motifs d'acétylation au niveau de la chromatine et définir des régions particulièrement actives du génome. Elles présentent également des motifs d'interaction avec de nombreux partenaires, pouvant ainsi créer de véritables plateformes de signalisation chromatinienne. Nous ne décrivons pas toutes les fonctions et processus dans lesquels sont impliqués ces protéines, mais nous nous concentrerons sur l'un des processus régulés par cette famille de protéine : la transcription. Dans un chapitre précédent, nous avons

vu que l'acétylation de la chromatine participait à la décompaction de régions régulatrices de plusieurs gènes et créait des sites d'interaction de plusieurs protéines à bromodomains, dont font partie les BET, permettant le recrutement du complexe d'initiation de la transcription et de l'ARN polymérase II. BRD4 a été très largement décrit comme un acteur essentiel aux différentes étapes du processus de transcription. En effet, comparé aux autres BET, l'isoforme longue de BRD4 présente, dans sa partie C-terminale, une région d'interaction avec des protéines régulant positivement la transcription comme les complexe Mediator et P-TEF $\beta$  (Jang et al., 2005). Nous avons vu que le complexe Mediator jouait un rôle essentiel au niveau des régions super-enhancers, dans le recrutement de facteurs de transcription et de la machinerie de transcription. Ainsi, avec l'aide de BRD4, ces protéines vont pouvoir former des complexes au niveau de régions enhancers et super-enhancers afin de recruter d'autres facteurs comme P-TEF $\beta$  (Figure 28). Ce complexe résulte de l'association entre deux protéines des familles cyclines/CDK que sont la cycline T1 et CDK9. Dans sa forme inactive, P-TEF $\beta$  est retrouvé associé avec un complexe ribo-protéique composé d'HEXIM1 et de l'ARNsn 7SK (Yik et al., 2003). Suite à des signaux d'activation, le complexe P-TEF $\beta$  est relargué et va pouvoir interagir avec BRD4 qui va le recruter au niveau de sites hyper-acétylés. Il a été montré que l'interaction entre BRD4 et ce complexe se faisait principalement par l'interaction du BD2 de BRD4 avec des motifs d'acétylation de la cycline T1 (Schröder et al., 2012). L'activité kinase de CDK9 va permettre la phosphorylation du facteur négatif de l'élongation de la transcription NELF et de la queue de l'ARN polymérase II, afin de lui permettre de sortir de son état de « pause » après l'initiation de la transcription (Figure 28). Des études *in vitro* ont pu montrer que la dégradation de BRD4 impactait l'assemblage du complexe d'élongation de la transcription ainsi que le clivage de l'ARNm (Arnold et al., 2021; Winter et al., 2017). BRD4 permet donc, via son rôle dans la structure des foyers transcriptionnels au niveau des régions enhancers et super-enhancers, et dans le recrutement de facteurs favorisant l'élongation par l'ARN polymérase II, d'activer le processus de transcription (Eischer et al., s. d.). Il est cependant intéressant de noter qu'une récente étude a observé que, dans certaines lignées de cancers du sein, BRD4 est retrouvée au niveau de régions SE, en association avec le complexe répresseur de la transcription NuRD/LSD1 (Liu et al., 2022).



**Figure 30.** Schéma simplifié du mécanisme de transcription médié par le recrutement à la chromatine des BET et du complexe Mediator favorisant le recrutement du facteur d'élongation P-TEF $\beta$  permettant de phosphoryler le facteur NELF et la polymérase II pour libérer cette dernière de son état de pause et l'activer (Eischer et al. 2022)

Même si leurs rôles sont moins décrits dans la littérature, BRD2 et BRD3 ont également été impliquées dans la régulation de la transcription des gènes, et notamment via la régulation de la structure chromatinienne. Une étude de 2008 a montré que BRD2 et BRD3 interagissaient au niveau de la chromatine hyper-acétylée enrichie en marques H4K5, H4K12 et H3K14, se répartissaient le long des gènes activement transcrits, et qu'elles étaient nécessaires à la transcription de gènes spécifiques (LeRoy et al., 2008). Il a également été montré que BRD2 jouait un rôle majeur dans l'insulation de certaines régions du génome en interagissant avec le facteur CTCF, régulant ainsi les interactions spatiales de l'environnement chromatinien où ce dernier se trouve enrichi (Hsu et al., 2017). BRD3, quant à lui, est capable de former, en association avec le long ARN non-codant *DIGIT*, des séparations de phase au niveau de régions enhancers localisées à proximité de gènes impliqués dans la formation de l'endoderme (Daneshvar et al., 2019). L'ensemble de ces données montre que les protéines BET sont essentielles dans le maintien de la structure de la chromatine, afin de réguler l'expression de différents programmes géniques au sein de nos cellules.

Les protéines BET peuvent également reconnaître différents facteurs de transcription, renforçant ainsi leur implication dans le contrôle de l'expression génique. Cela peut se faire via l'interaction entre leurs bromodomains et des motifs de lysines acétylées au sein de ces facteurs, ou bien via d'autres domaines de liaisons (Cheung et al., 2021). Nous avons vu que BRD4 était enrichi au niveau de régions enhancers et super-enhancers de plusieurs gènes. L'interaction de BRD4 avec ces éléments se fait via la reconnaissance d'histones acétylées, mais également via la reconnaissance de facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, on peut retrouver cette protéine en association avec la sous-unité RELA/p65 du facteur NF-κB. Cette interaction se déroule après l'intégration de stimuli particuliers comme des stimuli d'inflammation, de prolifération ou encore de différenciation, qui vont conduire à l'acétylation de RELA/p65 sur son résidu K130 par p300. Le facteur acétylé va alors pouvoir se fixer sur ses séquences cibles au niveau du génome, afin de réguler ses gènes cibles et, via son interaction avec BRD4, créer un environnement favorable à la transcription (Hajmirza et al., 2018). BRD4 a également été montré comme interagissant avec de nombreux facteurs régulant la transcription, dans différents contextes cellulaires, comme TWIST ou SNAIL (Qin et al., 2019; Shi et al., 2014). Une autre étude a mis en évidence que BRD3 reconnaissait les motifs acétylés de GATA1, un facteur de transcription clé de l'hématopoïèse, afin de stabiliser l'association de ce complexe à la chromatine et d'activer ses gènes cibles (Lamonica et al., 2011). Enfin, il a été montré que BRD2 interagissait avec la protéine LYAR de façon indépendante de ses bromodomains, permettant la régulation du facteur NANOG (Luna-Peláez & García-Domínguez, 2018). Via l'interaction avec des facteurs de transcription spécifiques, les BET sont donc capables de définir des programmes d'expression spécifiques d'un type cellulaire et/ou d'un état cellulaire donné.

## **b) Les protéines BET dans les maladies virales et inflammatoires**

Les protéines BET sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme le cycle cellulaire, la régulation de la transcription ou encore le maintien de l'intégrité du génome. Ces nombreux processus sont souvent retrouvés dérégulés dans des contextes pathologiques et sont liés à de profonds changements d'expression génique. Dans cette partie, nous présenterons brièvement l'implication des protéines BET dans les infections virales et les maladies inflammatoires.

### ➤ Les infections virales

Depuis plusieurs années, il est montré que les protéines BET jouent un rôle à différentes étapes de l'infection, comme l'intégration, la réplication ou la transcription du génome viral, et ce pour différentes familles de virus (I. P. Chen & Ott, 2022). Suite à la pandémie de COVID-19 causée par le SARS-CoV-2, plusieurs équipes ont essayé de caractériser la structure des protéines d'enveloppe, ainsi que de décrire l'interactome entre les protéines de ce virus et les protéines humaines des cellules infectées, afin d'identifier des cibles potentielles de traitement. Parmi les protéines identifiées figurent BRD2 et BRD4 qui interagissent avec la protéine d'enveloppe E du SARS-CoV-2 (Gordon et al., 2020). Une étude publiée en 2022 montre que la protéine E est acétylée dans les cellules hôtes, ce qui permet sa reconnaissance par BRD2 et BRD4. Cette protéine piège ainsi le pool de protéines BET en interagissant avec elles, conduisant à une perte d'expression des protéines de la machinerie antivirale. L'utilisation d'inhibiteur de BET dans des cellules de souris infectées a ainsi pu démontrer une aggravation de l'infection (I. P. Chen et al., 2022).

### ➤ Les inflammations

L'inflammation est un processus naturel qui, lorsque dérégulé, peut participer à la genèse de nombreuses pathologies comme le diabète, les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-inflammatoires, les septicémies et également le cancer. Le lien entre les protéines BET et la régulation de la réponse inflammatoire se trouve dans l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et des gènes cibles de ce dernier. Nous l'avons vu un peu plus haut, BRD4 est capable de reconnaître la sous-unité acétylée RELA/p65 et de s'y lier afin de recruter le complexe P-TEF $\beta$  et d'activer la transcription. Dans un contexte pro-inflammatoire, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B va conduire à l'expression de gènes à réponse primaire qui sont également contrôlés par les protéines BET (Hargreaves et al., 2009). Certaines études ont notamment montré l'efficacité des inhibiteurs des BET dans la suppression de la réponse inflammatoire dans le contexte d'infections bactériennes, de maladies cardiovasculaires ou encore de diabète de type 2 (Nicodeme et al., 2010b; Wasiak et al., 2020).

### c) Les protéines BET dans les cancers

Les cancers sont des entités complexes caractérisées par plusieurs signes distinctifs ou « hallmarks » qui ont été décrits par Robert Weinberg et Douglas Hanahan au début des années 2000, puis mis à jour en 2011 et 2022 (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Parmi les nouvelles « hallmarks » intégrées en 2022, on retrouve la reprogrammation épigénétique. Nous avons pu voir au début de ce manuscrit que les dérégulations épigénétiques étaient fréquentes dans le contexte des LBDGC et d'autres hémopathies. Nous décrirons ici le rôle des protéines BET dans les tumeurs solides, puis nous détaillerons plus spécifiquement leur implication dans les lymphomes.

#### ➤ Dérégulations des BET dans les tumeurs solides

Les protéines BET sont connues pour réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et plus globalement dans la prolifération. On peut ainsi retrouver des enrichissements de ces protéines à la chromatine, au niveau de régulateurs du cycle et de proto-oncogènes comme *PIM2*, *FOSL1*, *KRAS* ou encore *c-MYC* (B. Donati et al., 2018). Les protéines BET sont donc naturellement présentes au niveau de gènes potentiellement oncogéniques. La transformation tumorale médiée par ces protéines repose sur plusieurs mécanismes conduisant à leur dérégulation. Certains types de carcinomes de la ligne médiane présentent une translocation t(15;19) conduisant à la fusion entre les gènes *BRD4* et *NUT* (Nuclear protein in Testis) (French et al., 2003). Cette protéine de fusion va pouvoir se fixer à la chromatine acétylée via sa partie BRD4 et recruter l'acétyltransférase EP300 via sa partie NUT, ce qui entraîne la formation de domaines aberrants d'hyper-acétylation (Zee et al., 2016). Le proto-oncogène *c-MYC* apparaît être un acteur majeur en aval du produit de fusion BRD4-NUT, et nombreux sont ses gènes cibles retrouvés dérégulés dans ce contexte pathologique (Grayson et al., 2014). BRD4 est également retrouvé surexprimé dans des carcinomes rénaux (X. Wu et al., 2017). La stabilité des protéines BET peut également se trouver dérégulée dans le contexte de cancers de la prostate et de l'endomètre. En effet, ces deux types de cancers présentent des mutations de SPOP qui est une protéine adaptatrice de la famille des E3 ligases, capable d'interagir avec la cullin 3 (ubiquitine E3 ligase). Cette protéine peut également se lier aux BET afin d'induire leur dégradation. Cependant, dans le cancer de la prostate avec des mutations de SPOP, une réduction de la dégradation des BET a été observé alors que, dans le cancer de l'endomètre, ces mutations de SPOP potentialisent leur dégradation (Janouskova et al., 2017).

Deux modalités de dérégulation des BET semblent donc émerger dans les cancers : (1) l'augmentation de leur expression et de leur stabilité, (2) la dérégulation locale de la signalisation chromatinienne au niveau d'oncogènes. De forts niveaux de protéines BET, dans certains tissus ou cellules tumorales, peuvent résulter en l'expression d'oncogènes via des interactions aberrantes au niveau de la chromatine présentant des régions régulatrices pouvant être reconnues par celles-ci (comme *c-MYC* par exemple) (Shorstova et al., 2021a).

➤ Implication des protéines BET dans les hémopathies malignes

Nous avons pu voir que des événements de translocation dans certaines hémopathies conduisaient à la mise à proximité d'oncogènes, comme *c-MYC* par exemple, et de régions super-enhancers. Plusieurs études ont montré de forts enrichissements de la sous-unité MED1, du complexe Mediator, et de BRD4 dans ces régions. Dans les études princeps de 2013, publiées par le laboratoire de Richard Young, les auteurs ont montré que les SE sont souvent localisés à proximité de gènes « signatures » des types cellulaires analysés. Pour les auteurs, les SE représentent donc une sorte d'empreinte définissant en partie l'identité des cellules via la présence, en leur sein, de facteurs de transcription clés (Hnisz et al., 2013; Lovén et al., 2013a; Whyte et al., 2013). Hnisz et collègues ont également pu montrer que dans plusieurs types de cancers, des régions SE sont retrouvés à proximité d'oncogènes comme par exemple *MYC* (Hnisz et al., 2013). Cet oncogène apparaît être celui le plus souvent associé avec des régions SE dans nombreux types de cancers. Cependant, les raisons qui font que le locus *c-MYC* est un locus plus susceptible de se retrouver à proximité de SE que d'autres restent encore pleinement à être élucidées. Cette susceptibilité est probablement liée à l'environnement chromatinien de ce locus qui présente un grand nombre d'éléments de régulation pouvant être mobilisés pour activer sa transcription. Plusieurs signaux pourraient ainsi conduire à la réorganisation du TAD contenant *c-MYC*. Cependant, ces réorganisations qui induisent une plus forte accessibilité du locus peuvent favoriser une certaine fragilité génétique, le rendant plus à même de subir des événements d'amplification ou de translocation par la création de points de cassures. Récemment, une étude a montré la présence d'hypermutations de régions SE d'oncogènes comme *BCL6*, *BCL2* ou *CXCR4*. Les auteurs ont pu montrer que ces mutations permettaient de réprimer la fixation de complexes répresseurs au niveau de ces régions, renforçant ainsi leur effet oncogénique (Bal et al., 2022).

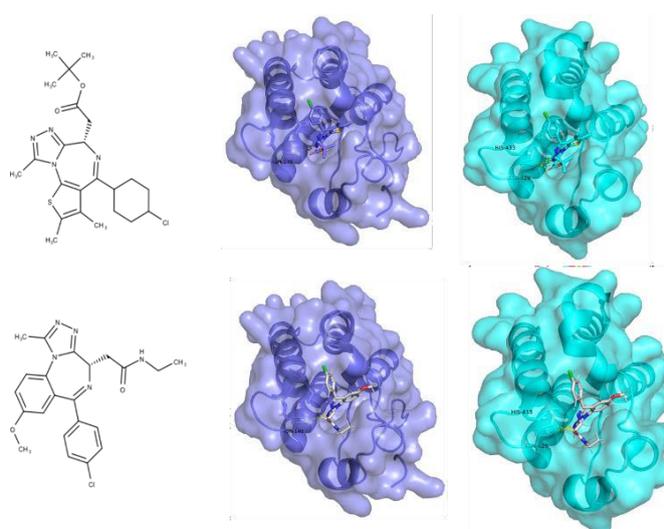
On retrouve donc, dans le contexte de nombreuses hémopathies malignes, des dérégulations conduisant à la mise à proximité de régions SE et d'oncogènes. Ces régions vont ensuite permettre le recrutement de facteurs de transcription essentiels pour l'activation du processus de transcription. Il faut cependant noter que les régions SE dépendent du niveau de

facteurs de transcription et de coactivateurs présents à un temps et lieu donné au sein du noyau (Michida et al., 2020). Ainsi, il est raisonnable de penser que la « simple » présence d'un SE à proximité d'un oncogène ne peut conduire seule à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes environnants. Plusieurs mécanismes existent au sein des cellules afin de créer des SE oncogéniques comme les réarrangements chromosomiques. D'autres remaniements génomiques comme des amplifications focales, des insertions et des délétions de régions de tailles différentes, ou encore des insertions de régions oncogéniques virales, peuvent également conduire à la création de SE oncogéniques (Jia et al., 2019).

#### d) Les inhibiteurs des BET (iBET)

##### ➤ Développement des premiers iBETs

Les premiers inhibiteurs de protéines à bromodomaine ont été développés au début des années 2000 et ciblent les acétyltransférases PCAF et CBP (Sachchidanand et al., 2006; Zeng et al., 2005). Ces études ont démontré que ces inhibiteurs pouvaient déplacer les protéines cibles de leurs ligands acétylés, ouvrant ainsi la porte au développement de nombreuses autres molécules contre différentes protéines à bromodomains (Ferri et al., 2016). C'est en 2010 qu'ont été publiés les premiers travaux décrivant le développement d'inhibiteurs spécifiques de la famille des protéines BET, avec les molécules JQ1 et I-BET (GSK525762A ou I-BET762) (Filippakopoulos et al., 2010b; Nicodeme et al., 2010b). Ces deux molécules de la famille des triazolodiazépines vont, par leur structure chimique, mimer les interactions chimiques d'un peptide acétylé et vont donc pouvoir se loger dans la poche hydrophobe des bromodomains BD1 et BD2 des BET, inhibant ainsi leur interaction avec d'autres substrats (*Figure 31*).



**Figure 31.** Interaction et structure de JQ1 (en haut) et I-BET (en bas) avec le BD1 (bleu foncé) et le BD2 (cyan) de BRD4

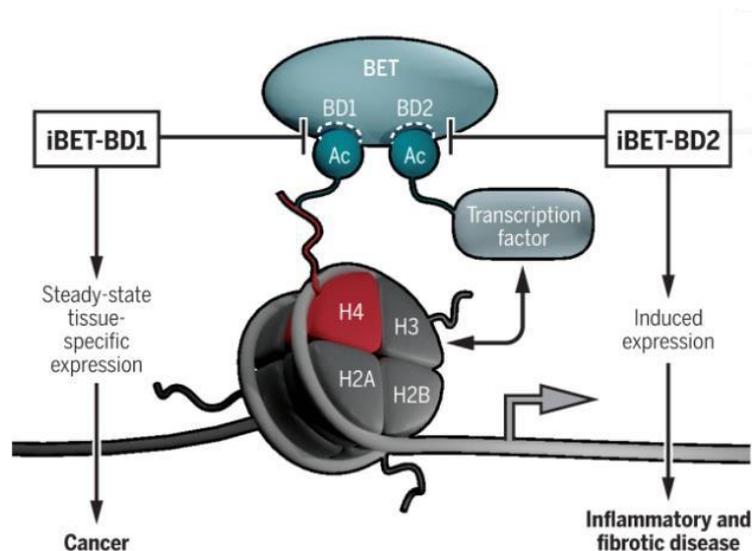
Les premiers essais démontrant des effets biologiques de JQ1 ont été réalisés dans des lignées de carcinome (NMC 797) présentant la translocation t(15;19) qui conduit à la fusion BRD4-NUT. Les auteurs ont pu démontrer l'efficacité de JQ1 à déplacer BRD4 de la chromatine par des expériences de FRAP dans des cellules d'ostéosarcome U2OS, et ont montré qu'il induisait un blocage du cycle cellulaire en phase G1, ainsi qu'une différenciation des cellules NMC. De plus, des expériences de xénogreffes de cellules NMC 797 dans des souris ont montré un effet anti-tumoral *in vivo* de JQ1. Cette étude est donc pionnière dans l'utilisation de petites molécules ciblant les protéines BET dans un contexte de cancer et montrant un effet anti-tumoral prometteur (Filippakopoulos et al., 2010b). I-BET  $\alpha$ , quant à elle, a été décrite pour son activité anti-inflammatoire via l'inhibition de gènes impliqués dans la réponse au lipopolysaccharide (LPS) dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse. Des tests *in vivo* ont également été réalisés avec ce composé sur des souris infectées par la bactérie *Salmonella typhimurium* préalablement tuée par choc thermique, ou injectées avec du LPS. Les résultats ont montré que les souris ayant préalablement reçu un traitement avec le composé I-BET avaient une meilleure survie. Également, une dose thérapeutique d'I-BET semblait être capable de soigner les souris après injection de LPS en réduisant significativement le taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes. Ces deux études ont donc montré l'intérêt biologique et les potentielles applications cliniques de ces composés dans différents contextes pathologiques.

Depuis le développement de JQ1 et I-BET, de nombreuses autres molécules dérivées ou non de ces composés ont vu le jour. On peut par exemple citer le composé I-BET151 (GSK1210151A), de la famille des dimethylisoxazoles, qui est le premier iBET non-dérivé de JQ1 et I-BET. Ce composé a montré une activité biologique dans des lignées de leucémie présentant des fusions du gène MLL (Mixed Lineage Leukemia) avec des partenaires de la famille SEC (Super Elongation complex) impliqués dans l'élongation de la transcription. En effet, un criblage protéomique a identifié les protéines BET BRD3 et BRD4 comme interagissant avec des protéines du complexe SEC et PAF (Polymerase Associated Factors). Les auteurs ont pu montrer que I-BET151 conduisait à la diminution d'expression d'oncogènes clés comme *c-MYC*, *CDK6* et *BCL2*. Ce composé a également montré une activité *in vivo* (Dawson et al., 2011).

➤ Les iBETs BD1 et BD2 sélectifs

Ces composés de première génération sont qualifiés de pan-iBET car ils peuvent lier avec la même affinité les deux bromodomains de l'ensemble des protéines BET. Le premier iBET sélectif décrit est le composé RVX-208, et montre une sélectivité envers le BD2 des BET. RVX-208 est un composé dérivé du resvératrol de la famille des quinazolinones découverte, à

l'origine lors d'un criblage de molécules, comme impactant le niveau de l'apolipoprotéine A1 (ApoA1) dans une lignée cellulaire de cancer du foie HepG2 (Bailey et al., 2010). Quelques années plus tard une étude a montré que RVX-208 était un iBET sélectif du deuxième bromodomaine des BET (Picaud et al., 2013a). Plus récemment, deux études ont démontré l'action de composés BD-sélectifs et ont essayé de caractériser les rôles respectifs de ces modules. La première étude s'est penchée sur l'action du composé BD2-sélectif ABBV-744 dans le contexte de cancers de la prostate dépendants du récepteur aux androgènes (AR). De façon très intéressante cette étude a montré que l'action antiproliférative de ce composé était assez limitée comparée à d'autres composés pan-iBET et semble, comme RVX-208, avoir un impact restreint à certains gènes. L'étude a également montré, d'un point de vue mécanistique, que ABBV-744 déplace BRD4 des régions super-enhancers contenant des AR sans affecter la liaison de P-TEF $\beta$ . Les auteurs émettent alors l'hypothèse qu'une interaction entre le BD2 des BET et les AR acétylés au niveau de régions super-enhancers serait à l'origine de la sensibilité de ces cancers pour le composé ABBV-744 (Faivre et al., 2020a). La deuxième étude présente le développement de trois nouvelles molécules sélectives : GSK-046 (BD2-sélective), GSK-620 (BD2-sélective et biodisponible par voie orale) et GSK-778 (BD1-sélective). Les auteurs ont démontré que l'inhibition sélective du premier bromodomaine, mais pas du second, mimait l'action des pan-iBET en décrochant de la chromatine les BET au niveau des régions promotrices et enhancers de *c-MYC*, et conduisait à des effets anti-prolifératifs dans des lignées de cancer du sein et de leucémie aigüe myéloïde. Cela suggère que le BD1 est responsable de la liaison des BET à la chromatine, via son interaction avec les lysines acétylées des histones au niveau de gènes impliqués dans la survie et la croissance cellulaire. L'inhibition du BD2 des BET ne semble donc pas avoir d'impact sur l'interaction des BET à la chromatine, mais montre des effets au niveau de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire contrôlé par des cytokines comme l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Ces stimuli pro-inflammatoires vont conduire à l'activation et au recrutement de facteurs de transcription spécifiques (comme NF- $\kappa$ B) au niveau de gènes impliqués dans l'inflammation et dont l'expression est dépendante des BET (Gilan et al., 2020b). L'ensemble des résultats de ces études permettent d'un peu mieux comprendre l'implication des deux bromodomains des BET et l'effet de leur inhibition sélective.



**Figure 32.** Modèle du rôle des bromodomains BD1 et BD2 des protéines BET et impact de leur inhibition spécifique (Filippakopoulos et Knapp 2020)

➤ Dégradation des BET par les composés PROTAC

En plus des inhibiteurs visant à bloquer l'interaction des BET à la chromatine, d'autres composés ont été développés afin d'évaluer si la dégradation de ces composés, plutôt que leur inhibition, améliorerait leur activité thérapeutique. Ces composés, appelés PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimeras), sont dérivés chimiquement de l'association entre des composés iBET avec un linker flexible couplé à un composé visant à interagir avec une sous-unité du complexe E3-ubiquitine ligase. L'idée est alors de créer un rapprochement spatial entre les protéines BET et le système E3 ligase pour induire leur dégradation par le protéasome (Ferri et al., 2016; C.-Y. Yang et al., 2019). Certains de ces composés, comme dBET1, ont montré d'intéressants effets en induisant une dégradation de BRD4, BRD3 et BRD2, corrélée à une baisse d'expression de MYC, et conduisant à l'augmentation de l'apoptose de lignées d'AML. Des tests *in vivo* ont également montré l'effet anti-tumoral de ce composé (Winter et al., 2015). D'autres combinaisons de composés iBET et d'inhibiteurs d'E3 ligase ont été développés mais, de façon assez surprenante, certaines de ces molécules comme MZ1 ont montré une plus forte action envers BRD4 comparé à BRD2 et BRD3 (Zengerle et al., 2015). Cela ouvre les possibilités du ciblage spécifiques des différentes protéines BET malgré la redondance et l'homologie observées entre les bromodomains.

### ➤ Utilisation des iBETs dans les hémopathies malignes

Au vu de l'implication des protéines à bromodomaines, et plus particulièrement des BET, dans la régulation de nombreux processus dont la structuration et l'activation des régions SE, plusieurs équipes ont étudié l'impact de l'inhibition de ces protéines par les iBETs dans le contexte d'hémopathies malignes. Un an après la publication de JQ1, deux études menées par Delmore et Mertz ont permis une avancée considérable en évaluant l'utilisation des iBETs dans les cancers présentant des dérégulations de l'oncogène *c-MYC*. En effet, les auteurs ont démontré, dans différents modèles cellulaires d'hémopathies malignes, que JQ1 induisait une répression de l'expression de l'oncogène conduisant à la dérégulation globale du programme d'expression contrôlé par ce dernier. Cet effet est associé, dans les lignées, à un arrêt du cycle cellulaire, une augmentation de la sénescence et une augmentation de la mort cellulaire (Delmore et al., 2011b; Mertz et al., 2011a). Ces études ont donc ouvert un vaste champ à l'utilisation des iBETs dans les contextes de cancers dépendants de MYC. Deux ans après ces études, Lovén et collègues ont pu fournir la preuve de concept mécanistique que l'inhibition de BRD4 par JQ1 conduit à une perte de la protéine spécifiquement au niveau des régions super-enhancer dans des lignées de myélome multiple, et que cette perte conduisait bien à la diminution de l'expression de l'oncogène *c-MYC* (Lovén et al., 2013a). Une autre étude publiée en 2013 par Bjoern Chapuy et collègues a pu montrer l'efficacité de l'inhibition de BRD4 dans des lignées de LBDGC en étudiant plus particulièrement l'effet de cette inhibition au niveau de réseaux oncogéniques régulés par des SE. Les auteurs ont ainsi montré que l'inhibition de BRD4 permettait de bloquer un grand nombre de programmes oncogéniques, comme ceux contrôlés par les facteurs clés de la lymphomagenèse MYC, BCL6, IRF8, PAX5 et OCA-B. L'inhibition par JQ1 conduit *in vivo* à l'arrêt de prolifération des cellules ainsi qu'à une réduction de la masse tumorale de xénogreffes murines. Cette étude représente donc l'une des études pionnière dans la rationalisation de l'utilisation de ces molécules dans le contexte des LBDGC (Chapuy et al., 2013b).

Nous avons vu, au cours de cette introduction, que les LBDGC étaient des entités présentant un grand nombre d'altérations conduisant à l'expression aberrante de différents programmes oncogéniques. Nous avons également pu voir que l'utilisation d'iBETs était une stratégie pertinente pour cibler plusieurs oncogènes, comme *c-MYC* ou *BCL2*, via la perturbation d'interaction des protéines BET à la chromatine et de leur liaison avec différents facteurs co-activateurs de la transcription. Plusieurs études dans les lymphomes ont pu démontrer l'efficacité de cette stratégie d'inhibition afin d'induire une toxicité au sein des cellules tumorales (Abedin et al., 2016; Chaidos et al., 2015).

Par exemple, l'utilisation de JQ1 dans des lignées de LBDGC du sous-type ABC conduit au blocage de l'activité oncogénique du complexe kinase IKK et à la mort par apoptose de ces cellules (Ceribelli et al., 2014a). Des traitements par JQ1 ont également été réalisés sur plusieurs lignées de LBDGC ABC et GCB avec différents statuts du locus de *c-MYC* (normal, transloqué ou amplifié). Les auteurs de cette étude ont pu confirmer les observations faites concernant l'induction d'un arrêt en G1 et la diminution de l'expression de MYC dans l'ensemble des lignées. De façon intéressante, ils ont pu montrer que certaines de ces lignées entraient en senescence suite à un traitement par JQ1 alors que d'autres entraient plutôt dans un programme de mort cellulaire par apoptose (Trabucco et al., 2015b). Le contexte cellulaire associé à chaque type de réponses aux iBETs reste encore à être élucidé.

### ➤ iBETs et essais cliniques

Les résultats très encourageants de ces composés dans des modèles *in vivo* dans différents contextes pathologiques ont rapidement conduit à la mise en place d'essais cliniques visant à évaluer les iBETs dans différents contextes pathologiques, dont les hémopathies malignes (Spriano et al., 2020) (*Tableau 1*).

Clinical trials evaluating BET inhibitors also for patients with lymphomas, acute leukemias or other hematological cancers. Trials sorted by current status and compound name.

Interventions	NCT Number	Status	Phase	Conditions	Publication
ABBV-744	NCT03360006	Recruiting	1	AML	n.a.
AZD5153 +/- olaparib	NCT03205176	Recruiting	1	Solid Tumors, Lymphomas	(Wang et al., 2019)*
BI 894999	NCT02516553	Recruiting	1	Solid Tumors, DLBCL	(Aftimos et al., 2017)*
BMS-986158	NCT03936465	Recruiting	1	Pediatric Solid Tumors, Pediatric Lymphomas	n.a.
BMS-986158 +/- nivolumab	NCT02419417	Recruiting	1/2	Solid Tumors, Hematological malignancies	(Hilton et al., 2018)*
CC-90010	NCT03220347	Recruiting	1	Solid Tumors, Lymphomas	(Cousin et al., 2020) / (Cousin et al., 2020)*
CC-95775	NCT04089527	Recruiting	1	Solid Tumor, Lymphomas	n.a.
CPI-0610 +/- ruxolitinib	NCT02158858	Recruiting	2	AML, MDS, Myelofibrosis	(Kremyanskaya et al., 2019)*
PLX51107 +/- azacitidine	NCT04022785	Recruiting	1	AML, MDS	n.a.
PLX51107 +/- azacitidine	NCT04022785	Recruiting	1	AML, MDS	n.a.
Birabresib	NCT02698189	Active, not recruiting	1	AML, DLBCL	n.a.
Birabresib	NCT01713582	Completed	1	Hematological malignancies	(Amorim et al., 2016; Berthon et al., 2016; Odore et al., 2016)
GSK525762	NCT01943851	Active, not recruiting	2	AML, MM, Lymphomas	n.a.
CPI-0610	NCT01949883	Completed	1	Lymphomas	(Blum et al., 2018)*
CPI-0610	NCT02157636	Completed	1	MM	n.a.
FT-1101 +/- azacitidine	NCT02543879	Completed	1	AML, MDS, Lymphomas	(Patel et al., 2019)*
G5-5829 +/- + exemestane or fulvestrant	NCT02392611	Completed	1	Solid tumors, Lymphomas	n.a.
Mivebresib +/- venetoclax	NCT02391480	Completed	1	Solid Tumors, AML, MM, Lymphomas	(Piha-Paul et al., 2018)*
RO6870810	NCT02308761	Completed	1	AML, MDS	n.a.
RO6870810 + venetoclax +/- rituximab	NCT03255096	Completed	1	DLBCL, HGBL-DH/TH	(Dickinson et al., 2019)*
RO6870810 +/- daratumumab	NCT03068351	Completed	1	MM	n.a.
Molibresib +/- entinostat	NCT03925428	Not yet recruiting	1	Solid tumors, Hematological malignancies	n.a.
BAY 1238097	NCT02369029	Terminated	1	Solid tumors, Hematological malignancies	(Postel-Vinay et al., 2019)
INCB054329	NCT02431260	Terminated	1/2	Solid tumors, Hematological malignancies	(Falchook et al., 2020)
PLX51107	NCT02683395	Terminated	1	Solid tumors, Hematological malignancies	(Patnaik et al., 2018)*
INCB057643	NCT02711137	Terminated	1/2	Solid tumors, Hematological malignancies	(Falchook et al., 2020)
N-methyl-pyrrolidone	NCT02468687	Unknown*	1	MM	n.a.
Birabresib + azacitidine	NCT02303782	Withdrawn	1/2	AML	n.a.
Birabresib + azacitidine	NCT02303782	Withdrawn	1/2	AML	n.a.

\*, based on <http://adisinsight.springer.com/> and/or <https://clinicaltrials.gov> accessed in May 2020; \*, meeting abstract; n.a., not available; \*, recruiting in 2016; AML, acute myeloid leukemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; HGBL-DH/TH, high-grade B-cell lymphoma MYC and/or BCL2 and/or BCL6 gene rearrangements; MDS, myelodysplastic syndrome; MM, multiple myeloma.

**Tableau 1.** Essais cliniques avec les iBETs (Spriano et al. 2020)

Les réponses cliniques sont hétérogènes avec, dans certains cas, des réponses partielles mais aussi complètes (Blum et al., 2018; Falchook et al., 2020; Moreno et al., 2020). Cela démontre l'efficacité de ces composés pour plusieurs patients pour lesquels aucune solution thérapeutique n'a pu être trouvée. Certains effets secondaires récurrents comme des thrombocytopénies, des anémies ou encore des problèmes gastro-intestinaux, sont observés dans plusieurs essais cliniques de phase I (Doroshov et al., 2017). Par exemple, dans les premiers essais menés avec le composé OTX015, les patients atteints de LBDGC et de myélomes ont montré des réponses hétérogènes et tous ont présenté des symptômes de toxicité, limitant alors la dose de drogue administrée.

➤ Pistes d'amélioration

### **Dose, pharmacocinétique et pharmacodynamisme**

Les tests sur des modèles *in vitro* utilisent généralement des doses allant d'environ 0,5 à 1  $\mu$ M. Adaptées sur des modèles *in vivo*, ces doses représentent plus de 50 mg/kg avec une administration deux fois par jour, ce qui ne peut pas être appliqué facilement en clinique (Shorstova et al., 2021a). Plusieurs essais étudient donc, en plus de leur effet anti-tumoral, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces composés afin d'optimiser les doses utilisées et leurs périodes d'administration (Falchook et al., 2020).

### **Combinaisons thérapeutiques**

#### *Modèles cellulaires et pré-cliniques*

Afin de mieux rationaliser l'utilisation de ces inhibiteurs en clinique, plusieurs études sont menées sur des modèles cellulaires et pré-cliniques visant à déterminer des biomarqueurs prédictifs de la réponse des patients aux iBETs. Ceci passe par la meilleure compréhension des mécanismes d'action et des gènes cibles de ces composés. Ces approches permettent notamment de mettre en lumière des réseaux oncogéniques contrôlés par les protéines BET et pouvant être ciblés par les iBETs. On peut noter par exemple que dans certains LBDGC, l'expression de la protéine nucléaire CYCLON (CCDC86), régulée par l'oncogène MYC, conduit à une résistance au rituximab. L'inhibition de MYC et de CYCLON par JQ1 restaure la sensibilité au rituximab *in vitro* et *in vivo* (Emadali et al., 2013).

L'évaluation de l'activité anti-tumorale des iBETs en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques est aujourd'hui un axe de recherche très prometteur. En effet, de nombreuses études ont pu montrer une interaction synergique des iBETs avec des composés ciblant des tyrosines kinases, des HDAC ou encore des HMT (*Tableau 2*)

(Doroshov et al., 2017; Ferri et al., 2016; Shorstova et al., 2021a; Spriano et al., 2020). Ces stratégies combinatoires semblent offrir de meilleurs effets thérapeutiques et permettraient de limiter l'apparition de résistances acquises (Hogg et al., 2017; Kurimchak et al., 2016; Pawar et al., 2018; Shu et al., 2020).

### Clinique

Plusieurs essais cliniques dans des tumeurs solides et dans des hémopathies sont en cours afin d'évaluer l'efficacité de la combinaison des iBETs avec d'autres molécules. En 2020, une étude a pu montrer l'efficacité de la combinaison de l'iBET ZEN3694 avec l'anti-androgène non-stéroïdien enzalutamide chez des patients atteints de cancers de la prostate métastatiques (Aggarwal et al., 2020). D'autres études récentes, menées chez des patients atteints de LBDGC réfractaires ou en rechutent, ainsi que chez des patients présentant des LBDGC de haut-grade double-hit ou triple-hit, ont évalué l'efficacité de combinaison du composé iBET RO6870810 avec le venetoclax et le rituximab. En plus de montrer une forte activité biologique sur la répression de *c-MYC* et de *BCL2*, les résultats de cette étude ont montré de façon très encourageante une réponse complète pour 20% des patients (Dickinson et al., 2021). Ces différentes études nous confortent donc quant au bénéfice du développement de stratégies combinatoires afin de potentialiser l'effet anti-tumoral des iBETs.

Summary of compounds showing preclinical synergism in combination with BET inhibitors in hematological malignancies.

Classes	Second compound	Preclinical Model	Reference
Small molecules	ALK inhibitors	ALK <sup>+</sup> -ALCL	(Boi et al., 2016)
	BTK inhibitors	ALK <sup>+</sup> -ALCL, ABC DLBCL, MCL, t(MYC) B-PLL; CLL	(Bates et al., 2016; Bernasconi et al., 2017; Boi et al., 2015; Boi et al., 2016; Ceribelli et al., 2014; Chapiro et al., 2018; Gaudio, Tarantelli, Ponzoni, et al., 2016; Kim, Ten Hacken, et al., 2019; Sun et al., 2015; Sun et al., 2018)
	CDK inhibitors	MCL, AML	(Sun et al., 2015; Sun et al., 2018; Tontsch-Grunt et al., 2018)
	BCL2/MCL1 inhibitors	MCL, B-PLL t(MYC), double hit DLBCL	(Chapiro et al., 2018; Lasorsa et al., 2015; Sun et al., 2015; Sun et al., 2018; Takimoto-Shimomura et al., 2018)
	CXCR4 inhibitors	DLBCL	(Recasens-Zorzo et al., 2019)
	CBP/ep300 inhibitors	AML	(Picaud et al., 2015)
	Hedgehog inhibitors	ALK <sup>+</sup> -ALCL	(Boi et al., 2016)
	PLK inhibitors	AML	(Tontsch-Grunt et al., 2018)
	MEK/ERK inhibitors	AML, MM	(Gaudio et al., 2016; Wyce et al., 2018)
	mTOR inhibitors	DLBCL, ABC DLBCL	(Bernasconi et al., 2017; Boi et al., 2015; Ceribelli et al., 2014; Gaudio, Tarantelli, Ponzoni, et al., 2016)
Antibodies	Anti-CD20 monoclonal antibodies	DLBCL, MYC overexpressing cells	(Boi et al., 2015; Emadali et al., 2013; Gaudio, Tarantelli, Ponzoni, et al., 2016; Stubbs et al., 2017)
	Immune modulators	DLBC, primary effusion lymphoma, MCL, ALCL, MM	(Bandini et al., 2018; Boi et al., 2015; Gopalakrishnan et al., 2016; Moros et al., 2014; Siu et al., 2017)
	Anti-PD1 monoclonal antibodies	Eμ-Myc lymphomas	(Hogg et al., 2017)
	Anti-4-1-BB monoclonal antibodies	Eμ-Myc lymphomas	(Hogg et al., 2017)
	Chimeric antigen receptors (CAR) T cells	ALL	(Kagoya et al., 2016)
Epigenetic drugs	EZH2 inhibitors	DLBCL	(Bernasconi et al., 2017; Zhao et al., 2013)
	HDAC inhibitors	DLBCL, ABC DLBCL, MCL	(Bhadury et al., 2014; Boi et al., 2015; Boi et al., 2016; Gaudio, Tarantelli, Ponzoni, et al., 2016; Sun et al., 2015)
Chemotherapy	Azacitidine	AML, MM	(Bui et al., 2017)
	Decitabine	DLBCL	(Boi et al., 2015)
	Bendamustine	DLBCL	(Boi et al., 2015; Stubbs et al., 2017)
		Doxorubicin	(Boi et al., 2015)

ALCL, anaplastic large T-cell lymphoma; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma; MM, multiple myeloma; PLL, prolymphocytic leukemia.

**Tableau 2.** Interactions synergiques entre les iBETs et d'autres composés en approches combinatoires (Spriano et al. 2020)

## Synthèse iBETs et hémopathies malignes

L'ensemble de ces données montre l'importance de poursuivre l'étude des mécanismes médiés par les BET, et plus particulièrement dans les hémopathies malignes où leur inhibition est associée à la suppression de plusieurs voies de signalisation oncogéniques, dont celles liées à MYC ou dépendantes des régions régulatrices de type « super-enhancers ». Le développement de nouvelles molécules sélectives a permis de mieux comprendre la contribution respective de chacun des 2 bromodomains de ces protéines, afin d'orienter le choix de molécules en fonction du contexte pathologique et des dérégulations associées. Bien que de nombreuses données aient été générées dans des lignées tumorales et des modèles précliniques, on comprend toujours mal l'hétérogénéité des réponses moléculaire et cellulaire obtenues suite au traitement par les iBET, même au sein d'une même pathologie.

---

Dans le cadre de mon travail de thèse, j'ai développé une approche utilisant des modèles cellulaires de lymphomes de LBDGC, dont plusieurs modèles de DH/TH, afin d'identifier quelles caractéristiques génétiques et moléculaires sont associées positivement ou négativement avec la réponse aux iBETs. Ce travail a été réalisé dans l'objectif de trouver des biomarqueurs de réponse aux iBETs qui pourraient permettre d'identifier les patients susceptibles de bénéficier de ces traitements, ainsi que d'explorer de nouvelles pistes de combinaison thérapeutique permettant d'améliorer l'activité anti-tumorale de ces composés.

---

# OBJECTIFS DE LA THÈSE

Nous avons vu au cours de cette introduction que les lymphocytes B sont des cellules immunitaires impliquées dans la reconnaissance et la neutralisation d'antigènes via la production d'anticorps spécifiques et affins. Au cours de leur maturation, ces cellules subissent un ensemble de changements phénotypiques et moléculaires contrôlés par de nombreux facteurs de transcription ainsi que par des régulations épigénétiques, permettant *in-fine* la création d'un répertoire clonal dédié à la reconnaissance d'antigènes (Basso & Dalla-Favera, 2015). L'activation des lymphocytes B est un processus composé d'une alternance de phases de prolifération cellulaire et de sélection, qui ont lieu au sein de structures appelées les centres germinatifs (De Silva & Klein, 2015). Ces différentes phases sont associées à une forte instabilité génomique physiologique via les hypermutations somatiques et les recombinaisons de classes des loci des immunoglobulines *IGH*, qui ont pour but de créer un vaste répertoire de récepteurs opérationnels dans la reconnaissance d'antigènes (Peled et al., 2008; Stavnezer et al., 2008). Le fort niveau de prolifération de ces cellules lors de leur activation combinée à cette instabilité génomique peut conduire à des réarrangements chromosomiques ou à des mutations affectant des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs associés au développement de lymphomes.

On s'intéressera ici aux lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC), qui représentent la forme la plus commune de lymphome B non-hodgkinien. Ces hémopathies malignes présentent un fort niveau d'hétérogénéité clinique et biologique. L'immunochimiothérapie R-CHOP utilisée en première ligne dans cette pathologie permet de guérir environ 70% des patients (Coiffier et al., 2010). Mais, 30% des patients y sont réfractaires ou rechutent en général dans les deux ans. Parmi les cas primo-réfractaires, on retrouve un sous-type, récemment défini par l'OMS comme une nouvelle entité (Campo et al., 2022), dit lymphome de haut grade (HGBL) et caractérisé par la présence de réarrangements chromosomiques au niveau des loci *c-MYC*, *BCL2* et/ou *BCL6* (Scott et al., 2018a). Ce sont des lymphomes très agressifs pour lesquels le pronostic reste très défavorable et peu de solutions thérapeutiques sont disponibles. Les réarrangements retrouvés dans ces lymphomes impliquent fréquemment les régions régulatrices du locus des chaînes lourdes des immunoglobulines *IGH*. Ces régions vont activer la transcription des oncogènes partenaires comme *c-MYC* ou *BCL2*, qui vont jouer un rôle important dans le développement tumoral en contrôlant des processus comme la prolifération, le cycle cellulaire ou encore l'apoptose. De nombreuses études se sont donc intéressées à cibler directement ou indirectement ces oncogènes dans le contexte de ces lymphomes.

Parmi ces différentes stratégies, une s'intéresse plus particulièrement au ciblage des régions régulatrices des *IGH* afin de réprimer la transcription des oncogènes. En effet, ces régions chromatinienne sont organisées sous forme de structures, appelées super-enhancers, qui ont pour fonction la nucléation de facteurs de transcription et de co-activateurs transcriptionnels permettant ainsi d'activer l'expression de gènes en aval (Pinaud et al., 2011; Whyte et al., 2013). Parmi ces facteurs, on retrouve des protéines lectrices de la chromatine de la famille des protéines BET (Bromodomain and Extra-Terminal domain). Ces bromodomaines sont capables de reconnaître les lysines acétylées, enrichies au niveau des histones dans ces régions chromosomiques. Ces protéines créent ainsi des plateformes de signalisation au niveau de la chromatine et recrutent via leur domaine extra-terminal des complexes impliqués dans l'initiation et l'élongation de la transcription (Filippakopoulos & Knapp, 2014a). Plusieurs molécules inhibitrices de la famille des protéines BET (iBET) ont été développées afin de cibler les domaines de lecture de ces protéines pour réprimer la transcription des gènes cibles impliqués dans la survie, la croissance ou encore le métabolisme cellulaire qu'ils contrôlent dans plusieurs contextes pathologiques (Stathis & Bertoni, 2018).

Les iBETs ont montré une efficacité anti-tumorale dans plusieurs modèles cellulaires et pré-cliniques de tumeurs solides et dans des hémopathies malignes comme les LBDGC (Boi et al., 2015a; Ceribelli et al., 2014a; Chapuy et al., 2013b; Mertz et al., 2011a). L'activité thérapeutique des iBETs dans ces lymphomes a principalement été attribué à la répression de différents programmes oncogéniques, comme par exemple ceux contrôlés par le facteur de transcription MYC ou encore la protéine anti-apoptotique BCL2, fréquemment dérégulés dans ces cancers. De plus, l'efficacité de ces inhibiteurs a été évaluée en clinique sur différents types de pathologies (Spriano et al., 2020). Des résultats très prometteurs, bien qu'hétérogènes, ont été obtenus dans les LBDGC. Mais, à ce jour, on comprend encore mal quels sont les patients les plus à même de bénéficier de ces nouveaux traitements.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à évaluer et à caractériser la réponse moléculaire d'iBETs dans des lignées de LBDGC, avec un focus particulier sur les HGBL. Ce travail a été réalisé dans le but d'identifier des facteurs moléculaires permettant de prédire la réponse à ces inhibiteurs, ainsi que de déterminer les voies de signalisation impliquées dans la résistance à ces composés afin de proposer de mieux rationaliser l'utilisation des iBET comme agents simples et de définir des nouvelles combinaisons thérapeutiques pour ces lymphomes réfractaires aux thérapies conventionnelles.

# RÉSULTATS

L'ensemble des résultats de mon projet de recherche est présenté sous forme d'une première version de manuscrit d'article. Pour résumer, nous avons mis en place une approche décrite dans l'article présenté ci-après consistant en une :

**1. Caractérisation détaillée de lignées de LBDGC** afin de déterminer la présence de réarrangements au niveau des loci *c-MYC*, *BCL2* et *BCL6* (et s'ils impliquent le locus *IGH*) dans ces modèles cellulaires. Des analyses de séquençage ciblé ont aussi été réalisées afin d'établir un profil mutationnel pour l'ensemble de nos lignées. Ces analyses ont été réalisées pour déterminer sans ambiguïté les perturbations génétiques associées à chacun de ces modèles et déterminer si elles sont associées à la réponse aux iBET. Nous avons également évalué si l'ensemble des altérations génétiques détectées avaient un impact sur les niveaux d'expression de *c-MYC*, *BCL2* et *BCL6*. Nous avons montré que la présence d'un réarrangement *IG-MYC*, en particulier lorsqu'il est associé avec une mutation stabilisatrice de la protéine, se traduit, comme attendu, par un fort niveau de cette dernière. Cependant, nos résultats suggèrent aussi qu'un réarrangement avec le locus *IGH* n'est pas automatiquement corrélé avec de forts niveaux d'ARNm ou de protéines du locus partenaire.

**2. Évaluation de la réponse cellulaire à différents iBETs** de nature chimique et sélectivités différentes dans les modèles cellulaires décrits ci-dessus. Ces analyses ont été réalisées en effectuant des tests de doses-réponses pour 6 composés iBETs, dont 3 pan-iBET et 3 BD2-sélectifs pour évaluer leur impact sur la prolifération et la viabilité cellulaire. Nos résultats nous ont tout d'abord permis de montrer que les pan-iBETs testés présentaient généralement un plus fort impact sur la prolifération et la viabilité cellulaire que les BD2-sélectifs, sur les différentes lignées. De plus, nous avons observé que les lignées présentant de forts niveaux de mortalité cellulaire suite aux différents traitements étaient des lignées présentant de forts niveaux protéiques de l'oncogène MYC.

**3. Identification des facteurs de sensibilité** à la cytotoxicité induite par les iBETs. Nous avons pour cela évalué si les niveaux d'expression des protéines BET elles-mêmes ou ceux de *c-MYC*, *BCL2* et *BCL6* étaient corrélés avec la cytotoxicité induite par les iBETs. Nous n'avons pas observé de corrélation entre réponse aux iBET et niveau d'expression des protéines BET. La relocalisation de BRD4 suite au traitement iBET ne semble pas non plus reliée avec la mortalité induite par ces molécules. Cependant, nous avons pu constater que les lignées avec des réarrangements *IG-MYC* et de forts niveaux de MYC présentaient de forts niveaux

de mortalité suite à l'inhibition des BET. Cela nous a donc conduit à évaluer la contribution de MYC dans la réponse aux iBETs en utilisant des modèles d'inactivation génique. Nos données indiquent que la cytotoxicité des iBETs est associée aux modèles ayant développés une dépendance à l'oncogène MYC.

#### **4. Exploration des voies de signalisation impliquées dans la résistance innée aux iBETs.**

Des analyses de RNAseq ont permis, dans un premier temps, d'identifier des signatures spécifiquement associées à la cytotoxicité induite par les iBET. Alors que les lignées résistantes à la mort cellulaire induite par les iBETs semblent dépendre de gènes nucléaires impliqués dans des processus de régulation de la prolifération, les lignées sensibles semblent, quant à elles, dépendre de gènes mitochondriaux ayant des fonctions dans le métabolisme et les voies de signalisation énergétique de la cellule. De plus, des analyses d'enrichissement de gènes effectuées sur les lignées sous traitement iBET, nous ont permis de déterminer des voies de signalisation impliquées dans la résistance à ces composés ouvrant de nouvelles pistes pour des approches combinatoires afin d'améliorer l'effet antitumoral des iBETs.

Certaines données, concernant l'impact de l'inactivation génique de MYC dans la lignée NUDUL-1 et l'interprétation des analyses transcriptomiques, restent encore à être complétées. Les analyses RNA-seq, ont mis en lumière l'implication de différentes grandes voies de signalisation dans la sensibilité et la résistance aux iBETs comme KRAS, mTORC1 et TGF $\beta$ . Nous avons également pu constater que les lignées sensibles à la mort cellulaire médiée par les iBETs, exprimaient un certain nombre de gènes associés à des processus métaboliques liés à l'activité mitochondriale. De plus, les analyses d'ontologie indiquent que ces gènes sont majoritairement sous le contrôle de MYC. Cette observation semble en cohérence avec ce qui est connu dans la littérature concernant l'implication de MYC dans le contrôle de plusieurs voies du métabolisme cellulaire (Dejure & Eilers, 2017; Dong et al., 2020). Dans ce contexte, il serait intéressant d'explorer les différences entre les deux grandes voies de production d'énergies que sont la glycolyse et la respiration mitochondriale, entre les lignées sensibles et résistantes suite à des traitements par iBETs. Ces analyses seront réalisées par des analyses de taux de consommation d'oxygène (OCR) et taux d'acidification extracellulaire (ECAR) via la technologie Agilent Seahorse. Ces données devraient permettre d'identifier quels inhibiteurs métaboliques pourraient être combinés aux iBET pour augmenter leur efficacité anti-tumorale, ce qui sera par la suite testé dans nos modèles cellulaires.

Ces expériences seront réalisées dans les prochaines semaines par les membres du laboratoire dans l'objectif de finaliser l'article scientifique pour une soumission avant l'été 2023.

Pour ce projet, j'ai réalisé l'intégralité des expériences présentées, avec l'aide de Sieme Hamaidia (Technicienne du laboratoire), et de Camille Teste (stagiaire de M1 sous ma supervision), à l'exception de la caractérisation cytogénétique et moléculaire des lignées (Christine Lefebvre et Sylvain Carras, CHU), et l'analyse bioinformatique poussée des données RNA-seq (Anouk Emadali, Patricia Betton-Fraisse). Les analyses de cycle cellulaire ont été réalisées avec l'aide de Thierry Bonnefoix (chercheur au laboratoire) pour la prise en main du logiciel ModFit. La mise en forme des heatmaps sur RStudio ont été réalisées par Émilie Montaut (Biostatisticienne au laboratoire).

## MYC oncogene addiction drives BET inhibition response in high-grade DLBCL

Loris Delrieu<sup>1</sup>, Sieme Hamaidia<sup>1,2</sup>, Patricia Betton-Fraisse<sup>1</sup>, Thierry Bonnefoix<sup>1,2</sup>, Camille Teste<sup>1</sup>, Emilie Montaut<sup>1,2</sup>, Christine Lefebvre<sup>1,3</sup>, Rémy Gressin<sup>1,4</sup>, Sylvain Carras<sup>1,3,4</sup>, Jérôme Govin<sup>1</sup>, Anouk Emadali<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CNRS, Institute for Advanced Biosciences, 38000 Grenoble, France, <sup>2</sup>Pôle Recherche et Innovation, Grenoble Alpes University Hospital, <sup>3</sup>Hematology, Oncogenetics and Immunology Unit, Grenoble Alpes University Hospital, France, <sup>4</sup>Département d'Hématologie Clinique, Grenoble Alpes University Hospital, France

### **Abstract**

Diffuse large cell B lymphoma (DLBCL) represents the most common form of non-Hodgkin's B lymphoma (NHL) and is characterized by a high biological and clinical heterogeneity. The current standard of care relies on an immunochemotherapeutic regimen called R-CHOP, which is effective for about 70% of patients. However, 30% of patients are refractory or relapse within two years. Among the primary refractory cases, there is a subtype called high-grade B lymphoma (HGBL) and is characterized by the presence of chromosomal rearrangements at the *c-MYC*, *BCL2* and/or *BCL6* loci. In this study, we aim to explore the potential of BET bromodomain inhibitors (BETi) in the context of HGBL for which few effective alternative therapies exist. We showed, using a diversity of HGBL cellular models, that BETi have different cell cytotoxicity patterns, depending on *c-MYC* genomic rearrangement, mutational status and protein expression level. We then demonstrated using gene invalidation experiment that BETi-induced cell death is related to MYC oncogene addiction. By comparing gene expression profiles between cell death-resistant and sensitive cell lines, we showed that the response to BETi is very different among cell lines with few commonly impacted genes. We also highlighted the importance of metabolic status, as well as KRAS, mTORC1 and TGFβ signaling pathways to predict response to BETi.

### **Introduction**

BET inhibition has been identified as a potential therapeutic strategy for both cancer and inflammatory diseases (Cochran et al., 2019). BET proteins (Bromodomain and Extra-Terminal domain) are a family of chromatin readers that include four members in humans: BRD2, BRD3, BRD4 and a testis-specific variant BRDT. Each protein has the same organisation with two bromodomains modules (BD1 and BD2) and an extra-terminal (ET) domain in their C-terminal moiety. BET bromodomains recognize acetylated lysines on histone and non-histone proteins, whereas the ET domain can interact with other nuclear proteins, thus creating a molecular platform that can modulate chromatin signaling (Filippakopoulos & Knapp, 2014b). While BETs have been related to different aspects of chromatin biology, such as DNA replication and mitotic bookmarking, their functions were mostly described in the

context of transcription regulation. BRD4, the most extensively studied family member, has been shown to be involved in Polymerase II-mediated transcription by recruiting several transcriptional regulators, including Mediator complex and activating transcription elongation factor b (P-TEFb) to gene promoters and enhancers (Filippakopoulos & Knapp, 2014b).

The hydrophobic nature of the bromodomain (BD) binding pocket of BET proteins has allowed the development of small inhibitory molecules (BETi), which prevent their interaction with their acetylated substrate. Two benzodiazepine-based compounds have been first described to modulate, respectively, oncogenic signaling mediated by the BRD4-NUT fusion protein in midline carcinoma (Filippakopoulos et al., 2010a) and inflammatory gene expression (Nicodeme et al., 2010a). This first-generation of compounds, which bind all 8 BET BDs, is now referred to as pan-BETi.

BETi anti-tumor activity has been initially attributed to their repressive effect on *c-MYC* transcription in MYC-driven malignancies, such as multiple myeloma (Delmore et al., 2011a), acute myeloid leukemia and Burkitt lymphoma (Mertz et al., 2011b). Later on, two major studies revealed that BET inhibition preferentially suppresses BRD4-dependent transcription mediated by super-enhancers in multiple myeloma (Lovén et al., 2013b) and lymphoma (Chapuy et al., 2013a) affecting oncogenic and lineage-specific transcriptional circuits. BETi therapeutic activity can therefore be attributed to specific subsets of target genes whose expression would be “hypersensitive” to BET inhibition in a cell-specific context.

High-grade B cell lymphoma (HGBL) is a recently described entity, previously referred to as double-hit (DH) or triple-hit (TH) DLBCL lymphoma. HGBL is very aggressive and treatment-refractory B-Cell malignancy presenting features of both Diffuse Large B Cell (DLBCL) and Burkitt lymphoma (BL). HGBL is notably defined by *c-MYC*, *BCL2* and/or *BCL6* gene rearrangements, which frequently involve BRD4-dependent regulatory regions of the *Ig* gene locus (Scott et al., 2018b). The only therapeutic option available today for these pathologies is treatment intensification and HGBL patients’ prognosis remains dismal. For this reason, the inhibition of BRD4, and more largely BET proteins, has raised the hope for the development of new therapeutic options for HGBL.

The response to diverse BETi chemical scaffolds has been evaluated in aggressive B-Cell lymphoma including DLBCL, BL and HGBL (Boi et al., 2015b; Ceribelli et al., 2014b; Chapuy et al., 2013a; Cummin et al., 2020; Esteve-Arenys et al., 2018; Hogg et al., 2016; W. Li et al., 2019b; Mertz et al., 2011b; Trabucco et al., 2015a). A large majority of lymphoma cell lines displayed a G1 cell cycle arrest upon exposure to BETi, as in several other types of hematological malignancies and solid tumors. This growth arrest correlates with a decrease in MYC expression. This observation is expected when chromosomal rearrangements place

*c-MYC* under the control of BET-dependent regulatory sequences, but is also observed in cellular models with wild-type *MYC* gene locus (Boi et al., 2015b; Chapuy et al., 2013a; Mertz et al., 2011b; Trabucco et al., 2015a). Moreover, a reduction in *MYC* expression does not always correlate with BET inhibition's impact on cell proliferation (Mertz et al., 2011b). Altogether, this suggests that *MYC* downregulation by itself may not be the main driver of the BETi's response and its anti-proliferative impact. This is further supported by the fact that *MYC*-induced murine lymphomas (E $\mu$ -*MYC*) are sensitive to BET inhibition while maintaining normal *MYC* expression levels (Bhadury et al., 2014).

BETi induce cell apoptosis or senescence only in several B-cell lymphoma models (Boi et al., 2015b; Ceribelli et al., 2014b; Chapuy et al., 2013a; Mertz et al., 2011b; Trabucco et al., 2015a). BETi-mediated apoptosis has been related to B-cell receptor (BCR) signaling-addicted DLBCL from the ABC subtype (Boi et al., 2015b; Ceribelli et al., 2014b) and seems to be independent of *TP53* mutational status (Hogg et al., 2016; Lasorsa et al., 2015). BET inhibition has also been shown to engage the mitochondrial apoptotic pathway through the regulation of pro- (BIM) and anti-apoptotic (BCL2/BCL-xL) BCL2 family members (Cummin et al., 2020; Hogg et al., 2016). However, these findings remain controversial since BETi have been shown to have no impact on BCL2 family members expression levels (W. Li et al., 2019b).

The therapeutic potential of BET inhibition when used as a single agent has been demonstrated in numerous preclinical xenograft (Ceribelli et al., 2014b; Chapuy et al., 2013a; Cummin et al., 2020; Esteve-Arenys et al., 2018; Mertz et al., 2011b; Trabucco et al., 2015a) or genetically-engineered (Bhadury et al., 2014; Hogg et al., 2016) mice models of aggressive lymphoma. Thus, several types of BETi are being evaluated in clinical trials mainly in hematological malignancies and solid tumors. Despite the promising results obtained mainly in hematological malignancies, BETi clinical development is impeded by significant side effects, potentially caused by off-target effects and their lack of selectivity towards the 8 human BET BDs (Shorstova et al., 2021b). Recent studies have demonstrated the potential of a new generation of selective inhibitors as antitumor agents. Namely, GSK788 which selectively inhibits BD1, and ABBV-744 and GSK046 which selectively inhibit BD2 (Faivre et al., 2020b; Gilan et al., 2020a). Their potential effects have not yet been evaluated in the context of B-Cell Lymphoma.

Several preclinical studies have also evaluated the synergic effect of BETi and other therapeutic agents such as cytarabine (Mertz et al., 2011b), BTK inhibitor – ibrutinib (Ceribelli et al., 2014b) or BCL2 inhibitor – venetoclax (Cummin et al., 2020; Esteve-Arenys et al., 2018). Interestingly, some of these combination therapies are now being evaluated in clinical trials for diverse indications in oncology and hemato-oncology (Shorstova et al., 2021b).

In this setting, a deeper understanding of the mechanism of action of BETi- presenting different chemical scaffolds and selectivities - in the context of extensively characterized B-cell lymphoma cell lines is required to rationalize the use of these molecules. This was performed here, with a special focus on HGBL, in the objective of identifying biomarkers that could predict BETi response in these pathologies as well as specific pathways related to BET resistance that could be targeted using combination therapies.

## **Material & Methods**

**Cell lines and culture conditions** - OCI-Ly1, OCI-Ly18, SUDHL-6, SUDHL-4, HT, NUDUL-1 (DLBCL), RAJI and RAMOS (BL) cell lines were purchased from DSMZ. B593 DLBCL cell line was developed in house (Callanan et al., 2000). NUDUL-1, OCI-Ly18, RIVA, RAMOS cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine, 100 mg/mL penicillin/streptomycin. SUDHL-4, SUDHL-6, HT, B593 and RAJI cell lines were cultured in RPMI Glutamax (Gibco) supplemented with 20% FBS, 1mM pyruvate sodium, 1% minimum essential medium non-essential amino acids (MEM NEAA) and 100 mg/mL penicillin/streptomycin. OCI-Ly1 cell line was grown in IMDM medium with 20% FBS and 100 mg/mL penicillin/streptomycin. All cells were grown at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cell culture reagents were purchased from Gibco. Prior to experimentation with the cell lines, Mycoplasma absence was confirmed by performing MycoAlert Assay (Lonza) according to manufacturer procedure.

**Cytogenetics** – B593, OCI-Ly18, OCI-Ly1, SUDHL-6, SUDHL-4, HT, HBL-1 and NUDUL-1 were prepared in a supplemented cell culture medium for cytogenetic analyses. Karyotype was performed on cell suspension following 17h unstimulated culture. Metaphase preparation slides for chromosome banding analysis were stained to reveal R-banding patterns. Karyotypes were described according to the current version of International System for Human Cytogenetic Nomenclature (*ISCN 2020 | Karger Book, s. d.*). Metaphase and interphase fluorescence hybridization (FISH) studies were performed on cytogenetic pellet using Dual Color breakapart probes (*BCL2*, *BCL6* and *c-MYC*, Cytocell) to detect the presence of *BCL2*, *BCL6* and/or *MYC* rearrangement. The detection of *IGH MYC* rearrangement was performed using a dual color dual fusion probe (XL *IGH/MYC* DF, Metasystems). Slides were fixed in methanol/acetic acid 3:1 for 30 min, air dried and dehydrated through graded alcohols. Both FISH probes and target DNA were denatured simultaneously for 1 min at 73°C, and incubated for 20h at 37°C. The post-hybridization washes were performed according to the manufacturer's instructions (Cytocell, Metasystems). A total of 100 nuclei were analyzed for each slide. FISH results on metaphases were interpreted with the karyotype for all cell lines tested.

**Next-Generation sequencing** - DNA was extracted from frozen cells samples using Promega RSC Blood DNA kit (Promega). Samples were analyzed using a homemade Ion Ampliseq panel (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA,) including coding regions and splice sites of genes of interest (*BCL2*, *BCOR*, *BIRC3*, *BTK*, *CCND3*, *CD79A*, *CD79B*, *CXCR4*, *DNMT3A*, *EZH2*, *FLT3*, *IDH1*, *MYD88*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *PLCG2*, *SF3B1*, *STAT5B*, *TET2* and *TP53*).

Ion Ampliseq libraries were prepared using 10ng of genomic DNA. Libraries qualification was performed with Agilent 4 200 Tape Station System. Two hundred base-read libraries templates were automated, prepared with Ion 510 & Ion 520 & Ion 530 kit on Ion Chef system, and sequenced on Ion GeneStudio S5 Plus system. All steps were carried out according to manufacturer's instructions, and reagents and equipment were manufactured by Thermo Fischer Scientific. Torrent Suite version 5.0 software was independently used to perform primary analysis. Binary alignment/map files were used by Torrent Suite Variant Caller to detect point mutations and short indels. Samples were considered of sufficient quality when >90% of targeted bases were read with a base call accuracy of at least Q20. A threshold of 500X was considered as minimal coverage, base per base and median sequencing depth was >1000X. Variant cut-off for calling a somatic variant was 10% to avoid false positive variants notably from FFPE samples. Common single nucleotide polymorphisms (SNPs) as reported >2% by dbSNP databases were excluded from analysis. Non-synonymous mutation of coding sequences and in splice site region were interpreted using Varsome, COSMIC and IARC TP53 databases.

**c-MYC exon 2 sequencing** – Genomic DNA was extracted from DLBCL cell lines with the “Genomic DNA from Tissue” kit (Macherey-Nagel). c-MYC exon 2 region was amplified by PCR using specific primers (Forward: ATTTTCGATTCCTCTGCCGCT, Reverse: AGCGACTCTGGTAAGCGAAG) and Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (Thermo Scientific). and sequenced.

**RNA extraction & RT-qPCR** - Total RNA was extracted from 3 million cells with NucleoSpin RNA extraction kit (Macherey-Nagel) according to manufacturer's instructions. Reverse transcription was carried out following RT Superscript™ III kit (Invitrogen RT) from 1µg extracted RNA. Target genes were amplified using PCR primers (Table 1) and quantified by qPCR on a thermocycler CF384 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad). Ct values (cycle threshold) were analyzed with CFX Manager™ Software (Bio-Rad) and normalized to GAPDH.

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
<b>c-MYC</b>	GGCTCCTGGCAAAGGTCA	CTGCGTAGTTGTGCTGATGT
<b>BCL2</b>	GTGGATGACTGAGTACCTGAAC	GAGACAGCCAGGAGAAATCAA
<b>BCL6</b>	TCTGGAGAGAAGCCCTACAA	CCACAGATTTACAGGGATAGG
<b>BRD4</b>	CAAGCTGAACCTCCCTGATTAC	TGGATACATTCCTGAGCATTCC
<b>BRD3</b>	GTGTGCGTTAGACTTGATGAGA	GGGTCATCGGGTTAGCATT
<b>BRD2</b>	GCCCATGAGTTACGATGAGAAG	GCTCCCTGGCTTGGATTATATG
<b>HEXIM1</b>	CCGAGGCCAGTAAGTTGGG	GACGGCGTCTCCTATGTTT
<b>GAPDH</b>	CCACTCCTCCACCTTTGAC	ACCCTGTTGCTGTAGCCA

**Table 1**

**Western blot** – 5 million cells were harvested, washed 2 times with cold PBS and centrifuged at 200 g for 6 min. Proteins were extracted with 100 µL of RIPA 1X buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% NP-40). Lysates were incubated 30 min at 4°C under agitation. Samples were then sonicated with Vibra Cell sonicator (15 seconds ON/OFF for 1 minute per sample). Then, samples were centrifuged 20 min at 16 000g and 4°C to clear insoluble material and quantified with Bradford protein assay. Then, 1X LDS with reducing agent (Invitrogen) was added to the samples. After 5 min denaturation at 95°C and 5 min centrifugation at 20000 g, 10 µg of each sample was loaded on a gradient gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Invitrogen) along with the molecular weight ladder Precision Plus Dual Color Standards (BioRad) and run in MES buffer (Invitrogen). The proteins were transferred on an activated (in 100% ethanol) PVDF membrane for 1 hour at 100V at 4°C in Tris Glycine 10% ethanol buffer. Membranes were blocked in either 5% milk or BSA in PBS-Tween (PBST) or TBS-Tween (TBST) for 1 hour, and incubated overnight with primary antibodies under constant rotation at 4°C. The following primary antibodies were used: anti-MYC 1/1000 TBST 5% BSA (rabbit, #A9169, Cell Signaling), anti-BCL2 1/1000 PBST 5% milk (mouse, #sc-7382, Santa-Cruz Biotechnology), anti-BCL6 1/2000 PBST 5% milk (mouse, #sc-7388, Santa-Cruz Biotechnology), anti-BRD4 1/1000 PBST 5 % milk (rabbit, # A301-985A, Bethyl laboratories), anti-BRD3 1/1000 PBST 5 % milk (rabbit, #A302-368A, Bethyl laboratories), anti-BRD2 1/2,000 PBST 5% milk (rabbit, #A302-583A, Bethyl laboratories), anti-αTubulin 1/5000 PBST 5 % milk (mouse, #T5168, Merck), anti-H4 1/5000 PBST 5 % milk (rabbit, #05-858, Upstate). The membranes were washed three times in PBST or TBST, incubated with the following secondary antibody: goat anti-rabbit IgG peroxidase 1/10 000 (#A9169-2ML, Merck) or polyclonal rabbit anti-mouse IgG peroxidase 1/2000 (#P026002-2, Agilent) for 1h at room temperature, washed three times and revealed with Luminol/peroxidase mix Clarity Western ECL (Biorad). Acquisitions were realized using Vilber imaging system.

**shMYC-inducible cell lines** – The following shRNA sequences targeting MYC (shMYCA: GCAATCACCTATGAACTTGTT and shMYCB: GACGACGAGACCTTCATCAAA from (Zippo et al., 2007) or not (shControl : CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG) were used. Primers were annealed using AgeI/EcoRI restriction and cloned in a pLKO Tet-On inducible plasmid as described in (Wiederschain et al., 2009). Lentiviral particles carrying each vector were packaged in the Plateau de Vectorologie (ENS Lyon). B593, SUDHL-4 and OCI-Ly1 cell lines were transduced with lentiviral particles at multiplicity of infection (MOI) of 10, and NUDUL-1 with a MOI of 20. Viral particles were washed after 24 hours. 1 µg/mL of puromycin was added at day 3. Cells were harvested and used for induction at day 7. Induction was performed with doxycycline at 200ng/mL during 72h for B593, SUDHL-4 and OCI-Ly1, and with 500ng/mL

during 72h for NUDUL-1. Knockdown efficiency was assessed by Western Blot. Specific mortality after 72h MYC knock-down was calculated by:

$$\frac{\% \text{ apoptotic cells shRNA tested} - \% \text{ apoptotic cells shCTRL}}{100 - \% \text{ apoptotic cells shCTRL}} \times 100$$

**Cell cycle analysis** – 1M cells were harvested and washed one time in PBS. The pellet was resuspended in 100µL PBS and fixed with 900µL of cold ethanol (70%) added drop by drop under constant agitation of the sample collection tube. After 30 minutes, the samples were stored at -20°C for some days. The day of the analysis, samples were slowly thawed at 4°C and then centrifuged (2000 RPM, 10 minutes). The pellet was resuspended in 1mL of PBS in order to complete rehydration of the fixed samples during 4h at 4°C. After rehydration, cells were collected by centrifugation (2000 RPM, 5min) and resuspended in 1mL PBS, 10µg/mL of RNase A (Sigma Aldrich) and 10µg/mL propidium iodide (Sigma Aldrich). Samples were incubated at room temperature in the dark during 30 minutes before being analyzed by flow cytometry (LSRII system, BD Biosciences). Data were analyzed using ModFit LT software.

**Assessment of cell proliferation and cell death** – Cell viability and proliferation were determined by dual Annexin V-FITC (BD Biosciences) and propidium iodide (Sigma Aldrich) staining and by numeration of the absolute count of fluorescent beads (Precision count beads, Biologends) and cells ratio. First, 0,1µg/mL Annexin V was diluted in Binding buffer solution (0,1M HEPES pH7.4, 1,4M NaCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>). Next, cells were harvested and washed with PBS and stained in 100µL of Annexin V staining mix at room temperature for 10 minutes in the dark. Then, 100µL of Binding Buffer 1X and 50µL of Precision count beads were added. Finally, 5µg/mL propidium iodide is added at the last minute before flow cytometry analysis (10 000 events analyzed per condition). Alive cells, apoptotic cells, and fluorescent beads populations were gated in order to get the number of events for each population. Cell viability was determined by the ratio of the number of alive cells events (AnV-/IP-) and that of apoptotic cells events (AnV+/IP-, AnV+/IP+) comparing to the total number of events. Cell proliferation was determined by the comparison between cell concentration at different timepoints or between different treatment conditions. The below formula was used, according to the Precision count beads' manufacturer protocol, to determine absolute cell count in each condition.

$$\text{Absolute Cell Count (Cells/}\mu\text{L)} = \frac{\text{Cell Count}}{\text{Precision Count Beads}^{\text{TM}} \text{ Count}} \times \text{Precision Count Beads}^{\text{TM}} \text{ Concentration (Beads/}\mu\text{L)}$$

**BET inhibitors treatments** – Dose response experiments were performed on all DLBCL and BL cell lines in order to determine IC<sub>50</sub> of 6 BET inhibitors of different selectivity. JQ1 was synthesized as described previously in (Emadali et al., 2013). I-BET726, I-BET762 and RVX-208 have been purchased from Selleckchem. GSK-046 has been purchased from Chemietek and ABBV-744 from Abmole. All compounds were dissolved in DMSO solvent. Cell lines were treated for 48h with either 10nM, 100nM, 500nM, 1µM, 10µM, 100µM for JQ1, I-BET762, I-BET726, ABBV-744, GSK-046. For RVX-208 cell lines were treated with either 100nM, 1µM, 5µM, 10µM, 100µM, 1mM.

**Cellular fractionation** – 20 million of cells were harvested, and washed two times in PBS, by smooth centrifugation at 4°C (200g, 6 minutes). The pellet was then resuspended in 100µL of fresh extraction buffer on ice composed of: Base buffer 1X (60mM KCl, 15mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM EGTA pH8.0 dissolved in ultrapure water), 0,3M sucrose, 0,5mM DTT, 0,1% NP-40/IGEPAL, 0,2mM spermine, 0,65mM spermidine and cOmplete EDTA-free Protease inhibitor cocktail 1X dissolved in ultrapure water. Cell lysis was monitored under microscope by trypan blue staining of free nuclei on a glass slide. Volume of extraction buffer was then adapted to obtain a complete lysis of cellular plasma membranes. The free nuclei were centrifuged at 4°C (420g, 3min) and the cytoplasmic fraction was collected in new tubes. The nuclei pellet was washed two times, to remove all traces of cytoplasmic fraction, with 150µL of extraction buffer without NP-40 and centrifuged at 4°C at high speed (1000g, 10min). The pellet was then resuspended in 500µL of extraction buffer and dissociated with a 23G needle and put on a wheel for 30 minutes at 4°C. Nuclei lysis was monitored under microscope by trypan blue staining. After incubation the samples were centrifuged at high speed (20000g, 5 minutes, 4°C) and the soluble nuclear fraction (nucleoplasm) was collected in new tubes. The chromatin pellet is resuspended in 100µL of LDS 1X mix: LDS 4X (Invitrogen) Reducing agent 10X (Invitrogen) and ultrapure water. The chromatin samples was sonicated (Bioruptor pico) in dedicated diagenode 1,5mL tubes for 15 cycles (30s ON, 30s OFF). After sonication the insoluble nuclear fraction (chromatin proteins) was collected in new tubes by high speed centrifugation (20000g, 5 minutes, 4°C).

**RNA sequencing** – B593, NUDUL-1, SUDHL-4 and OCI-Ly1 cell lines were treated with 500nM of either JQ1 or ABBV-744 for 24h. DMSO treatment was taken as the control condition. Total RNA, from 3 biological replicates, were extracted and purified according to the procedure mentioned in the RNA extraction & qPCR section. Purity of RNA was monitored by nanodrop analysis in order to get a 260/280 and 260/230 ratios of 2. RNA paired-ended sequencing and stranded library were performed by BGI genomics sequencing platform from 500ng total RNA in 10µL of ultrapure water. Sequencing depth is 30 million reads per sample. The bioinformatic analysis pipeline can be summarized as follows: reads were quality-checked

using FastQC. Reads were then aligned to *H. sapiens* genome build hg38 using STAR 2.7.1a [23104886]. Raw read counts for each gene were calculated using HTSeqCount 0.11.2 using defaults parameters [35561197]. Read count data was normalized using the R packages SARTools 1.7.4 [27280887] and/or DESeq2 1.32.0 [25516281] with R 4.1.0 (*R Core Team (2020)*. — *European Environment Agency*, s. d.). DESeq2 normalized read counts were used to identify differentially expressed genes with an adjusted p-value < 0.05 and a fold change below -2 or above 2.

## **Results and discussion**

### ***Detailed characterization of DLBCL model cell lines***

In order to precisely characterize the B-Cell lymphoma cellular models used to study BET inhibition, we performed cytogenetics, Next-Generation sequencing (NGS) and gene expression profiling for relevant gene targets in 8 DLBCL cell lines, selected to reflect disease genetic heterogeneity. First, the DH/TH status was validated by performing karyotyping and FISH analysis (Fig1A, S1A) using probes covering *c-MYC*, *BCL2* and *BCL6* loci. We confirmed the DH status implicating *c-MYC* and *BCL2* gene rearrangement for 4 cell lines (namely B593, OCI-Ly18, OCI-Ly1 and SUDHL-6) and also identified whether or not these rearrangements involved the *IG* locus (Fig1A). SUDHL-4 was identified as a TH with non-*IG-MYC* and non-*IG-BCL6* and *IG-BCL2* gene rearrangement. Coherently with the literature, these DH/TH cell lines belong to the GCB group (Rosenthal & Younes, 2017).

Targeted sequencing was also performed using a panel of 20 genes frequently mutated in lymphoma, and revealed mutations in *BCL2*, *EZH2* or *TP53* in 4 out of the 8 DLBCL cell lines (Fig1B) consistently with literature and public database (<https://depmap.org/portal/>) reports. In addition, the mutational status of *c-MYC* second exon was explored by Sanger sequencing and revealed the presence of a stabilizing T58 substitution (Sears, 2004a) in NUDUL-1 cell line (Fig1B, S1B), as well as other SNV in B593 and OCI-Ly18.

To evaluate whether their genetic alterations would affect gene expression and protein levels, MYC, BCL2, BCL6 levels were assessed by RT-qPCR and western blot (Fig1C). This was performed for the 8 DLBCL cell lines described above, as well as for 2 Burkitt lymphoma (BL) cell lines, characterized by an *IG-MYC* gene rearrangement. mRNA and protein profiles of these three genes are heterogeneous among cell lines, but show no obvious correlation was identified for *BCL2* and *BCL6* gene alterations and mRNA/protein levels (Fig1D).

In contrast, *IG-MYC* gene rearrangement, especially when co-occurring with MYC stabilizing mutations can translate into high MYC protein levels as observed for NUDUL-1 cell line (Fig1C). However, no strict correlation could be identified in other cellular models, including the *IG-MYC* rearranged BL lines, which show moderate MYC protein expression (Fig1C). Altogether, this systematic analysis of MYC rearrangement and mutational status showed that *IG-MYC* gene rearrangement is not always associated with very high MYC protein levels.

### ***Evaluation of response to pan- and BD2-selective BET inhibitors in lymphoma cells***

These model cell lines were then subjected to BETi treatment. We chose to evaluate both pan-BETi (JQ1, IBET-762 and IBET-726) and BD2-selective compounds (RVX-208, GSK-046 and ABBV-744). Dose-response experiments were conducted on 7 DLBCL and 2 BL cell lines in order to determine the exact impact of each of these inhibitors on cell proliferation and viability (Fig2A).

Analysis of cell proliferation revealed an impact of pan-BETi across all cell lines (Fig2B, S2A) with EC50 in the 100nM-1µM range. In comparison, BD2-selective compounds exhibited a modest effect on cell proliferation except for ABBV-744 (Fig2B, S2A). This could be expected since ABBV-744 was described to have anti-tumor activity in prostate cancer models (Faivre et al., 2020b), whereas RVX-208 and GSK-046 were reported for their anti-inflammatory effect (Gilan et al., 2020a; Nicodeme et al., 2010a; Picaud et al., 2013b). Thus, providing an opportunity to explore the anti-tumor activity of ABBV-744 in the context of B-Cell lymphoma.

In contrast, analysis of cell viability showed heterogeneous responses across the different cell lines, with B593 and NUDUL-1 showing a high sensitivity to BETi-induced cell death (Fig2B). As observed for cell proliferation, ABBV-744 was the only BD2-selective BETi impacting lymphoma cell viability (Fig2B), even though in a lesser extent compared to pan-BETi.

Altogether these results show that pan-BETi, as well as ABBV-744, have a similar cytostatic activity in DLBCL and BL cell models. However, their cytotoxic activity differs between cellular models. The reasons for this difference remain unclear: therefore, we selected JQ1 and ABBV-744 to dissect how these compounds affect lymphoma cells.

### ***BETi-induced cell death is independent of BET protein expression and localization***

We tested whether BET protein basal levels could explain how lymphoma cells respond to BETi. Western blot analysed BRD2, BRD3 and BRD4 protein levels, revealed heterogeneous protein profiles across cell lines (Fig3A). No significant correlation could be observed for either BRD4, BRD3 and BRD2 with BETi-induced cell death (FigS3).

We then questioned whether JQ1 and ABBV-744 could induce distinct relocalization of BET proteins between BETi-induced cell death sensitive and resistant cellular models. Their respective abundance was quantified in chromatin, as well as in nucleo- and cyto-soluble fractions (Fig3B). These data confirmed that JQ1-induced induced a massive release of chromatin-bound BRD4, with a relocalization shared between nucleoplasm and cytoplasm. As expected from previously published data (Faivre et al., 2020b), BRD4 remains mostly

associated to chromatin upon ABBV-744 BD2-selective treatment (Fig3B), because BRD4 BD1 is sufficient to anchor BRD to chromatin. In any case, we could not highlight any association between BET release from chromatin and BET-induced cell death in these models.

### ***BETi cytotoxicity is strongly associated with basal MYC protein levels but not with MYC downregulation***

We then further investigated whether *c-MYC*, *BCL2* and *BCL6* mutations or gene expression could be related to BETi-induced cell death. We observed a strong positive correlation between MYC protein level and BETi-induced cell death for both JQ1 ( $R^2=0.87$ ,  $p<0.001$ ) and ABBV-744 ( $R^2=0.90$ ,  $p<0.001$ ) (Fig4A). As shown in Fig 1D, MYC expression level does not strictly correlate with the presence of *IG-MYC* rearrangements and *MYC* locus mutations. Here, we demonstrate that high MYC basal protein level is a driver of BETi-induced cell death and could be used, rather than *MYC* rearrangements or mutations, as a predictor of BETi efficacy in lymphoma.

To further explore MYC involvement in BETi response in DLBCL cell lines, we treated B593 and NUDUL-1 (cell death sensitive) as well as SUDHL-4 and OCI-Ly1 (cell death resistant) cell lines with 500nM of JQ1 and ABBV-744 for 6h and 24h and evaluated MYC protein levels by western blot. The results showed that JQ1 induces a decrease in MYC protein level in both BETi sensitive and resistant cell lines (Fig4B). This indicates that MYC downregulation, which is similar between resistant and sensitive models (Fig4B), does not seem to be as central as thought in the BETi anti-tumor effects. Interestingly, we can notice that the BD2-selective compound ABBV-744 induced a decrease in MYC expression only in SUDHL-4 and OCI-Ly1 cell death-resistant models. This suggests a distinct mechanism of action of BD2-selective compounds between these models.

### ***BETi-induced cell death is restricted to MYC-addicted lymphoma cell lines***

To further characterize MYC involvement in BETi-induced lymphoma cell death, we compared the respective impact of MYC knockdown and BETi treatment on cell proliferation, apoptosis and cell cycle for B593, NUDUL-1, SUDHL-4 and OCI-Ly1 cell lines. Similar levels of MYC downregulation were achieved with both approaches (FigS5). Follow-up of cell proliferation for 72h showed that JQ1 induces growth arrest (Fig5A), by blocking cells in G1 phase (Fig5B), whereas ABBV-744 only induces a slowdown of proliferation in all four cell lines. Comparatively, MYC knockdown induces cell growth arrest only in B593, and is being

confirmed for NUDUL-1. This data suggests that MYC is not mediating the growth arrest observed upon BETi treatment in SUDHL-4 and OCI-Ly1.

In cell viability assessment, JQ1 induced high levels of apoptotic cell death in B593 and NUDUL-1 compared to SUDHL-4 and OCI-Ly1 (Fig5C). Similarly, MYC knockdown did not show any effect on SUDHL-4 and OCI-Ly1, but showed impaired cell viability in both B593 and NUDUL-1 (Fig5C).

Taken together, these results show that B593 and NUDUL-1 increased sensitivity to BETi-induced cell death could be explained by their addiction to MYC oncogene. Moreover, the growth arrest observed in models resistant to BETi-induced cell death does not seem to be mediated through MYC.

### ***BETi cytotoxicity is associated with specific innate and acquired metabolic gene signatures***

To get a global view of the genes and pathways associated with both innate and acquired resistance to BET cytotoxicity, we performed gene expression profiling on B593, NUDUL-1, SUDHL4 and OCI-Ly1 cell lines using RNA sequencing. First, we compared basal gene expression profiles between cell death-sensitive and resistant cell lines. This revealed 239 genes upregulated and 120 genes downregulated in SUDHL4 and OCI-Ly1 compared to B593 and NUDUL-1 cells (Fig6A). An ontology analysis showed that cell death-sensitive models express more mitochondrial genes associated with cell metabolism and energy pathways as well as apoptotic response (Fig6B, upper and middle panels). In contrast, cell death-resistant models seem to depend preferably on nuclear genes involved in cell cycle regulation and signal transduction. Interestingly, these differential genes seem to rely on different subsets of transcription factors (Fig6B, lower panels), including MYC for cells B593 and NUDUL-1, further confirming the link between BETi-induced cytotoxicity and MYC oncogene addiction.

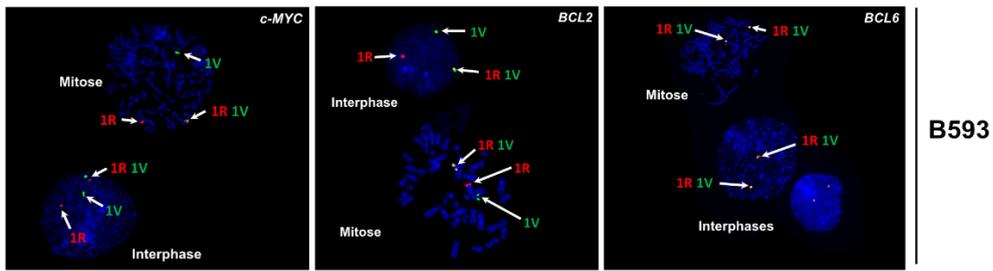
We then investigated and compared the impact of BETi treatment on gene expression profiles of the same four cell models. As shown in Fig6C-D, few genes were commonly affected by BETi between cell lines regardless of whether they are resistant or sensitive to BET cytotoxicity. A gene set enrichment analysis revealed that MYC target genes and genes involved in immune response are commonly impacted in all cell lines (Fig6E). Interestingly, we identified signaling pathways specifically associated with sensitivity (downregulation of KRAS) or resistance (downregulation of mTORC1 signaling and upregulation of TGF beta signaling) (Fig6E) suggesting TGF beta pathway inhibition could be used in combination with BETi to improve their therapeutic activity.

In summary, we have shown, using aggressive lymphoma cell models including LBDGC and HGBL, analyzed by cytogenetic and molecular approaches, that BETi exhibit different cytotoxicity profiles, depending on *c-MYC* genomic rearrangement, mutational status and protein expression level. Invalidation of MYC expression in these models suggests that BETi-induced cell death is related to their addiction to MYC oncogene. By comparing gene expression profiles between cell death resistant and sensitive cell lines, we showed that the response to BETi is very different between cell lines, with few commonly impacted genes. We also highlighted the importance of the metabolic status of the cells, as well as the alterations of the KRAS, mTORC1 and TGF $\beta$  signaling pathways in predicting the response to these compounds.

This work should allow to better identify patients likely to respond to BETi and to propose new therapeutic combinations targeting these signaling pathways in order to potentiate the anti-tumor efficacy of BETi in refractory lymphomas.

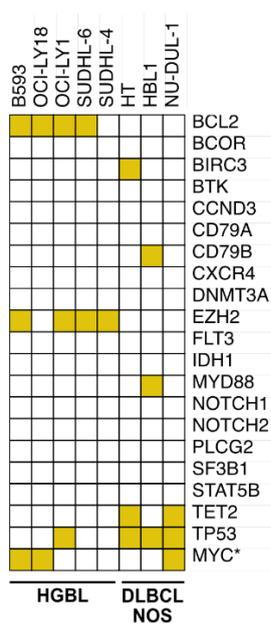
**Figure 1**

**A**

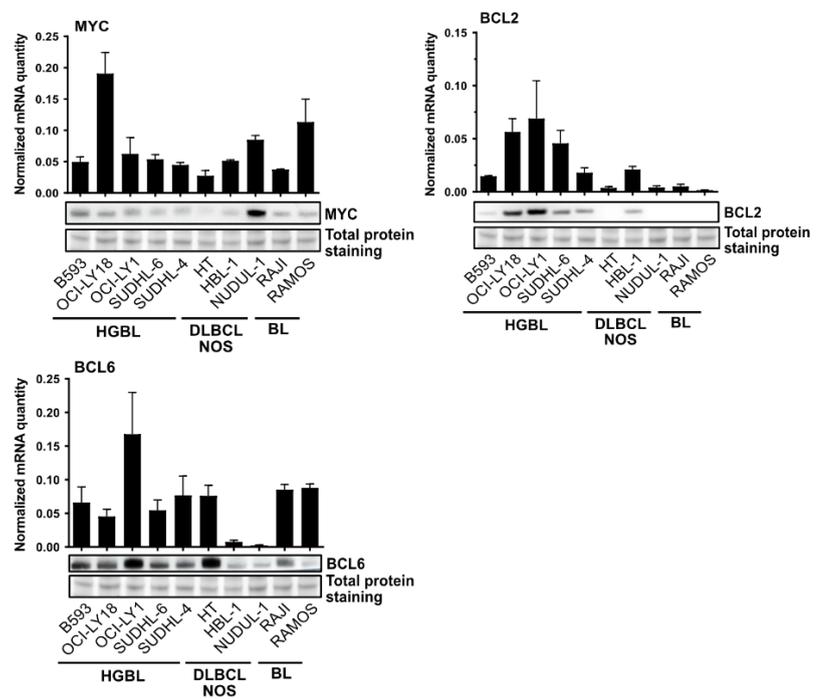


	HGBL					DLBCL NOS		
	B593	OCI-LY18	OCI-LY1	SUDHL-6	SUDHL-4	HT	HBL-1	NUDUL-1
<i>c-MYC</i>	IG	IG	Non-IG	Non-IG	Non-IG	NL	NL	IG
<i>BCL2</i>	IG	Non-IG	Non-IG	IG	IG	NL	Extra-copies	NLNL
<i>BCL6</i>	NL	NL	Extra-copies	NL	Non-IG	NL	Extra-copies	NL

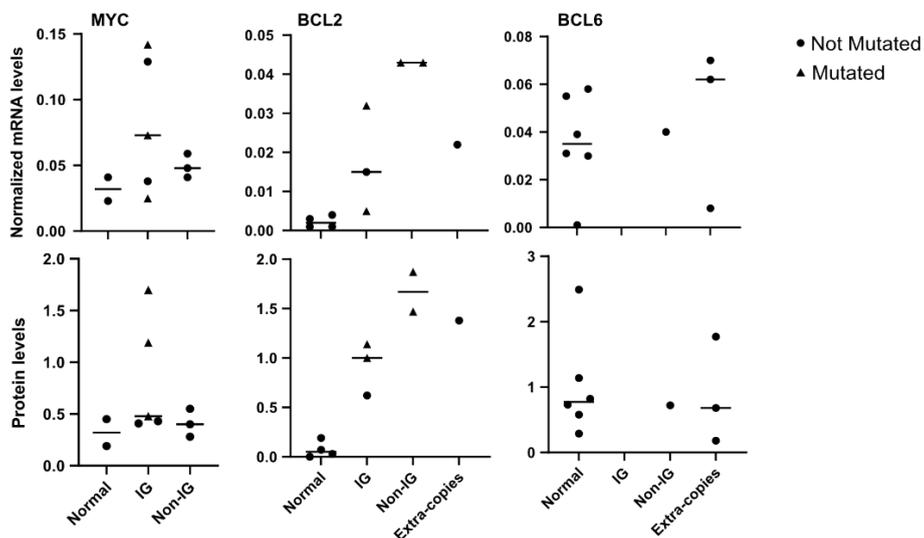
**B**



**C**

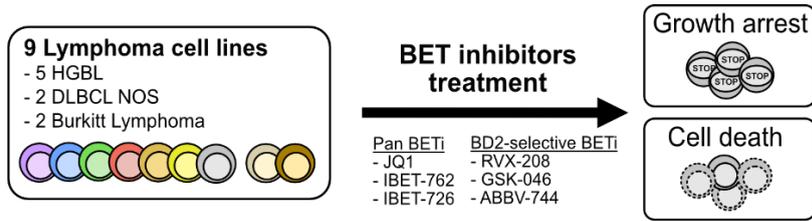


**D**

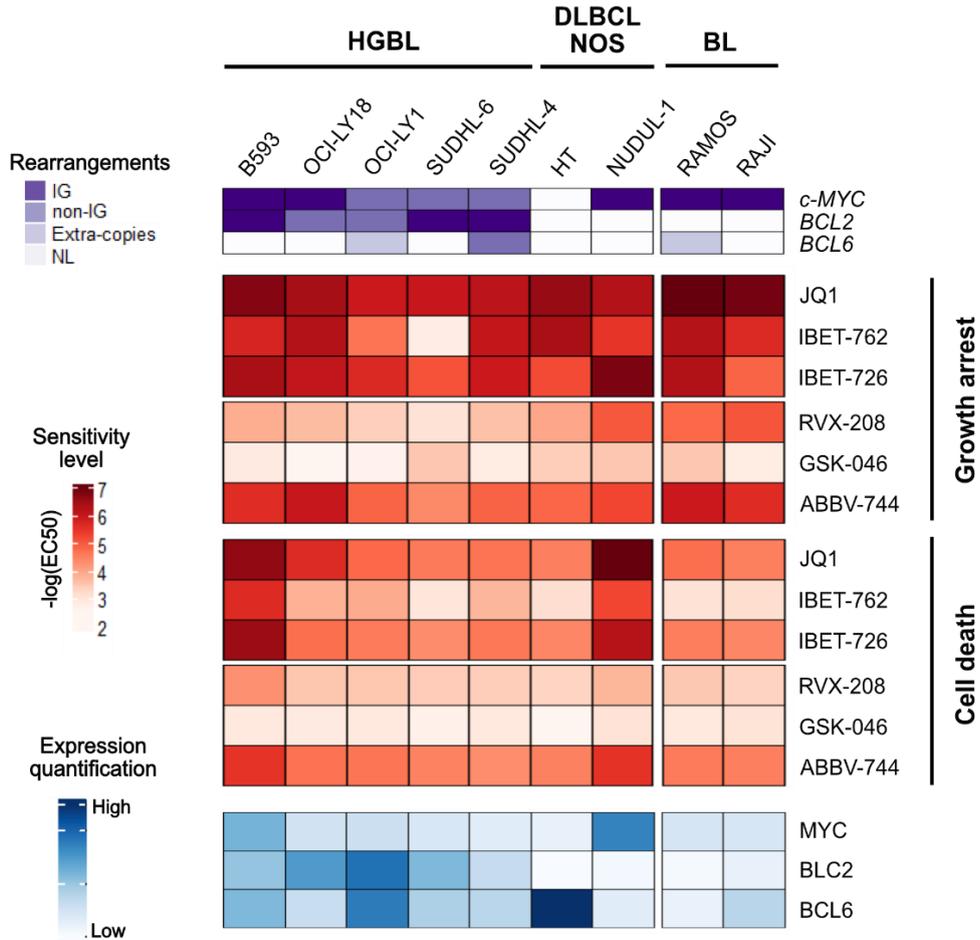


**Figure 2**

**A**

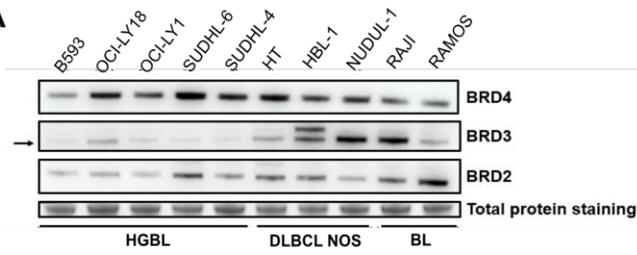


**B**

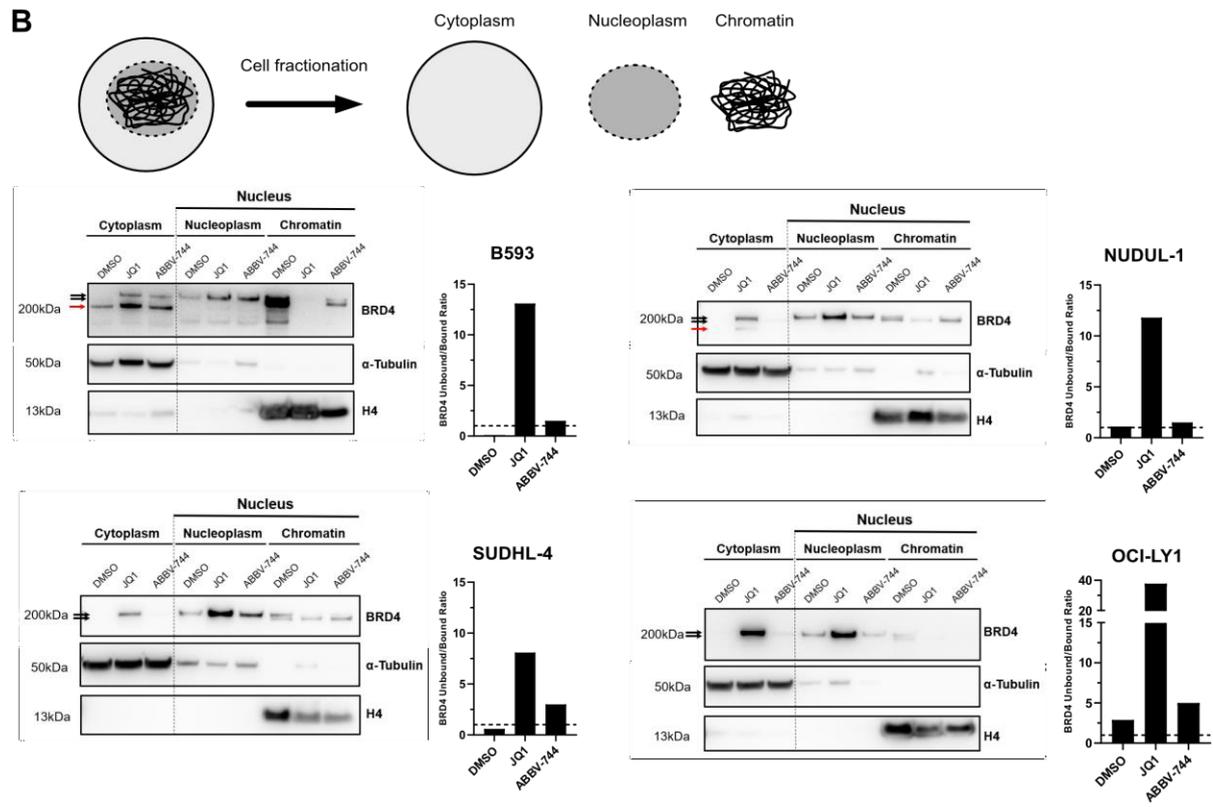


**Figure 3**

**A**

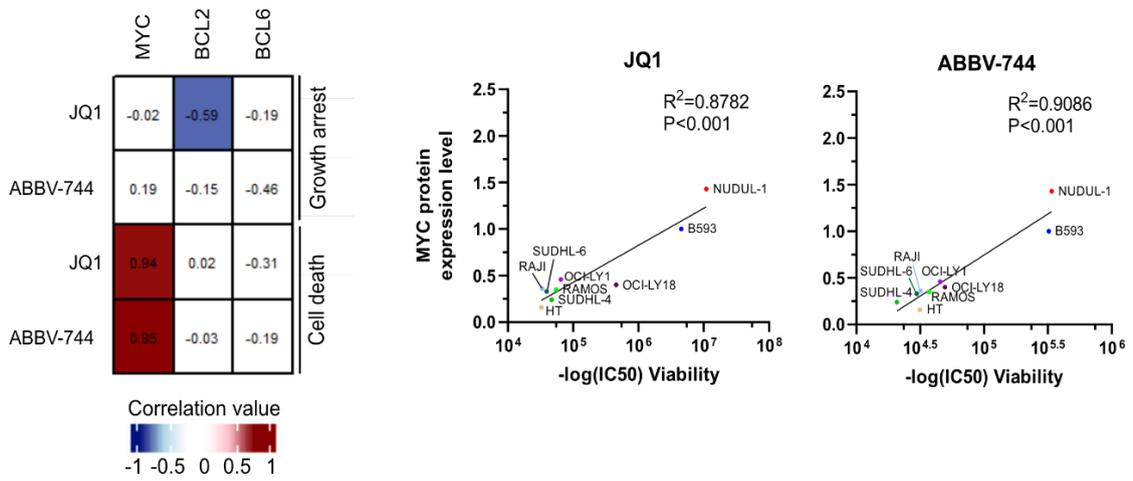


**B**



**Figure 4**

**A**

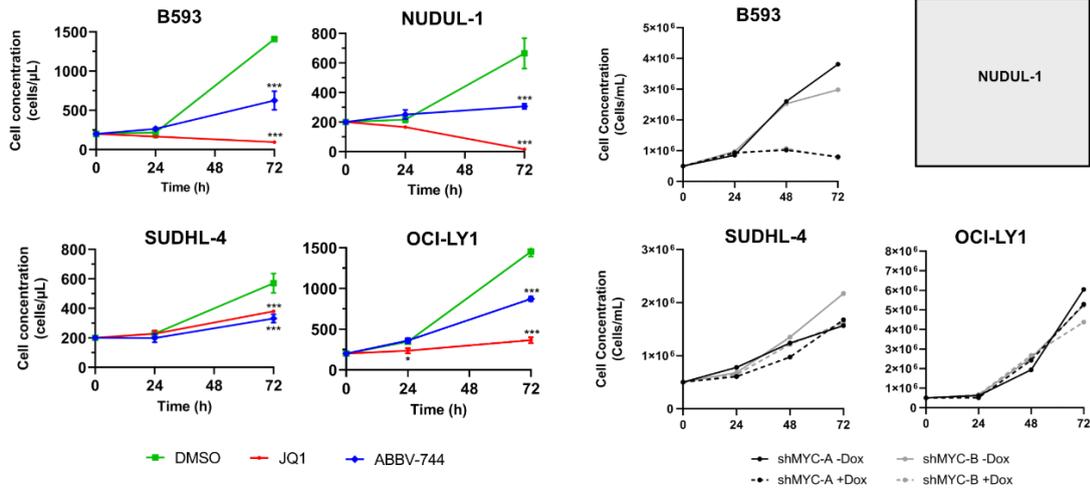


**B**

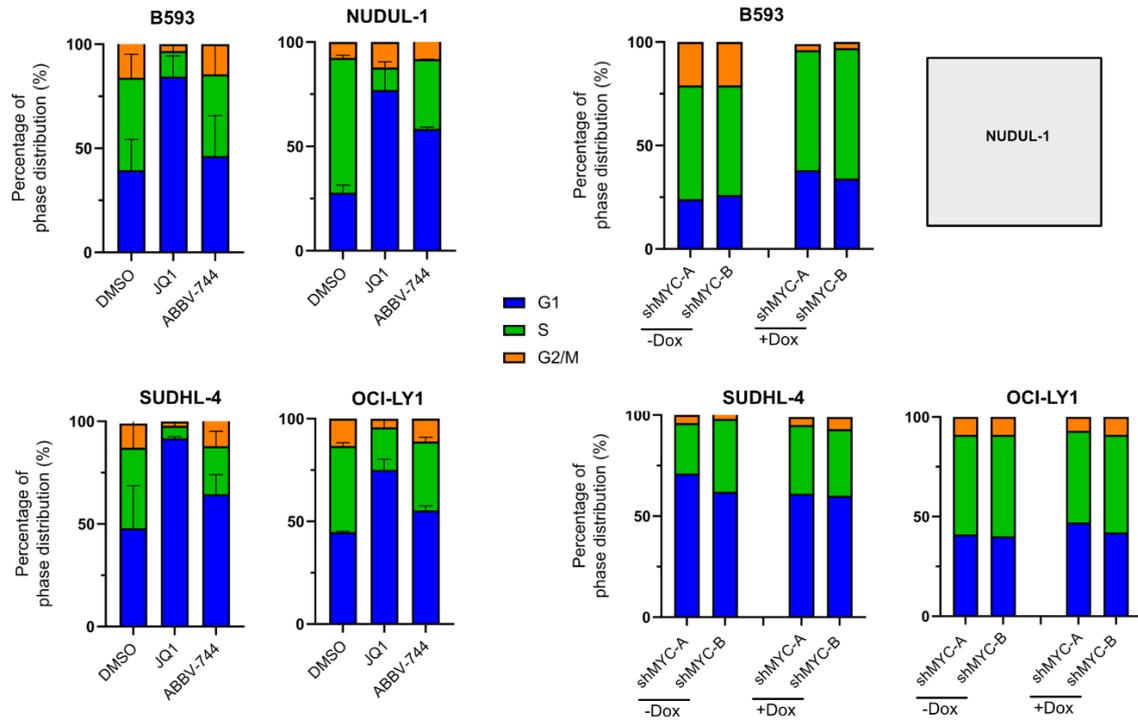


**Figure 5**

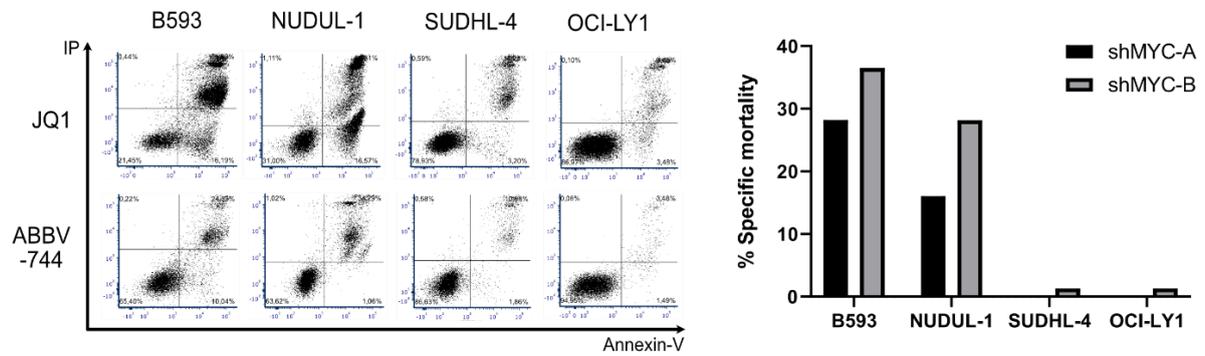
**A**



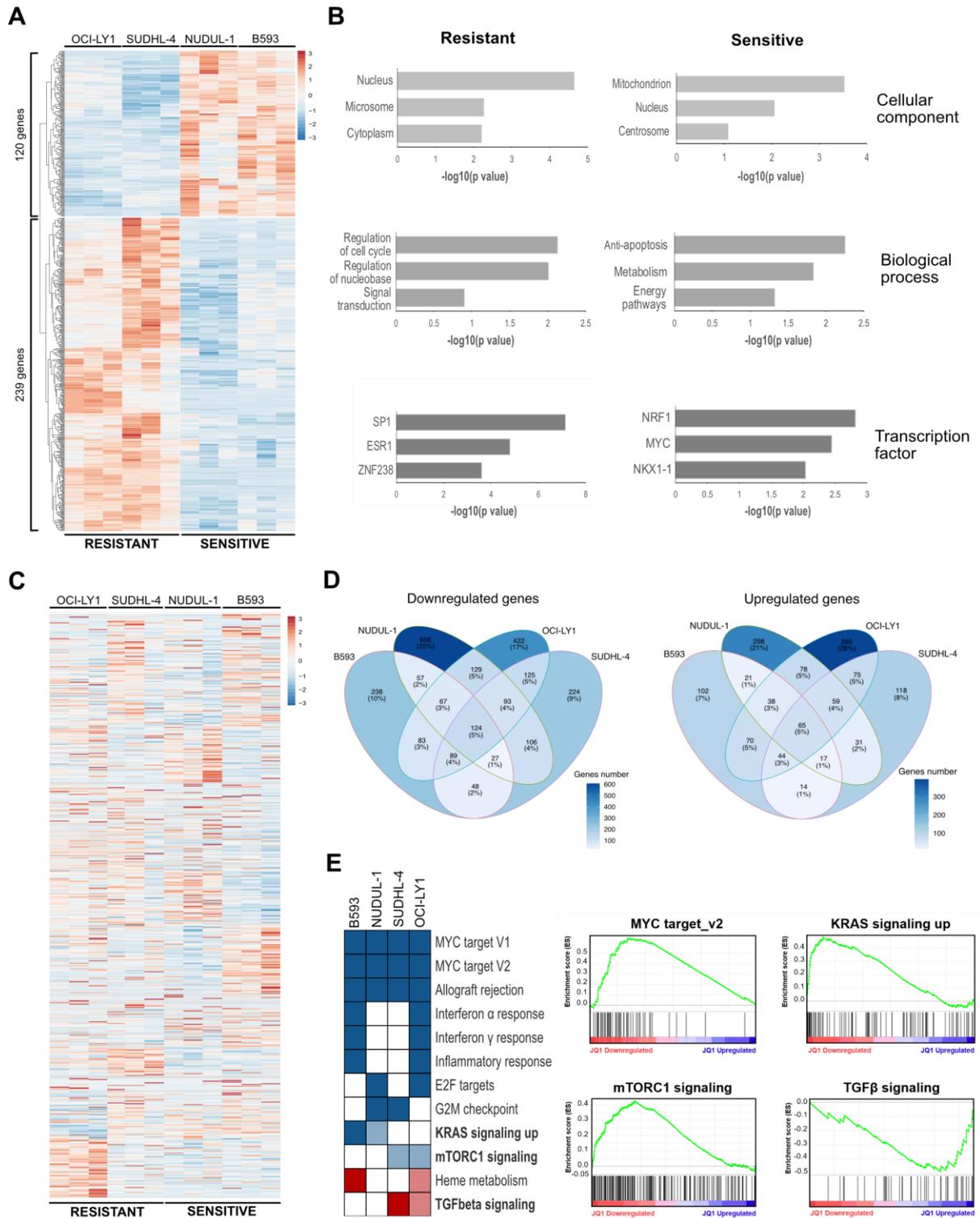
**B**



**C**

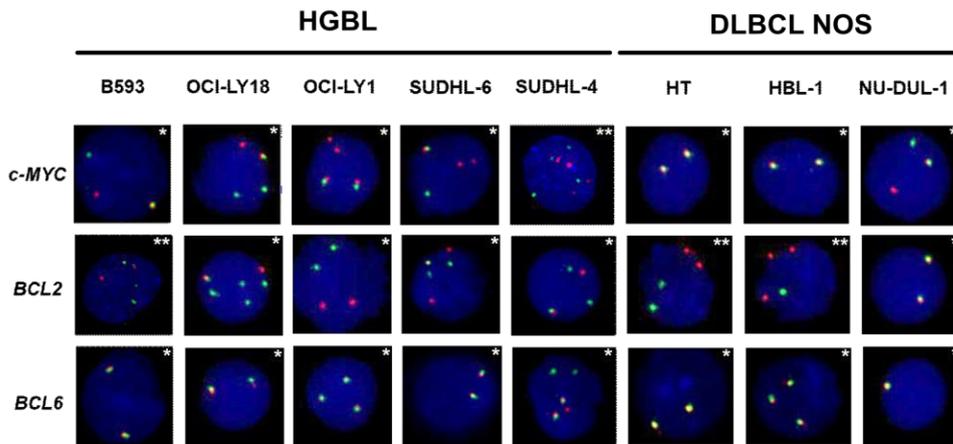


**Figure 6**



# Supplementary Figure 1

**A**

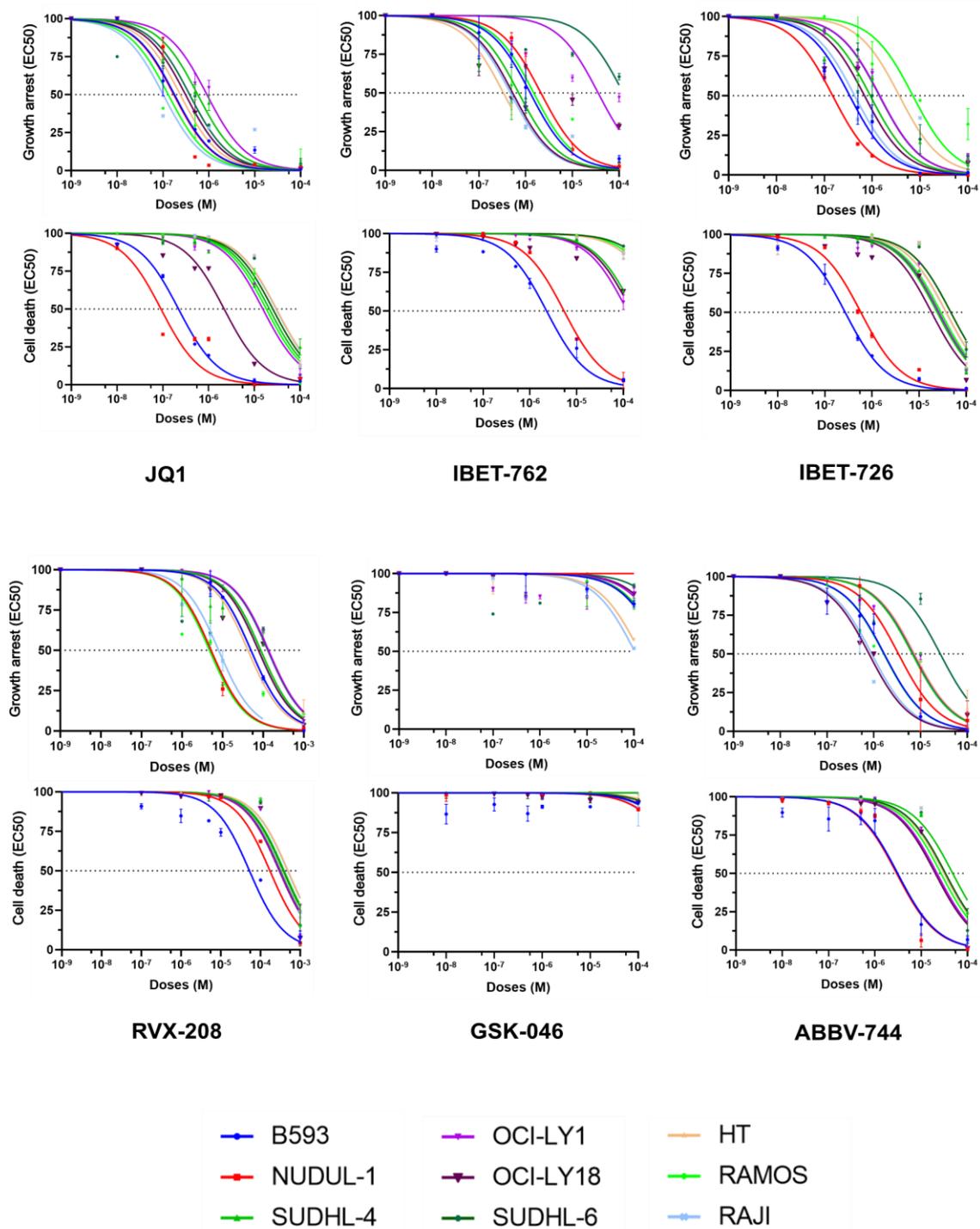


**B**



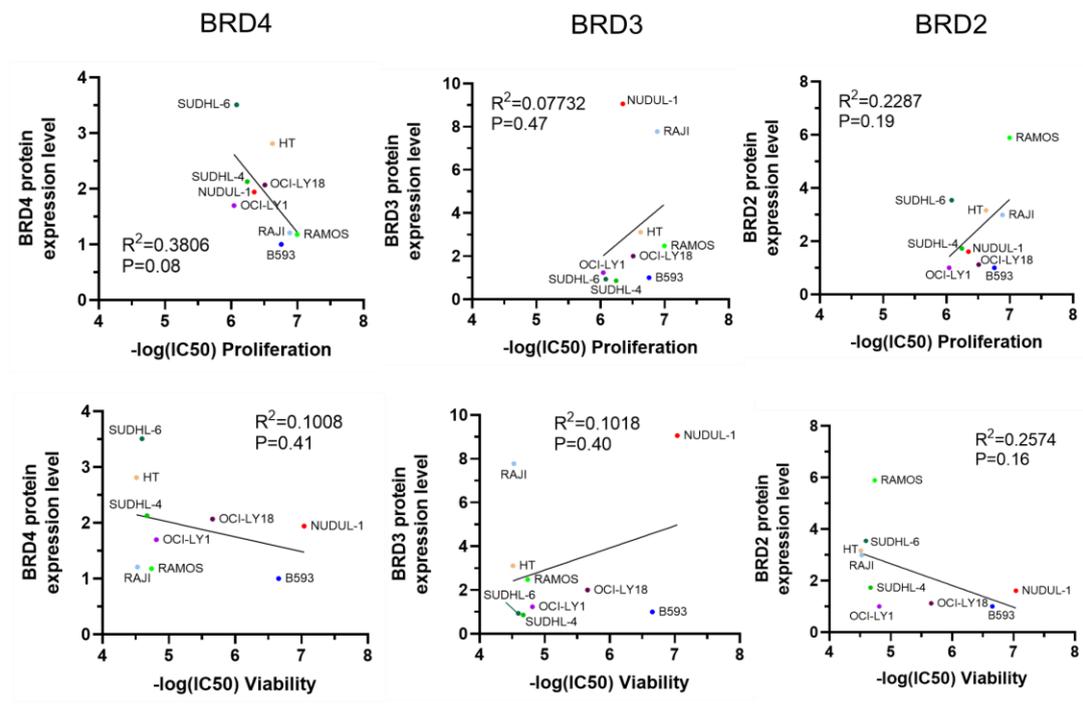
## Supplementary Figure 2

A

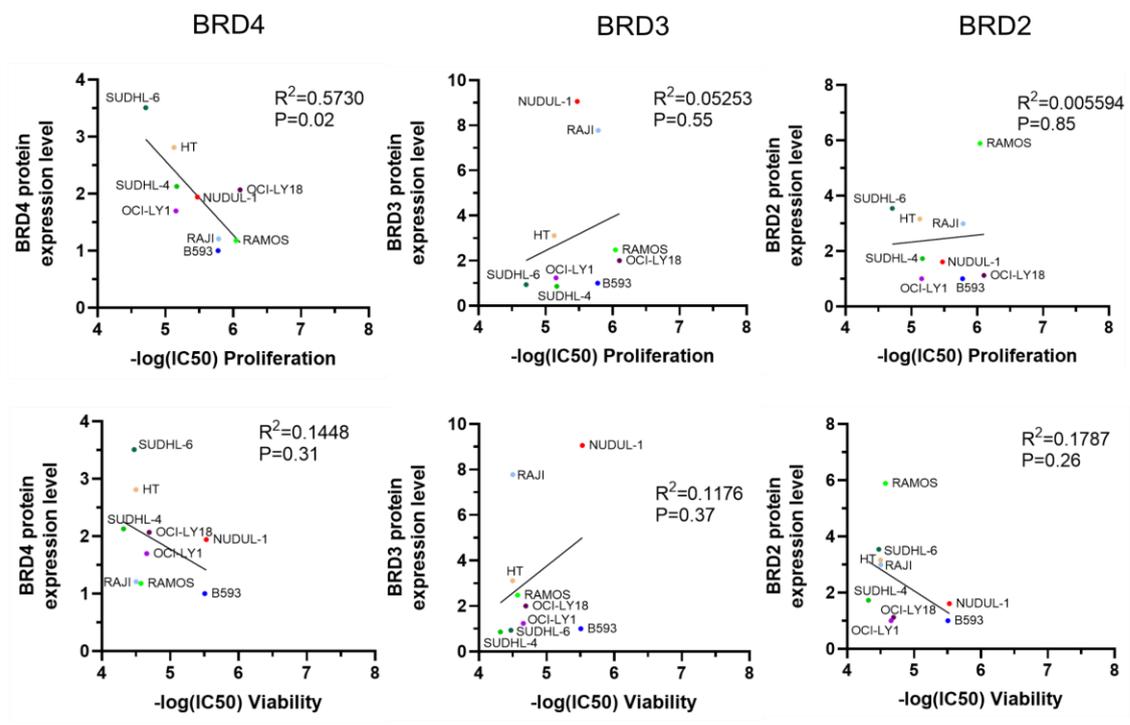


## Supplementary Figure 3

A



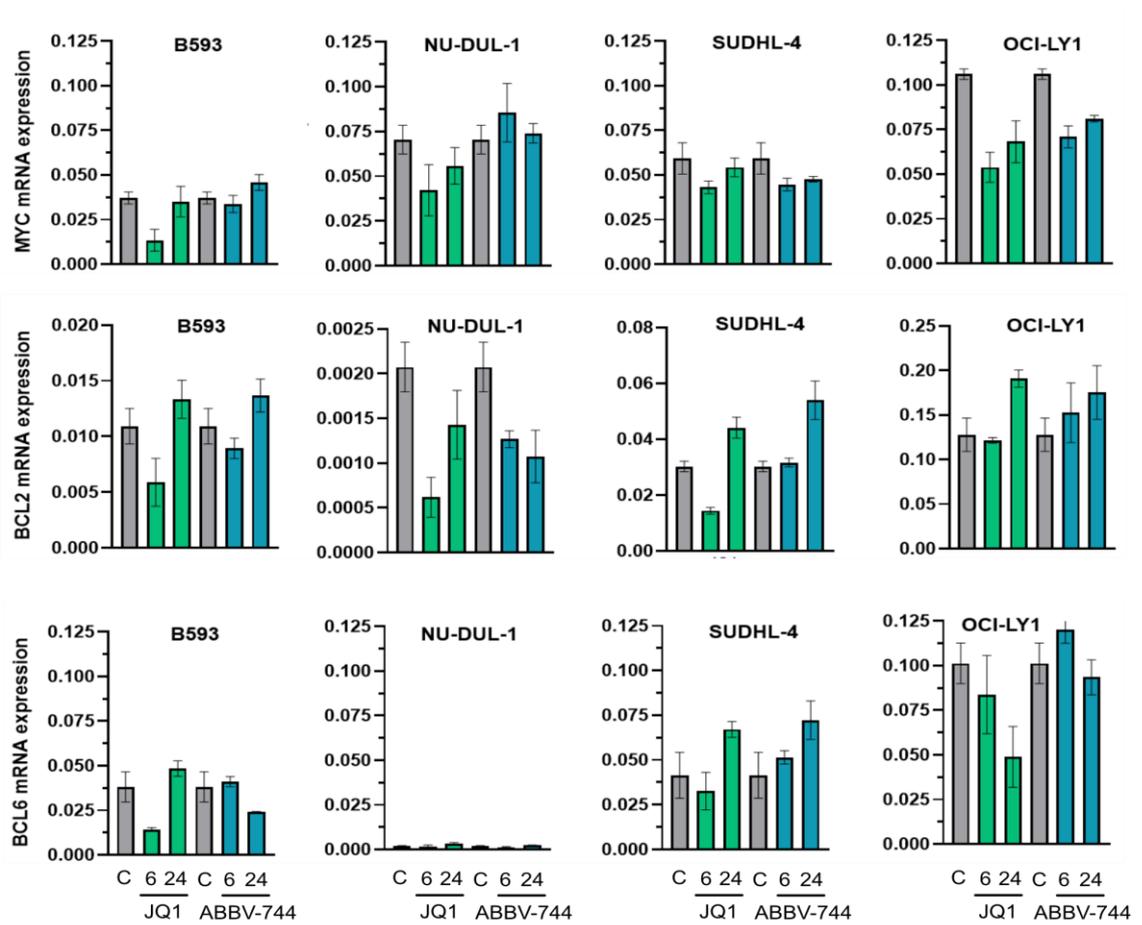
## Correlation Plots JQ1



## Correlation Plots ABBV-744

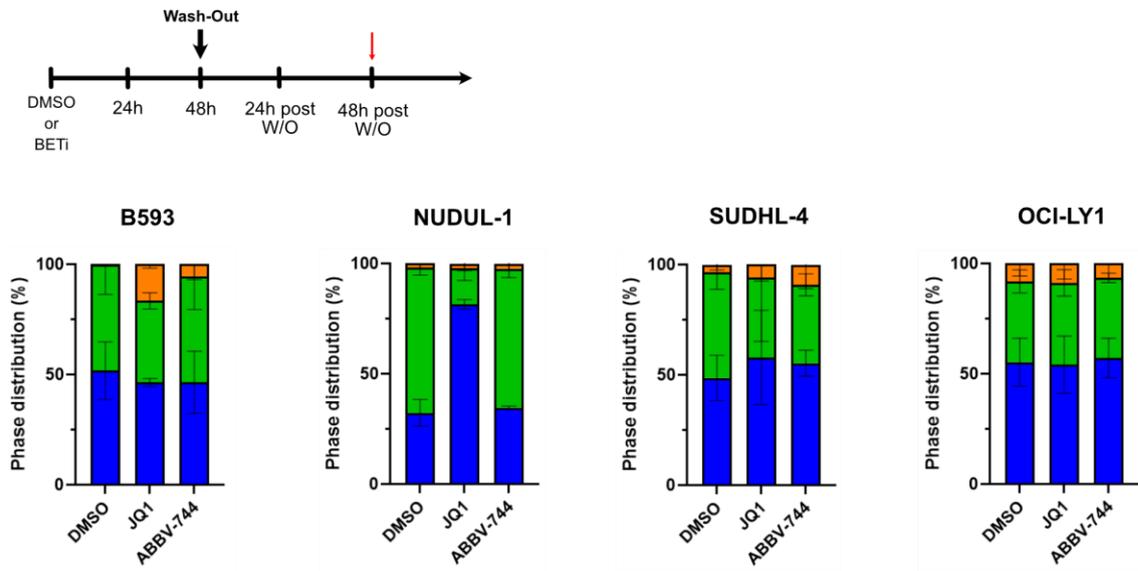
# Supplementary Figure 4

**A**

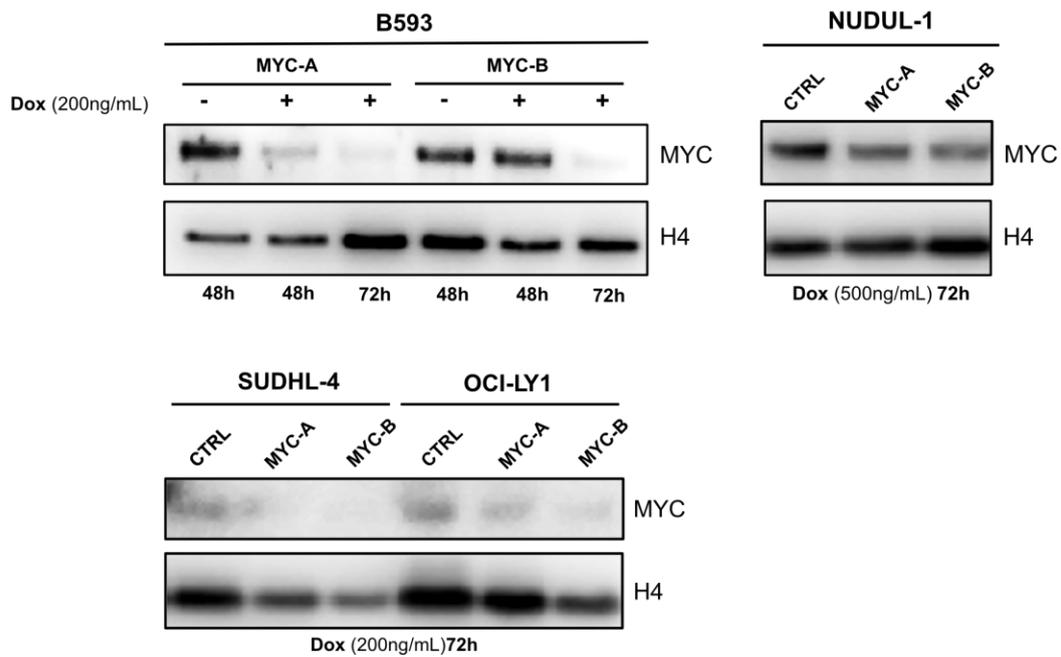


## Supplementary Figure 5

**A**



**B**



## Figure legends

### **Figure 1:** DLBCL HGBL cell lines characterization

(A) Cytogenetics analysis by Fluorescent In-Situ Hybridization of 8 DLBCL cell lines. *c-MYC*, *BCL2* and *BCL6* rearrangements were detected using breakapart probes. *IGH* rearrangement partner was detected using dual-fusion probes. Data is summarized in the table presented at the bottom part of the panel. (B) Heatmap representing the mutational status of 20 frequently mutated genes in lymphoma detected by next-generation sequencing. The yellow boxes indicate the presence of one or more mutations for each locus. \*MYC exon 2 mutational status was determined by sanger sequencing. (C) *c-MYC*, *BCL2* and *BCL6* expression levels were assessed by RT-qPCR (n=3) and by western blot (n=3). RT-qPCR quantity ratios were normalized to GAPDH. A total protein staining by coomassie was used as a loading control for western blot experiments. (D) Graphical representations of *c-MYC*, *BCL2* and *BCL6* mRNA and protein expression level according to their rearrangement and mutational status.

### **Figure 2:** Effects of BET inhibitors on lymphoma cell lines

(A) Schematic representation of the cell lines treatments with BET inhibitors. (B) Top panel: Graphical representation of *c-MYC*, *BCL2* and *BCL6* rearrangements in the different lymphoma cell lines. Middle panel: Heatmap representing EC50 responses after a 48h treatment with BET inhibitors. Doses range is going from 10nM to 10 $\mu$ M for all BET inhibitors except RVX-208 for which a 100nM to 1mM range was used. Sensitivity levels on cell proliferation and cell viability were evaluated by determining by the EC50 values of each compound on each cell line. Bottom panel: Heatmap representing the protein level quantification of corresponding western blot for MYC, BCL2 and BCL6.

### **Figure 3:** BET proteins expression and localization upon JQ1 and ABBV-744 treatments

(A) Basal BET proteins expression levels was detected by western blot analysis. A total protein staining by coomassie was used as a loading control for western blot experiments. (B) Schematic of the protein fractionation protocol, used to obtain cytoplasmic, nucleoplasmic and chromatin fractions. The abundance of BRD4 in each fraction was determined by western blot after JQ1 (500nM) and ABBV-744 (500nM) during 24h treatment.  $\alpha$ -Tubulin is used as a cytoplasmic marker and H4 as a chromatin marker. BRD4 displacement from chromatin upon JQ1 and ABBV-744 treatments are represented by the ratio of BRD4 protein level in the cytoplasmic and nucleoplasmic fractions to the chromatin-bound fraction.

**Figure 4: Interplay between MYC protein and BETi-mediated cell death**

(A) Correlation matrices between MYC expression level, BETi-induced growth arrest and cell death after JQ1 and ABBV-744 treatments.  $R^2$  and P-values are shown on each correlation plot, respectively written or color-coded. Corresponding correlation plots are presented on the right (B) Western blots of MYC, BCL2 and BCL6 protein levels upon 500nM JQ1 and ABBV-744 treatments for 6h and 24h (C = DMSO). MYC protein levels were quantified and normalized to total proteins.

**Figure 5: Evaluation of the MYC-dependence of the response to BET inhibitors**

(A) Left panels: B593, NUDUL-1, SUDHL-4 and OCI-Ly1 proliferation rate after 72h of JQ1 (500nM) and ABBV-744 (500nM) treatments (n=3). \*\*\* p-value<0,001 (Two-way ANOVA). Right panels: B593, NUDUL-1, SUDHL-4 and OCI-Ly1 proliferation rate after 72h post MYC knock-down by shRNA (n=1). Each cell line was beforehand treated (+Dox), or not (-Dox), with 200ng/mL doxycycline (B593, SUDHL-4 and NUDUL-1) or 500ng/mL (NUDUL-1) for 72h to induce MYC knock-down. For both analysis cell concentration was determined by flow cytometry using a constant volume of fluorescent beads as an internal reference. (B) Left panels: cell cycle analyzed by flow cytometry after 48h of JQ1 (500nM) or ABBV-744 (500nM) (n=3). Right panels: cell cycle analyzed by flow cytometry after 24h of MYC knock-down in cell lines beforehand treated (+Dox), or not (-Dox), with 200ng/mL doxycycline (B593, SUDHL-4 and NUDUL-1) or 500ng/mL (NUDUL-1) for 72h to induce MYC knock-down (n=1). (C) Left panels: Apoptosis detection by Annexin V-FITC/IP staining. Representative plots of Annexin V-FITC/IP staining of B593, NUDUL-1, SUDHL-4 and OCI-Ly1 cell lines cultured in the presence of 500nM of JQ1 or 500nM ABBV-744 for 48h, including the percentage of alive cells (bottom left quadrant), early apoptotic cells (bottom right quadrant) and late apoptotic cells (upper right quadrant) (n=3). Right panel: percentage of specific mortality upon MYC knock-down (n=1).

**Figure 6: Transcriptomic analysis and comparison of cellular models sensitive and resistant to BETi-induced cell death**

(A) Heatmap representing differentially expressed genes at the basal level in sensitive (B593 and NUDUL-1) and resistant (SUDHL-4 and OCI-Ly1). Red indicates genes that present a high expression level and blue indicates genes that present a low expression level. (B) Gene ontology analysis performed on genes only expressed in B593 and NUDUL-1 or in SUDHL-4 and OCI-Ly1. (C) Heatmap generated on RStudio representing genes differentially expressed between JQ1 treated condition (24h, 500nM) and DMSO control condition for each cell lines. Red indicates genes that are upregulated upon JQ1 treatment and blue indicates genes that

are downregulated upon JQ1 treatment. **(D)** Venn diagrams of JQ1 downregulated genes (left) and JQ1 upregulated genes (right) in B593, NUDUL-1, SUDHL-4 and OCI-Ly1 cell lines. **(E)** GSEA analysis of differentially expressed genes list for each cell lines using the Hallmark MSig database. On left, heatmap representing the FWER score of molecular signatures found downregulated, p-value<0.01 (dark blue), p-value<0.1 (light blue), or upregulated, p-value<0.01 (dark red), p-value<0.1 (light red) in each cell line. On right, representative GSEA enrichment plots.

## Supplementary Figures

### *Supp Figure 1 –*

**(A)** Representative images of cytogenetics analysis by Fluorescent In-Situ Hybridization of 8 DLBCL cell lines. \* breakapart probe \*\* dual fusion probe **(B)** Chromatograms from sanger sequencing of a portion of *c-MYC* exon 2 of the 8 DLBCL cell lines. Red arrows are pointing mutation sites.

### *Supp Figure 2 –*

**(A)** Dose-responses curves of BET inhibitors and their impact on cell death and growth arrest. Each curve represents one cell line for the different corresponding BETi tested. From these tests EC50 were calculated for the different compounds.

### *Supp Figure 3 –*

**(A)** Correlation matrices between BRD4, BRD3 and BRD2 expression level, BETi-induced growth arrest and cell death after JQ1 and ABBV-744 treatments. R<sup>2</sup> and P-values are showed on each correlation plots, respectively written or color-coded.

### *Supp Figure 4 –*

**(A)** B593, NUDUL-1, SUDHL-4 and OCI-LY1 *c-MYC*, *BCL2* and *BCL6* mRNA expression levels were analyzed after 6h and 24h of either vehicle (DMSO, control “C”) JQ1 or ABBV-744 treatments by RT-qPCR and normalized to GAPDH.

### *Supp Figure 5 –*

**(A)** Wash-out experiments and cell cycle analysis after JQ1 and ABBV-744 treatments on B593, NUDUL-1, SUDHL-4 and OCI-LY1. The top part of the panel represents the schematic procedure of the wash-out experiments. The bottom part of the panel represents the cell cycle analysis after 48h of BETi wash-out. **(B)** Western blots of MYC after 72h of doxycycline-induced knock-down. H4 was used as loading control.

## References

- Bhadury, J., Nilsson, L. M., Veppil Muralidharan, S., Green, L. C., Li, Z., Gesner, E. M., Hansen, H. C., Keller, U. B., McLure, K. G., & Nilsson, J. A. (2014). BET and HDAC inhibitors induce similar genes and biological effects and synergize to kill in Myc-induced murine lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(26). <https://doi.org/10.1073/pnas.1406722111>
- Boi, M., Gaudio, E., Bonetti, P., Kwee, I., Bernasconi, E., Tarantelli, C., Rinaldi, A., Testoni, M., Cascione, L., Ponzoni, M., Mensah, A. A., Stathis, A., Stussi, G., Riveiro, M. E., Herait, P., Inghirami, G., Cvitkovic, E., Zucca, E., & Bertoni, F. (2015). The BET Bromodomain Inhibitor OTX015 Affects Pathogenetic Pathways in Preclinical B-cell Tumor Models and Synergizes with Targeted Drugs. *Clinical Cancer Research*, *21*(7), 1628-1638. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1561>
- Callanan, M. B., Le Baccon, P., Mossuz, P., Duley, S., Bastard, C., Hamoudi, R., Dyer, M. J., Klobeck, G., Rimokh, R., Sotto, J. J., & Leroux, D. (2000). The IgG Fc receptor, FcγRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(1), 309-314. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.309>
- Ceribelli, M., Kelly, P. N., Shaffer, A. L., Wright, G. W., Xiao, W., Yang, Y., Mathews Griner, L. A., Guha, R., Shinn, P., Keller, J. M., Liu, D., Patel, P. R., Ferrer, M., Joshi, S., Nerle, S., Sandy, P., Normant, E., Thomas, C. J., & Staudt, L. M. (2014). Blockade of oncogenic IκB kinase activity in diffuse large B-cell lymphoma by bromodomain and extraterminal domain protein inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(31), 11365-11370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411701111>
- Chapuy, B., McKeown, M. R., Lin, C. Y., Monti, S., Roemer, M. G. M., Qi, J., Rahl, P. B., Sun, H. H., Yeda, K. T., Doench, J. G., Reichert, E., Kung, A. L., Rodig, S. J., Young, R. A., Shipp, M. A., & Bradner, J. E. (2013). Discovery and Characterization of Super-Enhancer-Associated Dependencies in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*, *24*(6), 777-790. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.11.003>
- Cochran, A. G., Conery, A. R., & Sims, R. J. (2019). Bromodomains : A new target class for drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *18*(8), 609-628. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0030-7>
- Cummin, T. E. C., Cox, K. L., Murray, T. D., Turaj, A. H., Dunning, L., English, V. L., Fell, R., Packham, G., Ma, Y., Powell, B., Johnson, P. W. M., Cragg, M. S., & Carter, M. J. (2020). BET inhibitors synergize with venetoclax to induce apoptosis in MYC-driven lymphomas with high BCL-2 expression. *Blood Advances*, *4*(14), 3316-3328. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002231>

- Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., Kastiris, E., Gilpatrick, T., Paranal, R. M., Qi, J., Chesi, M., Schinzel, A. C., McKeown, M. R., Heffernan, T. P., Vakoc, C. R., Bergsagel, P. L., Ghobrial, I. M., Richardson, P. G., Young, R. A., ... Mitsiades, C. S. (2011). BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target c-Myc. *Cell*, *146*(6), 904-917. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.017>
- Emadali, A., Rousseaux, S., Bruder-Costa, J., Rome, C., Duley, S., Hamaidia, S., Betton, P., Debernardi, A., Leroux, D., Bernay, B., Kieffer-Jaquinod, S., Combes, F., Ferri, E., McKenna, C. E., Petosa, C., Bruley, C., Garin, J., Ferro, M., Gressin, R., ... Khochbin, S. (2013). Identification of a novel BET bromodomain inhibitor-sensitive, gene regulatory circuit that controls Rituximab response and tumour growth in aggressive lymphoid cancers. *EMBO Molecular Medicine*, *5*(8), 1180-1195. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202034>
- Esteve-Arenys, A., Valero, J. G., Chamorro-Jorganes, A., Gonzalez, D., Rodriguez, V., Dlouhy, I., Salaverria, I., Campo, E., Colomer, D., Martinez, A., Rymkiewicz, G., Pérez-Galán, P., Lopez-Guillermo, A., & Roué, G. (2018). The BET bromodomain inhibitor CPI203 overcomes resistance to ABT-199 (venetoclax) by downregulation of BFL-1/A1 in in vitro and in vivo models of MYC+/BCL2+ double hit lymphoma. *Oncogene*, *37*(14), 1830-1844. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0111-1>
- Faivre, E. J., McDaniel, K. F., Albert, D. H., Mantena, S. R., Plotnik, J. P., Wilcox, D., Zhang, L., Bui, M. H., Sheppard, G. S., Wang, L., Sehgal, V., Lin, X., Huang, X., Lu, X., Uziel, T., Hessler, P., Lam, L. T., Bellin, R. J., Mehta, G., ... Shen, Y. (2020). Selective inhibition of the BD2 bromodomain of BET proteins in prostate cancer. *Nature*, *578*(7794), 306-310. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1930-8>
- Filippakopoulos, P., & Knapp, S. (2014). Targeting bromodomains : Epigenetic readers of lysine acetylation. *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(5), 337-356. <https://doi.org/10.1038/nrd4286>
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., ... Bradner, J. E. (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, *468*(7327), 1067-1073. <https://doi.org/10.1038/nature09504>
- Gilan, O., Rioja, I., Knezevic, K., Bell, M. J., Yeung, M. M., Harker, N. R., Lam, E. Y. N., Chung, C., Bamborough, P., Petretich, M., Urh, M., Atkinson, S. J., Bassil, A. K., Roberts, E. J., Vassiliadis, D., Burr, M. L., Preston, A. G. S., Wellaway, C., Werner, T., ... Dawson, M. A. (2020). Selective targeting of BD1 and BD2 of the BET proteins in cancer and

- immunoinflammation. *Science*, 368(6489), 387-394.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaz8455>
- Hogg, S. J., Newbold, A., Vervoort, S. J., Cluse, L. A., Martin, B. P., Gregory, G. P., Lefebure, M., Vidacs, E., Tothill, R. W., Bradner, J. E., Shortt, J., & Johnstone, R. W. (2016). BET Inhibition Induces Apoptosis in Aggressive B-Cell Lymphoma via Epigenetic Regulation of BCL-2 Family Members. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(9), 2030-2041. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0924>
- ISCN 2020 | Karger Book. (s. d.). Consulté 12 janvier 2023, à l'adresse <https://www.karger.com/Book/Home/279152>
- Lasorsa, E., Smoksey, M., Kirk, J. S., Rosario, S., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., & Ellis, L. (2015). Mitochondrial protection impairs BET bromodomain inhibitor-mediated cell death and provides rationale for combination therapeutic strategies. *Cell Death & Disease*, 6(12), e2014-e2014. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.352>
- Li, W., Gupta, S. K., Han, W., Kundson, R. A., Nelson, S., Knutson, D., Greipp, P. T., ElSawa, S. F., Sotomayor, E. M., & Gupta, M. (2019). Targeting MYC activity in double-hit lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with epigenetic bromodomain inhibitors. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0761-2>
- Lovén, J., Hoke, H. A., Lin, C. Y., Lau, A., Orlando, D. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*, 153(2), 320-334. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.036>
- Mertz, J. A., Conery, A. R., Bryant, B. M., Sandy, P., Balasubramanian, S., Mele, D. A., Bergeron, L., & Sims, R. J. (2011). Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), 16669-16674. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108190108>
- Nicodeme, E., Jeffrey, K. L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., White, J., Kirilovsky, J., Rice, C. M., Lora, J. M., Prinjha, R. K., Lee, K., & Tarakhovskiy, A. (2010). Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*, 468(7327), 1119-1123. <https://doi.org/10.1038/nature09589>
- Picaud, S., Wells, C., Felletar, I., Brotherton, D., Martin, S., Savitsky, P., Diez-Dacal, B., Philpott, M., Bountra, C., Lingard, H., Fedorov, O., Müller, S., Brennan, P. E., Knapp, S., & Filippakopoulos, P. (2013). RVX-208, an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the second bromodomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(49), 19754-19759. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310658110>

- R Core Team (2020). —European Environment Agency. (s. d.). [Methodology Reference]. Consulté 12 janvier 2023, à l'adresse <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006>
- Rosenthal, A., & Younes, A. (2017). High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6 : Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Reviews*, 31(2), 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.09.004>
- Scott, D. W., King, R. L., Staiger, A. M., Ben-Neriah, S., Jiang, A., Horn, H., Mottok, A., Farinha, P., Slack, G. W., Ennishi, D., Schmitz, N., Pfreundschuh, M., Nowakowski, G. S., Kahl, B. S., Connors, J. M., Gascoyne, R. D., Ott, G., Macon, W. R., & Rosenwald, A. (2018). High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. *Blood*, 131(18), 2060-2064. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-820605>
- Sears, R. C. (2004). The Life Cycle of C-Myc : From Synthesis to Degradation. *Cell Cycle*, 3(9), 1131-1135. <https://doi.org/10.4161/cc.3.9.1145>
- Shorstova, T., Foulkes, W. D., & Witcher, M. (2021). Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents. *British Journal of Cancer*, 124(9), 1478-1490. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01321-0>
- Trabucco, S. E., Gerstein, R. M., Evens, A. M., Bradner, J. E., Shultz, L. D., Greiner, D. L., & Zhang, H. (2015). Inhibition of Bromodomain Proteins for the Treatment of Human Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 21(1), 113-122. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3346>
- Wiederschain, D., Wee, S., Chen, L., Loo, A., Yang, G., Huang, A., Chen, Y., Caponigro, G., Yao, Y.-M., Lengauer, C., Sellers, W. R., & Benson, J. D. (2009). Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(3), 498-504. <https://doi.org/10.4161/cc.8.3.7701>
- Zippo, A., De Robertis, A., Serafini, R., & Oliviero, S. (2007). PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation. *Nature Cell Biology*, 9(8), 932-944. <https://doi.org/10.1038/ncb1618>

# CONCLUSION & PERSPECTIVES

Notre étude s'est intéressée à explorer la réponse moléculaire à l'inhibition des protéines BET, lecteurs épigénétiques de la chromatine, dans des modèles cellulaires de LBDGC et plus particulièrement dans des lignées dites HGBL présentant des réarrangements dépendants de régions régulatrices de type « super-enhancer », contrôlées par les protéines BET. Nos expériences ont pu montrer une corrélation entre le niveau de protéine de l'oncogène MYC, dans des contextes où ce locus est muté et réarrangé avec un locus immunoglobuline, et une augmentation de la cytotoxicité induite par les iBETs. De plus nous avons pu montrer que les lignées cellulaires présentant une plus forte sensibilité aux iBETs présentent une dépendance oncogénique à MYC. Nous avons également identifié des voies de signalisation associées à la mortalité cellulaire induite par les iBETs.

### ***Réarrangements IGH-MYC, BCL2 et BCL6 et niveau d'expression génique dans des modèles de LBDGC HGBL***

Les LBDGC sont des cancers très hétérogènes caractérisés par des signatures moléculaires et génétiques distinctes. C'est pour cela que la première partie de notre étude s'est intéressée à caractériser de façon détaillée un panel de 8 lignées de LBDGC afin de déterminer quels paramètres génétiques et/ou moléculaires pouvaient être liés à la réponse aux iBETs. Les analyses de FISH nous ont permis de déterminer le statut des loci *c-MYC*, *BCL2* et *BCL6* qui sont fréquemment réarrangés dans les LBDGC, et définissent le sous-type HGBL (Figure 1A). En plus de ces analyses cytogénétiques, le niveau d'expression de ces 3 gènes a également été analysé par RT-qPCR et western blot (Figure 1C). Le dogme actuel est que les réarrangements impliquant les loci des immunoglobulines, et plus particulièrement le locus *IGH*, sont associés à de forts niveaux d'expression des gènes cibles de ces translocations. Nous avons montré que les lignées présentant des réarrangements avec le locus *IGH* n'étaient pas forcément les lignées avec le plus fort niveau d'expression du gène partenaire que ce soit au niveau ARNm ou protéine (Figure 1C-D). Cela suggère des mécanismes de régulations différentielles du locus *IGH*, et notamment la région super-enhancer 3'RR, dépendantes du contexte cellulaire, pouvant expliquer ces résultats. Une étude a montré que le lecteur épigénétique ZMYND8 intervenait dans la régulation négative de la région 3'RR du locus *IGH* (Delgado-Benito et al., 2018). ZMYND8 a également été montré comme intervenant dans la régulation des loci IRF8 et MYC via des interactions médiées par BRD4 au niveau de régions enhancers dans des modèles d'AML (Cao et al., 2021). Ce facteur semble donc jouer un rôle important dans le contrôle des régions enhancers et super-enhancers. Une autre étude a également souligné l'importance de la présence de séquences d'ADN dites de « packaging », présentes entre les régions 3'RR permettant le fonctionnement optimal de ces régions lors des

processus de SHM et de CSR (Le Noir et al., 2017). De façon similaire, nous avons pu constater que les lignées présentant des réarrangements *IGH-BCL2* ne semblaient pas présenter des taux d'expression de *BCL2* plus importants que les autres lignées (Figure 1C-D). Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le statut du locus *BCL6* avec le niveau d'expression de la protéine. L'ensemble de ces données nous laissent à penser que le type exact de réarrangement, ainsi que les différents régulateurs épigénétiques retrouvés au niveau de ces loci, de façon dépendante du contexte cellulaire, pourrait expliquer ces résultats.

### ***Réarrangements MYC, BCL2 et BCL6 et sensibilité aux iBETs***

Notre postulat de départ est que les lignées présentant des réarrangements immunoglobulines seraient plus sensibles à l'inhibition par des iBETs, cela dû la présence de régions super-enhancers BET-dépendantes qui contrôle l'expression des oncogènes partenaires. Nous avons pu montrer que certaines lignées présentant des réarrangements *IGH-MYC* (B593, OCI-Ly18 et NUDUL-1) présentaient de plus hauts niveaux de mortalité cellulaire suite à l'inhibition des BET (Figure 2B, S2). Cependant nous avons également observé des cas, comme les lignées de lymphome de Burkitt, où la présence de réarrangements n'était pas forcément associée à une cytotoxicité induite par le traitement iBET. Il serait donc nécessaire de compléter ces analyses en réalisant des analyses d'enrichissement à la chromatine par ChIP-seq des différentes protéines BET et notamment de BRD4, connue pour intervenir dans la structure et la régulation des régions super-enhancers, au sein de nos lignées au niveau des loci *c-MYC*, *BCL2* et *BCL6*. De façon similaire, nous avons pu constater que les lignées présentant des réarrangements *IGH-BCL2* ne semblaient pas présenter des taux d'expression de *BCL2* plus importants que les autres lignées (Figure 1C-D). Cependant, nous avons pu voir que les lignées présentant des réarrangements *non-IG-BCL2* présentaient des taux importants d'ARNm se traduisant par des taux plus élevés de la protéine (Figure 1D). Malgré cela, aucune corrélation n'a pu être observée entre les réarrangements du locus *BCL2* et la sensibilité aux iBETs. Concernant les réarrangements de *BCL6*, nos analyses cytogénétiques ont montré que 5 de nos 8 lignées ne présentaient pas de réarrangement de ce locus (Figure 1A). Sur les 3 lignées présentant des anomalies au niveau de *BCL6* (OCI-Ly1, SUDHL-4 et HBL-1), les lignées OCI-Ly1 et HBL-1 présentent des variations du nombre de copies. Seule la lignée SUDHL-4 présente un réarrangement *non-IG-BCL6* faisant de cette lignée un modèle de triple-hit. Aucun lien clair entre le statut de *BCL6* et le niveau de sensibilité aux iBETs n'a pu être mis en évidence dans nos modèles (Figure 2B). L'ensemble de ces données nous indiquent que le statut de réarrangement des loci *c-MYC*, *BCL2* et *BCL6* ne semble, à lui seul, ne pas être un indicateur précis de la réponse des lignées aux iBETs.

Cependant, la présence de réarrangements *IGH-MYC* couplés à la présence de forts niveaux de la protéine semblent être liés à une mort cellulaire accrue dans les lignées présentant ce type d'association.

### ***Impact de BCL2 et de c-MYC sur le développement des lymphomes et la réponse thérapeutique***

#### *Impact fonctionnel des variants de séquence c-MYC et BCL2*

Nous avons caractérisé le profil mutationnel de notre panel de lignées par des analyses NGS sur un ensemble de 20 gènes fréquemment mutés dans les lymphomes. Ces analyses ont permis de mettre en évidence de fréquentes altérations de *BCL2* (4 lignées sur 8) (Figure 1B). Ces mutations de *BCL2* sont généralement localisées au niveau de l'exon codant le domaine d'interaction protéique BH4 et dans celui codant le domaine de repliement en boucle (FLD, Folding Loop Domain). Si certaines mutations de *BCL2* sont décrites comme impactant la survie des patients atteints de lymphomes folliculaires, elles ne semblent pas avoir d'impact sur le développement des LBDGC *de-novo*. Ces mutations peuvent néanmoins impacter les fonctions anti-apoptotiques de BCL2 en perturbant ses interactions avec des protéines pro-apoptotiques (comme BAX) ou des protéines impliquées dans des voies de signalisation oncogéniques (comme SOD1, RAF1 ou encore p53) (Correia et al., 2015; Schuetz et al., 2012; Singh & Briggs, 2016).

Les mutations de l'oncogène *c-MYC* sont retrouvés à une fréquence d'environ 30% chez des patients atteints de LBDGC. Plusieurs de ces mutations, comme celles retrouvées aux niveaux des résidus N11, P57, T58 ou S62, sont des variants de séquences localisées dans l'exon 2 de *c-MYC*. Les mutations T58A et T58I sont notamment décrites comme impactant la stabilité de la protéine en perturbant l'interaction avec les protéines du complexe SCF et FBXW7 impliquées dans la dégradation de MYC par le protéasome (Bahram et al., 2000; Sears, 2004b; Xu-Monette et al., 2016). Nous avons donc réalisé dans notre étude un séquençage de l'exon 2 de ce gène dans l'ensemble de nos lignées. Nous avons pu voir que les 3 lignées présentant des mutations au niveau de l'exon 2 de *c-MYC* étaient des lignées présentant des réarrangements *IGH-MYC* (Figure 1B). L'étude de Xu-Monette a montré que 37% des patients atteints de DLBCL du sous-type GCB et 14% du sous-type ABC, et présentant des mutations de *c-MYC*, présentaient également des réarrangements de ce dernier. De plus, une autre étude menée dans la lignée de lymphome de Burkitt, Ramos, a montré que seul l'allèle réarrangé avec le locus *IGH* de *c-MYC* présentait une accumulation de mutations caractéristiques du mécanisme d'hypermutations somatiques (Bemark & Neuberger, 2000).

Même si aucune claire prédiction ne peut être faite entre la présence de réarrangements du locus *c-MYC* et la présence de mutations, une hypothèse serait que la présence de réarrangements, et particulièrement avec le locus *IGH*, pourrait favoriser l'apparition de mutations via des mécanismes d'hypermutations également dans des modèles de LBDGC. Nous avons également pu analyser que la lignée NUDUL-1 présente notamment la mutation stabilisatrice T58I (Mahani et al., 2021) se traduisant par un fort niveau de la protéine détecté par western blot (Figure 1C).

#### *Implication de MYC et BCL2 dans la balance survie/apoptose*

MYC peut être impliqué aussi bien dans des processus de survie cellulaire que d'apoptose, le niveau protéique et le statut mutationnel de ce dernier va donc impacter le phénotype cellulaire via des changements de signalisation moléculaire. On peut noter par exemple que MYC peut induire l'apoptose de façon p53-dépendante ou p53-indépendante. De façon indépendante de p53, MYC va induire l'apoptose via la régulation de l'expression de la protéine pro-apoptotique BIM (Hemann et al., 2005). De forts niveaux de MYC dans les cellules peuvent donc conduire à la mort cellulaire. C'est pour cela, qu'en général, les cancers où MYC est surexprimé vont également présenter de forts niveaux des protéines anti-apoptotiques comme BCL2 pour contrer les effets pro-apoptotiques médiés par MYC. Cependant, dans un contexte cellulaire où MYC est muté et stabilisé, ce dernier échoue à activer l'apoptose médiée par BIM mais induit une prolifération tumorale accrue (Chang et al., 2000). De façon cohérente avec ces observations, on voit d'ailleurs que la lignée NUDUL-1, qui exprime des hauts niveaux de MYC muté, n'exprime quasiment pas de BCL2. Cela signifie donc qu'en plus du niveau d'expression de MYC, le statut mutationnel de ce dernier est à prendre en considération dans le développement de stratégies thérapeutiques visant à interagir avec les voies de signalisation contrôlées par MYC.

#### *Impact des iBETs pan et BD2-sélectifs sur la viabilité et la prolifération de lignées de LBDGC*

Après avoir caractérisé nos lignées nous avons réalisé un criblage de 6 iBETs de nature chimique et de sélectivité différente afin de déterminer les profils de sensibilité en analysant leur impact sur la viabilité cellulaire et sur la prolifération (Figure 2A-B, S2). Nous avons sélectionné 3 pan-iBETs (JQ1, IBET-762, IBET-726) inhibant le premier et le second bromodomaine des protéines BET ainsi que 3 BD2-sélectifs (RVX-208, GSK-046, ABBV-744) qui inhibe sélectivement le second bromodomaine des BET. Il serait également intéressant de pouvoir inclure à ce panel de molécules des BD1-sélectifs afin de déterminer si ces derniers

phénocopient les effets des pan-iBET sur la prolifération et la viabilité cellulaire. Cependant, nous n'avons pas pu avoir accès à ce type de molécules lors la mise en oeuvre de cette étude et très peu de molécules BD1-sélective restent disponibles à ce jour.

Nous avons pu déterminer grâce à nos analyses de dose-réponse que l'ensemble des pan-iBETs testés sur notre panel de lignées, ainsi que le composé ABBV-744, conduisent à un arrêt de prolifération. A l'inverse les composés BD2-sélectifs RVX-208 et GSK-046 ne présentent pas d'effet cytotatique (Figure 2B). Cette observation est cohérente avec ce qui est actuellement connu sur le fonctionnement de ces inhibiteurs (Gilan et al., 2020b; Nicodeme et al., 2010b; Picaud et al., 2013a). En effet, ces composés sont principalement décrits pour avoir impact sur les gènes à réponses immédiates, impliqués dans le contrôle de la réponse inflammatoire. De manière intéressante, nous avons pu constater que les différents iBETs testés n'avaient pas les mêmes effets sur la viabilité cellulaire. Nous avons pu ainsi déterminer que certaines lignées, comme B593 et NUDUL-1, étaient plus sensibles aux iBETs en termes de viabilité cellulaire alors que d'autres lignées comme SUDHL-4 et OCI-Ly1 étaient résistantes à la mortalité induite par ces composés (Figure 2B). Nous avons donc par la suite décidé de travailler avec ces quatre modèles de lignées cellulaires afin de mieux caractériser les mécanismes associés à la cytotoxicité induite par les iBETs

### *Effet des iBETs sur l'expression de MYC, BCL2 et BCL6*

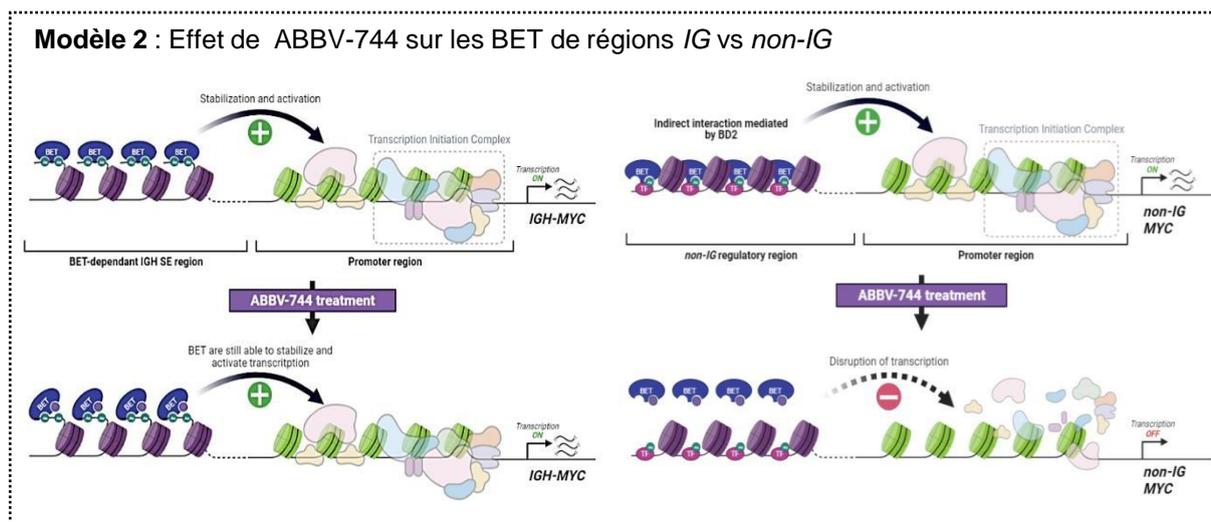
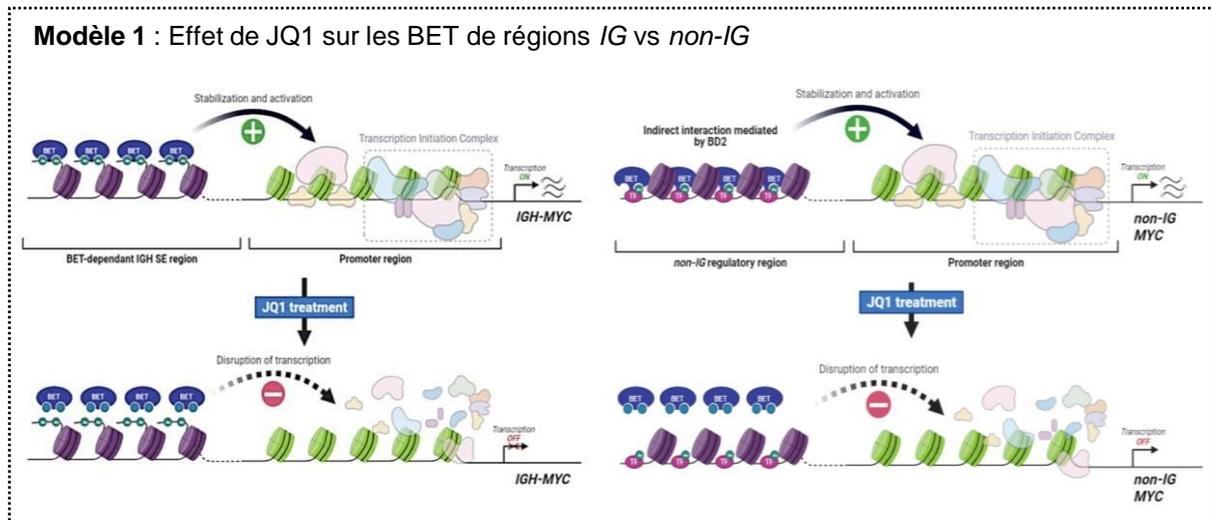
Nous avons ensuite testé l'impact d'un composé pan-iBET, JQ1, et d'un composé BD2-sélectif, ABBV-744 sur les niveaux d'expression de MYC, BCL2 et BCL6 (Figure 4B). La première chose que nous avons pu observer est que JQ1, connu pour induire une répression de l'expression de MYC dans de nombreux modèles de cancers dont les LBDGC, diminue le niveau de MYC dans l'ensemble des quatre lignées. Ce résultat suggère donc que la diminution du niveau de MYC par JQ1 n'est pas automatiquement associée à l'effet cytotoxique des iBETs. De plus nous n'avons pas constaté d'effet particulier des iBETs sur les niveaux protéiques de BCL2 après 24h de traitement. Dans l'étude de (W. Li et al., 2019a), aucun effet sur BCL2 n'a également été constaté après traitement avec des iBETs sur des lignées HGBL malgré les fortes doses utilisés (2,5 et 5 $\mu$ M). Cependant, nous avons pu observer des effets au niveau transcriptionnel après traitement par JQ1 dans les lignées B593, NUDUL-1 et SUDHL-4 (Figure S4) ce qui semble indiquer que le locus *BCL2* est sensible de façon directe ou indirecte à l'inhibition des BET mais que cela ne se traduit pas par un changement au niveau protéique. Ces données peuvent suggérer qu'une régulation au niveau de la protéine BCL2 est à l'œuvre afin de compenser la diminution transcriptionnelle induite par les iBETs. Nous pourrions

explorer par analyses ChIP-seq la distribution des BET au niveau du locus *BCL2* afin de déterminer si l'effet de diminution du niveau d'ARNm après traitement par iBETs est bien dû au relargage des BET dans cette région. Concernant *BCL6*, une forte diminution après traitement par JQ1 est observée dans la lignée OCI-Ly1 au niveau transcriptionnel et protéique. Cette lignée a été montrée comme étant dépendante de *BCL6* et de *BCL2*. Lors de l'inhibition spécifique de *BCL6* un changement d'expression des protéines anti-apoptotiques *BCL2*, *BCL-XL* (*BCL2L1*) et *MCL-1* s'opère afin de compenser la perte de *BCL6* (Dupont et al., 2015). Ce mécanisme peut donc être en partie responsable de la résistance de cette lignée à la cytotoxicité induite par les iBETs.

Nous avons également caractérisé l'impact du composé ABBV-744 sur le niveau de *MYC*, *BCL2* et *BCL6*. Si aucun effet n'a été observé avec ce composé sur les niveaux protéiques de *BCL2* et *BCL6*, des effets ont été constatés sur *MYC*. De façon surprenante, nous avons pu observer que seules les lignées SUDHL-4 et OCI-Ly1 présentaient une diminution de l'expression de *MYC* suite au traitement par ABBV-744. Une hypothèse pouvant expliquer cette différence entre les lignées sensibles et résistantes à la mort cellulaire induite par les iBET est la différence de réarrangement au niveau du locus de *c-MYC*. En effet, alors que B593 et NUDUL-1 présentent des réarrangements *IGH-MYC*, les lignées SUDHL-4 et OCI-Ly1 présentent des réarrangements *non-IG-MYC*. En 2020, Emily Faivre et collaborateurs publient une étude présentant l'effet de composés BD-sélectif, dont ABBV-744. Cette étude a montré, dans des contextes de cancer de la prostate dépendants des récepteurs androgéniques (AR) que l'inhibition sélective du second bromodomaine des BET induisait un relargage de la chromatine de ces dernières qui interagissent indirectement à la chromatine avec les AR acétylés via leur second bromodomaine (Faivre et al., 2020a). En plus de cette étude, plusieurs faisceaux d'évidences concernant les rôles des deux bromodomains des BET suggèrent que le premier bromodomaine jouerait un rôle dans le contrôle de gènes nécessaire à la survie cellulaire via l'interaction avec la chromatine acétylée, alors que le second bromodomaine jouerait un rôle dans le contrôle des gènes à réponse immédiate en interagissant indirectement à la chromatine avec des facteurs de transcription acétylés, comme NF- $\kappa$ B par exemple (Filippakopoulos & Knapp, 2020).

A l'instar des observations faites dans l'étude sur ABBV-744 dans les cancers de la prostate, on peut donc émettre l'hypothèse que les régions IG sont dépendantes de l'interaction avec le BD1 des BET et sont donc insensibles à l'inhibition par les BD2-sélectifs, alors que les régions *non-IG* seraient dépendantes de l'interaction des BET via leur BD2 avec des facteurs de transcription spécifiques et seraient donc sensibles à l'inhibition par les BD2-sélectifs.

Pour confirmer cette hypothèse des expériences de CHIP-seq des BET dans des conditions traitées ou non avec des iBETs pan, BD1 ou BD2-sélectifs, au niveau de loci réarrangés ou non avec des régions IG dans différentes lignées cellulaires seraient à réaliser.



### Dépendance oncogénique à MYC

Afin d'évaluer la dépendance oncogénique à MYC dans nos modèles, nous avons réalisé des expériences d'ARN interférents inducibles à la doxycycline afin de déterminer l'impact de la perte spécifique de MYC sur la viabilité et prolifération cellulaire en comparant ces effets avec ceux médiés par JQ1 et ABBV-744 (Figure 5). Nous avons pu constater dans un premier temps que comme JQ1, le knock-down de MYC dans la lignée B593 induisait un arrêt de prolifération. Ces résultats sont également en cours de confirmation pour la lignée NUDUL-1. Les lignées SUDHL-4 et OCI-Ly1, quant à elles, ne semblent pas impactées en termes de prolifération par la perte de MYC (Figure 5A).

Nous avons réalisé en parallèle des analyses de cycle cellulaire. Le composé JQ1 induit un arrêt de cycle en phase G1 dans l'ensemble des lignées, alors que le shMYC, quant à lui, induit une augmentation en G1 et S dans la lignée B593, qui n'est pas observé dans les lignées résistantes (Figure 5B). Pour conclure ces analyses, nous avons observé l'effet du shMYC sur la viabilité cellulaire de nos modèles. Comme montré précédemment, JQ1 induit une mort cellulaire dans les lignées B593 et NUDUL-1. De façon similaire, la perte de MYC par knock-down récapitule le phénotype observé avec JQ1 (Figure 5C). L'invalidation de l'expression de MYC dans ces modèles suggère que la mort cellulaire induite par les iBET est liée à leur dépendance à l'oncogène MYC. Afin de compléter et de renforcer nos observations, des expériences de sauvetage phénotypique par la surexpression de MYC dans une construction indépendante à l'inhibition des BET seraient à effectuer.

Cependant d'autres points restent à élucider, comme par exemple le mécanisme par lequel les cellules sensibles à l'inhibition des BET vont rentrer en apoptose suite à la perte de MYC ou encore comment les cellules SUDHL-4 et OCI-Ly1 résistantes peuvent tolérer les dommages induits par les iBETs conduisant à l'arrêt de prolifération et le blocage dans le cycle cellulaire sans entrer en apoptose. Pour répondre à ces questions des études sur les régulateurs du cycle et de l'apoptose dans des conditions de traitement par iBETs ou par shMYC pourraient être réalisées.

### *Niveau d'expression des BET, localisation et sensibilité aux iBETs*

La majorité des études portant sur les mécanismes d'inhibition des protéines BET s'intéresse plus particulièrement à l'effet de ces inhibiteurs sur la perturbation de l'interaction à la chromatine de BRD4 et peu sur les autres membres de cette famille. C'est pour cela que nous avons tout d'abord adressé la possibilité de l'implication du niveau protéique des différentes protéines BET et de leur changement de localisation suite à des traitements avec des iBETs sur la sensibilité des lignées cellulaires. Dans un premier temps, nous avons évalué le niveau des différents membres de la famille des BET dans notre panel de lignées (Figure 3A). Les niveaux des différentes BET sont très hétérogènes au sein de notre panel et aucune claire corrélation entre le niveau d'expression des différentes BET et le niveau de sensibilité aux iBETs n'a été observée.

La localisation des BET dans les différents compartiments cellulaires est également à prendre en compte lorsque le niveau des protéines BET est analysé. C'est pour cela que nous avons réalisé des analyses de fractionnement cellulaire afin de déterminer la dynamique du

réservoir des différentes protéines BET après traitement par JQ1 ou ABBV-744. Nous nous sommes tout d'abord concentrés sur la localisation de BRD4. De façon générale, nous avons pu voir que les traitements iBETs induisent un relargage de BRD4 de la chromatine vers le nucléoplasme et le cytoplasme (Figure 3B), comme très largement décrit dans la littérature. Il est intéressant de noter que BRD4 peut être localisé à l'extérieur du noyau dans le cytoplasme. De plus, certaines études ont notamment rapporté des fonctions de BRD4 cytosoliques comme par exemple dans la l'association du complexe BRD4-ISX-PCAF afin de promouvoir la transition épithélio-mésenchymateuse dans des cellules de cancer du poumon (Wang et al., 2020). Il serait donc intéressant de savoir si la relocalisation cytoplasmique de BRD4 est induite pour dégrader la protéine ou si cette dernière effectue d'autres fonctions dans ce compartiment. Les mêmes analyses sont en cours de réalisation sur BRD2 et BRD3.

### *Voies de signalisation impliquées dans la sensibilité et la résistance innée à JQ1*

Afin de mieux comprendre les effets des iBETs et de rationaliser leur utilisation dans le contexte des LBDGC et HGBL, nous avons réalisé un profilage d'expression de gènes par RNA-seq dans nos modèles de sensibilité et de résistance à la cytotoxicité induite par les iBETs. Nous avons donc dans un premier temps comparé les transcriptomes des différentes lignées sans traitement et de réaliser des analyses d'ontologie. Ces analyses nous ont permis de constater que les lignées résistantes exprimaient de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la régulation de acides nucléiques et la transduction des signaux cellulaires. Ces données suggèrent que le programme de survie de ces lignées repose des gènes impliqués dans des voies de signalisation pro-prolifératives. Dans le cas des lignées sensibles, ces dernières semblent exprimer des gènes impliqués dans des fonctions anti-apoptotiques et jouant un rôle dans le métabolisme cellulaire, au niveau de la mitochondrie et du noyau. De plus, les analyses d'ontologie indiquent que ces gènes sont majoritairement sous le contrôle de MYC. Cette observation semble en cohérence avec ce qui est connue dans la littérature concernant l'implication de MYC dans le contrôle de plusieurs voies du métabolisme cellulaire (Dejure & Eilers, 2017; Dong et al., 2020). Une récente étude s'est intéressée à comprendre l'impact de MYC sur le métabolisme dans des modèles cellulaires et de xéno greffes de LBDGC dépendant de l'oncogène. Cette étude a notamment pu montrer que MYC était lié à des signatures de gènes impliqués dans le métabolisme de phosphorylation oxydative et que l'inhibition de cette voie conduisait à une augmentation de l'apoptose intrinsèque (G. Donati et al., 2022). Dans ce contexte, il serait intéressant d'explorer les différences entre la glycolyse et la respiration mitochondriale, entre les lignées sensibles et résistantes suite à des traitements par iBETs. Ces analyses seront réalisées par des analyses de taux de consommation d'oxygène

(OCR) et taux d'acidification extracellulaire (ECAR) via la technologie Agilent Seahorse. Ces données devraient permettre d'identifier quels inhibiteurs métaboliques pourraient être combinés aux iBETs pour augmenter leur efficacité anti-tumorale, ce qui sera par la suite testé dans nos modèles cellulaires.

Nous avons également, dans un second temps, analysé les transcriptomes différentiels des lignées traitées avec JQ1 ou ABBV-744 pendant 24h. Ces analyses ont d'abord montré que, comparé à JQ1, le composé ABBV-744 induisait de très faibles changements au niveau du transcriptome rendant très difficile l'interprétation de ces données. C'est pour cette raison que nous nous sommes concentrés sur l'analyse des effets de JQ1. De façon intéressante, nous avons pu constater que les gènes dérégulés par JQ1 étaient majoritairement lignée-spécifiques. Des analyses par enrichissement de set de gènes (GSEA) nous ont permis de montrer que comme décrit largement dans la littérature JQ1 semble réprimer des gènes cibles de MYC, ainsi que des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation. Nous avons cherché à savoir si certaines de ces signatures étaient retrouvées communément réprimées ou surexprimées entre lignées sensibles et résistantes à l'apoptose induite par les iBET. Ces analyses GSEA nous ont permis d'observer la présence de signatures spécifiquement réprimées comme la signature de gènes activés par l'oncogène KRAS dans les lignées sensibles, et comme la signature de gènes régulés par mTORC1 dans les lignées résistantes. La voie mTORC1 est notamment connue pour jouer un rôle important dans le métabolisme, et sa plasticité, dans les LBDGC (Ricci & Chiche, 2018). De plus nous avons pu observer une surexpression de gènes faisant partis de la signature de la signalisation du TGF $\beta$  dans les lignées résistantes.

---

Ces travaux de thèse ont donc contribué à mieux appréhender dans des modèles de LBDGC HGBL réfractaires, le contexte moléculaire pour lequel les inhibiteurs des protéines à bromodomains semblaient efficaces. Nos analyses nous ont également conduit à explorer les voies de signalisation liées à la cytotoxicité aux iBETs afin de trouver des combinaisons thérapeutiques capables de potentialiser l'effet anti-tumoral de ces inhibiteurs.

---

# RÉFÉRENCES

- Abedin, S. M., Boddy, C. S., & Munshi, H. G. (2016). BET inhibitors in the treatment of hematologic malignancies : Current insights and future prospects. *OncoTargets and therapy*, *9*, 5943-5953. <https://doi.org/10.2147/OTT.S100515>
- Aggarwal, R. R., Schweizer, M. T., Nanus, D. M., Pantuck, A. J., Heath, E. I., Campeau, E., Attwell, S., Norek, K., Snyder, M., Bauman, L., Lakhotia, S., Feng, F. Y., Small, E. J., Abida, W., & Alumkal, J. J. (2020). A Phase Ib/IIa Study of the Pan-BET Inhibitor ZEN-3694 in Combination with Enzalutamide in Patients with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *26*(20), 5338-5347. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1707>
- Aj, S., Jd, L., Er, B., Sl, A., Nd, C., J, C., Bd, D., H, D., Sh, E., Wj, F., Dc, H., Sg, H., S, J., Sl, K., Pj, K., Lt, L., J, L., Hl, M., Kc, M., ... Sw, E. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, *19*(2). <https://doi.org/10.1038/nm.3048>
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., ... Staudt, L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, *403*(6769), 503-511. <https://doi.org/10.1038/35000501>
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., & Mirsky, A. E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *51*, 786-794. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>
- Arnold, M., Bressin, A., Jasnovidova, O., Meierhofer, D., & Mayer, A. (2021). A BRD4-mediated elongation control point primes transcribing RNA polymerase II for 3'-processing and termination. *Molecular Cell*, *81*(17), 3589-3603.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.06.026>
- Arrowsmith, C. H., Bountra, C., Fish, P. V., Lee, K., & Schapira, M. (2012). Epigenetic protein families : A new frontier for drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *11*(5), 384-400. <https://doi.org/10.1038/nrd3674>
- Ayer, D. E. (1999). Histone deacetylases : Transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends in Cell Biology*, *9*(5), 193-198. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(99\)01536-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(99)01536-6)

- Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C., & Larsson, L. G. (2000). C-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood*, *95*(6), 2104-2110.
- Bailey, D., Jahagirdar, R., Gordon, A., Hafiane, A., Campbell, S., Chatur, S., Wagner, G. S., Hansen, H. C., Chiacchia, F. S., Johansson, J., Krimbou, L., Wong, N. C. W., & Genest, J. (2010). RVX-208 : A small molecule that increases apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein cholesterol in vitro and in vivo. *Journal of the American College of Cardiology*, *55*(23), 2580-2589. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.02.035>
- Bal, E., Kumar, R., Hadigol, M., Holmes, A. B., Hilton, L. K., Loh, J. W., Dreval, K., Wong, J. C. H., Vlasevska, S., Corinaldesi, C., Soni, R. K., Basso, K., Morin, R. D., Khiabani, H., Pasqualucci, L., & Dalla-Favera, R. (2022). Super-enhancer hypermutation alters oncogene expression in B cell lymphoma. *Nature*, *607*(7920), 808-815. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04906-8>
- Baluapuri, A., Wolf, E., & Eilers, M. (2020). Target gene-independent functions of MYC oncoproteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *21*(5), 255-267. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0215-2>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 381-395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bartlett, N. L., Wilson, W. H., Jung, S.-H., Hsi, E. D., Maurer, M. J., Pederson, L. D., Polley, M.-Y. C., Pitcher, B. N., Cheson, B. D., Kahl, B. S., Friedberg, J. W., Staudt, L. M., Wagner-Johnston, N. D., Blum, K. A., Abramson, J. S., Reddy, N. M., Winter, J. N., Chang, J. E., Gopal, A. K., ... Leonard, J. P. (2019). Dose-Adjusted EPOCH-R Compared With R-CHOP as Frontline Therapy for Diffuse Large B-Cell Lymphoma : Clinical Outcomes of the Phase III Intergroup Trial Alliance/CALGB 50303. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *37*(21), 1790-1799. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01994>
- Barwick, B. G., Scharer, C. D., Martinez, R. J., Price, M. J., Wein, A. N., Haines, R. R., Bally, A. P. R., Kohlmeier, J. E., & Boss, J. M. (2018). B cell activation and plasma cell differentiation are inhibited by de novo DNA methylation. *Nature Communications*, *9*(1), 1900. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04234-4>
- Basso, K., & Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nature Reviews. Immunology*, *15*(3), 172-184. <https://doi.org/10.1038/nri3814>
- Beck, S., Hanson, I., Kelly, A., Pappin, D. J., & Trowsdale, J. (1992). A homologue of the Drosophila female sterile homeotic (fsh) gene in the class II region of the human MHC.

- DNA Sequence: The Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 2(4), 203-210.  
<https://doi.org/10.3109/10425179209020804>
- Béguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K. L., Rosen, M., Shen, H., Yang, S. N., Wang, L., Ezponda, T., Martinez-Garcia, E., Zhang, H., Zheng, Y., Verma, S. K., McCabe, M. T., Ott, H. M., Van Aller, G. S., Kruger, R. G., Liu, Y., ... Melnick, A. M. (2013). EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell*, 23(5), 677-692.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.011>
- Béguelin, W., Teater, M., Gearhart, M. D., Calvo Fernández, M. T., Goldstein, R. L., Cárdenas, M. G., Hatzi, K., Rosen, M., Shen, H., Corcoran, C. M., Hamline, M. Y., Gascoyne, R. D., Levine, R. L., Abdel-Wahab, O., Licht, J. D., Shaknovich, R., Elemento, O., Bardwell, V. J., & Melnick, A. M. (2016). EZH2 and BCL6 Cooperate to Assemble CBX8-BCOR Complex to Repress Bivalent Promoters, Mediate Germinal Center Formation and Lymphomagenesis. *Cancer Cell*, 30(2), 197-213.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.07.006>
- Béguelin, W., Teater, M., Meydan, C., Hoehn, K. B., Phillip, J. M., Soshnev, A. A., Venturutti, L., Rivas, M. A., Calvo-Fernández, M. T., Gutierrez, J., Camarillo, J. M., Takata, K., Tarte, K., Kelleher, N. L., Steidl, C., Mason, C. E., Elemento, O., Allis, C. D., Kleinstein, S. H., & Melnick, A. M. (2020). Mutant EZH2 Induces a Pre-malignant Lymphoma Niche by Reprogramming the Immune Response. *Cancer Cell*, 37(5), 655-673.e11.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.04.004>
- Bemark, M., & Neuberger, M. S. (2000). The c-MYC allele that is translocated into the IgH locus undergoes constitutive hypermutation in a Burkitt's lymphoma line. *Oncogene*, 19(30), 3404-3410. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203686>
- Bereshchenko, O. R., Gu, W., & Dalla-Favera, R. (2002). Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nature Genetics*, 32(4), 606-613.  
<https://doi.org/10.1038/ng1018>
- Bhadury, J., Nilsson, L. M., Veppil Muralidharan, S., Green, L. C., Li, Z., Gesner, E. M., Hansen, H. C., Keller, U. B., McLure, K. G., & Nilsson, J. A. (2014). BET and HDAC inhibitors induce similar genes and biological effects and synergize to kill in Myc-induced murine lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(26).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1406722111>
- Bisgrove, D. A., Mahmoudi, T., Henklein, P., & Verdin, E. (2007). Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 104(34), 13690-13695.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0705053104>
- Blum, K. A., Abramson, J., Maris, M., Flinn, I., Goy, A., Mertz, J., Sims, R., Garner, F., Senderowicz, A., & Younes, A. (2018). A phase I study of CPI-0610, a bromodomain and extra terminal protein (BET) inhibitor in patients with relapsed or refractory lymphoma. *Annals of Oncology*, 29, iii7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy048>
- Boi, M., Gaudio, E., Bonetti, P., Kwee, I., Bernasconi, E., Tarantelli, C., Rinaldi, A., Testoni, M., Cascione, L., Ponzoni, M., Mensah, A. A., Stathis, A., Stussi, G., Riveiro, M. E., Herait, P., Inghirami, G., Cvitkovic, E., Zucca, E., & Bertoni, F. (2015a). The BET Bromodomain Inhibitor OTX015 Affects Pathogenetic Pathways in Preclinical B-cell Tumor Models and Synergizes with Targeted Drugs. *Clinical Cancer Research*, 21(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1561>
- Boi, M., Gaudio, E., Bonetti, P., Kwee, I., Bernasconi, E., Tarantelli, C., Rinaldi, A., Testoni, M., Cascione, L., Ponzoni, M., Mensah, A. A., Stathis, A., Stussi, G., Riveiro, M. E., Herait, P., Inghirami, G., Cvitkovic, E., Zucca, E., & Bertoni, F. (2015b). The BET Bromodomain Inhibitor OTX015 Affects Pathogenetic Pathways in Preclinical B-cell Tumor Models and Synergizes with Targeted Drugs. *Clinical Cancer Research*, 21(7), 1628-1638. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1561>
- Boice, M., Salloum, D., Mourcin, F., Sanghvi, V., Amin, R., Oricchio, E., Jiang, M., Mottok, A., Denis-Lagache, N., Ciriello, G., Tam, W., Teruya-Feldstein, J., de Stanchina, E., Chan, W. C., Malek, S. N., Ennishi, D., Brentjens, R. J., Gascoyne, R. D., Cogné, M., ... Wendel, H.-G. (2016). Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell*, 167(2), 405-418.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.032>
- Bolden, J. E., Peart, M. J., & Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(9), 769-784. <https://doi.org/10.1038/nrd2133>
- Bonev, B., & Cavalli, G. (2016). Organization and function of the 3D genome. *Nature Reviews. Genetics*, 17(11), 661-678. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.112>
- Brescia, P., Schneider, C., Holmes, A. B., Shen, Q., Hussein, S., Pasqualucci, L., Basso, K., & Dalla-Favera, R. (2018). MEF2B Instructs Germinal Center Development and Acts as an Oncogene in B Cell Lymphomagenesis. *Cancer Cell*, 34(3), 453-465.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.08.006>
- Calado, D. P., Sasaki, Y., Godinho, S. A., Pellerin, A., Köchert, K., Sleckman, B. P., de Alborán, I. M., Janz, M., Rodig, S., & Rajewsky, K. (2012). The cell-cycle regulator c-Myc is

- essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nature Immunology*, *13*(11), 1092-1100. <https://doi.org/10.1038/ni.2418>
- Callanan, M. B., Le Baccon, P., Mossuz, P., Duley, S., Bastard, C., Hamoudi, R., Dyer, M. J., Klobeck, G., Rimokh, R., Sotto, J. J., & Leroux, D. (2000). The IgG Fc receptor, FcγRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(1), 309-314. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.309>
- Campo, E., Jaffe, E. S., Cook, J. R., Quintanilla-Martinez, L., Swerdlow, S. H., Anderson, K. C., Brousset, P., Cerroni, L., de Leval, L., Dirnhofer, S., Dogan, A., Feldman, A. L., Fend, F., Friedberg, J. W., Gaulard, P., Ghia, P., Horwitz, S. M., King, R. L., Salles, G., ... Zelenetz, A. D. (2022). The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms : A report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*, *140*(11), 1229-1253. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015851>
- Cao, Z., Budinich, K. A., Huang, H., Ren, D., Lu, B., Zhang, Z., Chen, Q., Zhou, Y., Huang, Y.-H., Alikarami, F., Kingsley, M. C., Lenard, A. K., Wakabayashi, A., Khandros, E., Bailis, W., Qi, J., Carroll, M. P., Blobel, G. A., Faryabi, R. B., ... Shi, J. (2021). ZMYND8-regulated IRF8 transcription axis is an acute myeloid leukemia dependency. *Molecular Cell*, *81*(17), 3604-3622.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.018>
- Cardenas, M. G., Yu, W., Beguelin, W., Teater, M. R., Geng, H., Goldstein, R. L., Oswald, E., Hatzi, K., Yang, S.-N., Cohen, J., Shaknovich, R., Vanommeslaeghe, K., Cheng, H., Liang, D., Cho, H. J., Abbott, J., Tam, W., Du, W., Leonard, J. P., ... Melnick, A. M. (2016). Rationally designed BCL6 inhibitors target activated B cell diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(9), 3351-3362. <https://doi.org/10.1172/JCI85795>
- Cerchietti, L. C., Ghetu, A. F., Zhu, X., Da Silva, G. F., Zhong, S., Matthews, M., Bunting, K. L., Polo, J. M., Farès, C., Arrowsmith, C. H., Yang, S. N., Garcia, M., Coop, A., MacKerell, A. D., Privé, G. G., & Melnick, A. (2010). A Small-Molecule Inhibitor of BCL6 Kills DLBCL Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Cell*, *17*(4), 400-411. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.050>
- Ceribelli, M., Kelly, P. N., Shaffer, A. L., Wright, G. W., Xiao, W., Yang, Y., Mathews Griner, L. A., Guha, R., Shinn, P., Keller, J. M., Liu, D., Patel, P. R., Ferrer, M., Joshi, S., Nerle, S., Sandy, P., Normant, E., Thomas, C. J., & Staudt, L. M. (2014a). Blockade of oncogenic IκB kinase activity in diffuse large B-cell lymphoma by bromodomain and extraterminal domain protein inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 111(31), 11365-11370.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1411701111>
- Ceribelli, M., Kelly, P. N., Shaffer, A. L., Wright, G. W., Xiao, W., Yang, Y., Mathews Griner, L. A., Guha, R., Shinn, P., Keller, J. M., Liu, D., Patel, P. R., Ferrer, M., Joshi, S., Nerle, S., Sandy, P., Normant, E., Thomas, C. J., & Staudt, L. M. (2014b). Blockade of oncogenic IκB kinase activity in diffuse large B-cell lymphoma by bromodomain and extraterminal domain protein inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), 11365-11370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411701111>
- Chadwick, B. P., & Willard, H. F. (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *The Journal of Cell Biology*, 152(2), 375-384. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.2.375>
- Chaidos, A., Caputo, V., & Karadimitris, A. (2015). Inhibition of bromodomain and extra-terminal proteins (BET) as a potential therapeutic approach in haematological malignancies : Emerging preclinical and clinical evidence. *Therapeutic Advances in Hematology*, 6(3), 128-141. <https://doi.org/10.1177/2040620715576662>
- Chang, D. W., Claassen, G. F., Hann, S. R., & Cole, M. D. (2000). The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals. *Molecular and Cellular Biology*, 20(12), 4309-4319. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.12.4309-4319.2000>
- Chapuy, B., McKeown, M. R., Lin, C. Y., Monti, S., Roemer, M. G. M., Qi, J., Rahl, P. B., Sun, H. H., Yeda, K. T., Doench, J. G., Reichert, E., Kung, A. L., Rodig, S. J., Young, R. A., Shipp, M. A., & Bradner, J. E. (2013a). Discovery and Characterization of Super-Enhancer-Associated Dependencies in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*, 24(6), 777-790. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.11.003>
- Chapuy, B., McKeown, M. R., Lin, C. Y., Monti, S., Roemer, M. G. M., Qi, J., Rahl, P. B., Sun, H. H., Yeda, K. T., Doench, J. G., Reichert, E., Kung, A. L., Rodig, S. J., Young, R. A., Shipp, M. A., & Bradner, J. E. (2013b). Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*, 24(6), 777-790. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.11.003>
- Chapuy, B., Stewart, C., Dunford, A. J., Kim, J., Kamburov, A., Redd, R. A., Lawrence, M. S., Roemer, M. G. M., Li, A. J., Ziepert, M., Staiger, A. M., Wala, J. A., Ducar, M. D., Leshchiner, I., Rheinbay, E., Taylor-Weiner, A., Coughlin, C. A., Hess, J. M., Peadamallu, C. S., ... Shipp, M. A. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nature Medicine*, 24(5), 679-690. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0016-8>

- Chen, H., Liu, H., & Qing, G. (2018). Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *3*, 5. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0008-7>
- Chen, I. P., Longbotham, J. E., McMahon, S., Suryawanshi, R. K., Khalid, M. M., Taha, T. Y., Tabata, T., Hayashi, J. M., Soveg, F. W., Carlson-Stevermer, J., Gupta, M., Zhang, M. Y., Lam, V. L., Li, Y., Yu, Z., Titus, E. W., Diallo, A., Oki, J., Holden, K., ... Ott, M. (2022). Viral E protein neutralizes BET protein-mediated post-entry antagonism of SARS-CoV-2. *Cell Reports*, *40*(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111088>
- Chen, I. P., & Ott, M. (2022). Viral Hijacking of BET Proteins. *Viruses*, *14*(10), 2274. <https://doi.org/10.3390/v14102274>
- Cheung, K. L., Kim, C., & Zhou, M.-M. (2021). The Functions of BET Proteins in Gene Transcription of Biology and Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.728777>
- Cinar, M., Rosenfelt, F., Rokhsar, S., Lopategui, J., Pillai, R., Cervania, M., Pao, A., Cinar, B., & Alkan, S. (2015). Concurrent inhibition of MYC and BCL2 is a potentially effective treatment strategy for double hit and triple hit B-cell lymphomas. *Leukemia Research*, *39*(7), 730-738. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2015.04.003>
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., & Busslinger, M. (2007). Pax5 : The guardian of B cell identity and function. *Nature Immunology*, *8*(5), 463-470. <https://doi.org/10.1038/ni1454>
- Cochran, A. G., Conery, A. R., & Sims, R. J. (2019). Bromodomains : A new target class for drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *18*(8), 609-628. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0030-7>
- Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., Reyes, F., Lederlin, P., & Gisselbrecht, C. (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, *346*(4), 235-242. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011795>
- Coiffier, B., Thieblemont, C., Van Den Neste, E., Lepeu, G., Plantier, I., Castaigne, S., Lefort, S., Marit, G., Macro, M., Sebban, C., Belhadj, K., Bordessoule, D., Fermé, C., & Tilly, H. (2010). Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients : A study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*, *116*(12), 2040-2045. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276246>

- Copie-Bergman, C., Cuillière-Dartigues, P., Baia, M., Briere, J., Delarue, R., Canioni, D., Salles, G., Parrens, M., Belhadj, K., Fabiani, B., Recher, C., Petrella, T., Ketterer, N., Peyrade, F., Haioun, C., Nagel, I., Siebert, R., Jardin, F., Leroy, K., ... Gaulard, P. (2015). MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy : A GELA/LYSA study. *Blood*, *126*(22), 2466-2474. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-647602>
- Correia, C., Schneider, P. A., Dai, H., Dogan, A., Maurer, M. J., Church, A. K., Novak, A. J., Feldman, A. L., Wu, X., Ding, H., Meng, X. W., Cerhan, J. R., Slager, S. L., Macon, W. R., Habermann, T. M., Karp, J. E., Gore, S. D., Kay, N. E., Jelinek, D. F., ... Kaufmann, S. H. (2015). BCL2 mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma. *Blood*, *125*(4), 658-667. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-571786>
- Cummin, T. E. C., Cox, K. L., Murray, T. D., Turaj, A. H., Dunning, L., English, V. L., Fell, R., Packham, G., Ma, Y., Powell, B., Johnson, P. W. M., Cragg, M. S., & Carter, M. J. (2020). BET inhibitors synergize with venetoclax to induce apoptosis in MYC-driven lymphomas with high BCL-2 expression. *Blood Advances*, *4*(14), 3316-3328. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002231>
- Daneshvar, K., Ardehali, M. B., Klein, I. A., Kratkiewicz, A. J., Zhou, C., Mahpour, A., Cook, B. M., Li, W., Pondick, J. V., Moran, S. P., Young, R. A., Kingston, R. E., & Mullen, A. C. (2019). *LncRNA DIGIT and BRD3 protein form phase-separated condensates to regulate endoderm differentiation* [Preprint]. *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1101/547513>
- Davies, A., Cummin, T. E., Barrans, S., Maishman, T., Mamot, C., Novak, U., Caddy, J., Stanton, L., Kazmi-Stokes, S., McMillan, A., Fields, P., Pocock, C., Collins, G. P., Stephens, R., Cucco, F., Clipson, A., Sha, C., Tooze, R., Care, M. A., ... Johnson, P. W. M. (2019). Gene-expression profiling of bortezomib added to standard chemoimmunotherapy for diffuse large B-cell lymphoma (REMoDL-B) : An open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *20*(5), 649-662. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30935-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30935-5)
- Dawson, M. A., Prinjha, R. K., Dittmann, A., Giotopoulos, G., Bantscheff, M., Chan, W.-I., Robson, S. C., Chung, C., Hopf, C., Savitski, M. M., Huthmacher, C., Gudgin, E., Lugo, D., Beinke, S., Chapman, T. D., Roberts, E. J., Soden, P. E., Auger, K. R., Mirguet, O., ... Kouzarides, T. (2011). Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature*, *478*(7370), 529-533. <https://doi.org/10.1038/nature10509>

- De Silva, N. S., & Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews Immunology*, *15*(3), 137-148. <https://doi.org/10.1038/nri3804>
- De Silva, N. S., Simonetti, G., Heise, N., & Klein, U. (2012). The diverse roles of IRF4 in late germinal center B-cell differentiation. *Immunological Reviews*, *247*(1), 73-92. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01113.x>
- Dejure, F. R., & Eilers, M. (2017). MYC and tumor metabolism : Chicken and egg. *The EMBO Journal*, *36*(23), 3409-3420. <https://doi.org/10.15252/embj.201796438>
- Delgado-Benito, V., Rosen, D. B., Wang, Q., Gazumyan, A., Pai, J. A., Oliveira, T. Y., Sundaravinayagam, D., Zhang, W., Andreani, M., Keller, L., Kieffer-Kwon, K.-R., Pełkowska, A., Jung, S., Driesner, M., Subbotin, R. I., Casellas, R., Chait, B. T., Nussenzweig, M. C., & Di Virgilio, M. (2018). The Chromatin Reader ZMYND8 Regulates Igh Enhancers to Promote Immunoglobulin Class Switch Recombination. *Molecular Cell*, *72*(4), 636-649.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.042>
- Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., Kastritis, E., Gilpatrick, T., Paranal, R. M., Qi, J., Chesi, M., Schinzel, A. C., McKeown, M. R., Heffernan, T. P., Vakoc, C. R., Bergsagel, P. L., Ghobrial, I. M., Richardson, P. G., Young, R. A., ... Mitsiades, C. S. (2011a). BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target c-Myc. *Cell*, *146*(6), 904-917. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.017>
- Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., Kastritis, E., Gilpatrick, T., Paranal, R. M., Qi, J., Chesi, M., Schinzel, A. C., McKeown, M. R., Heffernan, T. P., Vakoc, C. R., Bergsagel, P. L., Ghobrial, I. M., Richardson, P. G., Young, R. A., ... Mitsiades, C. S. (2011b). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*, *146*(6), 904-917. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.017>
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., & Staudt, L. M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science (New York, N.Y.)*, *276*(5312), 589-592. <https://doi.org/10.1126/science.276.5312.589>
- DeVita, V. T., Canellos, G. P., Chabner, B., Schein, P., Hubbard, S. P., & Young, R. C. (1975). Advanced diffuse histiocytic lymphoma, a potentially curable disease. *Lancet (London, England)*, *1*(7901), 248-250. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)91142-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(75)91142-3)
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., & Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, *399*(6735), 491-496. <https://doi.org/10.1038/20974>

- Dickinson, M., Briones, J., Herrera, A. F., González-Barca, E., Ghosh, N., Cordoba, R., Rutherford, S. C., Bournazou, E., Labriola-Tompkins, E., Franjkovic, I., Chesne, E., Brouwer-Visser, J., Lechner, K., Brennan, B., Nüesch, E., DeMario, M., Rüttinger, D., Kornacker, M., & Hutchings, M. (2021). Phase 1b study of the BET protein inhibitor RO6870810 with venetoclax and rituximab in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Advances*, *5*(22), 4762-4770. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004619>
- Dominguez, P. M., Ghamlouch, H., Rosikiewicz, W., Kumar, P., Béguelin, W., Fontán, L., Rivas, M. A., Pawlikowska, P., Armand, M., Mouly, E., Torres-Martin, M., Doane, A. S., Calvo Fernandez, M. T., Durant, M., Della-Valle, V., Teater, M., Cimmino, L., Droin, N., Tadros, S., ... Melnick, A. M. (2018). TET2 Deficiency Causes Germinal Center Hyperplasia, Impairs Plasma Cell Differentiation, and Promotes B-cell Lymphomagenesis. *Cancer Discovery*, *8*(12), 1632-1653. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0657>
- Dominguez-Sola, D., Ying, C. Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D. A., Gu, W., Gautier, J., & Dalla-Favera, R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*, *448*(7152), 445-451. <https://doi.org/10.1038/nature05953>
- Donati, B., Lorenzini, E., & Ciarrocchi, A. (2018). BRD4 and Cancer : Going beyond transcriptional regulation. *Molecular Cancer*, *17*(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0915-9>
- Donati, G., Ravà, M., Filipuzzi, M., Nicoli, P., Cassina, L., Verrecchia, A., Doni, M., Rodighiero, S., Parodi, F., Boletta, A., Vellano, C. P., Marszalek, J. R., Draetta, G. F., & Amati, B. (2022). Targeting mitochondrial respiration and the BCL2 family in high-grade MYC- associated B-cell lymphoma. *Molecular Oncology*, *16*(5), 1132-1152. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13115>
- Dong, Y., Tu, R., Liu, H., & Qing, G. (2020). Regulation of cancer cell metabolism : Oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00235-2>
- Doroshov, D. B., Eder, J. P., & LoRusso, P. M. (2017). BET inhibitors : A novel epigenetic approach. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *28*(8), 1776-1787. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx157>
- Dunleavy, K., Fanale, M. A., Abramson, J. S., Noy, A., Caimi, P. F., Pittaluga, S., Parekh, S., Lacasce, A., Hayslip, J. W., Jagadeesh, D., Nagpal, S., Lechowicz, M. J., Gaur, R., Lucas, A., Melani, C., Roschewski, M., Steinberg, S. M., Jaffe, E. S., Kahl, B., ... Wilson,

- W. H. (2018). A Prospective Multicenter Phase 2 Study of Dose-Adjusted-EPOCH-R in Untreated MYC-Rearranged Aggressive B-cell Lymphoma. *The Lancet. Haematology*, 5(12), e609-e617. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(18\)30177-7](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(18)30177-7)
- Dupont, T., Yang, S., Patel, J., Hatzi, K., Malik, A., Tam, W., Martin, P., Leonard, J., Melnick, A., & Cerchietti, L. (2015). Selective targeting of BCL6 induces oncogene addiction switching to BCL2 in B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 7(3), 3520-3532. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6513>
- Eischer, N., Arnold, M., & Mayer, A. (s. d.). Emerging roles of BET proteins in transcription and co-transcriptional RNA processing. *WIREs RNA*, n/a(n/a), e1734. <https://doi.org/10.1002/wrna.1734>
- Emadali, A., Rousseaux, S., Bruder-Costa, J., Rome, C., Duley, S., Hamaidia, S., Betton, P., Debernardi, A., Leroux, D., Bernay, B., Kieffer-Jaquinod, S., Combes, F., Ferri, E., McKenna, C. E., Petosa, C., Bruley, C., Garin, J., Ferro, M., Gressin, R., ... Khochbin, S. (2013). Identification of a novel BET bromodomain inhibitor-sensitive, gene regulatory circuit that controls Rituximab response and tumour growth in aggressive lymphoid cancers. *EMBO Molecular Medicine*, 5(8), 1180-1195. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202034>
- Epigenetics* (2 nd ed). (2015). Cold Spring Harbor laboratory press.
- Esteve-Arenys, A., Valero, J. G., Chamorro-Jorganes, A., Gonzalez, D., Rodriguez, V., Dlouhy, I., Salaverria, I., Campo, E., Colomer, D., Martinez, A., Rymkiewicz, G., Pérez-Galán, P., Lopez-Guillermo, A., & Roué, G. (2018). The BET bromodomain inhibitor CPI203 overcomes resistance to ABT-199 (venetoclax) by downregulation of BFL-1/A1 in in vitro and in vivo models of MYC+/BCL2+ double hit lymphoma. *Oncogene*, 37(14), 1830-1844. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0111-1>
- Faivre, E. J., McDaniel, K. F., Albert, D. H., Mantena, S. R., Plotnik, J. P., Wilcox, D., Zhang, L., Bui, M. H., Sheppard, G. S., Wang, L., Sehgal, V., Lin, X., Huang, X., Lu, X., Uziel, T., Hessler, P., Lam, L. T., Bellin, R. J., Mehta, G., ... Shen, Y. (2020a). Selective inhibition of the BD2 bromodomain of BET proteins in prostate cancer. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1930-8>
- Faivre, E. J., McDaniel, K. F., Albert, D. H., Mantena, S. R., Plotnik, J. P., Wilcox, D., Zhang, L., Bui, M. H., Sheppard, G. S., Wang, L., Sehgal, V., Lin, X., Huang, X., Lu, X., Uziel, T., Hessler, P., Lam, L. T., Bellin, R. J., Mehta, G., ... Shen, Y. (2020b). Selective inhibition of the BD2 bromodomain of BET proteins in prostate cancer. *Nature*, 578(7794), 306-310. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1930-8>

- Falchook, G., Rosen, S., LoRusso, P., Watts, J., Gupta, S., Coombs, C. C., Talpaz, M., Kurzrock, R., Mita, M., Cassaday, R., Harb, W., Peguero, J., Smith, D. C., Piha-Paul, S. A., Szmulewitz, R., Noel, M. S., Yeleswaram, S., Liu, P., Switzky, J., ... Mehta, A. (2020). Development of 2 Bromodomain and Extraterminal Inhibitors With Distinct Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profiles for the Treatment of Advanced Malignancies. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *26*(6), 1247-1257. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4071>
- Ferri, E., Petosa, C., & McKenna, C. E. (2016). Bromodomains : Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochemical Pharmacology*, *106*, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.005>
- Filippakopoulos, P., & Knapp, S. (2014a). Targeting bromodomains : Epigenetic readers of lysine acetylation. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *13*(5), 337-356. <https://doi.org/10.1038/nrd4286>
- Filippakopoulos, P., & Knapp, S. (2014b). Targeting bromodomains : Epigenetic readers of lysine acetylation. *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(5), 337-356. <https://doi.org/10.1038/nrd4286>
- Filippakopoulos, P., & Knapp, S. (2020). Next-generation epigenetic inhibitors. *Science*, *368*(6489), 367-368. <https://doi.org/10.1126/science.abb5060>
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., ... Bradner, J. E. (2010a). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, *468*(7327), 1067-1073. <https://doi.org/10.1038/nature09504>
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., ... Bradner, J. E. (2010b). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, *468*(7327), 1067-1073. <https://doi.org/10.1038/nature09504>
- French, C. A., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Grier, H. E., Perez-Atayde, A. R., & Fletcher, J. A. (2003). BRD4-NUT Fusion Oncogene : A Novel Mechanism in Aggressive Carcinoma1. *Cancer Research*, *63*(2), 304-307.
- Fujisawa, T., & Filippakopoulos, P. (2017). Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(4), Art. 4. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.143>

- Fyodorov, D. V., Zhou, B.-R., Skoultchi, A. I., & Bai, Y. (2018). Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *19*(3), 192-206. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.94>
- Ghiraldini, F. G., Filipescu, D., & Bernstein, E. (2021). Solid tumours hijack the histone variant network. *Nature Reviews. Cancer*, *21*(4), 257-275. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00330-0>
- Gilan, O., Rioja, I., Knezevic, K., Bell, M. J., Yeung, M. M., Harker, N. R., Lam, E. Y. N., Chung, C., Bamborough, P., Petretich, M., Urh, M., Atkinson, S. J., Bassil, A. K., Roberts, E. J., Vassiliadis, D., Burr, M. L., Preston, A. G. S., Wellaway, C., Werner, T., ... Dawson, M. A. (2020a). Selective targeting of BD1 and BD2 of the BET proteins in cancer and immunoinflammation. *Science*, *368*(6489), 387-394. <https://doi.org/10.1126/science.aaz8455>
- Gilan, O., Rioja, I., Knezevic, K., Bell, M. J., Yeung, M. M., Harker, N. R., Lam, E. Y. N., Chung, C.-W., Bamborough, P., Petretich, M., Urh, M., Atkinson, S. J., Bassil, A. K., Roberts, E. J., Vassiliadis, D., Burr, M. L., Preston, A. G. S., Wellaway, C., Werner, T., ... Dawson, M. A. (2020b). Selective targeting of BD1 and BD2 of the BET proteins in cancer and immunoinflammation. *Science (New York, N.Y.)*, *368*(6489), 387-394. <https://doi.org/10.1126/science.aaz8455>
- Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., O'Meara, M. J., Rezelj, V. V., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Hüttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Foussard, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., ... Krogan, N. J. (2020). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, *583*(7816), Art. 7816. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thévenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., & Caron, C. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *176*(3), 283-294. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604141>
- Grayson, A. R., Walsh, E. M., Cameron, M. J., Godec, J., Ashworth, T., Ambrose, J. M., Aserlind, A. B., Wang, H., Evan, G. I., Kluk, M. J., Bradner, J. E., Aster, J. C., & French, C. A. (2014). MYC, a downstream target of BRD-NUT, is necessary and sufficient for the blockade of differentiation in NUT midline carcinoma. *Oncogene*, *33*(13), Art. 13. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.126>
- Gu, W., Shi, X. L., & Roeder, R. G. (1997). Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature*, *387*(6635), 819-823. <https://doi.org/10.1038/42972>

- Guièze, R., Liu, V. M., Rosebrock, D., Jourdain, A. A., Hernández-Sánchez, M., Martínez Zurita, A., Sun, J., Ten Hacken, E., Baranowski, K., Thompson, P. A., Heo, J.-M., Cartun, Z., Aygün, O., Iorgulescu, J. B., Zhang, W., Notarangelo, G., Livitz, D., Li, S., Davids, M. S., ... Wu, C. J. (2019). Mitochondrial Reprogramming Underlies Resistance to BCL-2 Inhibition in Lymphoid Malignancies. *Cancer Cell*, *36*(4), 369-384.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.005>
- Hajmirza, A., Emadali, A., Gauthier, A., Casasnovas, O., Gressin, R., & Callanan, M. B. (2018). BET Family Protein BRD4 : An Emerging Actor in NFκB Signaling in Inflammation and Cancer. *Biomedicines*, *6*(1), E16. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010016>
- Han, H., Jain, A. D., Truica, M. I., Izquierdo-Ferrer, J., Anker, J. F., Lysy, B., Sagar, V., Luan, Y., Chalmers, Z. R., Unno, K., Mok, H., Vatapalli, R., Yoo, Y. A., Rodriguez, Y., Kandela, I., Parker, J. B., Chakravarti, D., Mishra, R. K., Schiltz, G. E., & Abdulkadir, S. A. (2019). Small-Molecule MYC Inhibitors Suppress Tumor Growth and Enhance Immunotherapy. *Cancer Cell*, *36*(5), 483-497.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.10.001>
- Han, J. (2006). MyD88 beyond Toll. *Nature Immunology*, *7*(4), 370-371. <https://doi.org/10.1038/ni0406-370>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer : New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hans, C. P., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Gascoyne, R. D., Delabie, J., Ott, G., Müller-Hermelink, H. K., Campo, E., Braziel, R. M., Jaffe, E. S., Pan, Z., Farinha, P., Smith, L. M., Falini, B., Banham, A. H., Rosenwald, A., Staudt, L. M., Connors, J. M., Armitage, J. O., & Chan, W. C. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, *103*(1), 275-282. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1545>
- Hargreaves, D. C., Horng, T., & Medzhitov, R. (2009). Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell*, *138*(1), 129-145. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.047>
- Harrington, C. T., Sotillo, E., Robert, A., Hayer, K. E., Bogusz, A. M., Psathas, J., Yu, D., Taylor, D., Dang, C. V., Klein, P. S., Hogarty, M. D., Georger, B., El-Deiry, W. S., Wiels, J., & Thomas-Tikhonenko, A. (2019). Transient stabilization, rather than inhibition, of MYC

- amplifies extrinsic apoptosis and therapeutic responses in refractory B-cell lymphoma. *Leukemia*, *33*(10), 2429-2441. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0454-4>
- Haynes, S. R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., & Dawid, I. B. (1992). The bromodomain : A conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins. *Nucleic Acids Research*, *20*(10), 2603. <https://doi.org/10.1093/nar/20.10.2603>
- Heise, N., De Silva, N. S., Silva, K., Carette, A., Simonetti, G., Pasparakis, M., & Klein, U. (2014). Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF- $\kappa$ B transcription factor subunits. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(10), 2103-2118. <https://doi.org/10.1084/jem.20132613>
- Hemann, M. T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J. A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J. L., Tansey, W. P., & Lowe, S. W. (2005). Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature*, *436*(7052), 807-811. <https://doi.org/10.1038/nature03845>
- Heward, J., Konali, L., D'Avola, A., Close, K., Yeomans, A., Philpott, M., Dunford, J., Rahim, T., Al Seraihi, A. F., Wang, J., Korfi, K., Araf, S., Iqbal, S., Bewicke-Copley, F., Kumar, E., Barisic, D., Calaminici, M., Clear, A., Gribben, J., ... Fitzgibbon, J. (2021). KDM5 inhibition offers a novel therapeutic strategy for the treatment of KMT2D mutant lymphomas. *Blood*, *138*(5), 370-381. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008743>
- Hnisz, D., Abraham, B. J., Lee, T. I., Lau, A., Saint-André, V., Sigova, A. A., Hoke, H. A., & Young, R. A. (2013). Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*, *155*(4), 934-947. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.053>
- Hodawadekar, S. C., & Marmorstein, R. (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes : Structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene*, *26*(37), Art. 37. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210619>
- Hogg, S. J., Newbold, A., Vervoort, S. J., Cluse, L. A., Martin, B. P., Gregory, G. P., Lefebure, M., Vidacs, E., Tothill, R. W., Bradner, J. E., Shortt, J., & Johnstone, R. W. (2016). BET Inhibition Induces Apoptosis in Aggressive B-Cell Lymphoma via Epigenetic Regulation of BCL-2 Family Members. *Molecular Cancer Therapeutics*, *15*(9), 2030-2041. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0924>
- Hogg, S. J., Vervoort, S. J., Deswal, S., Ott, C. J., Li, J., Cluse, L. A., Beavis, P. A., Darcy, P. K., Martin, B. P., Spencer, A., Traunbauer, A. K., Sadovnik, I., Bauer, K., Valent, P., Bradner, J. E., Zuber, J., Shortt, J., & Johnstone, R. W. (2017). BET-Bromodomain Inhibitors Engage the Host Immune System and Regulate Expression of the Immune Checkpoint Ligand PD-L1. *Cell Reports*, *18*(9), 2162-2174. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.011>

- Hsu, S. C., Gilgenast, T. G., Bartman, C. R., Edwards, C. R., Stonestrom, A. J., Huang, P., Emerson, D. J., Evans, P., Werner, M. T., Keller, C. A., Giardine, B., Hardison, R. C., Raj, A., Phillips-Cremins, J. E., & Blobel, G. A. (2017). The BET Protein BRD2 Cooperates with CTCF to Enforce Transcriptional and Architectural Boundaries. *Molecular Cell*, *66*(1), 102-116.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.027>
- ISCN 2020 / Karger Book*. (s. d.). Consulté 12 janvier 2023, à l'adresse <https://www.karger.com/Book/Home/279152>
- Italiano, A., Soria, J.-C., Toulmonde, M., Michot, J.-M., Lucchesi, C., Varga, A., Coindre, J.-M., Blakemore, S. J., Clawson, A., Suttle, B., McDonald, A. A., Woodruff, M., Ribich, S., Hedrick, E., Keilhack, H., Thomson, B., Owa, T., Copeland, R. A., Ho, P. T. C., & Ribrag, V. (2018). Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours : A first-in-human, open-label, phase 1 study. *The Lancet. Oncology*, *19*(5), 649-659. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30145-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30145-1)
- Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S., & Tjian, R. (2000). Structure and Function of a Human TAFII250 Double Bromodomain Module. *Science*, *288*(5470), 1422-1425. <https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1422>
- Jang, M. K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H.-S., Brady, J. N., & Ozato, K. (2005). The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Molecular Cell*, *19*(4), 523-534. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.027>
- Janouskova, H., El Tekle, G., Bellini, E., Udeshi, N. D., Rinaldi, A., Ulbricht, A., Bernasocchi, T., Civenni, G., Losa, M., Svinkina, T., Bielski, C. M., Kryukov, G. V., Cascione, L., Napoli, S., Enchev, R. I., Mutch, D. G., Carney, M. E., Berchuck, A., Winterhoff, B. J. N., ... Theurillat, J.-P. P. (2017). Opposing effects of cancer-type-specific SPOP mutants on BET protein degradation and sensitivity to BET inhibitors. *Nature Medicine*, *23*(9), 1046-1054. <https://doi.org/10.1038/nm.4372>
- Jia, Y., Chng, W.-J., & Zhou, J. (2019). Super-enhancers : Critical roles and therapeutic targets in hematologic malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0757-y>
- Jiang, Y., Ortega-Molina, A., Geng, H., Ying, H.-Y., Hatzi, K., Parsa, S., McNally, D., Wang, L., Doane, A. S., Agirre, X., Teater, M., Meydan, C., Li, Z., Poloway, D., Wang, S., Ennishi, D., Scott, D. W., Stengel, K. R., Kranz, J. E., ... Melnick, A. M. (2017). CREBBP Inactivation Promotes the Development of HDAC3-Dependent Lymphomas. *Cancer Discovery*, *7*(1), 38-53. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0975>

- Kalashnikova, A. A., Porter-Goff, M. E., Muthurajan, U. M., Luger, K., & Hansen, J. C. (2013). The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. *Journal of the Royal Society Interface*, *10*(82), 20121022. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.1022>
- Kallappagoudar, S., Yadav, R. K., Lowe, B. R., & Partridge, J. F. (2015). Histone H3 mutations—A special role for H3.3 in tumorigenesis? *Chromosoma*, *124*(2), 177-189. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0510-4>
- Konuma, T., Yu, D., Zhao, C., Ju, Y., Sharma, R., Ren, C., Zhang, Q., Zhou, M.-M., & Zeng, L. (2017). Structural Mechanism of the Oxygenase JMJD6 Recognition by the Extraterminal (ET) Domain of BRD4. *Scientific Reports*, *7*(1), 16272. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16588-8>
- Kosak, S. T., Skok, J. A., Medina, K. L., Riblet, R., Le Beau, M. M., Fisher, A. G., & Singh, H. (2002). Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5565), 158-162. <https://doi.org/10.1126/science.1068768>
- Koschmann, C., Calinescu, A.-A., Nunez, F. J., Mackay, A., Fazal-Salom, J., Thomas, D., Mendez, F., Kamran, N., Dzaman, M., Mulpuri, L., Krasinkiewicz, J., Doherty, R., Lemons, R., Brosnan-Cashman, J. A., Li, Y., Roh, S., Zhao, L., Appelman, H., Ferguson, D., ... Castro, M. G. (2016). ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Science Translational Medicine*, *8*(328), 328ra28-328ra28. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac8228>
- Küppers, R., & Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*, *20*(40), 5580-5594. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204640>
- Kurimchak, A. M., Shelton, C., Duncan, K. E., Johnson, K. J., Brown, J., O'Brien, S., Gabbasov, R., Fink, L. S., Li, Y., Lounsbury, N., Abou-Gharbia, M., Childers, W. E., Connolly, D. C., Chernoff, J., Peterson, J. R., & Duncan, J. S. (2016). Resistance to BET Bromodomain Inhibitors Is Mediated by Kinome Reprogramming in Ovarian Cancer. *Cell Reports*, *16*(5), 1273-1286. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.091>
- Lacy, S. E., Barrans, S. L., Beer, P. A., Painter, D., Smith, A. G., Roman, E., Cooke, S. L., Ruiz, C., Glover, P., Van Hoppe, S. J. L., Webster, N., Campbell, P. J., Tooze, R. M., Patmore, R., Burton, C., Crouch, S., & Hodson, D. J. (2020). Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes : A Haematological Malignancy Research Network report. *Blood*, *135*(20), 1759-1771. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003535>
- Lamonica, J. M., Deng, W., Kadauke, S., Campbell, A. E., Gamsjaeger, R., Wang, H., Cheng, Y., Billin, A. N., Hardison, R. C., Mackay, J. P., & Blobel, G. A. (2011). Bromodomain

- protein Brd3 associates with acetylated GATA1 to promote its chromatin occupancy at erythroid target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(22), E159-168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102140108>
- Lasorsa, E., Smonksey, M., Kirk, J. S., Rosario, S., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., & Ellis, L. (2015). Mitochondrial protection impairs BET bromodomain inhibitor-mediated cell death and provides rationale for combination therapeutic strategies. *Cell Death & Disease*, *6*(12), e2014-e2014. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.352>
- Le Noir, S., Boyer, F., Lecardeur, S., Brousse, M., Oruc, Z., Cook-Moreau, J., Denizot, Y., & Cogné, M. (2017). Functional anatomy of the immunoglobulin heavy chain 3' super-enhancer needs not only core enhancer elements but also their unique DNA context. *Nucleic Acids Research*, *45*(10), 5829-5837. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx203>
- LeRoy, G., Rickards, B., & Flint, S. J. (2008). The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Molecular Cell*, *30*(1), 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.01.018>
- Li, L., Pongtornpipat, P., Tiutan, T., Kendrick, S. L., Park, S., Persky, D. O., Rimsza, L. M., Puvvada, S. D., & Schatz, J. H. (2015). Synergistic induction of apoptosis in high-risk DLBCL by BCL2 inhibition with ABT-199 combined with pharmacologic loss of MCL1. *Leukemia*, *29*(8), 1702-1712. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.99>
- Li, W., Gupta, S. K., Han, W., Kundson, R. A., Nelson, S., Knutson, D., Greipp, P. T., Elswa, S. F., Sotomayor, E. M., & Gupta, M. (2019a). Targeting MYC activity in double-hit lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with epigenetic bromodomain inhibitors. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0761-2>
- Li, W., Gupta, S. K., Han, W., Kundson, R. A., Nelson, S., Knutson, D., Greipp, P. T., Elswa, S. F., Sotomayor, E. M., & Gupta, M. (2019b). Targeting MYC activity in double-hit lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with epigenetic bromodomain inhibitors. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0761-2>
- Liu, B., Liu, X., Han, L., Chen, X., Wu, X., Wu, J., Yan, D., Wang, Y., Liu, S., Shan, L., Zhang, Y., & Shang, Y. (2022). BRD4-directed super-enhancer organization of transcription repression programs links to chemotherapeutic efficacy in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(6), e2109133119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2109133119>

- Lovén, J., Hoke, H. A., Lin, C. Y., Lau, A., Orlando, D. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013a). Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*, *153*(2), 320-334. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.036>
- Lovén, J., Hoke, H. A., Lin, C. Y., Lau, A., Orlando, D. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013b). Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*, *153*(2), 320-334. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.036>
- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J. P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S. Y. R., & Almouzni, G. (2009). The HP1 $\alpha$ -CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO reports*, *10*(7), 769-775. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.90>
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, *389*(6648), 251-260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Luna-Peláez, N., & García-Domínguez, M. (2018). Lysine-Mediated Recruitment of Brd2 to the Chromatin Attenuates Nanog Downregulation Following Induction of Differentiation. *Journal of Molecular Biology*, *430*(8), 1084-1097. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.02.023>
- Lunning, M. A., & Green, M. R. (2015). Mutation of chromatin modifiers; an emerging hallmark of germinal center B-cell lymphomas. *Blood Cancer Journal*, *5*, e361. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.89>
- Luo, W., Weisel, F., & Shlomchik, M. J. (2018). B Cell Receptor and CD40 Signaling Are Rewired for Synergistic Induction of the c-Myc Transcription Factor in Germinal Center B Cells. *Immunity*, *48*(2), 313-326.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.008>
- Lygerou, Z., Conesa, C., Lesage, P., Swanson, R. N., Ruet, A., Carlson, M., Sentenac, A., & Séraphin, B. (1994). The yeast BDF1 gene encodes a transcription factor involved in the expression of a broad class of genes including snRNAs. *Nucleic Acids Research*, *22*(24), 5332-5340.
- Mahani, A., Arvidsson, G., Sadeghi, L., Grandien, A., & Wright, A. P. H. (2021). Differential Transcriptional Reprogramming by Wild Type and Lymphoma-Associated Mutant MYC Proteins as B-Cells Convert to a Lymphoma Phenotype. *Cancers*, *13*(23), 6093. <https://doi.org/10.3390/cancers13236093>
- Martire, S., & Banaszynski, L. A. (2020). The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *21*(9), 522-541. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0262-8>

- McGinty, R. K., & Tan, S. (2015). Nucleosome structure and function. *Chemical Reviews*, *115*(6), 2255-2273. <https://doi.org/10.1021/cr500373h>
- Méchali, M. (2022). Replication timing and genetic instability. *Science (New York, N.Y.)*, *377*(6612), 1259-1260. <https://doi.org/10.1126/science.ade4734>
- Mendiratta, S., Gatto, A., & Almouzni, G. (2018). Histone supply : Multitiered regulation ensures chromatin dynamics throughout the cell cycle. *The Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807179>
- Mertz, J. A., Conery, A. R., Bryant, B. M., Sandy, P., Balasubramanian, S., Mele, D. A., Bergeron, L., & Sims, R. J. (2011a). Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(40), 16669-16674. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108190108>
- Mertz, J. A., Conery, A. R., Bryant, B. M., Sandy, P., Balasubramanian, S., Mele, D. A., Bergeron, L., & Sims, R. J. (2011b). Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(40), 16669-16674. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108190108>
- Meyer, S. N., Scuoppo, C., Vlasevska, S., Bal, E., Holmes, A. B., Holloman, M., Garcia-Ibanez, L., Nataraj, S., Duval, R., Vantrimpont, T., Basso, K., Brooks, N., Dalla-Favera, R., & Pasqualucci, L. (2019). Unique and Shared Epigenetic Programs of the CREBBP and EP300 Acetyltransferases in Germinal Center B Cells Reveal Targetable Dependencies in Lymphoma. *Immunity*, *51*(3), 535-547.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.006>
- Michida, H., Imoto, H., Shinohara, H., Yumoto, N., Seki, M., Umeda, M., Hayashi, T., Nikaido, I., Kasukawa, T., Suzuki, Y., & Okada-Hatakeyama, M. (2020). The Number of Transcription Factors at an Enhancer Determines Switch-like Gene Expression. *Cell Reports*, *31*(9), 107724. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107724>
- Millán-Zambrano, G., Burton, A., Bannister, A. J., & Schneider, R. (2022). Histone post-translational modifications—Cause and consequence of genome function. *Nature Reviews. Genetics*, *23*(9), 563-580. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7>
- Montefiori, L., Wuerffel, R., Roqueiro, D., Lajoie, B., Guo, C., Gerasimova, T., De, S., Wood, W., Becker, K. G., Dekker, J., Liang, J., Sen, R., & Kenter, A. L. (2016). Extremely Long-Range Chromatin Loops Link Topological Domains to Facilitate a Diverse Antibody Repertoire. *Cell Reports*, *14*(4), 896-906. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.083>

- Moreno, V., Sepulveda, J. M., Vieito, M., Hernández-Guerrero, T., Doger, B., Saavedra, O., Ferrero, O., Sarmiento, R., Arias, M., De Alvaro, J., Di Martino, J., Zuraek, M., Sanchez-Pérez, T., Aronchik, I., Filvaroff, E. H., Lamba, M., Hanna, B., Nikolova, Z., & Braña, I. (2020). Phase I study of CC-90010, a reversible, oral BET inhibitor in patients with advanced solid tumors and relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *31*(6), 780-788. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.03.294>
- Morin, R. D., Johnson, N. A., Severson, T. M., Mungall, A. J., An, J., Goya, R., Paul, J. E., Boyle, M., Woolcock, B. W., Kuchenbauer, F., Yap, D., Humphries, R. K., Griffith, O. L., Shah, S., Zhu, H., Kimbara, M., Shashkin, P., Charlot, J. F., Tcherpakov, M., ... Marra, M. A. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature Genetics*, *42*(2), 181-185. <https://doi.org/10.1038/ng.518>
- Morin, R. D., Mendez-Lago, M., Mungall, A. J., Goya, R., Mungall, K. L., Corbett, R. D., Johnson, N. A., Severson, T. M., Chiu, R., Field, M., Jackman, S., Krzywinski, M., Scott, D. W., Trinh, D. L., Tamura-Wells, J., Li, S., Firme, M. R., Rogic, S., Griffith, M., ... Marra, M. A. (2011). Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*, *476*(7360), 298-303. <https://doi.org/10.1038/nature10351>
- Morschhauser, F., Feugier, P., Flinn, I. W., Gasirowski, R., Greil, R., Illés, Á., Johnson, N. A., Larouche, J.-F., Lugtenburg, P. J., Patti, C., Salles, G. A., Trněný, M., de Vos, S., Mir, F., Samineni, D., Kim, S. Y., Jiang, Y., Punnoose, E., Sinha, A., ... Zelenetz, A. D. (2021). A phase 2 study of venetoclax plus R-CHOP as first-line treatment for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, *137*(5), 600-609. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006578>
- Morschhauser, F., Tilly, H., Chaidos, A., McKay, P., Phillips, T., Assouline, S., Batlevi, C. L., Campbell, P., Ribrag, V., Damaj, G. L., Dickinson, M., Jurczak, W., Kazmierczak, M., Opat, S., Radford, J., Schmitt, A., Yang, J., Whalen, J., Agarwal, S., ... Salles, G. (2020). Tazemetostat for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma : An open-label, single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, *21*(11), 1433-1442. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30441-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30441-1)
- Muppidi, J. R., Schmitz, R., Green, J. A., Xiao, W., Larsen, A. B., Braun, S. E., An, J., Xu, Y., Rosenwald, A., Ott, G., Gascoyne, R. D., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Braziel, R. M., Tubbs, R. R., Cook, J. R., ... Cyster, J. G. (2014). Loss of signalling via Gα13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature*, *516*(7530), 254-258. <https://doi.org/10.1038/nature13765>

- Murphy, K. M., & Weaver, C. (2017). *Janeway's immunobiology* (9th edition). GS, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Nacev, B. A., Feng, L., Bagert, J. D., Lemiesz, A. E., Gao, J., Soshnev, A. A., Kundra, R., Schultz, N., Muir, T. W., & Allis, C. D. (2019). The expanding landscape of « oncohistone » mutations in human cancers. *Nature*, *567*(7749), 473-478. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1038-1>
- Ngo, V. N., & Müschen, M. (2019). Chemical choreography of germinal center B-cell migration. *Cell Research*, *29*(7), 514-515. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0170-7>
- Ngo, V. N., Young, R. M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K.-H., Kohlhammer, H., Xu, W., Yang, Y., Zhao, H., Shaffer, A. L., Romesser, P., Wright, G., Powell, J., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Ott, G., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., ... Staudt, L. M. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, *470*(7332), 115-119. <https://doi.org/10.1038/nature09671>
- Nicodeme, E., Jeffrey, K. L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., White, J., Kirilovsky, J., Rice, C. M., Lora, J. M., Prinjha, R. K., Lee, K., & Tarakhovsky, A. (2010a). Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*, *468*(7327), 1119-1123. <https://doi.org/10.1038/nature09589>
- Niu, H., Ye, B. H., & Dalla-Favera, R. (1998). Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes & Development*, *12*(13), 1953-1961. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.1953>
- Ortega-Molina, A., Boss, I. W., Canela, A., Pan, H., Jiang, Y., Zhao, C., Jiang, M., Hu, D., Agirre, X., Niesvizky, I., Lee, J.-E., Chen, H.-T., Ennishi, D., Scott, D. W., Mottok, A., Hother, C., Liu, S., Cao, X.-J., Tam, W., ... Wendel, H.-G. (2015). The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nature Medicine*, *21*(10), 1199-1208. <https://doi.org/10.1038/nm.3943>
- Papillon-Cavanagh, S., Lu, C., Gayden, T., Mikael, L. G., Bechet, D., Karamboulas, C., Ailles, L., Karamchandani, J., Marchione, D. M., Garcia, B. A., Weinreb, I., Goldstein, D., Lewis, P. W., Dancu, O. M., Dhaliwal, S., Stecho, W., Howlett, C. J., Mymryk, J. S., Barrett, J. W., ... Jabado, N. (2017). Impaired H3K36 methylation defines a subset of

- head and neck squamous cell carcinomas. *Nature Genetics*, 49(2), 180-185.  
<https://doi.org/10.1038/ng.3757>
- Pasqualucci, L. (2019). Molecular pathogenesis of germinal center-derived B cell lymphomas. *Immunological Reviews*, 288(1), 240-261. <https://doi.org/10.1111/imr.12745>
- Pasqualucci, L., Dominguez-Sola, D., Chiarenza, A., Fabbri, G., Grunn, A., Trifonov, V., Kasper, L. H., Lerach, S., Tang, H., Ma, J., Rossi, D., Chadburn, A., Murty, V. V., Mullighan, C. G., Gaidano, G., Rabadan, R., Brindle, P. K., & Dalla-Favera, R. (2011). Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*, 471(7337), 189-195. <https://doi.org/10.1038/nature09730>
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Küppers, R., & Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, 412(6844), 341-346.  
<https://doi.org/10.1038/35085588>
- Pawar, A., Gollavilli, P. N., Wang, S., & Asangani, I. A. (2018). Resistance to BET Inhibitor Leads to Alternative Therapeutic Vulnerabilities in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cell Reports*, 22(9), 2236-2245. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.011>
- Peled, J. U., Kuang, F. L., Iglesias-Ussel, M. D., Roa, S., Kalis, S. L., Goodman, M. F., & Scharff, M. D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. *Annual Review of Immunology*, 26, 481-511.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090236>
- Peycheva, M., Neumann, T., Malzl, D., Nazarova, M., Schoeberl, U. E., & Pavri, R. (2022). DNA replication timing directly regulates the frequency of oncogenic chromosomal translocations. *Science (New York, N.Y.)*, 377(6612), eabj5502.  
<https://doi.org/10.1126/science.abj5502>
- Pflum, M. K., Tong, J. K., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (2001). Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47733-47741.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M105590200>
- Phan, R. T., & Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*, 432(7017), 635-639.  
<https://doi.org/10.1038/nature03147>
- Picaud, S., Wells, C., Felletar, I., Brotherton, D., Martin, S., Savitsky, P., Diez-Dacal, B., Philpott, M., Bountra, C., Lingard, H., Fedorov, O., Müller, S., Brennan, P. E., Knapp, S., & Filippakopoulos, P. (2013a). RVX-208, an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the second bromodomain. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 110(49), 19754-19759.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1310658110>
- Picaud, S., Wells, C., Felletar, I., Brotherton, D., Martin, S., Savitsky, P., Diez-Dacal, B., Philpott, M., Bountra, C., Lingard, H., Fedorov, O., Müller, S., Brennan, P. E., Knapp, S., & Filippakopoulos, P. (2013b). RVX-208, an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the second bromodomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(49), 19754-19759. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310658110>
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., & Cogné, M. (2011). The IgH locus 3' regulatory region : Pulling the strings from behind. *Advances in Immunology*, 110, 27-70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8>
- Potthoff, M. J., & Olson, E. N. (2007). MEF2 : A central regulator of diverse developmental programs. *Development (Cambridge, England)*, 134(23), 4131-4140. <https://doi.org/10.1242/dev.008367>
- Qin, Z.-Y., Wang, T., Su, S., Shen, L.-T., Zhu, G.-X., Liu, Q., Zhang, L., Liu, K.-W., Zhang, Y., Zhou, Z.-H., Zhang, X.-N., Wen, L.-Z., Yao, Y.-L., Sun, W.-J., Guo, Y., Liu, K.-J., Liu, L., Wang, X.-W., Wei, Y.-L., ... Wang, B. (2019). BRD4 Promotes Gastric Cancer Progression and Metastasis through Acetylation-Dependent Stabilization of Snail. *Cancer Research*, 79(19), 4869-4881. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0442>
- Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C. K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M.-H., Godley, L., Opolon, P., Tilly, H., Solary, E., Duffourd, Y., Dessen, P., Merle-Beral, H., Nguyen-Khac, F., Fontenay, M., ... Bernard, O. A. (2011). TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*, 20(1), 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.003>
- R Core Team (2020). —*European Environment Agency*. (s. d.). [Methodology Reference]. Consulté 12 janvier 2023, à l'adresse <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006>
- Rahman, S., Sowa, M. E., Ottinger, M., Smith, J. A., Shi, Y., Harper, J. W., & Howley, P. M. (2011). The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Molecular and Cellular Biology*, 31(13), 2641-2652. <https://doi.org/10.1128/MCB.01341-10>
- Récher, C., Coiffier, B., Haioun, C., Molina, T. J., Fermé, C., Casasnovas, O., Thiéblemont, C., Bosly, A., Laurent, G., Morschhauser, F., Ghesquières, H., Jardin, F., Bologna,

- S., Fruchart, C., Corront, B., Gabarre, J., Bonnet, C., Janvier, M., Canioni, D., ... Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. (2011). Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B) : An open-label randomised phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, *378*(9806), 1858-1867. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61040-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61040-4)
- Ricci, J.-E., & Chiche, J. (2018). Metabolic Reprogramming of Non-Hodgkin's B-Cell Lymphomas and Potential Therapeutic Strategies. *Frontiers in Oncology*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00556>
- Rosenthal, A., & Younes, A. (2017). High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6 : Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Reviews*, *31*(2), 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.09.004>
- Rosenwald, A., Bens, S., Advani, R., Barrans, S., Copie-Bergman, C., Elsensohn, M.-H., Natkunam, Y., Calaminici, M., Sander, B., Baia, M., Smith, A., Painter, D., Pham, L., Zhao, S., Ziepert, M., Jordanova, E. S., Molina, T. J., Kersten, M. J., Kimby, E., ... Maucort-Boulch, D. (2019). Prognostic Significance of MYC Rearrangement and Translocation Partner in Diffuse Large B-Cell Lymphoma : A Study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *37*(35), 3359-3368. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00743>
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Giltane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Powell, J., ... Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, *346*(25), 1937-1947. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012914>
- Rosikiewicz, W., Chen, X., Dominguez, P. M., Ghamlouch, H., Aoufouchi, S., Bernard, O. A., Melnick, A., & Li, S. (2020). TET2 deficiency reprograms the germinal center B cell epigenome and silences genes linked to lymphomagenesis. *Science Advances*, *6*(25), eaay5872. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay5872>
- Sachchidanand, Resnick-Silverman, L., Yan, S., Mutjaba, S., Liu, W., Zeng, L., Manfredi, J. J., & Zhou, M.-M. (2006). Target Structure-Based Discovery of Small Molecules that Block Human p53 and CREB Binding Protein Association. *Chemistry & Biology*, *13*(1), 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.10.014>

- Sarkozy, C., Traverse-Glehen, A., & Coiffier, B. (2015). Double-hit and double-protein-expression lymphomas : Aggressive and refractory lymphomas. *The Lancet. Oncology*, *16*(15), e555-e567. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00005-4)
- Schmitz, R., Wright, G. W., Huang, D. W., Johnson, C. A., Phelan, J. D., Wang, J. Q., Roulland, S., Kasbekar, M., Young, R. M., Shaffer, A. L., Hodson, D. J., Xiao, W., Yu, X., Yang, Y., Zhao, H., Xu, W., Liu, X., Zhou, B., Du, W., ... Staudt, L. M. (2018). Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, *378*(15), 1396-1407. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801445>
- Scholze, H., Stephenson, R. E., Reynolds, R., Shah, S., Puri, R., Butler, S. D., Trujillo-Alonso, V., Teater, M. R., van Besien, H., Gibbs-Curtis, D., Ueno, H., Parvin, S., Letai, A., Mathew, S., Singh, A., Cesarman, E., Melnick, A., & Giulino-Roth, L. (2020). Combined EZH2 and Bcl-2 inhibitors as precision therapy for genetically defined DLBCL subtypes. *Blood Advances*, *4*(20), 5226-5231. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002580>
- Schröder, S., Cho, S., Zeng, L., Zhang, Q., Kaehlcke, K., Mak, L., Lau, J., Bisgrove, D., Schnölzer, M., Verdin, E., Zhou, M.-M., & Ott, M. (2012). Two-pronged binding with bromodomain-containing protein 4 liberates positive transcription elongation factor b from inactive ribonucleoprotein complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(2), 1090-1099. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.282855>
- Schuetz, J. M., Johnson, N. A., Morin, R. D., Scott, D. W., Tan, K., Ben-Nierah, S., Boyle, M., Slack, G. W., Marra, M. A., Connors, J. M., Brooks-Wilson, A. R., & Gascoyne, R. D. (2012). BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, *26*(6), 1383-1390. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.378>
- Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D. T. W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A. M., Quang, D.-A. K., Tönjes, M., Hovestadt, V., Albrecht, S., Kool, M., Nantel, A., Konermann, C., Lindroth, A., Jäger, N., Rausch, T., Ryzhova, M., ... Jabado, N. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*, *482*(7384), 226-231. <https://doi.org/10.1038/nature10833>
- Scott, D. W., King, R. L., Staiger, A. M., Ben-Neriah, S., Jiang, A., Horn, H., Mottok, A., Farinha, P., Slack, G. W., Ennishi, D., Schmitz, N., Pfreundschuh, M., Nowakowski, G. S., Kahl, B. S., Connors, J. M., Gascoyne, R. D., Ott, G., Macon, W. R., & Rosenwald, A. (2018a). High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. *Blood*, *131*(18), Art. 18. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-820605>

- Scott, D. W., King, R. L., Staiger, A. M., Ben-Neriah, S., Jiang, A., Horn, H., Mottok, A., Farinha, P., Slack, G. W., Ennishi, D., Schmitz, N., Pfreundschuh, M., Nowakowski, G. S., Kahl, B. S., Connors, J. M., Gascoyne, R. D., Ott, G., Macon, W. R., & Rosenwald, A. (2018b). High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. *Blood*, *131*(18), 2060-2064. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-820605>
- Scourzic, L., Salataj, E., & Apostolou, E. (2021). Deciphering the Complexity of 3D Chromatin Organization Driving Lymphopoiesis and Lymphoid Malignancies. *Frontiers in Immunology*, *12*, 669881. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669881>
- Sears, R. C. (2004a). The Life Cycle of C-Myc : From Synthesis to Degradation. *Cell Cycle*, *3*(9), 1131-1135. <https://doi.org/10.4161/cc.3.9.1145>
- Sears, R. C. (2004b). The Life Cycle of C-Myc : From Synthesis to Degradation. *Cell Cycle*, *3*(9), Art. 9. <https://doi.org/10.4161/cc.3.9.1145>
- Shaknovich, R., Cerchiatti, L., Tsikitas, L., Kormaksson, M., De, S., Figueroa, M. E., Ballon, G., Yang, S. N., Weinhold, N., Reimers, M., Clozel, T., Luttrup, K., Ekstrom, T. J., Frank, J., Vasanthakumar, A., Godley, L. A., Michor, F., Elemento, O., & Melnick, A. (2011). DNA methyltransferase 1 and DNA methylation patterning contribute to germinal center B- cell differentiation. *Blood*, *118*(13), 3559-3569. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-357996>
- Shi, J., Wang, Y., Zeng, L., Wu, Y., Deng, J., Zhang, Q., Lin, Y., Li, J., Kang, T., Tao, M., Rusinova, E., Zhang, G., Wang, C., Zhu, H., Yao, J., Zeng, Y.-X., Evers, B. M., Zhou, M.-M., & Zhou, B. P. (2014). Disrupting the Interaction of BRD4 with Di-acetylated Twist Suppresses Tumorigenesis in Basal-like Breast Cancer. *Cancer cell*, *25*(2), 210-225. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.028>
- Shorstova, T., Foulkes, W. D., & Witcher, M. (2021a). Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents. *British Journal of Cancer*, *124*(9), 1478-1490. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01321-0>
- Shorstova, T., Foulkes, W. D., & Witcher, M. (2021b). Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents. *British Journal of Cancer*, *124*(9), 1478-1490. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01321-0>
- Shu, S., Wu, H.-J., Ge, J. Y., Zeid, R., Harris, I. S., Jovanović, B., Murphy, K., Wang, B., Qiu, X., Endress, J. E., Reyes, J., Lim, K., Font-Tello, A., Syamala, S., Xiao, T., Reddy Chilamakuri, C. S., Papachristou, E. K., D'Santos, C., Anand, J., ... Polyak, K. (2020). Synthetic Lethal and Resistance Interactions with BET Bromodomain Inhibitors in Triple-

- Negative Breast Cancer. *Molecular Cell*, 78(6), 1096-1113.e8.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.027>
- Shvedunova, M., & Akhtar, A. (2022). Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(5), Art. 5.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00441-y>
- Singh, K., & Briggs, J. M. (2016). Functional Implications of the spectrum of BCL2 mutations in Lymphoma. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 769, 1-18.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.06.001>
- Sneeringer, C. J., Scott, M. P., Kuntz, K. W., Knutson, S. K., Pollock, R. M., Richon, V. M., & Copeland, R. A. (2010). Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), 20980-20985. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012525107>
- Spriano, F., Stathis, A., & Bertoni, F. (2020). Targeting BET bromodomain proteins in cancer : The example of lymphomas. *Pharmacology & Therapeutics*, 215, 107631.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107631>
- Stathis, A., & Bertoni, F. (2018). BET Proteins as Targets for Anticancer Treatment. *Cancer Discovery*, 8(1), 24-36. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0605>
- Stavnezer, J., Guikema, J. E. J., & Schrader, C. E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual Review of Immunology*, 26, 261-292.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248>
- Tilly, H., Morschhauser, F., Sehn, L. H., Friedberg, J. W., Trněný, M., Sharman, J. P., Herbaux, C., Burke, J. M., Matasar, M., Rai, S., Izutsu, K., Mehta-Shah, N., Oberic, L., Chauchet, A., Jurczak, W., Song, Y., Greil, R., Mykhalska, L., Bergua-Burgués, J. M., ... Salles, G. (2022). Polatuzumab Vedotin in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 386(4), 351-363.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2115304>
- Trabucco, S. E., Gerstein, R. M., Evens, A. M., Bradner, J. E., Shultz, L. D., Greiner, D. L., & Zhang, H. (2015a). Inhibition of Bromodomain Proteins for the Treatment of Human Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 21(1), 113-122.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3346>
- Trabucco, S. E., Gerstein, R. M., Evens, A. M., Bradner, J. E., Shultz, L. D., Greiner, D. L., & Zhang, H. (2015b). Inhibition of Bromodomain Proteins for the Treatment of Human Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 21(1), 113-122.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3346>

- van Schoonhoven, A., Huylebroeck, D., Hendriks, R. W., & Stadhouders, R. (2020). 3D genome organization during lymphocyte development and activation. *Briefings in Functional Genomics, 19*(2), 71-82. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elz030>
- Vilarrasa-Blasi, R., Soler-Vila, P., Verdaguer-Dot, N., Russiñol, N., Di Stefano, M., Chapaprieta, V., Clot, G., Farabella, I., Cuscó, P., Kulis, M., Agirre, X., Prosper, F., Beekman, R., Beà, S., Colomer, D., Stunnenberg, H. G., Gut, I., Campo, E., Marti-Renom, M. A., & Martin-Subero, J. I. (2021). Dynamics of genome architecture and chromatin function during human B cell differentiation and neoplastic transformation. *Nature Communications, 12*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20849-y>
- Voon, H. P. J., Udugama, M., Lin, W., Hii, L., Law, R. H. P., Steer, D. L., Das, P. P., Mann, J. R., & Wong, L. H. (2018). Inhibition of a K9/K36 demethylase by an H3.3 point mutation found in paediatric glioblastoma. *Nature Communications, 9*(1), 3142. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05607-5>
- Wang, L.-T., Liu, K.-Y., Jeng, W.-Y., Chiang, C.-M., Chai, C.-Y., Chiou, S.-S., Huang, M.-S., Yokoyama, K. K., Wang, S.-N., Huang, S.-K., & Hsu, S.-H. (2020). PCAF-mediated acetylation of ISX recruits BRD4 to promote epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Reports, 21*(2), e48795. <https://doi.org/10.15252/embr.201948795>
- Wasiak, S., Dzobo, K. E., Rakai, B. D., Kaiser, Y., Versloot, M., Bahjat, M., Stotz, S. C., Fu, L., Sweeney, M., Johansson, J. O., Wong, N. C. W., Stroes, E. S. G., Kroon, J., & Kulikowski, E. (2020). BET protein inhibitor apabetalone (RVX-208) suppresses pro-inflammatory hyper-activation of monocytes from patients with cardiovascular disease and type 2 diabetes. *Clinical Epigenetics, 12*(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00943-0>
- Westin, J., & Sehn, L. H. (2022). CAR T cells as a second-line therapy for large B-cell lymphoma : A paradigm shift? *Blood, 139*(18), 2737-2746. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015789>
- Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell, 153*(2), 307-319. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.035>
- Wiederschain, D., Wee, S., Chen, L., Loo, A., Yang, G., Huang, A., Chen, Y., Caponigro, G., Yao, Y.-M., Lengauer, C., Sellers, W. R., & Benson, J. D. (2009). Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.), 8*(3), 498-504. <https://doi.org/10.4161/cc.8.3.7701>

- Willcockson, M. A., Healton, S. E., Weiss, C. N., Bartholdy, B. A., Botbol, Y., Mishra, L. N., Sidhwani, D. S., Wilson, T. J., Pinto, H. B., Maron, M. I., Skalina, K. A., Toro, L. N., Zhao, J., Lee, C.-H., Hou, H., Yusufova, N., Meydan, C., Osunsade, A., David, Y., ... Skoultchi, A. I. (2021). H1 histones control the epigenetic landscape by local chromatin compaction. *Nature*, *589*(7841), 293-298. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3032-z>
- Wilson, W. H., Young, R. M., Schmitz, R., Yang, Y., Pittaluga, S., Wright, G., Lih, C.-J., Williams, P. M., Shaffer, A. L., Gerecitano, J., de Vos, S., Goy, A., Kenkre, V. P., Barr, P. M., Blum, K. A., Shustov, A., Advani, R., Fowler, N. H., Vose, J. M., ... Staudt, L. M. (2015). Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nature Medicine*, *21*(8), 922-926. <https://doi.org/10.1038/nm.3884>
- Winter, G. E., Buckley, D. L., Paulk, J., Roberts, J. M., Souza, A., Dhe-Paganon, S., & Bradner, J. E. (2015). Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science*, *348*(6241), 1376-1381. <https://doi.org/10.1126/science.aab1433>
- Winter, G. E., Mayer, A., Buckley, D. L., Erb, M. A., Roderick, J. E., Vittori, S., Reyes, J. M., di Iulio, J., Souza, A., Ott, C. J., Roberts, J. M., Zeid, R., Scott, T. G., Paulk, J., Lachance, K., Olson, C. M., Dastjerdi, S., Bauer, S., Lin, C. Y., ... Bradner, J. E. (2017). BET Bromodomain Proteins Function as Master Transcription Elongation Factors Independent of CDK9 Recruitment. *Molecular Cell*, *67*(1), 5-18.e19. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.004>
- Wright, G. W., Huang, D. W., Phelan, J. D., Coulibaly, Z. A., Roulland, S., Young, R. M., Wang, J. Q., Schmitz, R., Morin, R. D., Tang, J., Jiang, A., Bagaev, A., Plotnikova, O., Kotlov, N., Johnson, C. A., Wilson, W. H., Scott, D. W., & Staudt, L. M. (2020). A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell*, *37*(4), 551-568.e14. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.015>
- Wu, S.-Y., Lee, A.-Y., Lai, H.-T., Zhang, H., & Chiang, C.-M. (2013). Phospho switch triggers Brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting. *Molecular Cell*, *49*(5), 843-857. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.006>
- Wu, X., Liu, D., Gao, X., Xie, F., Tao, D., Xiao, X., Wang, L., Jiang, G., & Zeng, F. (2017). Inhibition of BRD4 Suppresses Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Renal Cell Carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *41*(5), 1947-1956. <https://doi.org/10.1159/000472407>

- Xu, Y., Harder, K. W., Huntington, N. D., Hibbs, M. L., & Tarlinton, D. M. (2005). Lyn tyrosine kinase : Accentuating the positive and the negative. *Immunity*, *22*(1), 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.12.004>
- Xu-Monette, Z. Y., Deng, Q., Manyam, G. C., Tzankov, A., Li, L., Xia, Y., Wang, X.-X., Zou, D., Visco, C., Dybkær, K., Li, J., Zhang, L., Liang, H., Montes-Moreno, S., Chiu, A., Orazi, A., Zu, Y., Bhagat, G., Richards, K. L., ... Young, K. H. (2016). Clinical and Biologic Significance of MYC Genetic Mutations 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>
- Yang, C.-Y., Qin, C., Bai, L., & Wang, S. (2019). Small-molecule PROTAC degraders of the Bromodomain and Extra Terminal (BET) proteins—A review. *Drug Discovery Today. Technologies*, *31*, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2019.04.001>
- Yang, H., & Green, M. R. (2019). Epigenetic Programming of B-Cell Lymphoma by BCL6 and Its Genetic Deregulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*, 272. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00272>
- Yik, J. H. N., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J. L., Link, A. J., & Zhou, Q. (2003). Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Molecular Cell*, *12*(4), 971-982. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00388-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00388-5)
- Ying, C. Y., Dominguez-Sola, D., Fabi, M., Lorenz, I. C., Hussein, S., Bansal, M., Califano, A., Pasqualucci, L., Basso, K., & Dalla-Favera, R. (2013). MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nature Immunology*, *14*(10), 1084-1092. <https://doi.org/10.1038/ni.2688>
- Younes, A., Sehn, L. H., Johnson, P., Zinzani, P. L., Hong, X., Zhu, J., Patti, C., Belada, D., Samoilova, O., Suh, C., Leppä, S., Rai, S., Turgut, M., Jurczak, W., Cheung, M. C., Gurion, R., Yeh, S.-P., Lopez-Hernandez, A., Dührsen, U., ... PHOENIX investigators. (2019). Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *37*(15), 1285-1295. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.02403>
- Young, R. M., & Staudt, L. M. (2013). Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *12*(3), 229-243. <https://doi.org/10.1038/nrd3937>

- Yusufova, N., Kloetgen, A., Teater, M., Osunsade, A., Camarillo, J. M., Chin, C. R., Doane, A. S., Venters, B. J., Portillo-Ledesma, S., Conway, J., Phillip, J. M., Elemento, O., Scott, D. W., Béguelin, W., Licht, J. D., Kelleher, N. L., Staudt, L. M., Skoultchi, A. I., Keogh, M.-C., ... Melnick, A. M. (2021). Histone H1 loss drives lymphoma by disrupting 3D chromatin architecture. *Nature*, *589*(7841), 299-305. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3017-y>
- Zaware, N., & Zhou, M.-M. (2019). Bromodomain biology and drug discovery. *Nature Structural & Molecular Biology*, *26*(10), 870-879. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0309-8>
- Zee, B. M., Dibona, A. B., Alekseyenko, A. A., French, C. A., & Kuroda, M. I. (2016). The Oncoprotein BRD4-NUT Generates Aberrant Histone Modification Patterns. *PLOS ONE*, *11*(10), e0163820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163820>
- Zelenetz, A. D., Salles, G., Mason, K. D., Casulo, C., Le Gouill, S., Sehn, L. H., Tilly, H., Cartron, G., Chamuleau, M. E. D., Goy, A., Tam, C. S., Lugtenburg, P. J., Petrich, A. M., Sinha, A., Samineni, D., Herter, S., Ingalla, E., Szafer-Glusman, E., Klein, C., ... Morschhauser, F. (2019). Venetoclax plus R- or G-CHOP in non-Hodgkin lymphoma : Results from the CAVALLI phase 1b trial. *Blood*, *133*(18), 1964-1976. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-880526>
- Zeng, L., Li, J., Muller, M., Yan, S., Mujtaba, S., Pan, C., Wang, Z., & Zhou, M.-M. (2005). Selective Small Molecules Blocking HIV-1 Tat and Coactivator PCAF Association. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(8), 2376-2377. <https://doi.org/10.1021/ja044885g>
- Zengerle, M., Chan, K.-H., & Ciulli, A. (2015). Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chemical Biology*, *10*(8), 1770-1777. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00216>
- Zhang, J., Dominguez-Sola, D., Hussein, S., Lee, J.-E., Holmes, A. B., Bansal, M., Vlasevska, S., Mo, T., Tang, H., Basso, K., Ge, K., Dalla-Favera, R., & Pasqualucci, L. (2015). Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nature Medicine*, *21*(10), 1190-1198. <https://doi.org/10.1038/nm.3940>
- Zhang, J., Vlasevska, S., Wells, V. A., Nataraj, S., Holmes, A. B., Duval, R., Meyer, S. N., Mo, T., Basso, K., Brindle, P. K., Hussein, S., Dalla-Favera, R., & Pasqualucci, L. (2017). The CREBBP Acetyltransferase Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in B-cell Lymphoma. *Cancer Discovery*, *7*(3), 322-337. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1417>

- Zheng, H., & Xie, W. (2019). The role of 3D genome organization in development and cell differentiation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(9), 535-550. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0132-4>
- Zippo, A., De Robertis, A., Serafini, R., & Oliviero, S. (2007). PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation. *Nature Cell Biology*, 9(8), 932-944. <https://doi.org/10.1038/ncb1618>

## Résumé projet de thèse « Grand Public »

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à un type de cancer appelé Lymphome de Haut Grade (HGBL). Ce cancer touche les lymphocytes B, cellules jouant un rôle dans l'immunité et la protection de notre organisme. Les HGBL sont des cancers agressifs, résistants au traitement et de mauvais pronostic. Mon projet s'est donc intéressé à évaluer l'effet de nouvelles molécules thérapeutiques appelés les iBET, sur la biologie de ces lymphomes et de caractériser les facteurs moléculaires impliqués dans leur activité anti-tumorale. L'un de ces facteurs semble être le niveau d'expression d'une protéine, très importante dans le développement tumoral appelée MYC. De plus, nous avons en lumière l'implication de voies de signalisation moléculaire liées au métabolisme cellulaire dans la réponse à ces composés. L'ensemble de ces travaux devrait permettre de mieux utiliser ce nouveau traitement et, à terme, d'améliorer la prise en charge clinique des HGBL.

## Thesis abstract « Vulgarized »

For my thesis, I was interested in a type of cancer called High Grade B-cell Lymphoma (HGBL). This cancer affects B lymphocytes, cells that play a role in immunity and protection of our body. HGBL is very aggressive and treatment-refractory disease, associated dismal prognosis. My project consisted in evaluating the effect of a family of inhibitors called BETi, on the biology of these aggressive lymphomas in order to unravel the molecular factors involved in the BETi response. One of these factors seems to be MYC protein expression level. Furthermore, we have highlighted the involvement of molecular signaling pathways related to cellular metabolism in the response to these compounds. This work should lead to better use of this new treatment and, ultimately, to improved HGBL clinical management

## Abstract

Diffuse large cell B lymphoma (DLBCL) represents the most common form of non-Hodgkin's B lymphoma (NHL) and is characterized by high biological and clinical heterogeneity. The current standard of care is based on an immunochemotherapy called R-CHOP, which is effective in approximately 70% of patients. However, 30% of patients are refractory or relapse within two years. Among the primary refractory cases, high-grade B lymphoma (HGBL) represents a particularly aggressive subtype with a poor prognosis, for which few therapeutic solutions are available.

We developed an approach to explore the potential of inhibitors of BET proteins (BETi), a novel epigenetic therapy, for these refractory lymphomas. The BETi target protein modules called BET protein bromodomains (BRD2, BRD3, BRD4, and BRDT) that are chromatin readers with key roles in controlling expression of oncogenes as well as proteins involved in cell cycle control, apoptosis, and the anti-tumor immune response. Despite their potential as novel anti-tumor agents, the clinical activity of BETi appears to be limited to specific cases and their development is hampered by significant side effects, probably due to their lack of selectivity. Recent preclinical studies suggest that BETi may be effective in high-grade DLBCL also known as double/triple hit (DH/TH). This subtype of aggressive and treatment-refractory DLBCL is characterized by genomic rearrangements affecting *c-MYC*, *BCL2* and/or *BCL6* that place their expression under the control of BET-dependent regulatory regions called Super-Enhancers (SE).

Using a variety of lymphoma cell models including DLBCL and HGBL, analyzed by cytogenetic and molecular approaches, we have shown that BETi exhibit different cytotoxicity profiles, depending on *c-MYC* genomic rearrangement, mutational status and protein the expression level. Our data obtained using a *MYC* gene invalidation models strongly suggest that BETi- induced cell death is related to *MYC* oncogene dependency. By comparing gene expression profiles between cell death-resistant and sensitive cell lines, we showed that the response to BETi is very different between cell lines, with few commonly impacted genes. We also highlighted the importance of metabolic status, as well as *KRAS*, *mTORC1* and *TGF $\beta$*  signaling pathways in predicting the response to these compounds.

This work should allow to better identify patients susceptible to benefit from BETi-based treatment and rationalize new combination therapy targeting these signaling pathways in order to potentiate the anti-tumor effectiveness of BETi in refractory lymphomas.

## Résumé

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) représentent la forme la plus courante de lymphome B non hodgkinien (LNH) et se caractérisent par une grande hétérogénéité biologique et clinique. Le traitement standard actuel repose sur un traitement d'immunochimiothérapie appelé R-CHOP, qui est efficace pour environ 70% des patients. Cependant, 30% des patients sont réfractaires ou rechutent dans les deux ans. Parmi les cas primo-réfractaires, les lymphomes B de haut grade (HGBL) représentent un sous-type particulièrement agressif et de mauvais pronostic, pour lequel peu de solutions thérapeutiques sont disponibles.

Nous avons développé une approche permettant d'explorer l'action anti-tumorale des inhibiteurs des protéines BET (iBET), une nouvelle thérapie épigénétique, sur ces lymphomes réfractaires. Les iBETs ciblent des modules protéiques appelés bromodomaines des protéines BET (BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT) qui sont des lecteurs de la chromatine jouant des rôles clés dans le contrôle de l'expression des oncogènes ainsi que des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la réponse immunitaire anti-tumorale. Malgré leur potentiel en tant que nouveaux agents anti-tumoraux, l'activité clinique des iBET semble être limitée à des cas spécifiques et leur développement est entravé par des effets secondaires importants, probablement dus à leur manque de sélectivité. Des études récentes suggèrent que les iBET pourraient être particulièrement efficaces dans les HGBL, caractérisés par des réarrangements génomiques affectant *c-MYC*, *BCL2* et/ou *BCL6* qui placent leur expression sous le contrôle de régions régulatrices dépendantes des BET appelées Super-Enhancers (SE).

Nous avons montré, en utilisant une diversité de modèles cellulaires de lymphomes agressifs incluant LBDGC et HGBL, analysés par des approches cytogénétique et moléculaires, que les iBETs présentent différents profils de cytotoxicité, en fonction du réarrangement génomique de *c-MYC*, du statut mutationnel et du niveau d'expression de la protéine. L'invalidation de l'expression de *MYC* dans ces modèles suggère que la mort cellulaire induite par les iBET est liée à leur dépendance à l'oncogène *MYC*. En comparant les profils d'expression génique entre les lignées cellulaires résistantes et sensibles à la mort cellulaire, nous avons montré que la réponse aux iBETs est très différente entre les lignées cellulaires, avec peu de gènes communément impactés. Nous avons également souligné l'importance du statut métabolique des cellules, ainsi que de l'activation des voies de signalisation *KRAS*, *mTORC1* et *TGFβ* pour prédire la réponse à ces composés.

Ce travail devrait permettre de mieux identifier les patients susceptibles de répondre aux iBET et de proposer de nouvelles combinaisons thérapeutiques ciblant ces voies de signalisation afin de potentialiser l'efficacité anti-tumorale des iBETs dans les lymphomes réfractaires.