



HAL
open science

Rôle du gène suppresseur de tumeur BTG1 dans la lymphomagenèse B

Lorric Delage

► **To cite this version:**

Lorric Delage. Rôle du gène suppresseur de tumeur BTG1 dans la lymphomagenèse B. Cancer. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1267 . tel-04544730

HAL Id: tel-04544730

<https://theses.hal.science/tel-04544730>

Submitted on 13 Apr 2024

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.



N° d'ordre NNT : 2021LYSE1267

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N°340 (Biologie Moléculaire Intégrative
et Cellulaire)

Spécialité : **Oncohématologie**
Discipline : **Biologie**

Soutenue publiquement le 06/12/2021, par :

Lorric Quentin DELAGE

Rôle du gène suppresseur de tumeur *BTG1* dans la lymphomagenèse B

Directeur de thèse : Docteur Jean-Pierre ROUAULT

Co-directeur de thèse : Docteur Pierre SUJOBERT

Devant le jury composé de :

Dr. MAUXION, Fabienne	CR CNRS	IGBMC Illkirch	Rapporteur
Dr. SARRY, Jean-Emmanuel	DR INSERM	CRCT Toulouse	Rapporteur
Pr. LAURENT, Camille	PU - PH	UPS III Toulouse	Examinatrice
Pr. GHESQUIERES, Hervé	PU - PH	UCBL1 Lyon	Président du jury
Dr. SUJOBERT, Pierre	MCU - PH	UCBL1 Lyon	Co-directeur de thèse
Dr. ROUAULT, Jean-Pierre	CR CNRS	CNRS Lyon	Directeur de thèse

Université Claude Bernard - LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directrice Générale des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTÉ

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES ET DÉPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Département Génie Électrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
École Supérieure de Chimie, Physique, Électronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Éducation	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Pierre, mon directeur de thèse, qui m'a consacré une bonne partie de ses heures de présence au labo et qui a accepté de me laisser travailler sur BTG1, son gène de cœur (qui de l'avis général devrait s'appeler JPR1 !). Merci pour le temps que tu as passé à m'encadrer, à m'apprendre à tenir une pipette et à essayer de développer mon sens critique de la recherche en toutes occasions, souvent en râlant, mais toujours dans la bienveillance.

Pierre, merci de m'avoir d'abord encadré comme étudiant de master et d'avoir tout de même accepté de m'encadrer pour codiriger cette thèse ! Merci pour le temps que tu as passé à écrire, corriger et améliorer les appels à projets, les présentations, et surtout, ce manuscrit. Merci également pour le foisonnement d'idées que tu nous apportais lorsque l'hôpital te laissait un peu de répit, et désolé de ne pas avoir pu aller au bout de chacune d'entre elles...

Je souhaite particulièrement remercier Fabienne Mauxion et Jean-Emmanuel Sarry d'avoir accepté le rôle de rapporteurs, ainsi que Camille Laurent et Hervé Ghesquières pour leur participation à mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Laurent, merci de m'avoir accueilli au sein de ton équipe, et d'avoir toujours tenu ouverte ta porte pour répondre à mes questions incessantes en immunologie ou tout autre sujet farfelu ! Il va te falloir trouver un remplaçant en dépannage informatique à portée de cri, j'espère que tu accepteras de le prêter parfois à Jean-Pierre ! Manu, merci pour les discussions en réunions d'équipe et pour ton regard critique sur ce projet. Bon courage pour la direction de l'équipe avec Laurent au CIRI !

Je remercie également chaleureusement les membres de mon comité de thèse, Sandrine Roulland et Jean-Jacques Diaz pour avoir suivi mes travaux, pour avoir donné un jugement objectif et de nombreux conseils sur l'avancée du projet et sur les perspectives à mener.

Jean-Jacques, c'est dans ton équipe que j'ai fait mes premiers pas dans la recherche, merci pour cela. Sandrine, encore une fois, désolé de ne pas avoir pu t'inclure au jury de cette thèse...

J'aimerais remercier Dimitri pour le temps passé à raconter autant de bêtises que possible, voire plus ; pour les midi-chapi de 13h et pour la bonne humeur que tu n'as pas cessé de mettre dans ce labo, au détriment parfois de certains ! Merci pour ton aide précieuse en manips de souris et pour m'avoir fait découvrir les subtilités de la cytométrie sans (presque) râler ! Merci également à Sofiane pour avoir partagé ce bureau avec moi, sans jamais te plaindre sur la quantité d'articles et de protocoles qui se baladaient sur notre bureau... J'espère que ta future carrière Apollonesque sera fructueuse !!

Sylvain, merci pour les quelques mois que nous avons partagés dans le bureau, avant que la médecine, ton « vrai » travail, ne te rappelle, et pour ta compagnie, forte enrichissante et toujours pleine de culture ! À Ludo aussi, une pensée, c'est avec toi que j'ai découvert la cytométrie pour la première fois, et c'est finalement à ta place de bureau que j'ai écrit cette thèse... Camille, merci pour ta bonne humeur et ta résilience à l'écoute de toutes nos bêtises...

J'aimerais également remercier mes co-thésardes. Chloé, nous avons passé une bonne partie de nos thèses en même temps dans ce labo, bon courage pour la suite et la fin, j'espère qu'ACHYL te livrera ses secrets à temps ! Narimène, bon courage pour la suite de cette thèse, finalement devenue une thèse en bio-info ! Édith, bon courage pour la suite, pour toi la bio-info ne devrait pas poser de problème, mais réussiras-tu à tirer quelque chose du trop vite oublié bcl11b :) ?

Merci également à Lucas et Jenny pour m'avoir supporté pendant plusieurs mois et pour avoir été les deux premiers étudiants que j'ai eu à encadrer. J'espère que la suite de votre parcours se passera bien et que votre future recherche sera enrichissante !

Ensuite, j'aimerais remercier tous les membres de l'équipe qui ont partagé mon quotidien pendant près de 5 ans. Merci à Nathalie pour tous les petits dej', les meringues, cookies et autres brookies :) ! Merci de m'avoir fait une petite

place dans votre bureau et de toujours m'avoir aidé pour les manips, dès mon master... ce n'était pas gagné au début ! Merci à Aurélie également, pour les tris de dernière minutes non planifiés, pour ton aide en cytométrie et pour tous les prélèvements dont tu as pu t'occuper avec les anapath'. Merci à Amel pour ton aide en bio-mol, la qPCR n'a plus de secret pour moi ! Merci à Stéphanie pour les (très) nombreuses commandes que tu as passées pour moi ! Émilie, merci pour tout le temps que tu m'as consacré à injecter mes souris et à t'occuper de ces pauvres bestioles... Merci à tout le reste de l'équipe que je n'ai pas cité ici mais qui contribue tous les jours à la bonne humeur du labo !

Léna, j'aimerais également te remercier tout particulièrement pour ton soutien indéfectible tout au long de cette thèse et depuis plus de 7 ans ! Tu m'as supporté pendant certaines périodes compliquées, au cours desquelles les résultats se faisaient attendre et où mon humeur pouvait être parfois sombre... Merci d'avoir cru en moi, et d'avoir continué, jour après jour, à me raconter toutes les péripéties de l'école, je ne t'en ai pas raconté tant des miennes...

Merci à ma famille, mes parents, mon frère et ma sœur, pour leur soutien tout au long de cette aventure qu'est la thèse !!

Table des matières

ABRÉVIATIONS	10
Résumé	12
- Première partie - INTRODUCTION.....	13
A / Les lymphomes	14
1 - Généralités sur les lymphomes.....	14
1.1 Épidémiologie des lymphomes.....	14
1.2 Classifications des lymphomes B	15
1.2.1 Classification anatomopathologique et histologique du DLBCL	16
1.2.2 Classification à partir du stade de maturation de la cellule	
d'origine	17
1.2.3 Classifications moléculaires.....	20
1.3 Stadification des lymphomes	24
1.4 Du lymphocyte au lymphome : migration, dissémination et « homing »	27
1.4.1 lymphocyte et migration	27
1.4.1.1 Migration et polymérisation de l'actine	28
1.4.1.2 Migration mésenchymateuse	32
1.4.1.3 Migration amiboïde	35
1.4.1.4 Migration collective	38
1.4.1.5 Impact de BCAR1 sur la migration	39
1.4.1.6 Migration des lymphocytes	42
1.4.2 Lymphocyte, lymphome et « homing ».....	43
1.5 Traitements	48
1.5.1 Chimiothérapies.....	48
1.5.2 Thérapies ciblées.....	49
1.5.3 Nouvelles approches thérapeutiques.....	52
2 - Physiopathologie des DLBCL, de la génomique aux études	
fonctionnelles	53

2.1 Concept de gène driver ou passager.....	53
2.2 Mutations liées à AID.....	56
2.3 Validation fonctionnelle des mutations driver de la lymphomagenèse..	59
B/ Famille des gènes <i>BTG</i>.....	62
1 - <i>BTG1</i> , découverte et fonctions	63
1.1 <i>BTG1</i> , le prototype d'une famille de gènes antiprolifératifs.....	63
1.2 Structure des gènes de la famille <i>BTG</i>	64
1.3 Fonctions principales de <i>BTG1</i>	67
1.3.1 Régulation de la méthylation des arginines.....	67
1.3.2 La dégradation des messagers par <i>BTG1</i>	70
2 - Impact de l'expression de <i>BTG1</i> dans les cancers.....	73
3 - Implications fonctionnelles de <i>BTG1</i> dans la tumorigenèse	76
3.1 Régulation du cycle cellulaire	76
3.2 L'expression protéique de <i>BTG1</i> comme biomarqueur	77
3.3 Effets de <i>PRTM1</i> en cancérogenèse.....	78
3.4 Impact de <i>BTG1</i> sur la différenciation cellulaire	80
4 - Mutations de <i>BTG1</i> dans les lymphomes.....	81
Objectifs de la thèse	84
- Deuxième partie - RÉSULTATS.....	86
Première partie de résultats	87
Seconde partie de résultats – Demande de brevet	138
- Troisième partie - DISCUSSION	148
<i>BTG1</i> , un gène driver dans un modèle murin de lymphomagenèse B ?	150

1) BTG1, un gène driver de la lymphomagenèse B.....	150
2) Avantages et limites du modèle murin VavP-BCL2	151
BCAR1, un nouveau partenaire protéique de BTG1 modulant la	
migration cellulaire	155
1) BTG1 et migration cellulaire.....	155
2) Partenaires protéiques de BTG1	157
3) Domaine d'interaction de BTG1 et BCAR1.....	159
Coopération oncogénique entre BTG1 et MYD88	160
BTG1, un acteur de la dynamique mitochondriale ?	161
 ANNEXE.....	 171
 RÉFÉRENCES	 176

ABRÉVIATIONS

ABC	Activated B Cell	CXCR4/5	CXC motif Chemokine Receptor 4/5
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	DLBCL	Diffuse Large B Cell Lymphoma
ADMA	Asymmetric Dimethylarginine	DOCK180	Dedicator of cytokinesis
ADN / ARN	Acide Desoxyribonucléique / Ribonucléique	EP300	E1A binding protein p300
ADP	Adenosine diphosphate	ETV6	ETS variant transcription factor 6
AID	Activation-induced cytidine deaminase	EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
ALL	Leucémie Aiguë Lymphoblastique	FAK	Focal Adhesion Kinase
AML	Leucémie Myéloïde Aiguë	FDC	Follicular Dendritic Cell
ARP2/3	Actin Related Protein 2/3	FOXP1	Forkhead box protein P1
ATP	Adenosine triphosphate	GAR	Glycine Arginine Rich domains
BCAR1/3	Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 1/3	GCB	Germinal Center B cell
BCL2/6	B-cell lymphoma 2	GEP	Gene expression profiling
BCP-ALL	B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia	GNA13	G Protein Subunit Alpha 13
BCR	B-cell Receptor	GTP	Guanosine triphosphate
BLIMP	Beta-Interferon Gene Positive-Regulatory Domain 1 Binding Factor (PRMD1)	H3K27	Histone H3 Lysine K27
BTG1/2	B-cell Translocation Gene 1/2	ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule
BTK	Bruton Tyrosine Kinase	Ig	Immunoglobuline
CAF1	Chromatin assembly factor 1	IKZF1	IKAROS Family Zinc Finger 1
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T-cells	IPI	International Prognostic Index
CCR4-NOT	Carbon Catabolite Repression - Negative On TATA-less	IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
CD	Cluster of differentiation	JAK	Janus Kinase
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity	KO	Knock Out
CDC42	Cell Division Cycle 42	LDH	Lactate Deshydrogenase
CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4	LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
COO	Cell Of Origin	LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
CREBBP	CREB binding protein	LNH	Lymphome non hodgkinien
CRK	CT10 Regulator of Kinase	LxxLL	Motif Leucine xx Leucine Leucine
CSR	Class Switch Recombination	MMA	Monomethylarginine
CXCL12/13	CXC motif Chemokine Ligand 12/13	MMPs	Matrix Metalloproteinases

MYD88	Mutant Myeloid Differentiation Primary Response 88	SYK	Spleen Associated Tyrosine Kinase
NFκB	Nuclear factor-kappa B	TBL1XR1	Transducin Beta-Like 1X-Related Protein 1
NGF	Nerve Growth Factor	TOB1/2	Transducer Of ERBB2 1/2
NOS	Not Otherwise Specified	VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	VDJ	Variabilitu Diversity Junction
OS	Overall Survival	VLA-4	Very late antigen-4
P130CAS	P130 Crk-Associated Substrate (= BCAR1)	WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
P53	Tumor Protein 53	WT	Wilde Type
PAK	P21 Activated Kinase	XBP1	X-Box Binding Protein 1
PAM	Protospacer adjacent motif		
PAN2/3	Poly-A Nuclease		
PCNSL	Primary Central Nervous System Lymphoma		
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1		
PET-CT	Positron emission tomography-computed tomography		
PMBL	Primary mediastinal B-cell lymphoma		
pRb	Retinoblastoma Protein		
RAC-GTP	Rac family small GTPase 1		
RAG 1/2	Recombination Activating Gene 1 / 2		
RBPs	RNA Binding Proteins		
RCHOP	Rituximab Cyclophosphamide Doxorubicine Vincristine Prednisone		
RHOA	Ras Homology family member A		
RHOGTPase	Rho family GTPase		
ROCK	Rho associated protein kinase		
RSS	Recombination Signal Sequence		
RUNX1	RUNX Family Transcription Factor 1		
S1PR2	Sphingosine 1-phosphate receptor 2		
SDMA	Symmetric Dimethylarginine		
SHM	Somatic Hypermutation		
SiRNA	Small interfering RNA		
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3		

Résumé

Les lymphomes sont un groupe de cancers développés aux dépens des lymphocytes B ou T. Parmi les lymphomes B, il existe une grande hétérogénéité de présentations cliniques et de réponses thérapeutiques, résultant de la mise en œuvre de mécanismes oncogéniques différents. Les lymphomes B diffus à grandes cellules représentant la sous-entité majoritaire des lymphomes B non Hodgkiniens, sont classés selon le stade de différenciation de leur cellule d'origine supposée et sur leur profil mutationnel. Le gène *BTG1* est particulièrement muté dans le sous-groupe MCD/C5, caractérisé par un pronostic défavorable et associé à des atteintes extra-ganglionnaires. L'objet de ce travail a été de comprendre les conséquences fonctionnelles de l'inactivation de *BTG1* dans la lymphomagenèse B.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'inactivation de *BTG1* entraîne une augmentation de la formation des centres germinatifs après immunisation par antigènes T dépendants. De plus, l'inactivation de *BTG1* accélère le développement de lymphomes induits par la surexpression de l'oncogène BCL2. Puis nous avons mis au point un modèle murin de dissémination lymphomateuse, dans lequel nous avons observé que *BTG1* promeut la dissémination tumorale, rappelant le phénotype des lymphomes MCD/C5. Grâce à des approches protéomiques, nous avons identifié un nouveau partenaire protéique de *BTG1*, BCAR1, qui joue entre autres un rôle de mécanocenseur et participe à la transduction du signal des plaques d'adhésions focales à travers différentes phosphorylations médiées par les kinases Src. Nous avons montré que les cellules inactivées pour *BTG1* présentent une activation constitutive de la voie BCAR1-RAC1, qui se traduit par un remodelage du cytosquelette d'actine, la formation de filopodes, et des capacités d'adhésion augmentées. Ces modifications sont abolies par la réexpression de *BTG1* ou par l'utilisation du dasatinib, un inhibiteur des Src kinases. Enfin, nous avons mis en évidence une vulnérabilité thérapeutique des cellules *BTG1* KO par rapport aux inhibiteurs de MCL1 (peptides ou composé S63845) qui ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes pour ces lymphomes de mauvais pronostic.

- Première partie -
INTRODUCTION

A / Les lymphomes

Les lymphomes représentent un groupe de cancers hématopoïétiques qui se développent aux dépens des lymphocytes. La classification actuelle de l’OMS se base sur le stade de différenciation de la cellule d’origine devenue tumorale. On peut distinguer deux grands ensembles au sein des lymphomes, que sont les lymphomes de Hodgkin et les lymphomes non Hodgkiniens (LNH). Les lymphomes non hodgkiniens qui nous intéresseront ici sont caractérisés par une prolifération clonale de lymphocytes matures qui peuvent être B ou T, constituant un groupe très hétérogène d’hémopathies malignes.

Au cours de ce travail, nous nous intéresserons principalement aux lymphomes non hodgkiniens de type B, qui représentent la majorité des LNH.

1 - Généralités sur les lymphomes

1.1 Épidémiologie des lymphomes

Les LNH représentent le cinquième cancer le plus courant en France, avec environ 12000 nouveaux cas chaque année. L’incidence est en augmentation de 3 à 4% par an en moyenne chez les hommes et reste stable chez les femmes (Defossez et al., 2019). La survie globale des patients atteints par un LNH est de l’ordre de 60% à 5 ans, mais cette estimation est extrêmement variable du fait de la très grande diversité des maladies regroupées sous ce terme (Swerdlow SH et al., 2016; Tarella et al., 2014). Le sous-type de lymphome B le plus répandu est le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL), qui représente près de 40 % des LNH (Alizadeh et al., 2000). L’âge moyen des patients diagnostiqués pour un

DLBCL se situe autour de 60 ans, avec 30% des patients ayant plus de 75 ans. Bien que considéré comme cliniquement agressif, près de 60% des patients atteints de DLBCL peuvent être guéris par une immunochimiothérapie, le R-CHOP, associant l'anticorps monoclonal anti-CD20 Rituximab à une polychimiothérapie (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone) (Sehn & Salles, 2021).

1.2 Classifications des lymphomes B

Dans cette partie descriptive des classifications des lymphomes, nous nous intéresserons principalement aux classifications contemporaines mises en place par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à partir des années 2000 et régulièrement mises à jour (Swerdlow SH et al., 2016), basées sur le stade de différenciation présumé de la cellule d'origine. Dans ce manuscrit, nous décrirons exclusivement les lymphomes non hodgkiniens (LNH), qui sont entre autres classifiés à partir de leur cellule d'origine (B, T ou NK), de la localisation de la maladie ou encore de présence d'évènements génétiques somatiques récurrents. Historiquement, la classification des hémopathies lymphoïdes B différencie les lymphomes en fonction du stade de maturation de leurs cellules d'origine, que ce soient des précurseurs B, des lymphocytes B matures ou des plasmocytes (Tableau 1). En pratique clinique, on distingue classiquement les lymphomes indolents, caractérisés par une évolution lente de la maladie, des lymphomes agressifs, pour lesquels on observe une évolution très rapide.

Lors de ce travail nous nous intéresserons plus particulièrement au lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) que nous avons précédemment décrit comme l'entité majoritaire des lymphomes B non hodgkiniens et dans

laquelle on retrouve des mutations du gène *BTG1* à hauteur de 8 à 10%, tous sous-types confondus.

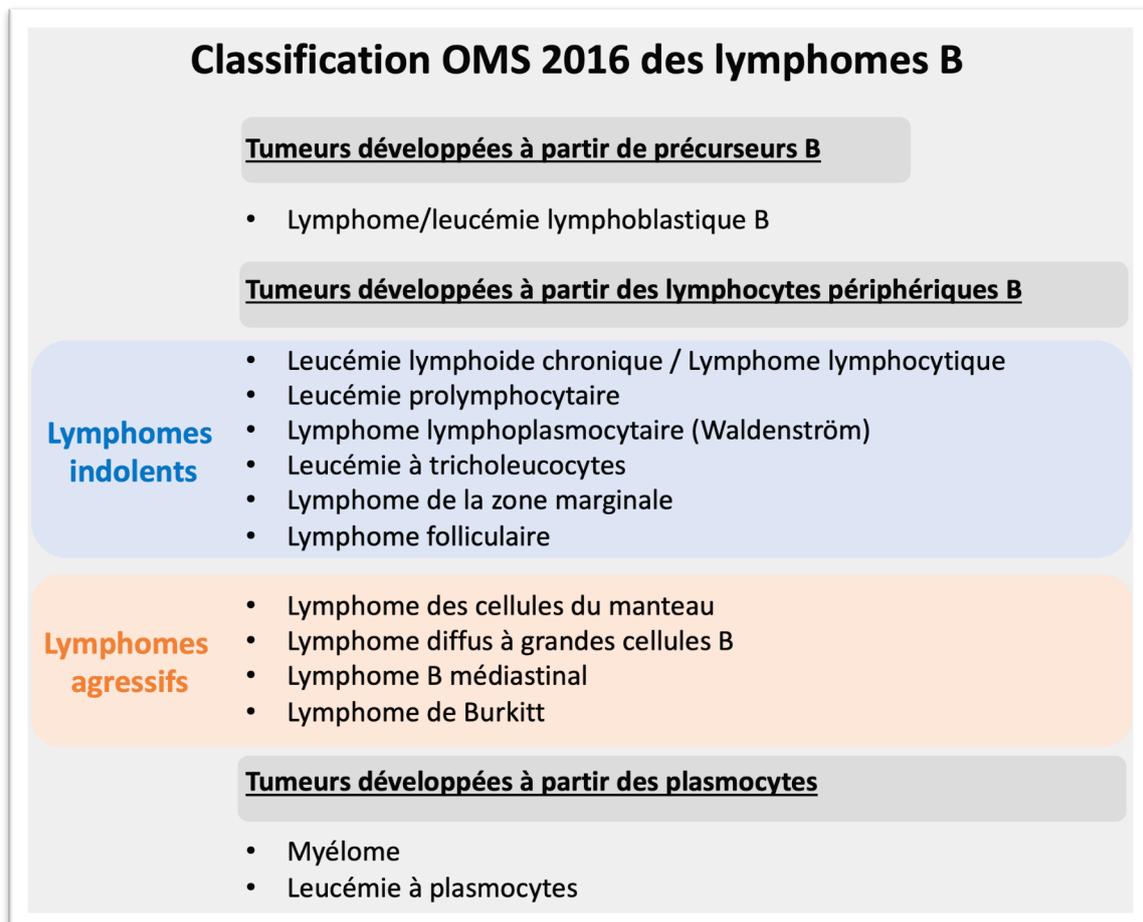


Tableau 1 : Classification OMS 2016 des lymphomes B. Adapté de (Swerdlow et al., 2016)

1.2.1 Classification anatomopathologique et histologique du DLBCL

La première étape du diagnostic d'un lymphome est l'analyse macroscopique de l'aspect et de la taille du tissu biopsié, généralement une adénopathie. Dans un second temps, une analyse microscopique des tissus est nécessaire. D'un point de vue histologique, un DLBCL est caractérisé par une

prolifération diffuse de cellules lymphoïdes B de grande taille (dont la taille du noyau est supérieure à deux fois la taille d'un globule rouge). La classification OMS 2016 dénombre une vingtaine de sous-entités de DLBCL distinctes, dont plus de 80% sont classées DLBCL NOS (not otherwise specified) (Swerdlow SH et al., 2016). On distingue par exemple des lymphomes dits grey-zone, présentant des caractéristiques intermédiaires entre DLBCL et lymphome de Hodgkin, ainsi que des lymphomes dits « double- ou triple-hit » pour 5% des DLBCL, qui présentent des réarrangements de *MYC*, et *BCL2* et/ou *BCL6* (Swerdlow, 2014). On peut également distinguer le lymphome du médiastin (PMBL, primary mediastinal B cell lymphoma, 6% des DLBCL), caractérisé par une amplification 9p21 et une positivité pour les marqueurs CD30, CD23, PDL1 et PDL2.

1.2.2 Classification à partir du stade de maturation de la cellule d'origine

Outre cette classification histologique, il est important de définir la provenance de la cellule à l'origine du lymphome, chaque état de différenciation étant associé à des caractéristiques et à une expression génique spécifique.

Lors de leur maturation dans la moelle osseuse, les lymphocytes B réarrangent leur génome pour exprimer un récepteur B à l'antigène (BCR) unique du fait de la recombinaison aléatoire des locus V, D et J, avant toute rencontre avec l'antigène. Cette phase de recombinaison est un des éléments permettant de générer la diversité des immunoglobulines et est médiée par l'expression des protéines RAG1 et RAG2 (Recombination Activating Genes) (Oettinger et al., 1990; Olaru et al., 2005; Papavasiliou et al., 1997). Ces lymphocytes B naïfs migrent dans les organes lymphoïdes secondaires, où ils

formeront des centres germinatifs (CG) après une première rencontre avec des antigènes présentés par les cellules dendritiques, en présence d'une co-stimulation par un lymphocyte T *helper*. Au sein du CG, les lymphocytes opèreront une commutation isotypique (class switch recombination, CSR), leur permettant de changer de classe isotypique en réponse à des signaux cytokiniques délivrés par les cellules T. Dans le CG, les lymphocytes B exprimeront différents facteurs de transcription spécifiques, tels que NFκB, qui permet l'activation d'*IRF4* et de *BCL6*, nécessaires au passage de la phase d'initiation à la phase de prolifération, qui permet d'augmenter la quantité de lymphocytes B au sein du CG. Durant cette phase de prolifération, les régions variables (V) des épitopes des immunoglobulines subiront un grand nombre de mutations dans leurs séquences qui modifieront l'affinité du BCR pour l'antigène (phénomène appelé hypermutation somatique, ou SHM). Une partie des lymphocytes dont l'affinité du BCR est insuffisante mourra par apoptose. Si l'affinité du BCR pour l'antigène qui lui a été présenté par la cellule dendritique folliculaire est suffisante, le lymphocyte exprimera entre autres les gènes *BLIMP1* et *XBP1* par l'intermédiaire d'*IRF4*, qui est réactivé en sortie de zone claire, entraînant ainsi sa différenciation en plasmocyte ou en cellule B mémoire (Figure 1). Lors de ces étapes de maturation, les lymphocytes subiront un très grand nombre de mutations médiées par l'enzyme AID, qui permettent de moduler l'affinité du BCR. Cependant, dans certains cas, ces mutations peuvent entraîner la transformation de quelques cellules et permettre la mise en place d'une prolifération incontrôlée d'un clone émergent.

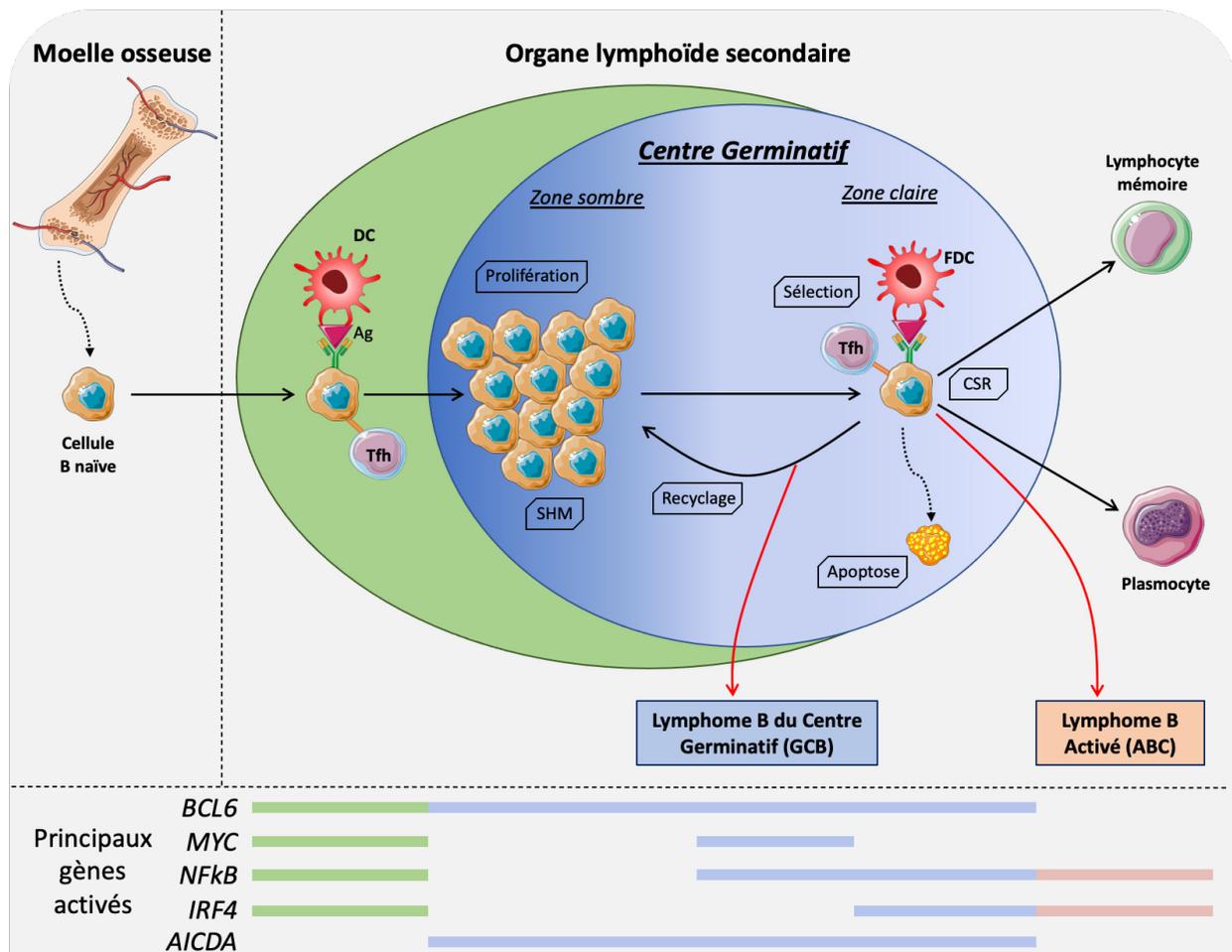


Figure 1 : Production, maturation et différenciation d'un lymphocyte B, de la moelle osseuse au centre germinatif et représentation des sites d'origine des DLBCL ABC et GCB. Adapté de (Basso & Dalla-Favera, 2015)

C'est à partir de ce schéma de différenciation que s'effectue la classification basée sur la cellule d'origine du lymphome (COO). Cette classification des DLBCL provient d'une analyse transcriptomique qui a permis de distinguer trois grandes catégories, basées sur leurs profils d'expression génique (Alizadeh et al., 2000). On distinguera donc les lymphomes ayant un profil d'expression proche de celui des lymphocytes B du GC, qui seront appelés « Germinal Center B cell lymphoma » (GCB), des lymphomes issus de cellules plus différenciées, qui ont quitté le centre germinatif et qui seront appelés « Activated B cell lymphoma » (ABC). Une troisième catégorie est proposée,

comportant des lymphomes dits inclassables, à l'interface entre les deux précédentes. Il est intéressant de noter qu'un certain nombre d'altérations génétiques sont exclusives d'un groupe à l'autre, mais également que la survie globale (OS) des patients traités par chimiothérapie CHOP ou RCHOP est différente entre les patients, avec un pronostic défavorable associé aux patients atteints d'un DLBCL de type ABC (Alizadeh et al., 2000) (Coiffier et al., 2002) (Rosenwald et al., 2002).

En pratique courante, bien que plusieurs équipes aient tenté de remplacer cette analyse transcriptomique par des techniques d'immunohistochimie évaluant l'expression de protéines telles que CD10, BCL6, IRF4, FOXP1, GCET1 et LMO2, celles-ci restent sous-optimales, notamment car elles ne reconnaissent que 2 (et non 3) classes (Hans et al., 2004; De Jong et al., 2007; Meyer et al., 2011). Désormais, des techniques moléculaires permettent une analyse transcriptomique de quelques marqueurs permettant de classer correctement les DLBCL à partir de tissus fixés (RT-MLPA (Mareschal et al., 2015), Nanostring (Scott et al., 2014)). Jusqu'en 2018, la classification des DLBCL s'arrêtait à la classification de la cellule d'origine, qui bien que communément admise, regroupe des cas très hétérogènes en termes de pronostic, de survie globale et probablement nécessitant des traitements différents.

1.2.3 Classifications moléculaires

Pour raffiner la classification basée sur la cellule d'origine, l'utilisation de techniques de séquençage à haut débit d'un grand nombre de patients atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules a permis de proposer plusieurs sous-types basés sur des anomalies génétiques communes. Deux classifications

moléculaires ont été proposées, la classification LymphGen (Schmitz et al., 2018; Wright et al., 2020) et la classification DLBCL Clusters (Chapuy et al., 2018). Ces deux classifications, basées sur le regroupement d'évènements moléculaires somatiques et de données transcriptomiques, ont permis de constituer 6 et 5 groupes distincts. Cependant, il est à noter que la classification LymphGen est biaisée, du fait d'un enrichissement en patients atteints de DLBCL de type ABC et non classifiés, ce qui ne représente pas la répartition des DLBCL totaux, et par le fait que l'ensemble des groupes proposés ne contiennent que 45% du total des patients atteints de DLBCL, en laissant une partie non négligeable non assignée à un des groupes.

Dans ces classifications, le sous-type ABC est ici sous-divisé en 3 sous-types, MCD, N1 et A53 pour LymphGen et C2 et C5 pour Clusters. De la même manière, le groupe GC est divisé en deux groupes, EZB ou C3 et ST2 ou C4. Un dernier sous-groupe BN2 ou C1 (comportant des altérations de *BCL6* et *NOTCH2*) regroupe une partie des cas non classifiés, quelques cas ABC et quelques GC. Le sous-groupe MCD/C5, caractérisé par des mutations des gènes *MYD88* et *CD79B*, est associé à un très mauvais pronostic (Figure 2A), au même titre que le sous-groupe N1, caractérisé par une forte représentation de mutations de *NOTCH1*. On définit également le sous-groupe A53/C2 comme associé à un pronostic défavorable, et caractérisé par des mutations du gène *TP53*. Finalement, les deux sous-groupes EZB (*EZH2*, *BCL2*)/C3 et ST2 (*SGK1*, *TET2*)/C4 sont associés à un pronostic plutôt favorable (Figure 3) (Dubois & Jardin, 2018).

Il est intéressant de noter que le sous-type MCD/C5 est caractérisé par une forte récurrence d'altération des gènes *MYD88*, *CD79B*, *ETV6*, *TBL1XR1* ou encore *PIM1* et une activation chronique des voies du BCR et de NF- κ B (Figure 2B). On y retrouve également de forts taux de mutations des gènes *BTG1* (47%,

principalement faux sens) et *BTG2* (34%) (Schmitz et al., 2018), faisant de ces derniers de possibles marqueurs de mauvais pronostic, au même titre que *TBL1XR1*, que nous détaillerons plus tard. On remarquera également que la plupart des lymphomes primitifs du système nerveux central (PCNSL), de même que les lymphomes avec atteinte testiculaire ou mammaire, qui sont donc des lymphomes extra-ganglionnaires primaires, sont regroupés dans le cluster MCD/C5 (par soucis de clarté, nous parlerons par la suite du sous-type MCD/C5 sous l'appellation MCD uniquement). Ce sous-type MCD serait donc caractérisé par des atteintes extra-ganglionnaires importantes, ainsi qu'une survie à 5 ans faible (35%, contre plus de 60% pour les sous-types moins agressifs) et avec un taux de réponse à l'immunochimiothérapie R-CHOP le plus faible (64% contre 80% pour les sous-types ayant les meilleures réponses) (Lacy et al., 2020).

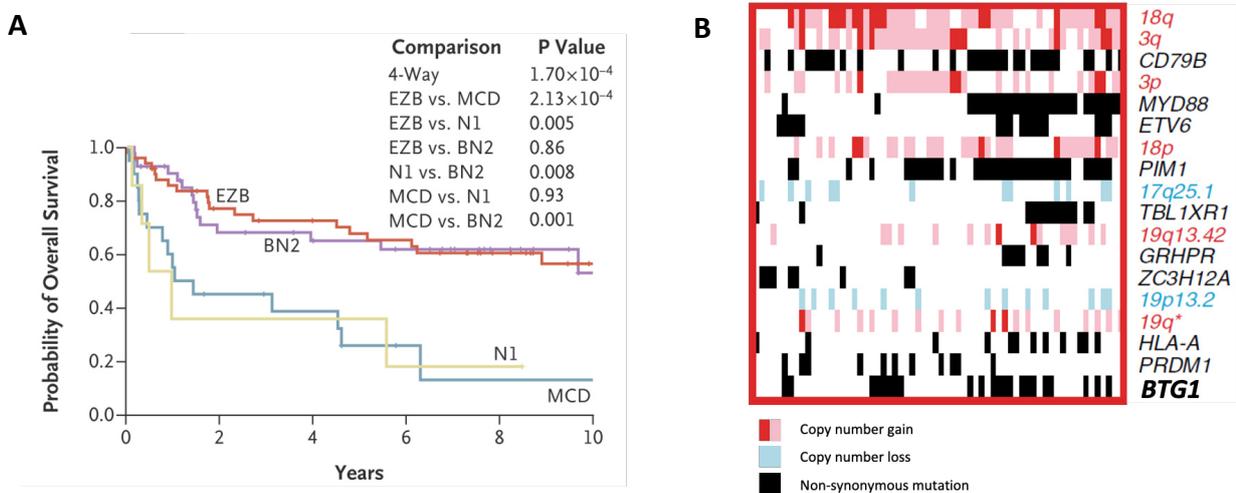


Figure 2 : (A) Représentation de la survie globale à 10 ans en fonction du sous-type de DLBCL (Schmitz et al., 2018). (B) Fréquence d'altérations génétiques dans le sous-type C5 (Chapuy et al., 2018)

Une des questions qui se pose pendant est l'intérêt pratique de ces classifications. Lors de la prise en charge d'un patient, il est en effet compliqué

de réaliser une séquence de l'exome entier de celui-ci, et il faudrait déterminer un panel de gènes suffisant à définir les groupes. Récemment, une étude semble également remettre en question le classement effectué par les études de Chapuy et de Schmitz, en proposant d'autres regroupements, parfois redondants, mais classant un certain nombre d'entités dans de nouveaux groupes qui ne recoupent pas forcément ceux précédemment proposés, ce qui au final peut poser problème dans une optique de prise en charge des malades et qui nécessiterait une harmonisation des clusters entre les différentes études (Lacy et al., 2020). Enfin, il reste à prouver que l'adaptation des prises en charges thérapeutiques en fonction des sous-types est bénéfique, ce qui n'a pas encore été le cas pour la classification basée sur la cellule d'origine (Davies et al., 2019; Younes et al., 2019).

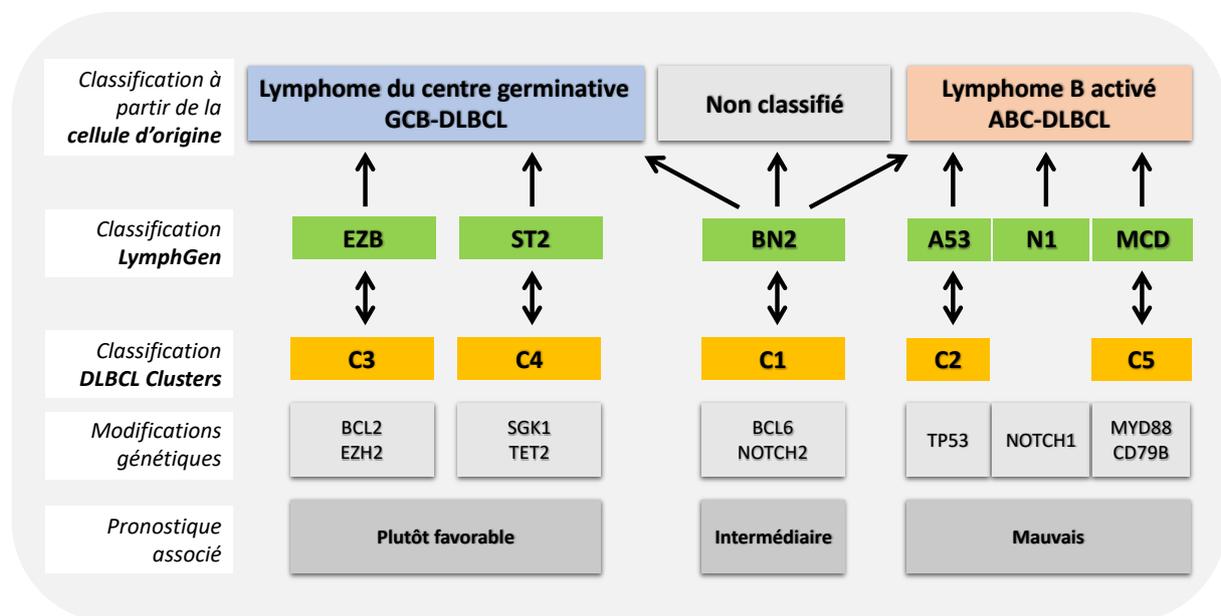


Figure 3 : Différentes classifications des DLBCL et corrélation entre LymphGen, DLBCL Clusters et COO. Adapté de (Sehn & Salles, 2021).

1.3 Stadification des lymphomes

Après l'établissement du diagnostic, il est nécessaire d'évaluer précisément l'extension de la maladie. Pour cela, plusieurs solutions sont possibles et reposent principalement sur de l'imagerie.

Très utilisée du fait de son importante sensibilité, la tomographie par émission de positons couplée à un scanner (PET-CT), permet de repérer la localisation précise des ganglions actifs dans l'organisme. On peut également réaliser un scanner pour déterminer le nombre d'organes ou de ganglions atteints ainsi que la taille de la tumeur. L'utilisation de ces techniques permet de déterminer le stade du lymphome et l'état d'envahissement de la maladie. On utilise alors la stadification de Ann Arbor, qui se base sur la localisation et le nombre d'organes ou de ganglions atteints (Figure 4):

Stade I :

- *Atteinte ganglionnaire limitée à un territoire anatomique.*
- *Atteinte extra-nodale unique.*

Stade II :

- *Atteinte de deux territoires ganglionnaires ou plus, situés du même côté du diaphragme.*
- *Atteinte d'un seul territoire ganglionnaire associé à une ou plusieurs localisation extra-nodales contiguës, accessible à un champ d'irradiation délivrant une dose curatrice.*

Stade III :

- *Atteintes ganglionnaires situées de part et d'autre du diaphragme avec ou sans atteinte splénique.*

Stade IV :

- *Atteinte extra-nodale avec atteinte ganglionnaire non contiguë.*
- *Deux atteintes extra-nodales au moins, non contiguës.*
- *Atteinte ganglionnaire et extra-nodale dont le volume interdit un champ d'irradiation à dose curatrice.*

À cette classification initiale, il est possible d'ajouter quatre lettres modulant chaque stade. Un stade **A** (absence) ou **B** (présence) signale ou non la présence de signes cliniques systémiques (fièvre, sueurs nocturnes, forte perte de poids) présents avant le diagnostic. Un stade **E** caractérise l'envahissement d'une structure extra-lymphatique pour les stades I à III. Le stade **X** correspond à la présence d'une masse tumorale importante (ganglion de plus de 10 cm de diamètre) (Sehn & Salles, 2021).

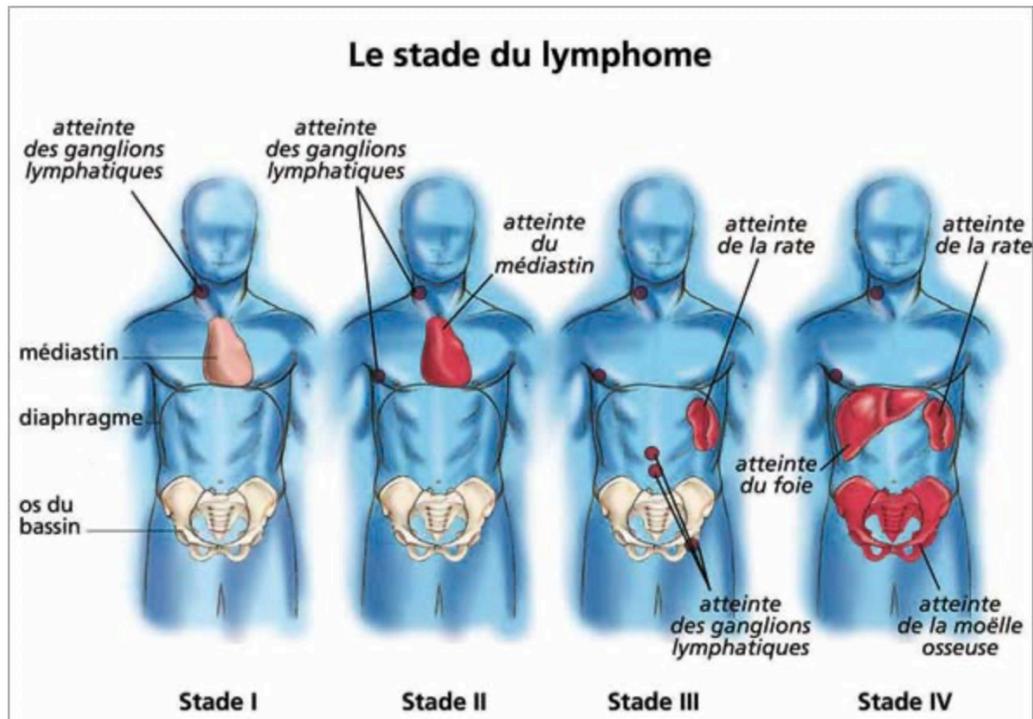


Figure 4 : représentation des atteintes lymphomateuses et du stade du lymphome (image issue de <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Le-lymphome-hodgkinien/Classification-des-lymphomes-hodgkiniens>)

Pour affiner le principe de stadification de Ann Arbor, un index international de pronostic (IPI) a été mis en place, basé sur les caractéristiques cliniques de chaque patient avant le traitement, permettant de prédire le pronostic d'un patient atteint de DLBCL. Le score IPI assigne 1 point pour la présence de chaque facteur pronostic négatif :

- Age du patient supérieur à 60 ans.
- Taux de lactate déshydrogénase (LDH) élevé.
- Stade Ann Arbor de III ou IV.
- Score ECOG supérieur ou égal à 2 (basé sur la capacité du patient à réaliser des activités (de pleinement actif à complètement handicapé et/ou immobile)).
- Nombre d'atteinte extra-ganglionnaire supérieur à 1.

Les patients sont alors classés en quatre catégories, les patients à faible risque (0 ou 1), à risque intermédiaire faible (2), à risque intermédiaire élevé (3) et à risque élevé (4 à 5) (Ruppert et al., 2021). Cependant, ce score IPI, développé il y a plus de 25 ans, se base sur des patients traités uniquement par chimiothérapie CHOP et ne tient pas compte de l'ajout de rituximab au traitement, ce qui modifie nettement la survie et le taux de rémission des patients, bien qu'en pratique ce score soit toujours utilisé malgré l'usage du rituximab. Plusieurs scores ont ainsi été mis en place en modifiant légèrement le score IPI initial, tels que le score IPI révisé (R-IPI) ou le score NCCN-IPI (National Comprehensive Cancer Network) qui augmente le nombre de grade de chaque facteur pronostic (ex : âge > 75 = 3 points, âge > 60 = 2 points, âge > 40 = 1 et âge < 40 = 0 point), augmentant la précision du pronostic, mais qui en pratique ne sont pas utilisés.

1.4 Du lymphocyte au lymphome : migration, dissémination et « homing »

1.4.1 lymphocyte et migration

La migration cellulaire est un phénomène très contrôlé, notamment lors de l'embryogenèse, permettant à chaque type cellulaire d'occuper une localisation précise. Les lymphocytes sont des cellules qui conservent des capacités de migration chez l'adulte, leur permettant d'atteindre un site spécifique où se déroule la réponse immunitaire.

Les lymphomes se développent en général dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, etc.). Cependant, des localisations

lymphomateuses extra-ganglionnaires sont décrites, dont on distingue deux formes : d'une part la dissémination de lymphocytes malins originaires de ganglions lymphatiques vers d'autres organes, qui sera appelée lymphome extra-ganglionnaire secondaire (tous les organes peuvent être atteints, avec des fréquences plus importantes pour l'estomac, les amygdales, le foie, les os ou la peau); et d'autre part, lorsque le lymphome se développe directement dans des organes non lymphoïdes, dans lesquels on ne retrouve parfois même aucun lymphocyte en condition normale, tels que le système nerveux central (Malikova et al., 2018) ou les testicules, appelé alors lymphome extra-ganglionnaire primaire. La recherche d'une atteinte extra-ganglionnaire d'un lymphome est essentielle à la détermination du stade du lymphome, qui conditionne les choix thérapeutiques. Concernant les DLBCL, les lymphomes extra-ganglionnaires sont considérés comme plus agressifs et sont généralement des DLBCL de type ABC. Il apparaît alors important de s'intéresser aux mécanismes de la migration des lymphocytes normaux et pathologiques pour comprendre et optimiser la prise en charge thérapeutique des atteintes extra-ganglionnaires. Pour commencer, nous allons décrire brièvement les trois grands types de migration cellulaire qui peuvent être observés, qui dépendent du type cellulaire, du stade de différenciation et du tissu cible, que sont la migration mésoenchymateuse, la migration amiboïde et la migration collective. La mise en place d'un réseau d'actine est un mécanisme central de ces différents types de migrations.

1.4.1.1 Migration et polymérisation de l'actine

In vitro, la migration s'effectue principalement en 2 dimensions et permet une étude détaillée des mécanismes mis en œuvre lors du déplacement cellulaire. L'étape majeure de la migration passe par la polarisation cellulaire, qui

est traduite par l'organisation asymétrique de la cellule entre l'avant (le front de migration ou « leading edge ») et l'arrière (uropode ou « trailing edge ») (Etienne-Manneville, 2008). La polarisation et l'organisation cellulaire se mettent en place en fonction des caractéristiques de l'environnement, tels que le chimiotactisme (attirance pour des chémo-attractants), le mécanotactisme (contacts cellules-cellules), le durotactisme (induit par des différences de rigidité du substrat), ou une combinaison de plusieurs de ces facteurs. La mise en place du front de migration se fait principalement par une activité de polymérisation de l'actine, entraînant la formation d'un réseau dense et permettant l'adhésion au substrat. Le « trailing edge » quant à lui, fait suite à la formation du front de migration, et résulte de la contraction du cytosquelette d'actine et de myosine, et du désassemblage des adhérences (Vallénus, 2013).

La formation du front de migration s'effectue principalement par la mise en place de protrusions de la membrane, tels que des lamellipodes ou des filopodes, soutenus par des structures cytosquelettiques à travers la polymérisation de l'actine et des points d'adhésion au substrat. Nous allons détailler la chronologie de la polymérisation de l'actine, dont les étapes sont illustrées sur la figure 5, qui débute par la réception d'un signal extracellulaire, telle qu'une modification de la concentration d'une molécule chémo-attractante par les récepteurs membranaires. Le principal complexe nécessaire à la nucléation de l'actine (initiation de la polymérisation) est le complexe ARP2/3, qui est contrôlé par le complexe protéique WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), N-WASP et WAVE/SCAR (WASP-family verprolin homologous protein) (Pollitt & Insall, 2009). Ce dernier fait partie d'un complexe inhibiteur contenant les protéines ABI, NAP125, SRA-1 et HSPC-300, qui peut être dissocié du complexe WAVE/SCAR par des GTPases de types RAC1-GTP et CDC42, ce qui permettra l'activation du complexe WAVE/SCAR (Pollard & Gary, 2003).

L'activation du complexe ARP2/3 qui en découle promeut l'initiation de nouveaux filaments d'actine à partir de filaments préexistants en forme de Y. Un filament d'actine qui a arrêté de croître ne peut recommencer, il est en effet capé à son extrémité par des protéines telles que la β -actinine, CAPZ ou CAP32/34, qui protègent la dégradation de l'extrémité du filament, mais bloquent également son élongation future. Le complexe ARP2/3 permet alors la polymérisation de filament de F-actine à partir de monomères de G-actine liés à un groupement ATP, formant une hélice de 8nm de diamètre, et appelée extrémité barbée (Richardson et al., 2007). Cette polymérisation entraîne la formation de filopodes ou de lamellipodes (Figure 6). Par la suite, le groupement ATP est hydrolysé de manière irréversible au bout de quelques secondes et dans les minutes suivantes, le phosphate est dissocié par les protéines de la famille ADF/cofiline, formant l'extrémité appelée bout pointu. Les filaments de F-actine liés à l'ADP seront dépolymérisés par l'intermédiaire de ces mêmes protéines, libérant les monomères de G-actine-ADP, qui seront pris en charge par une protéine liant l'actine (ABP), la profiline, qui pourra moduler l'accessibilité du site de liaison à l'ADP, régulant ainsi la disponibilité de la G-actine disponible à la polymérisation. La profiline liée à la G-actine-ATP favorisera ensuite l'élongation de nouvelles branches de filaments, formant ainsi un cycle (Figure 5). La disponibilité en G-actine totale module la vitesse d'élongation et de polymérisation, ce qui a un impact direct sur la vitesse de migration de la cellule sur son substrat (Pollard & Gary, 2003). La polymérisation de l'actine et donc la mise en place de protrusions est un mécanisme très dynamique qui se présente sous la forme d'un « tapis roulant » entre polymérisation et recyclage des monomères de G-actine.

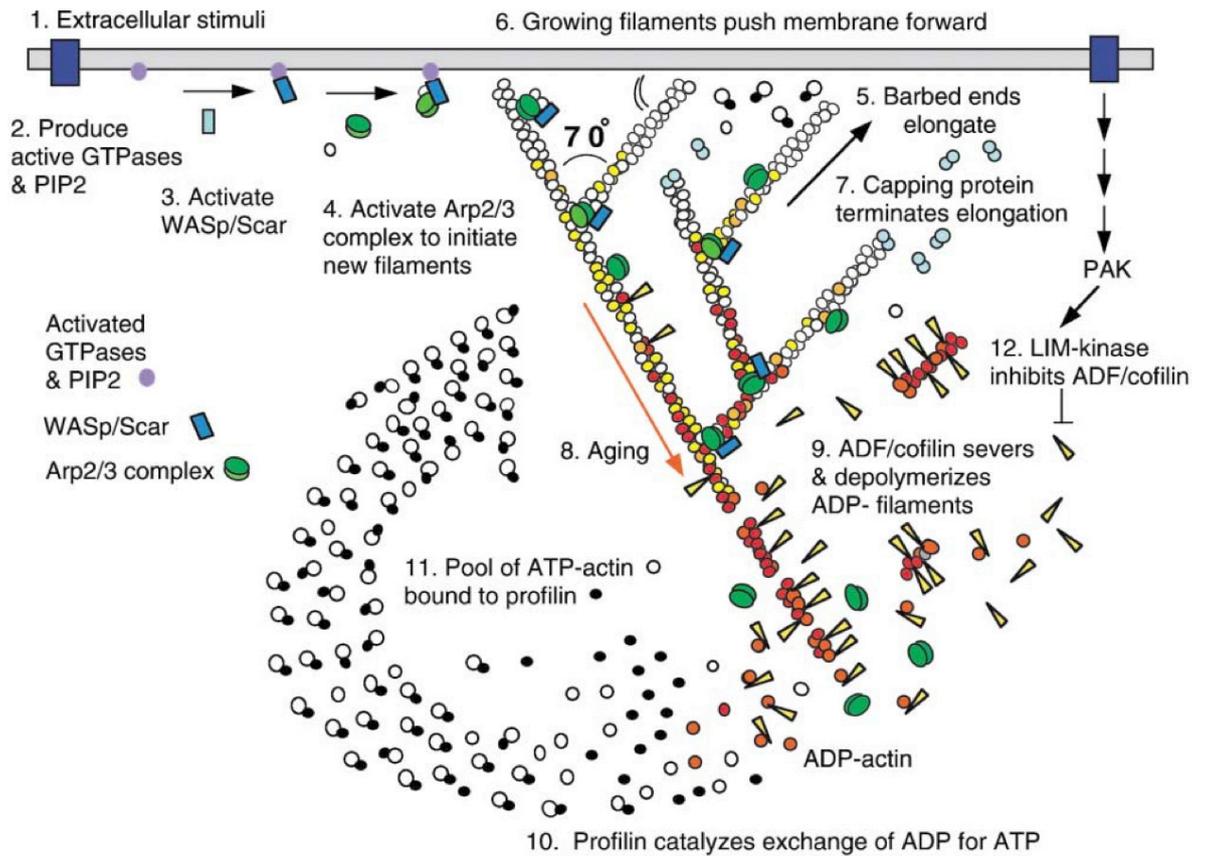


Figure 5 : Représentation de la cascade de signalisation et des étapes conduisant à la polymérisation de l'actine et à son recyclage. (Pollard & Gary, 2003)



Figure 6 : Répartition des fibres de F-actine et régulation des embranchements par le complexe ARP2/3 dans la mise en place de filopodes et de lamellipodes (Pollitt & Insall, 2009).

Si la polymérisation de l'actine est un processus central dans toutes les formes de migration, on peut distinguer plusieurs types de migration cellulaire que nous allons décrire brièvement.

1.4.1.2 Migration mésenchymateuse

Pour se déplacer, les cellules peuvent mettre en place trois mécanismes de migration, que sont la migration mésenchymateuse, la migration amiboïde et la migration collective, selon leur localisation, leur état et la composition du microenvironnement (Paňková et al., 2010). La migration mésenchymateuse est le mécanisme exploité entre autres par les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales ou encore les macrophages, donnant aux cellules une forme aplatie, allongée et polarisée, due aux interactions entre la matrice extracellulaire et les intégrines.

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires essentiels aux interactions entre le substrat et le cytosquelette d'actine. Ce sont des

hétérodimères $\alpha\beta$ comportant un domaine extracellulaire large et un domaine cytoplasmique court (Hynes, 2002). Le domaine extracellulaire permet la liaison aux ligands du substrat, tels que la fibronectine (intégrines de type $\alpha5\beta1$, $\alphaV\beta3$, $\alpha4\beta1$...) ou le collagène ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$...). Le signal reçu par les intégrines est transmis par l'intermédiaire des protéines des adhésions focales liées aux domaines cytoplasmiques courts, telles que FAK (focal adhesion kinase) ou les kinases Src, qui permettent en aval l'activation des GTPases nécessaires à la polymérisation de l'actine et à la migration cellulaire (Figure 7).

La migration mésoenchymateuse peut se résumer en 5 étapes, que sont l'extension du front de migration par la formation de filopodes ou de lamellipodes, l'adhésion à la matrice extracellulaire, la contraction du cytoplasme, le relâchement des sites d'adhésion et enfin le recyclage des molécules et des récepteurs nécessaires à l'adhésion et à la polymérisation de l'actine vers l'avant de la cellule (Sheetz et al., 1999). La migration mésoenchymateuse, du fait de ses adhésions fortes avec le substrat, entraîne des vitesses de migration cellulaires assez faibles, de l'ordre d'un micromètre par minute (Petrie et al., 2009) (Figure 8).

Une caractéristique de la migration mésoenchymateuse est la dégradation de la matrice qu'elle engendre. En effet, les complexes d'intégrines recrutent des enzymes protéolytiques nécessaires à la dégradation de la matrice extracellulaire, permettant la création d'un tunnel facilitant la migration cellulaire dans un environnement tridimensionnel. Les protéases majoritaires impliquées dans ce processus de dégradation sont les métalloprotéases matricielles (MMPs) (Gifford & Itoh, 2019) qui sont des protéines dépendantes du zinc, et qui ont la capacité de dégrader tous les composants de la matrice extracellulaire en fonction du type de MMP sécrétée (24 MMP chez l'humain)

(Nagase et al., 2006). Il existe également des protéases de type cystéine (cystéines cathepsines) ou sérine protéases (telle que la plasmine) (Deryugina & Quigley, 2012; Mohamed & Sloane, 2006). Ces protéases peuvent soit être sécrétées dans le milieu extracellulaire, soit exposées à la surface de la membrane plasmique (MT-MMPs, Membrane type MMPs). Il a par exemple été montré qu'une surexpression de MT1-MMP permet une augmentation de la capacité invasive des cellules (Itoh, 2006).

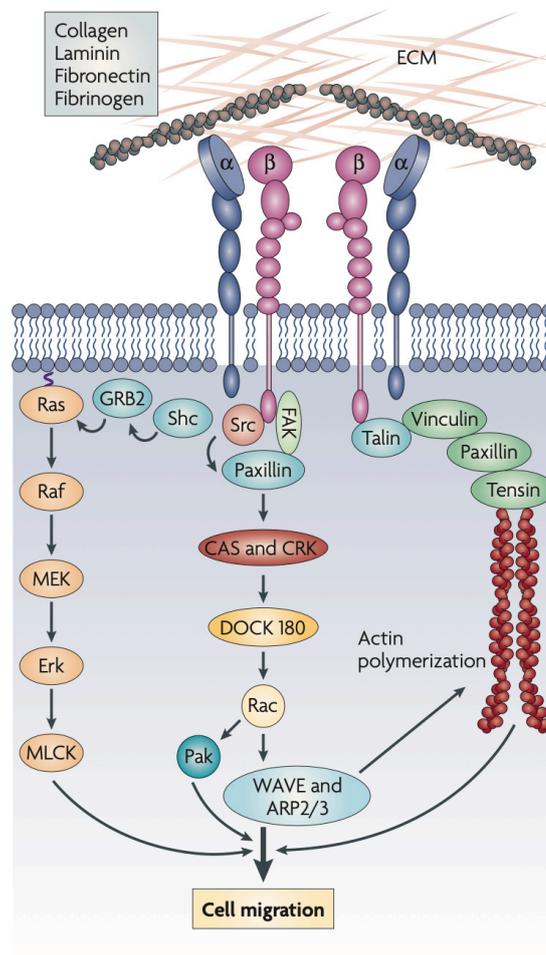


Figure 7 : Représentation des voies de signalisation partant de l'adhésion des intégrines à la matrice extra cellulaire en passant par CAS (BCAR1/p130CAS) jusqu'à la polymérisation de l'actine et à la migration cellulaire en résultant. Extrait de (Avraamides et al., 2008).

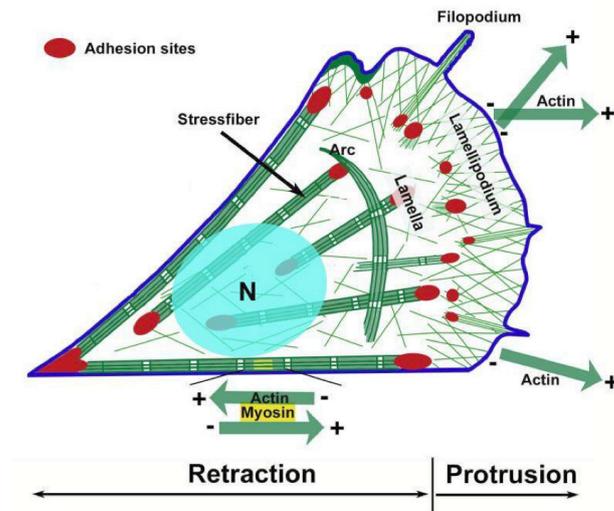


Figure 8 : Représentation d'un fibroblaste polarisé migrant de façon mésenchymateuse et comportant des protrusions de type lamellipodes et filopodes médiées par un réseau d'actine dense (Risler, 2011).

1.4.1.3 Migration amiboïde

À l'inverse du mécanisme de migration mésenchymateuse décrit ci-dessus, la migration amiboïde permet une vitesse de déplacement cellulaire plus élevée, pouvant dépasser les 10 μ m/min (Petrie et al., 2009). La forme des cellules au cours de la migration amiboïde sera arrondie et non allongée, du fait des forces exercées par la contractilité cellulaire. Sous cette forme, la cellule interagit peu avec le substrat et peut se déformer fortement pour passer entre les fibres de la matrice extra cellulaire.

Ce type de migration repose sur la déformation et le décollement de la membrane plasmique du cortex d'actine et de myosine, ce qui entraîne la formation d'un « bourgeon » (appelée *bleb*). Le cytosquelette peut se détacher localement du cortex d'actine soit par l'initiation de la dépolymérisation de

l'actine ou une rupture locale du cortex et de la membrane plasmique, soit par une augmentation locale de la pression intracellulaire (Figure 9) (Keller & Eggli, 1998). La membrane plasmique est en effet accrochée au réseau d'actine par des protéines de la famille ERM, comprenant des protéines telles que l'Ezrine, la Radixine ou la Moesine, qui sont toutes régulées par les petites GTPases de type RhoA et leur effecteur ROCK (rho associated protein kinase) (Niggli & Rossy, 2008). ROCK induit la phosphorylation de la chaîne légère de myosine MLC2, permettant l'augmentation de la contractilité de l'acto-myosine (Worthylake et al., 2001), faisant de la voie RhoA/ROCK la principale responsable de la contractilité du bleb. L'acto-myosine est un complexe formé de fibres de F-actine et de myosine II, la myosine II pouvant se déplacer le long des filaments d'actine et ainsi exercer une force de traction en rapprochant deux filaments d'actine parallèles (Agarwal & Zaidel-Bar, 2019). Le bleb ainsi formé peut soit se rétracter lorsque le cortex d'acto-myosine se reforme à l'intérieur du bleb, soit perdurer et permettre la migration cellulaire par les forces qu'il exerce sur le substrat (Charras et al., 2006). Ayant des adhérences faibles avec le substrat, des vitesses de 25µm/min peuvent être relevées dans le cas de lymphocytes dans du collagène. Ces faibles adhérences favorisent la migration dans un environnement 3D confiné (entre des lamelles de verre ou dans la matrice), ce qui permet l'application des forces sur la membrane extracellulaire (Figure 9). À l'inverse de la migration mésenchymateuse, les cellules qui migrent de façon amiboïde ne sécrètent pas de protéases et ne dégradent pas la matrice extracellulaire, elles l'utilisent au contraire pour participer à leur progression.

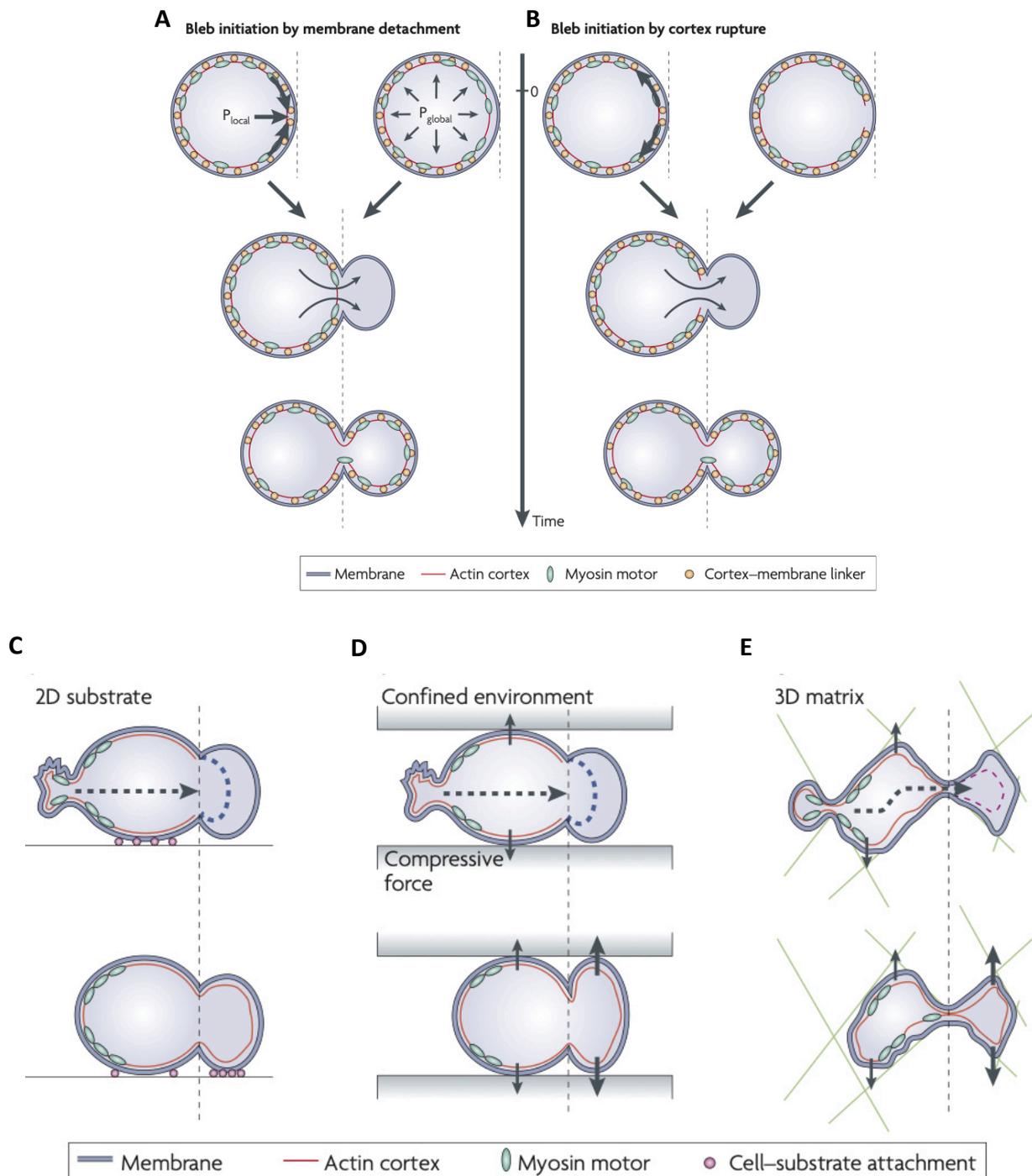


Figure 9 : Représentation de l'initiation d'un bleb par détachement de la membrane plasmique du cortex d'acto-myosine (A) ou par rupture du cortex d'acto-myosine (B). Comportement d'un bleb *in vitro* sur un support 2D (C), dans un environnement confiné entre deux lamelles (D) et dans une matrice 3D de collagène (E). (Charras & Paluch, 2008)

1.4.1.4 Migration collective

La migration collective permet le déplacement d'un groupe de cellules liées entre elles par des adhésions cellulaires, médiées par des protéines de jonctions adhérentes telles que les cadhérines. Ces cellules adoptent un mode de polarité appelée supra cellulaire, ce qui entraîne une organisation du cytosquelette au niveau de l'ensemble du groupe et non de la cellule isolée (Friedl & Gilmour, 2009). Les cellules au front de migration (cellules de la pointe) génèrent d'importantes protrusions tels que des lamellipodes ou des pseudopodes avec de fortes adhésions, nécessaires pour tracter les cellules dites suiveuses, qui de leurs côtés génèrent d'importantes quantités de MMPs pour faciliter l'avancée du groupe dans un environnement 3D. Ce système de migration est très utilisé dans les phénomènes d'embryogenèse pour la mise en place des tissus et organes. On trouve également de la migration collective dans certains processus d'invasion tumorale (Figure 10) (Friedl & Gilmour, 2009), Mais ce processus ne semble pas être impliqué dans la lymphomagenèse à notre connaissance.

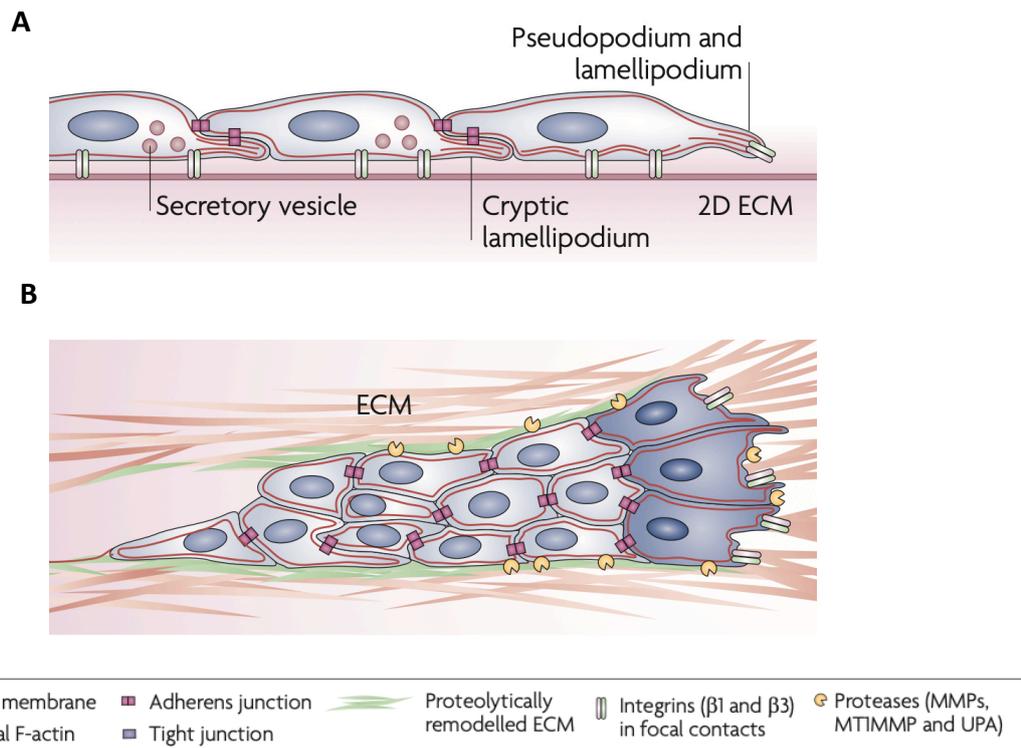


Figure 10 : Représentation du front de migration d'une monocouche de cellules migrant de façon collective en 2D (**A**), et d'un cluster de cellules migrant de façon collective dans un environnement 3D, les cellules foncées représentant le front de migration (**B**). Adapté de (Friedl & Gilmour, 2009)

1.4.1.5 Impact de BCAR1 sur la migration

Le cytosquelette d'actine et sa réorganisation dynamique permettent de moduler la plasticité cellulaire et d'entraîner les phénomènes migratoires précédemment évoqués. Pour aller plus loin et lier la migration au processus métastatique dans le cancer, nous allons nous intéresser au rôle de la protéine BCAR1 (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance, également appelée p130Cas) sur la migration. Comme nous l'avons vu plus tôt, la protéine Rho-GTPase RAC1 est nécessaire à la formation de filaments d'actine lors de la mise en place de lamellipodes, d'une part en agissant sur le complexe WAVE et d'autre part en activant la kinase PAK, ce qui permet de stabiliser l'actine polymérisée via l'inhibition de la cofilin. Il a d'ailleurs été montré que l'inactivation de BCAR1

dans des fibroblastes inhibe la migration, la diffusion cellulaire et la capacité des cellules à réparer une brèche faite sur une monocouche de fibroblastes (Honda et al., 1999).

Une importante partie des mécanismes de migrations est médiée par l'état d'activation de la protéine échafaudage BCAR1 et sa cascade de signalisation, entraînant l'activation de RAC1 par sa liaison au GTP. En effet, en aval des intégrines, au niveau des sites d'adhésion de la cellule au substrat, on retrouve les plaques d'adhésion focales, qui sont des complexes protéiques nécessaire à la transduction des signaux. Ces complexes d'adhésion sont composés de nombreuses kinases, dont la protéine FAK (Focal adhesion kinase), BCAR1, BCAR3 ou des SRC kinases. Au niveau de ces plaques d'adhésion, la protéine BCAR1 peut être phosphorylée au niveau de ses résidus tyrosine, ce qui permet la formation de sites de « docking » et le recrutement des protéines CRK et DOCK180, entraînant l'activation de la protéine RAC1 en échangeant le groupement GDP par un groupement GTP (Brugnera et al., 2002), modulant ainsi le réarrangement du cytosquelette d'actine et permettant la migration cellulaire (Figure 11). Cette phosphorylation de BCAR1 est permise par l'étirement de son domaine SD (Substrate Domain), libérant les sites de phosphorylation. Il a d'ailleurs été montré dans le cancer du sein que la phosphorylation de BCAR1 était médiée par l'interaction avec BCAR3, nécessaire au recrutement de Src, et que l'inactivation de BCAR3 entraîne une réduction de l'adhésion et de la migration cellulaire *in vitro* (Schuh et al., 2010). Une étude montre également que l'activation de BCAR1 augmente la capacité des cellules à migrer à travers un support en matrigel et que cette migration est possible par la formation de protrusions cellulaires importantes et l'expression de la métalloprotéase MMP2 (Brábek et al., 2004).

L'activation de la protéine BCAR1 et l'induction de la migration qu'elle entraîne en fait donc une cible potentiellement intéressante pour le traitement des processus de migration tumorale, notamment des métastases. En effet, une forte expression de BCAR1 est associée à un mauvais pronostic et à une résistance aux traitements dans les cancers du sein (Van Der Flier et al., 2000), mais également à une augmentation de la dissémination métastatique de la maladie (Kumbrink et al., 2016). Au cours de ce travail de thèse, nous avons d'ailleurs montré que la protéine BCAR1 était impliquée dans la migration de lignées lymphomateuses *in vivo* et *in vitro*, selon le statut du gène *BTG1*.

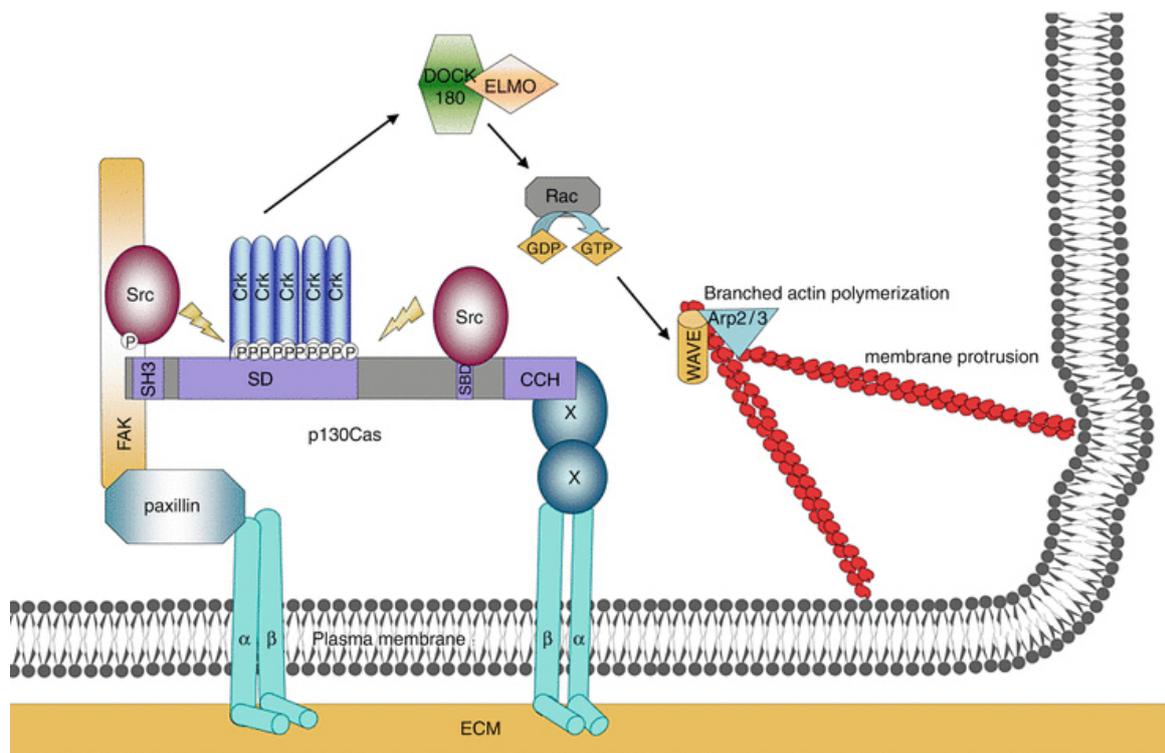


Figure 11: Représentation d'une adhésion focale et de la signalisation de BCAR1/P130Cas à travers l'activation de RAC1, suivi de la mise en place de la polymérisation de l'actine et de la formation de protrusions membranaires (Donato et al., 2012).

1.4.1.6 Migration des lymphocytes

Nous allons maintenant décrire les mécanismes mis en jeu dans la migration des lymphocytes normaux, qui peut éclairer la compréhension des mécanismes de dissémination à l'œuvre dans les atteintes extra-ganglionnaires des lymphomes. Comme le montre l'exemple paradigmatique des lymphomes du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT), une stimulation antigénique persistante dans un organe peut par exemple conduire à la formation d'un tissu lymphoïde avec expression de chimiokines habituellement retrouvées dans les tissus lymphoïdes secondaires, et ainsi, potentiellement participer à la mise en place d'un lymphome primaire dans des tissus non lymphoïdes (Aloisi & Pujol-Borrell, 2006).

Dans le centre germinatif, les cellules dendritiques folliculaires (FDC) et les cellules stromales produisent de grandes quantités de molécules chémo-attractantes, telles que le CXCL13 ou le CXCL12, qui attirent les cellules B exprimant les récepteurs CXCR5 ou CXCR4 respectivement, permettant la mise en place des centres germinatifs et leur maintien (Dubey et al., 2019). Une fois dans la zone sombre du centre germinatif, le lymphocyte B naïf suit le gradient de CXCL13 vers la zone claire du centre germinatif. En effet, une fois sécrétée, la protéine CXCL13 est majoritairement immobilisée par fixation aux glycosaminoglycans (GAGs), et forme des gradients de concentration importants dans la zone claire du centre germinatif (Cosgrove et al., 2020). De la même manière que pour CXCL13, les FDC sécrètent la protéine d'adhésion ICAM-1 qui sera reconnue par l'intégrine LFA-1 ($\alpha L\beta 2$) exprimée à la membrane du lymphocyte. Une étude a montré que la migration de lymphocytes B sur un substrat recouvert de CXCL13 et de l'ICAM-1 se faisait de façon aléatoire et

dépendante de la formation de bleb, confirmant une migration de type amiboïde pour les lymphocytes B (Liu et al., 2016).

La migration des lymphocytes T et des cellules hématopoïétiques se fait communément de façon amiboïde (Wolf et al., 2003) indépendamment de l'action des MMPs. La migration des lymphocytes B reste cependant assez peu étudiée. Une récente étude montre que la migration de lymphocytes B dans le cas d'un lymphome B diffus à grandes cellules se fait principalement de façon amiboïde, impliquant la voie RhoA/ROCK (Pan et al., 2018). En effet l'interleukine 10, généralement fortement exprimée dans les DLBCL, permet la phosphorylation de STAT3 par l'intermédiaire des kinases de la famille JAK, ce qui entraîne l'activation de la voie RhoA/ROCK et participe ainsi à la phosphorylation de la myosine, comme nous l'avons décrit plus haut. Des inhibiteurs de JAK tels que le ruxolitinib empêchent la dissémination de lignées de DLBCL *in vivo* (Pan et al., 2018). Il a par ailleurs été montré que la surexpression de RAC1-GTP entraîne une activation de STAT3 dans le cancer colorectal et est associée à un pronostic défavorable. RAC1-GTP interagit directement avec STAT3, et entraîne la formation d'un complexe avec PKC (Protein Kinase C), ce qui permet la phosphorylation de STAT3 et conduit à l'invasion métastatique (Mattagajasingh et al., 2012; Zhou et al., 2018).

1.4.2 Lymphocyte, lymphome et « homing »

Nous allons maintenant nous intéresser au confinement des lymphocytes B dans les centres germinatifs, permettant leur développement au niveau de sites spécifiques et conduisant potentiellement à la mise en place d'un lymphome.

Les lymphocytes matures circulent dans le sang et les organes lymphoïdes, mais ont besoin de l'expression de molécules spécifiques pour se fixer à la membrane endothéliale des vaisseaux sanguins et entrer dans un organe lymphoïde. La localisation de ces lymphocytes est médiée par l'expression de gènes appelés récepteurs de homing (HRs) codant pour des protéines telles que LAM-1, LFA-1 ou VLA-4 (Pals et al., 2007). Les lymphocytes ressortent de la circulation en se fixant aux parois endothéliales au niveau des veinules à endothélium épais retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires. Les mécanismes d'extravasation (appelés aussi diapédèse) des lymphocytes B sont peu étudiés mais probablement proches de ceux observés pour les lymphocytes T nettement plus documentés. Les lymphocytes B, de la même façon que les T, s'accrochent à la surface luminale des cellules endothéliales par l'intermédiaire des molécules d'adhésion VLA-4 (intégrine $\alpha 4\beta 1$) et LFA-1 (intégrine $\alpha L\beta 2$) dont les ligands sont respectivement VCAM-1 et ICAM-1 (Figure 12A). Deux modes d'extravasation sont décrits : le mode para-cellulaire (au niveau de la jonction de deux cellules endothéliales) et le mode trans-cellulaire (à travers une seule cellule endothéliale), bien que la migration trans-cellulaire soit sujette à controverse (Ley et al., 2007). Lors de la migration trans-endothéliale de type para-cellulaire, les molécules PECAM1 (platelet-endothelial-cell adhesion molecule 1) et JAMs (junctional adhesion molecule) exprimées à la surface des cellules endothéliales guident les lymphocytes au niveau des jonctions cellules-cellules (Figure 12B). L'expression de ces molécules de surface est stimulée par l'expression d'interleukine 1β (IL- 1β) et promeut la migration des lymphocytes (Nourshargh et al., 2006). Il est intéressant de noter qu'une forte expression de ces récepteurs, conduisant à la migration et à l'adhésion cellulaire au substrat, semble être un marqueur de mauvais pronostic et de dissémination des lymphomes extra-ganglionnaires (Jalkanen et al., 1991).

Une fois les lymphocytes engagés dans un centre germinatif, l'expression du récepteur d'inhibition de la migration S1PR2 (Sphingosine-1-phosphate receptor 2) permet de confiner les cellules dans le centre germinatif et d'empêcher leur dissémination. L'activation de S1PR2 inhibe les fonction des RAC-GTPases nécessaires à la migration cellulaire, favorisant ainsi la rétention des lymphocytes dans les centres germinatifs (Green & Cyster, 2012). Il a également été montré que l'inactivation du gène *GNA13* codant la protéine G α 13 qui est couplée au récepteur S1PR2 entraîne de la même façon la dissémination des lymphocytes B hors du centre germinatif dans des organes distants (Muppidi et al., 2014). *S1PR2* est fréquemment muté (27%) dans les DLBCL de type GC, entraînant le développement de ces lymphomes et une réduction du confinement des lymphocytes dans le centre germinatif (Cattoretti et al., 2009). Bien que très rarement retrouvé muté dans les ABC-DLBCL, pourtant caractérisés par des atteintes extra-ganglionnaires fréquentes, il semblerait que l'expression protéique de S1PR2 soit réprimée dans ces lymphomes par le facteur de transcription FOXP1 (factor forkhead box protein 1) (Flori et al., 2016).

Il est par ailleurs intéressant de noter que l'on retrouve une très forte concentration de CXCL13 dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de lymphomes du système nerveux central (CNS) par rapport à ce que l'on retrouve chez un patient sain ou chez un patient atteint de cancer du système nerveux (468 pg/ml, contre 6 pg/ml pour un patient sain et 8 pg/ml pour un cancer du système nerveux), alors que l'on n'observe pas d'augmentation d'expression de CXCL12 dans le liquide céphalo-rachidien, suggérant un impact majeur de la présence de CXCL13 sur la formation d'un lymphome dans le système nerveux central (Figure 13) (Fischer et al., 2009).

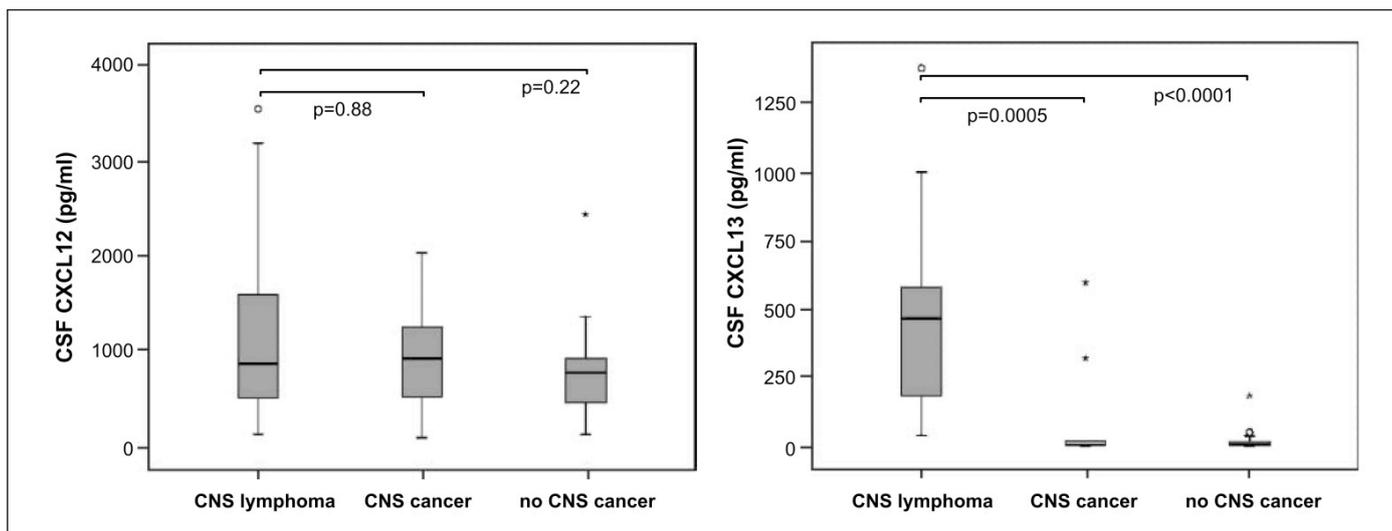


Figure 13 : Niveaux de CXCL12 et CXCL13 dans le liquide céphalo-rachidien (cerebrospinal fluid, CSF) on fonction de l'atteinte du lymphome (CNS lymphoma = lymphome du système nerveux central, CNS cancer : cancer du système nerveux central) (Fischer et al., 2009).

Bien que relativement peu étudié, le niveau de dissémination des lymphomes est très important à l'établissement du pronostic et à la stadification, nécessaires à la mise en place d'un traitement adapté. L'étude de son mécanisme permettrait de mieux comprendre son évolution vers une maladie incurable. La réalisation d'un modèle de dissémination lymphomateuse et la description d'un mécanisme moléculaire ont fait l'objet d'une partie de ce travail.

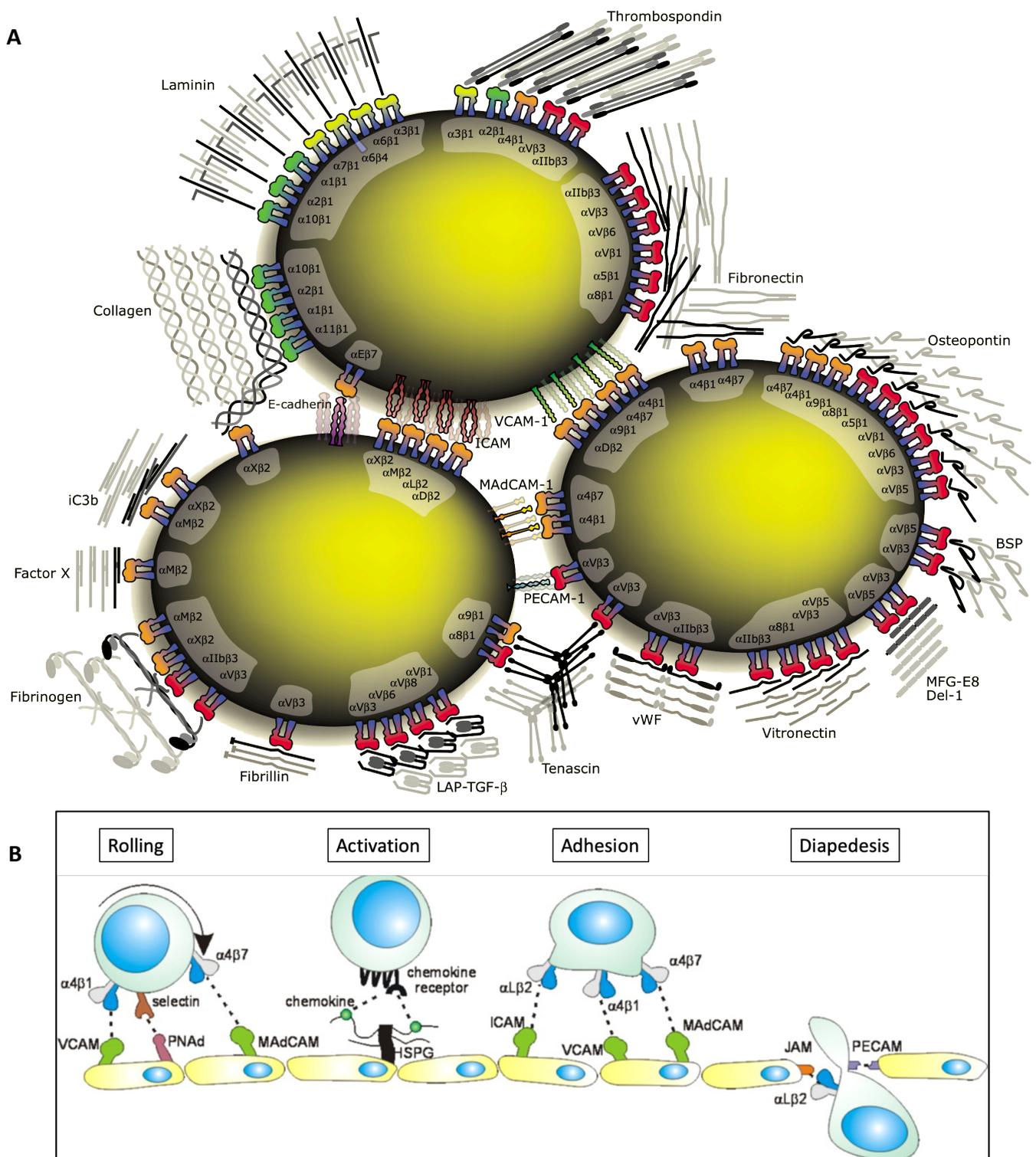


Figure 12 : (A) Représentation des différentes intégrines, de leur ligands et des molécules qui conduisent à leur activation (Humphries et al., 2006). (B) Extravasation des lymphocytes B et molécules mises en jeu. Adapté de (Pals et al., 2007)

1.5 Traitements

Au cours de ce chapitre, nous présenterons de façon non exhaustive quelques approches thérapeutiques actuellement utilisées en clinique ou encore en développement, dans le but de mettre en perspective l'approche que nous proposons dans les résultats de ce manuscrit.

1.5.1 Chimiothérapies

À la différence des cancers solides, il n'y a pas de place thérapeutique pour la chirurgie dans la prise en charge des DLBCL. La plupart des patients nouvellement diagnostiqués présentent un stade avancé de la maladie (70%), historiquement pris en charge par six ou huit cycles de chimiothérapies par CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone) (Sonnen et al., 2002; Wästerlid et al., 2018).

Au début des années 2000, il fut proposé d'ajouter du rituximab, un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre la protéine membranaire CD20 spécifique des cellules B matures (Coiffier et al., 2002). L'efficacité des thérapies par anticorps monoclonaux repose sur la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) et sur la cytotoxicité dépendante du complément (CDC). L'ajout de rituximab a permis d'augmenter le taux de réponse au traitement (76% pour les patients traités par R-CHOP contre 63% pour le traitement CHOP seul (Coiffier et al., 2002)), cependant 30 à 40% des patients traités par R-CHOP rechutent dans les 2 ans suivant le traitement ou ont une maladie réfractaire au traitement. Les stratégies d'intensification thérapeutique permettant d'augmenter la dose-intensité de la chimiothérapie (RCHOP-14, R-ACVBP, R-daEPOCH) peuvent améliorer le contrôle de la maladie,

mais au prix de toxicités qui ont limité leur usage (par exemple, (Récher et al., 2011)). L'utilisation de radiothérapie en supplément de l'immunochimiothérapie ne semble en général pas apporter de bénéfice à la survie, excepté dans la prise en charge de fixations persistantes au PET-scanner post-traitement ou pour le traitement de DLBCL localisés (Freeman et al., 2021).

1.5.2 Thérapies ciblées

Une autre approche se base sur le ciblage de certaines voies de signalisation souvent suractivées lors de la transformation tumorale, telle que peut l'être la voie NF- κ B dans les DLBCL. Initialement décrits dans les lymphocytes B matures, les facteurs NF- κ B sont impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques comme la réponse immunitaire, la prolifération ou l'inhibition de l'apoptose. NF- κ B est une famille de facteurs de transcription composée de 5 protéines fonctionnant sous la forme d'homo ou d'hétérodimères (NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB et cRel). Sous leur forme inactive, les protéines NF- κ B sont généralement séquestrées dans le cytoplasme par des inhibiteurs de la famille I κ B, tels que I κ B α . L'activation de NF- κ B par la voie canonique conduit à la dégradation des molécules inhibitrices de NF- κ B. Cette voie peut être activée par un grand nombre de récepteurs, dont le récepteur des cellules B (BCR) ou les Toll like récepteurs (TLR), et entraîne la phosphorylation de I κ B α . Celui-ci sera alors ubiquitinylé et dégradé par le protéasome (Liu et al., 2017), libérant ainsi les facteurs NF- κ B (principalement NF- κ B1/RelA et NF- κ B1/c-Rel), leur permettant d'être transloqués dans le noyau où ils pourront se fixer aux séquences promotrices ou inhibitrices pour activer ou réprimer certains gènes cibles (*BCL2*, *VEGF*, *VCAM-1*...). Il est possible de cibler le facteur NF- κ B avec, par exemple, la molécule pevonedistat (MLN4924), qui module

l'ubiquitinylation de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ et empêche sa dégradation, ce qui permet de bloquer NF- κ B dans le cytoplasme et d'inhiber son action (Soucy et al., 2009). Une autre approche à l'étude est l'inhibition du protéasome, dont la fonction est requise pour l'activation du facteur NF- κ B. Pour maintenir l'expression de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, des inhibiteurs du protéasome, tels que le bortezomib couplé à du cisplatine ou à du R-CHOP, sont en phase d'essai clinique pour traiter des patients atteints de DLBCL, mais n'ont pas permis d'améliorer la survie sans progression des patients traités (Bose et al., 2014; Davies et al., 2019).

Une seconde possibilité est de cibler les protéines en amont de NF- κ B, telles que BTK (Bruton's Tyrosine Kinase), qui joue un rôle majeur dans la transduction du signal du BCR (B cell receptor), ou SYK (spleen tyrosine kinase). Il existe de nombreuses molécules inhibant spécifiquement ces protéines, telles que l'ibrutinib (BTK), l'entospletinib ou le fostamatinib (SYK) (pour revue sur les molécules et essais cliniques : (Wang et al., 2020) (Figure 14). Là encore, les essais cliniques n'ont pas permis de démontrer un intérêt à l'adjonction de ces inhibiteurs. L'essai PHOENIX montre d'ailleurs une aggravation de la maladie après ajout d'ibrutinib au traitement R-CHOP chez les sujets âgés de plus de 60 ans, avec cependant une survie globale légèrement plus élevée chez les sujets de moins de 60 ans. L'âge médian de prise en charge étant de 62 ans, il apparaît difficile de proposer l'ajout d'ibrutinib au R-CHOP de façon généralisée (Younes et al., 2019). Récemment, l'effet de l'ajout d'ibrutinib au R-CHOP a été décrit comme très positif pour le traitement de patients jeunes (<60 ans) atteints d'un DLBCL de type MCD, avec une survie sans évènement de 100% à trois ans pour le groupe traité par ibrutinib contre 60% pour le groupe placebo (Wilson et al., 2021). La classification moléculaire semble ici apporter un avantage thérapeutique significatif par rapport à l'approche basée sur la cellule d'origine qui comporte une forte hétérogénéité dans le regroupement des patients.

Finalement, de très nombreuses molécules sont actuellement en essai clinique, mais aucune n'a pour le moment pu démontrer son intérêt réel dans des essais randomisés. C'est pourquoi il est important de continuer la recherche de nouvelles thérapies, ou le repositionnement de molécules qui cibleraient des voies peu étudiées, nécessaires à la mise en place des lymphomes, tel que nous le présenterons dans les résultats de ce manuscrit, en s'intéressant à l'effet de *BTG1* dans la lymphomagenèse et aux moyens potentiels de cibler ces effets.

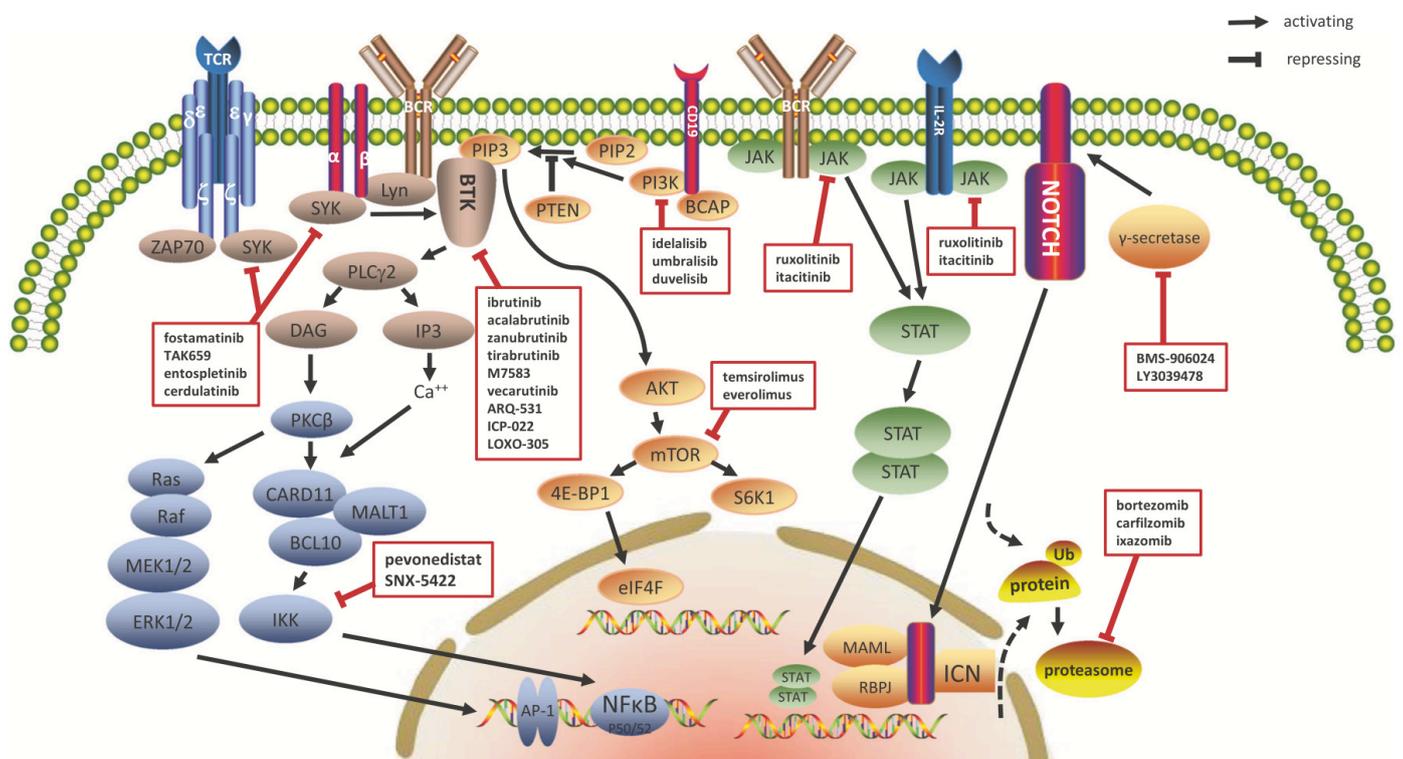


Figure 14 : Voies de signalisation du BCR et thérapies ciblées associées. (Wang et al., 2020)

1.5.3 Nouvelles approches thérapeutiques

Au contraire des thérapies ciblées, dont l'efficacité clinique reste à prouver dans les DLBCL, de nouvelles approches d'immunothérapies ont été développées, avec beaucoup plus de succès. En 2018, l'utilisation de CAR-T cells a été développée pour les patients atteints de DLBCL réfractaires. Le concept de CAR-T cells (Chimeric antigen receptor T) repose sur l'activité naturelle cytotoxique des cellules T à détruire une cellule cible. Les lymphocytes T du patient sont prélevés et modifiés (par infection lentivirale et culture *in vitro*) pour leur faire exprimer un récepteur membranaire ciblant un antigène tumoral (le CD19 dans le cas des DLBCL) et une chaîne intra-cytoplasmique chimérique, composée de plusieurs domaines d'activation des lymphocytes T. Ces lymphocytes T modifiés sont ensuite réinjectés au patient après un conditionnement par cyclophosphamide, permettant de favoriser l'expansion des CAR-T, qui pourront alors détruire les cellules exprimant le CD19 (cellules tumorales et lymphocytes B normaux) (figure 15) (Schuster et al., 2017). L'utilisation de ces thérapies semble donner d'excellents résultats pour les patients répondeurs, avec plus de 70% de réponses, dont environ 35% de rémissions complètes durables (Locke et al., 2019; Sesques et al., 2020). Dans le contexte du développement des CAR-T cells, la description d'un cas de DLBCL n'exprimant pas le CD19 du fait d'une mutation affectant un site de splice dupliquée par disomie uniparentale acquise, a pris toute son importance, et a fait l'objet d'une publication dans le cadre de ce travail de thèse (Delage et al., 2019).

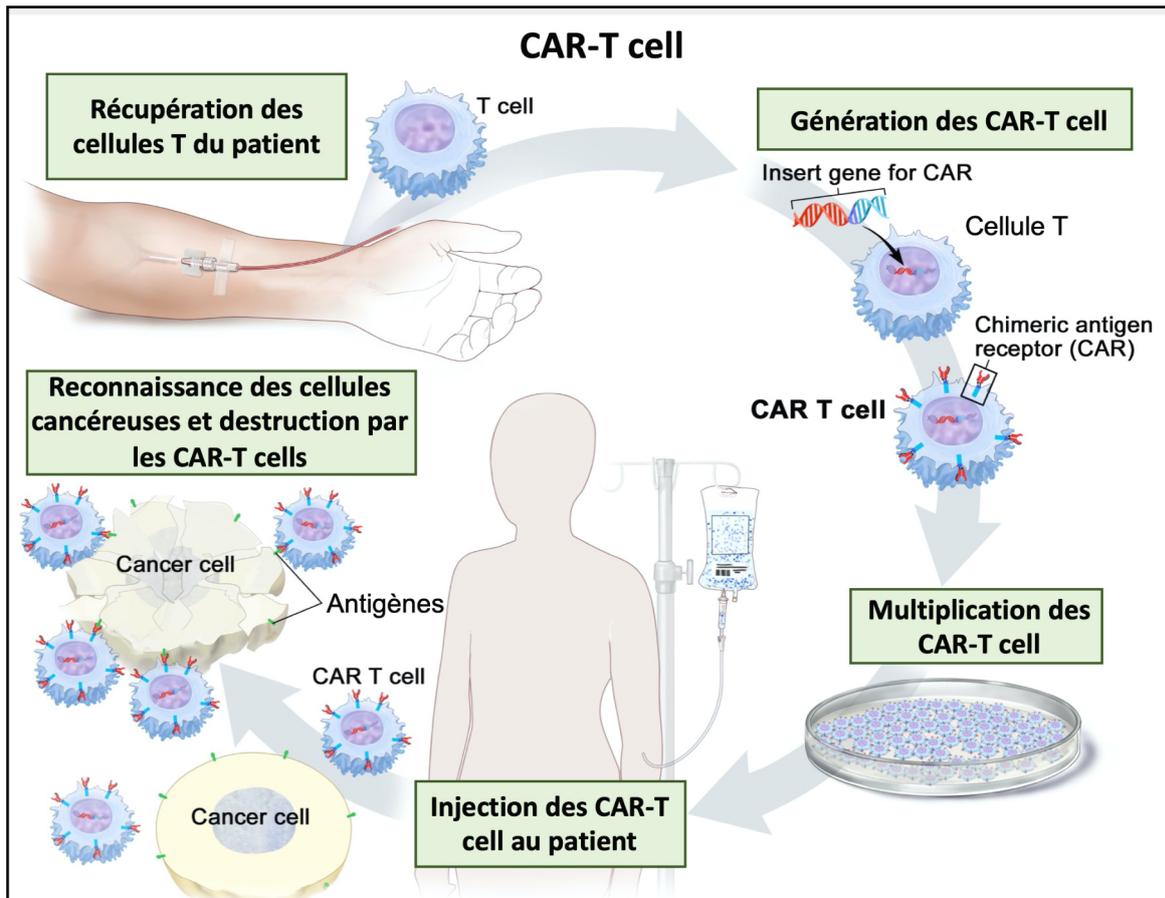


Figure 15 : Étapes de la génération de CAR-T cells (adapté de <https://www.omedit-grand-est.ars.sante.fr/car-t-cells>)

2 - Physiopathologie des DLBCL, de la génomique aux études fonctionnelles

2.1 Concept de gène driver ou passager

Avec l'essor des technologies de séquençage à haut débit, il devient de plus en plus aisé de déterminer l'ensemble des modifications génétiques somatiques d'une tumeur donnée. L'analyse de la récurrence des modifications génétiques (mutations, translocations, délétions...) parmi un très grand nombre de patients, permet de prédire l'impact qu'aura une mutation sur l'initiation

et/ou la progression du cancer. Le principe de mutation « *driver* » d'un cancer a été proposé et défini en 2009 (Stratton et al., 2009). Selon la théorie des mutations somatiques, la plupart des cancers sont initiés par une ou des modifications de l'ADN d'une cellule (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Cependant, toutes les modifications somatiques n'entraînent pas nécessairement un cancer, et n'ont parfois même aucun impact. Une mutation est dite *driver* si elle apporte un avantage sélectif à la cellule tumorale. Une mutation *driver* n'est pas forcément maintenue tout le long du développement d'une tumeur (elle l'est tout de même généralement), mais elle est nécessaire au moins à un moment de son développement.

À l'opposé du concept de mutation *driver*, on définit une mutation « *passenger* » comme n'étant pas sélectionnée positivement, n'apportant pas d'avantage prolifératif et ne participant pas au développement de la tumeur. Lors des multiples divisions que subit une cellule, il peut apparaître des mutations lors de la réplication de l'ADN, la plupart n'ayant aucune conséquence fonctionnelle. C'est pourquoi, lors de l'exploration des modifications génétiques propres à une tumeur, la cellule tumorale originale (dans le cas d'une prolifération clonale) est très probablement porteuse d'une ou plusieurs mutations *passenger*, antérieures ou postérieures à l'apparition de la mutation *driver*, qui seront conservées tout au long de la prolifération clonale, compliquant ainsi la détermination de l'impact des mutations détectées lors du diagnostic. Une tumeur sera donc porteuse d'un grand nombre de mutations *passenger* et d'un certain nombre de mutations *driver*, pouvant par ailleurs, dans les deux cas, apparaître au cours du traitement, de la rechute ou de l'évolution de la maladie.

De manière importante, une mutation *passenger* (non sélectionnée positivement durant l'oncogénèse) peut avoir un impact sur « la fitness » des

cellules tumorales en présence d'une drogue de chimiothérapie, ce qui souligne que ces mutations peuvent également être intéressantes dans le contexte clinique.

On définira par la suite la notion d'oncogène et de gène suppresseur de tumeur comme deux sous-ensembles des gènes *driver*, que l'on peut simplifier par la règle 20/20 pour analyser les profils mutationnels (Vogelstein et al., 2013). Un oncogène se définit comme un gène *driver* dont la plupart des mutations sont activatrices. Un gène suppresseur de tumeur quant à lui se définit par le fait qu'au moins 20% des mutations retrouvées sont des mutations inactivatrices ou perte de fonction.

À partir des données collectées dans des études moléculaires extensives de grandes cohortes, telles que TCGA (The Cancer Genome Atlas) ou ICGC (the International Cancer Genome Consortium)(Futreal et al., 2004), des algorithmes ont été mis au point pour assigner un rôle *driver* ou *passenger* à un gène donné dans un cancer donné. Ces différentes études proposent alors une très grande variété de gènes comme *drivers*, allant de 158 pour la plus restrictive (MustigCV) à plus de 2600 pour la plus souple (OncodriveFM) (Figure 16) (Tokheim et al., 2016). L'attribution d'une fonction driver/passenger étant largement dépendante de la nature des algorithmes d'analyse des données de séquençage, cela doit inciter à une certaine prudence en l'absence d'étude fonctionnelle. En effet, même si l'intérêt de connaître *a priori* l'impact d'une mutation génétique peut sembler séduisante dans la prise en charge d'un patient ou la mise en place de thérapie ciblée, la détermination algorithmique d'une liste de gène *driver* peut engendrer des erreurs et fortement sous-estimer l'impact de mutations alors déterminées comme *passenger* (Tokheim et al., 2016).

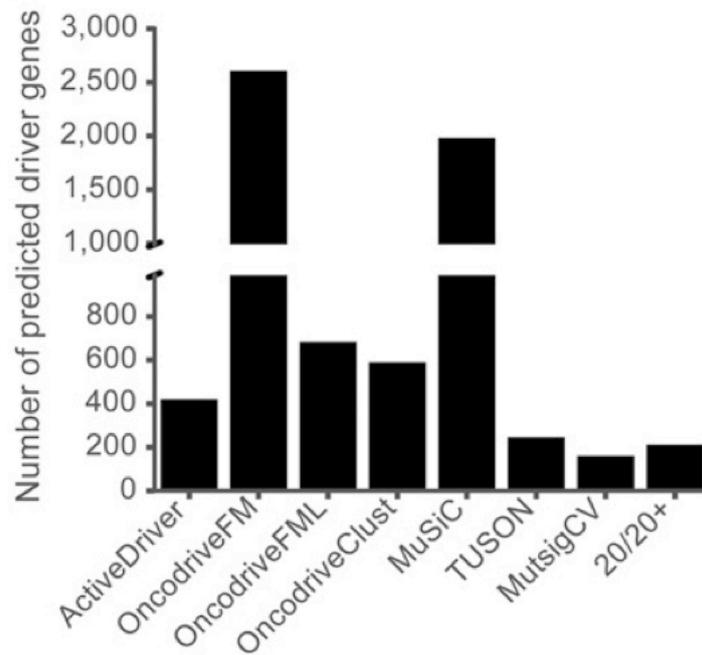


Figure 16 : Représentation du nombre de gènes prédits comme drivers en fonction de l'étude et des différentes méthodes utilisées (Tokheim et al., 2016)

2.2 Mutations liées à AID

Dans les centres germinatifs, l'enzyme AID (Activation-Induced-Cytidine Deaminase) est fortement exprimée par les lymphocytes B situés dans la zone sombre, dans lesquels elle est responsable de l'hypermutation somatique des gènes codant pour les immunoglobulines, permettant d'augmenter leur affinité pour l'antigène. AID reconnaît des séquences nucléotidiques spécifiques de type WRCY (W = A ou T, R = A ou G et Y = C ou T) (Amin et al., 2017; Pham et al., 2003). Son activité entraîne la désamination des cytosines, pour former un uracile et entraîner des mutations génétiques et des cassures de l'ADN (Zaheen & Martin, 2011). Il n'est pas à exclure l'échappement de certaines cellules aux points de contrôles, permettant ainsi l'émergence d'une cellule pré-tumorale.

Dans le cas du DLBCL, de très nombreuses mutations sont dues à l'activité d'AID. Il est alors important de déterminer si les mutations induites par AID peuvent induire ou non une transformation tumorale, ou apporter un avantage sélectif à la cellule (Amin et al., 2017). Certains gènes tels que *PIM1* sont des cibles d'AID, mais les mutations retrouvées sur ce locus ne semblent pas avoir d'effet *driver* et ne présentent que de légères aberrations phénotypiques (Laird et al., 1993). Cependant, l'inactivation simultanée des trois kinases PIM1, PIM2 et PIM3, entraîne une forte réduction de masse des animaux, suggérant un effet délétère cumulatif (Mikkers et al., 2004). De la même façon, le gène *BTG1*, fréquemment retrouvé muté dans les DLBCL, est considéré comme une cible d'AID et comme un gène *passenger* de la lymphomagenèse, comme le montre la figure 17, dans laquelle les mutations liées à AID sont notées en bleu et les mutations liées au vieillissement sont notées en rose, permettant de mettre en avant l'impact *a priori* de certains gènes, dont les mutations sont fortement associées au vieillissement et non à AID (Chapuy et al., 2018).

Finalement, bien que certains gènes soient très fortement mutés dans les lymphomes, l'impact d'AID n'est pas à négliger et de plus amples études fonctionnelles sur ces mutations sont nécessaires pour décider du caractère *driver* ou non d'un gène, l'approche à grande échelle médiée par des algorithmes étant possiblement insuffisante, voire inexacte.

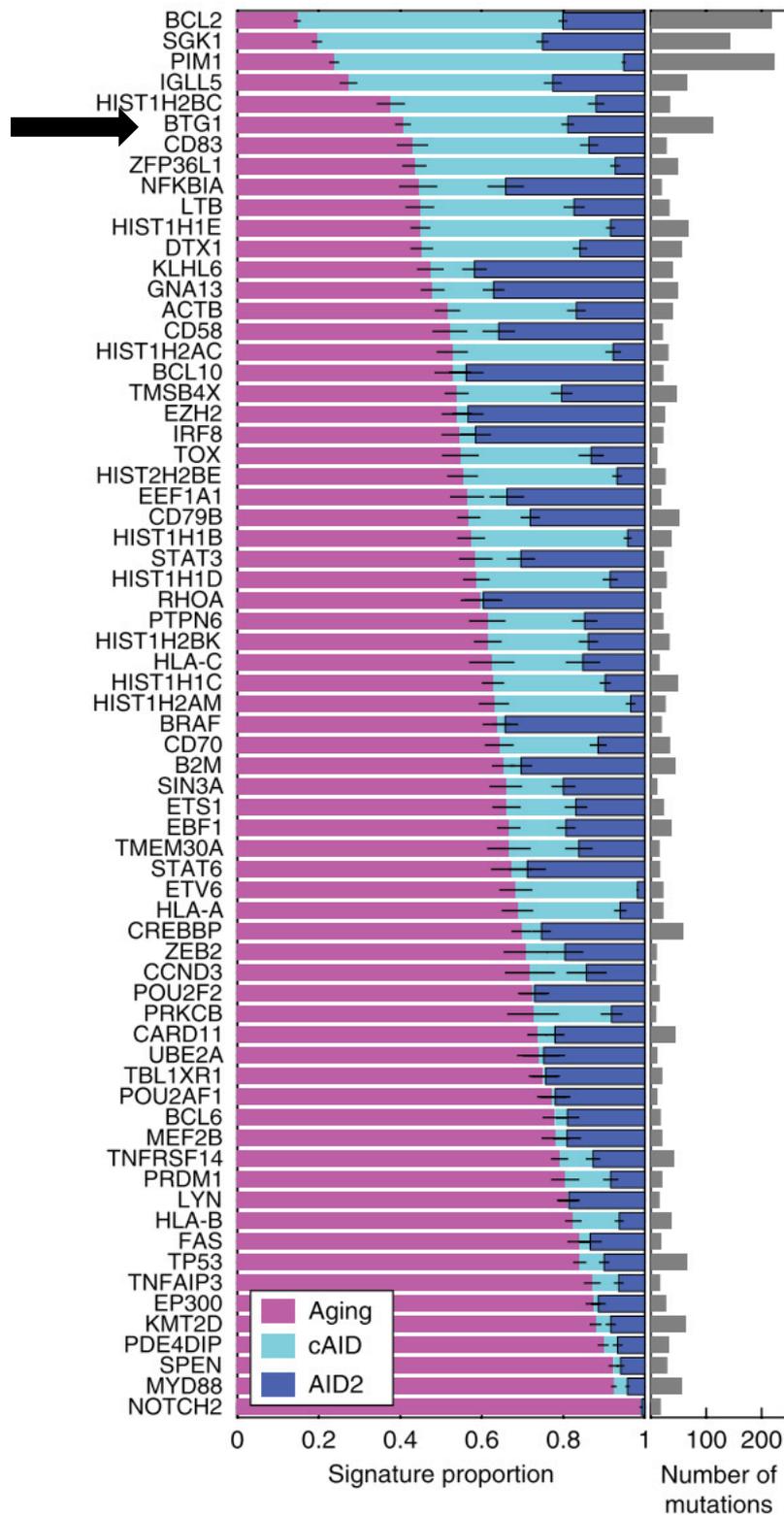


Figure 17 : Représentation de la part de mutations liées à AID en bleu et liées au vieillissement en rose de gènes fréquemment retrouvés mutés dans les DLBCL (Chapuy et al., 2018).

2.3 Validation fonctionnelle des mutations driver de la lymphomagenèse

Bien que certains gènes soient caractérisés comme des *passengers* ou des *drivers* après analyse statistique, l'étude approfondie de leur rôle et de leur impact dans la lymphomagenèse reste indispensable. Récemment, de nombreuses études ont permis de valider l'impact des mutations de certains gènes dans la lymphomagenèse, avec parfois la mise en avant d'un composé thérapeutique, ciblant spécifiquement la ou les voies impactées par ces mutations.

Des gènes tels que *CREBBP* (CREB binding protein) ou *EP300*, deux acétyltransférases majeures nécessaires à la régulation transcriptionnelle, présentent un important taux de mutations ou délétions dans les hémopathies malignes, avec une fréquence de 41% dans le lymphome folliculaire et 39% dans le DLBCL pour *CREBBP* (Pasqualucci et al., 2011). Il est intéressant de noter que ces mutations apparaissent souvent sur un seul allèle pour de nombreux gènes tels que *KMT2D* (Zhang et al., 2015) ou *CREBBP* (Zhang et al., 2017), et que ces mutations, bien qu'inactivatrices, suffisent à fortement moduler l'activité de la protéine. La plupart des mutations se situent au niveau du domaine histone acetyltransferase (HAT) de *CREBBP*, réduisant considérablement son activité acétyl transférase sur des protéines telles que BCL6 et p53 (Pasqualucci et al., 2011). L'acétylation de p53 médiée par CREBBP est indispensable à son activité transcriptionnelle. Cette réduction de l'activité de p53 est renforcée par l'inhibition de l'acétylation cette fois de BCL6, ce qui entraîne une activation constitutive de sa fonction oncogénique (Pasqualucci et al., 2011), permettant aux cellules malignes de conserver des propriétés propres aux cellules du centre

germinatif, et conduisant à une protection contre l'apoptose entraînée par des dommages à l'ADN et un maintien de la prolifération.

De la même façon, il est intéressant de décrire le cas du gène *TBL1XR1* dans le lymphome. Des études de grandes cohortes classent le gène *TBL1XR1* comme un gène suppresseur de tumeur, retrouvé muté dans des DLBCL de type ABC, ou de sous-type MCD / C5, et associé à un pronostic défavorable (Chapuy et al., 2018; Reddy et al., 2017; Schmitz et al., 2018). Les études sur ce gène montrent des taux de mutation supérieurs à 35% dans ces sous-types de lymphomes les plus agressifs. TBLR1 (codée par *TBL1XR1*) est un des composants et co-activateurs du complexe SMRT/NCOR1, impliqué dans la répression de la transcription. Il a récemment été démontré que dans le lymphome B, les mutations de *TBL1XR1* bloquent la prolifération des cellules B du centre germinatif et permettent la formation de cellules pré B mémoires, qui ne pourront à terme pas se différencier en plasmocytes, et qui ré-entreront dans de nouveaux centres germinatifs, conduisant à la formation de lymphomes avec des atteintes extra-ganglionnaires (Venturutti et al., 2020). Cependant, ces analyses ne corrèlent que rarement le niveau d'expression du gène à celui de sa protéine. Une cohorte de 208 patients atteints de DLBCL, traités par R-CHOP, a montré qu'une forte expression protéique en immunohistochimie de TBLR1 dans les DLBCL ABC (souvent mutés pour *TBL1XR1*) au niveau nucléaire est corrélée à une réduction de la survie sans progression et de la survie globale, et pouvait donc avoir une valeur pronostic (Ednersson et al., 2020).

Des études fonctionnelles, aussi bien transcriptomiques que protéomiques, apparaissent nécessaires pour confirmer l'impact mutationnel prédit par les études à haut débit sur la lymphomagenèse. Parmi les gènes mutés

de manière récurrente dans les lymphomes, dont la contribution à la lymphomagenèse B est indéterminée, figure *BTG1*, qui fait l'objet de ce travail.

Points clés :

*Initialement classés uniquement sur des critères morphologiques, les lymphomes B diffus à grandes cellules sont actuellement décrits à l'aide d'une classification moléculaire basée sur des récurrences d'altération génétiques somatiques. Les mutations de *BTG1* sont associées aux lymphomes de type MCD/C5, caractérisés par de fréquentes localisations extra-ganglionnaires, et un pronostic défavorable. À cet égard, nous présentons les mécanismes de migrations cellulaires pouvant potentiellement expliquer cette localisation extra-ganglionnaire, la migration des lymphocytes étant essentiellement amiboïde.*

B/ Famille des gènes *BTG*

BTG1 est un gène découvert par sérendipité lors de l'étude d'une hémopathie maligne (Rimokh et al., 1991; Rouault et al., 1992). Il a par la suite été décrit comme gène suppresseur de tumeur dans une autre hémopathie qu'est la leucémie aiguë lymphoblastique pré-B (Waanders et al., 2012). Finalement, et assez récemment, il est décrit comme étant très fréquemment muté dans certains sous-types de lymphomes caractérisés par un pronostic plutôt défavorable et associé à une dissémination extra-ganglionnaire (Chapuy et al., 2016).

Certains auteurs considèrent cependant que *BTG1* est un gène *passenger* de la lymphomagenèse, car ses mutations portent la signature d'AID (Chapuy et al., 2018). Néanmoins, la majorité des mutations de *BTG1* sont retrouvées dans la phase de lecture ouverte du gène, ce qui nous laisse penser que ces mutations sont spécifiquement sélectionnées dans la mise en place d'un processus tumoral. D'autre part, *BTG1* est fréquemment muté dans certains sous-types de cancers particulièrement agressifs et associés à des atteintes extra-ganglionnaires ; l'apparition de mutations à la rechute de la maladie après traitement ont également été relevées. Ces observations semblent nous indiquer que les mutations de *BTG1* sont un élément important dans la tumorigenèse, et particulièrement dans la lymphomagenèse B.

Au cours du chapitre suivant, nous allons décrire de façon non exhaustive les fonctions principales de *BTG1*, et nous mettrons en perspective son impact dans les cancers.

1 - *BTG1*, découverte et fonctions

1.1 *BTG1*, le prototype d'une famille de gènes antiprolifératifs

BTG1 (B-cell Translocation Gene 1) est un gène découvert en 1991, lors de l'étude moléculaire d'une translocation t(8 ; 12) apparue lors de la phase de transformation d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC) (Rimokh et al., 1991). Il fut alors montré que l'expression de *BTG1* était ubiquitaire et qu'il était très fortement conservé tout au long de l'évolution chez de nombreuses espèces testées (poulet, lapin, chien, souris, humain...) (Rimokh et al., 1991; Rouault et al., 1992). *BTG1* est situé sur le chromosome 12, est composé de 2 exons et un intron, et code une protéine de 171 acides aminés d'un poids moléculaire de 19kDa. Dans un premier temps, *BTG1* a été décrit comme un gène réduisant la prolifération cellulaire lorsqu'il est surexprimé dans des cellules NIH3T3 et dont l'expression est maximale en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Rouault et al., 1992).

Un gène homologue de *BTG1*, *BTG2* (également appelé *PC3* chez la souris ou *TIS21*) a été découvert simultanément. Il est exprimé transitoirement dans les cellules 3T3 après traitement au tétradecanoyl phorbol acetate (TPA) (Fletcher et al., 1991) et a été montré comme étant une cible de p53 (Rouault et al., 1996). Quelques années plus tard, *TOB1* (Transducer Of ERBB2) fut découvert pour la capacité de sa protéine à réduire la prolifération de cellules NIH3T3 et à fixer ERBB2 (Matsuda et al., 1996). Les derniers gènes de la famille BTG/Tob, que sont *BTG3* (également nommé *ANA*) (Guéhenneux et al., 1997; Yoshida et al., 1998), *BTG4* (ou *PC3B*) (Buanne et al., 2000) et *TOB2* (Ikematsu et al., 1999) furent découverts par la suite, en se basant sur les homologies de séquence et sur

leur propriété antiproliférative induisant un arrêt de la progression du cycle cellulaire en phase G1/S lors d'une surexpression, et ce dans de nombreux types cellulaires.

1.2 Structure des gènes de la famille BTG

La famille de gènes *BTG* se distingue par la forte homologie de séquence de ses membres, principalement dans la région N-Terminale, entre les acides aminés 4 et 119. Cette région, nommée domaine BTG, comprend deux domaines d'homologie encore plus conservés, qui sont appelés la boîte A et la boîte B (Guéhenneux et al., 1997). *BTG1* et *BTG2* sont les seuls membres de la famille à comprendre un troisième domaine très conservé qu'est la boîte C, directement positionnée en 3' de la boîte B. *TOB1* et *TOB2*, quant à eux, disposent de deux domaines exclusifs PAM2, situés dans la région C-terminale de la protéine (Figure 18A) (Guéhenneux et al., 1997; Winkler, 2010). Plusieurs études ont par la suite permis de montrer que le domaine BTG était fortement impliqué dans des interactions protéines-protéines à travers la boîte B et la boîte C, notamment avec des régulateurs post-transcriptionnels. On retrouve également deux motifs peptidiques LxxLL situés dans le domaine BTG, connus pour faciliter les interactions protéines-protéines notamment avec des récepteurs nucléaires (Heery et al., 1997; Prévôt et al., 2001; Yang et al., 2008).

Les protéines *TOB1* et *TOB2*, qui disposent d'une partie C-terminale plus longue que les 4 autres membres de la famille, comportent deux régions PAM2 (PABP-interacting motif 2) qui permettent l'interaction avec la cytoplasmic poly-A binding protein 1 (PABPC1) (Ezzeddine et al., 2007). La détermination de la structure cristalline des protéines *BTG2* et *TOB1* a permis de caractériser le site

d'interaction avec la protéine CNOT7 (hCaf1) et de mettre en avant la forte conservation de la structure du domaine BTG (Horiuchi et al., 2009; Yang et al., 2008). BTG2 et TOB1 sont donc formées de 5 hélices alpha contenant les deux motifs LxxLL, ainsi que de 4 feuillets bêta retrouvés exclusivement dans les boîtes A, B et C (Figure 18B). Il a par ailleurs été montré, grâce aux données de cristallographie, que les résidus formant les boîtes A et B sont tous retrouvés au niveau des régions en contact avec la surface de la protéine CNOT7 lorsque les deux protéines interagissent, ce qui laisse penser que des mutations ou des modifications de conformation de ces régions très conservées pourraient avoir un fort impact sur l'interaction avec CNOT7, et ainsi moduler l'activité du complexe majeur de déadénylation CCR4-NOT (Horiuchi et al., 2009).

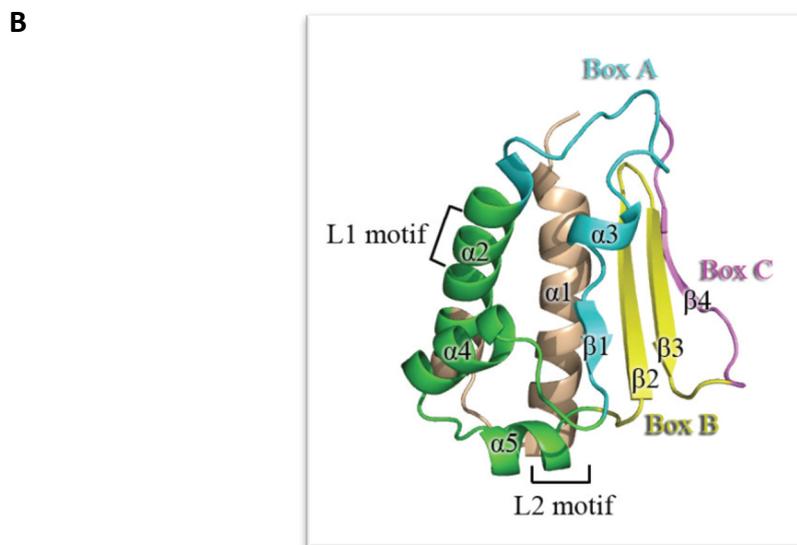
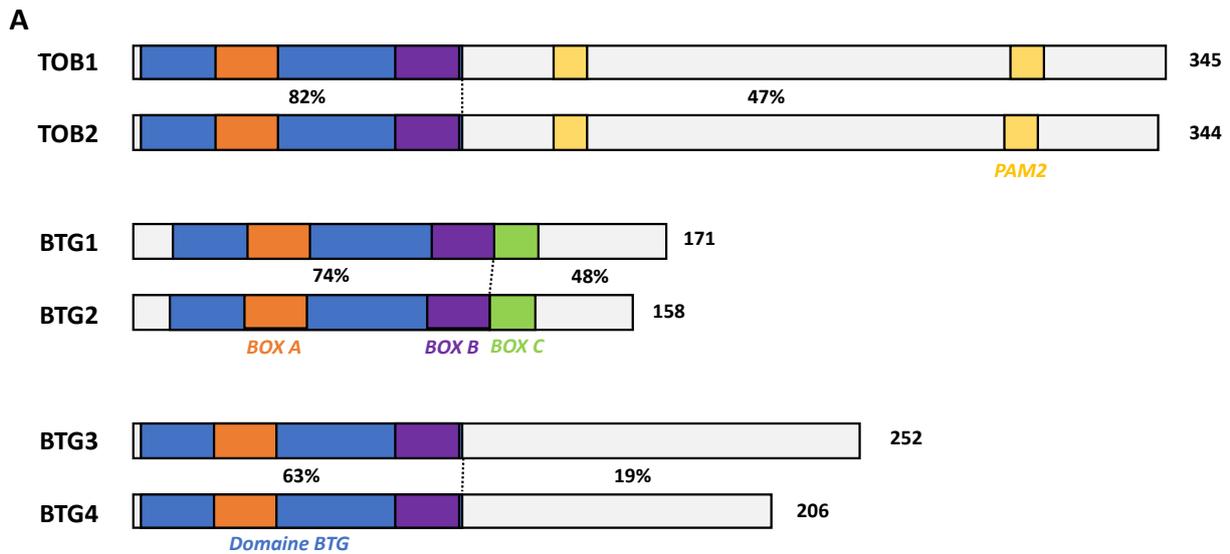


Figure 18 : (A) principaux domaines d'interaction des 6 protéines de la famille BTG/TOB. Le domaine BTG en bleu, également appelé domaine APRO (Anti PROlifératif), contient les deux domaines de très forte homologie, les boîtes A et boîtes B, elles-mêmes directement suivies par la boîte C, uniquement pour BTG1 et BTG2 (BTG1 exon 1 = 1-49, exon 2 = 50 – 171). Ces domaines d'homologies favorisent les interactions avec de nombreux partenaires protéiques, interactions renforcées par la présence de deux motifs LxxLL présents dans le domaine BTG. Les domaines PAM2 sont également présentés en jaune sur les protéines TOB1 et TOB2, permettant les interactions avec PABPC1. Adapté de (Amine et al., 2021; Guéhenneux et al., 1997; Winkler, 2010). (B) Structure cristalline de la protéine BTG2, avec représentation des hélices alpha composant la majorité du domaine BTG et contenant les motifs LxxLL, et représentation des feuillets beta, composant principalement les boîtes A, B et C (Yang et al., 2008).

1.3 Fonctions principales de BTG1

Dans un souci de clarté, nous allons ici nous intéresser aux fonctions les plus documentées de BTG1. *BTG1* reste un gène dont les fonctions sont encore peu connues. Cependant, il semble maintenant clair qu'il joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire, la modulation de la méthylation des arginines à travers l'interaction avec PRMT1 et qu'il impacte également la dégradation des messagers en interagissant avec la protéine CAF1 (Figure 19). Pour aller plus loin dans la compréhension exhaustive de ses fonctions, il est possible de se référer aux revues suivantes (Matsuda et al., 2001; Mauxion et al., 2009; Winkler, 2010; Yuniati et al., 2019).



- Résistance aux glucocorticoïdes
- Différenciation érythroïde
- Dégradation des ARNm
- Maintien en quiescence des cellules T

Figure 19 : Principales fonctions de la protéine *BTG1* et conséquences de ses interactions avec ses partenaires protéiques.

1.3.1 Régulation de la méthylation des arginines

Après leur découverte, il a été montré que BTG1 et BTG2 agissaient en partie à travers des interactions protéines-protéines, et que l'une de ces

interactions liait BTG1 et BTG2 à l'arginine méthyl transférase PRMT1 (Lin et al., 1996). Ces protéines arginine méthyl transférases sont exprimées dans tous les tissus des mammifères, et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la transcription des ARN messagers, la réparation de l'ADN, ou la modulation des voies de signalisation (Bedford & Clarke, 2009; Bedford & Richard, 2005) (Figure 20). Par exemple, les protéines liant l'ARN (RNA binding proteins ou RBPs) sont indispensables à la conformation, à la stabilisation et à la localisation des ARN et des ARN messagers ; ces RBPs sont souvent riches en domaines RGG (Glycine Arginine Rich) et sont les cibles de méthylation des arginines, modulant ainsi leur activité (Blackwell & Ceman, 2012). Plusieurs types de méthylations sont possibles et dépendent de différentes méthyl transférases. Cependant, il est admis que PRMT1 est l'enzyme majeure, et qu'elle réalise plus de 90% de la méthylation dite asymétrique des arginines (aDMA). Nous pourrions citer l'exemple de l'hélicase A, qui est nécessaire à l'épissage des ARN et qui est une cible connue de PRMT1 au niveau de ses motifs RGG, dont la translocation nucléaire requiert la méthylation de ses arginines (Smith et al., 2004). Il a également été montré que PRMT1 contribue au remodelage de la chromatine à travers la méthylation de l'arginine 3 de l'histone H4, modulant fortement l'accès à l'ADN et de ce fait la transcription d'un grand nombre de gènes (Bedford & Clarke, 2009).

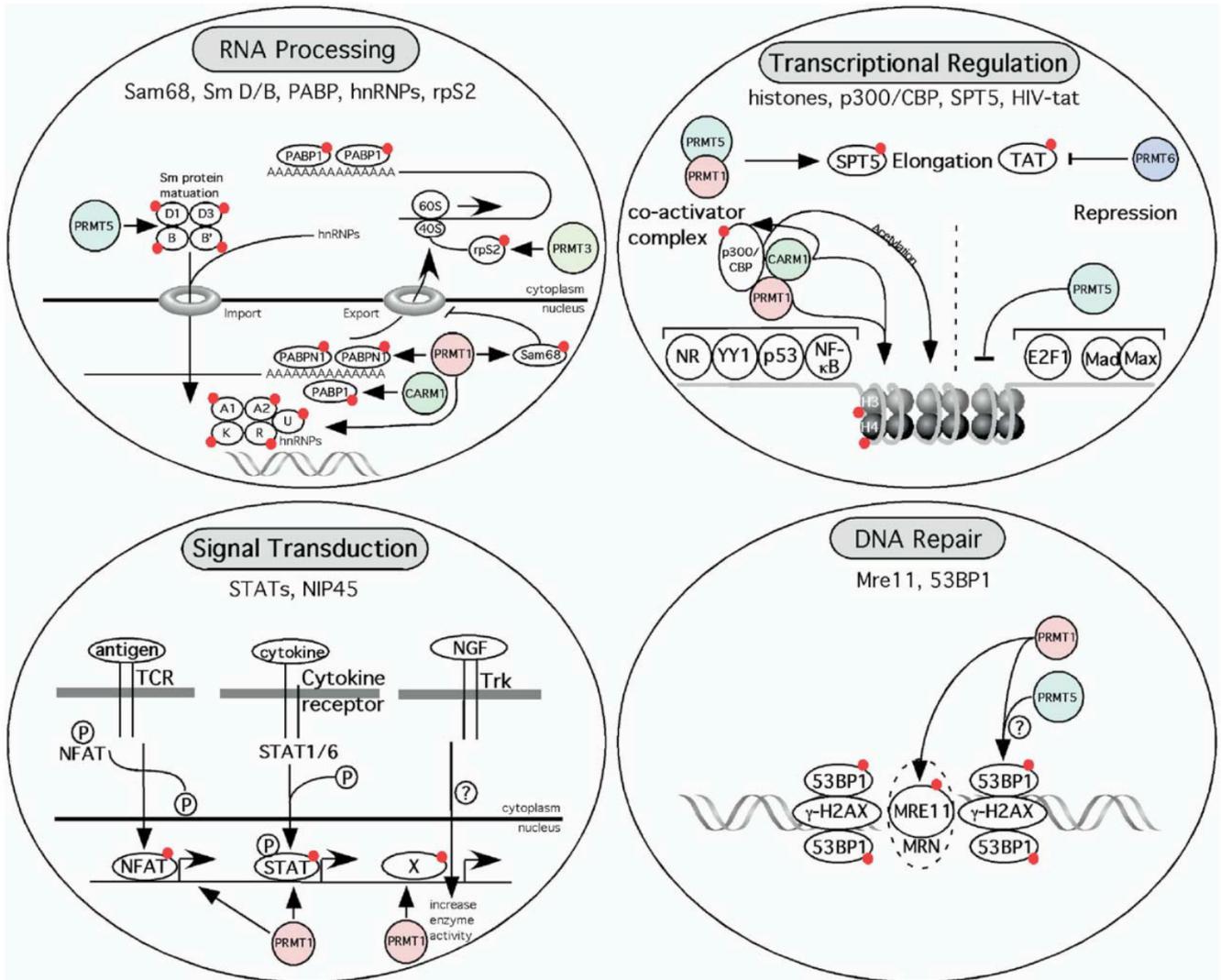


Figure 20 : Représentation des processus régulés par la méthylation des arginines, représentée par des points rouges, fortement médiée par PRMT1. Pour revue exhaustive, voir : (Bedford & Richard, 2005).

Il a également été montré que la boîte C de BTG1 et BTG2 était nécessaire à l'interaction avec PRMT1, et que la surexpression du peptide boîte C inhibe l'effet de BTG1 et BTG2 sur PRMT1 en réduisant la méthylation de l'histone H2A, ce qui indique un rôle de co-activateur majeur de ces deux protéines sur PRMT1 (Berthet et al., 2002; Lin et al., 1996).

BTG1 a également été décrit comme étant une cible de FOXO3a. Dans un modèle de différenciation érythroïde, l'expression de FOXO3a entraîne un arrêt du cycle cellulaire associé à une surexpression de *BTG1*. La surexpression de *BTG1* sauvage inhibe la prolifération des progéniteurs érythroïdes, alors que l'expression d'une forme tronquée de *BTG1*, sans boîte C, ne réduit pas la prolifération de progéniteurs érythroïdes, suggérant un effet de cette boîte C, qui pourrait passer par son interaction avec PRMT1. Il semble donc que l'activité méthyltransférase empêche la différenciation et la prolifération des progéniteurs érythroïdes, faisant de *BTG1* un possible régulateur d'une partie de cette différenciation (Bakker et al., 2004).

1.3.2 La dégradation des messagers par BTG1

La dégradation des ARN messagers (ARNm) est une étape importante dans la régulation de l'expression génique. Succinctement, les ARN messagers sont des structures protégées en 5' par une coiffe 7-méthylguanosine (Cowling, 2010) et en 3' par une queue poly-A auxquelles se fixent des protéines. Ces ARNm peuvent être dégradés dans le sens 5' -> 3' par l'enzyme XRN1, dans le sens 3' -> 5' par un complexe d'exonucléases appelé exosome ou par des endonucléases (Garneau et al., 2007). La plupart des ARNm sont dégradés par la voie dépendante de la déadénylation de la queue poly-A en 3' de l'ARNm. Cette déadénylation est médiée par deux complexes majeurs que sont le complexe CCR4-NOT, le complexe PAN (PAN2-PAN3) et une enzyme PARN qui favorise la dégradation de la queue poly-A des ARN messagers capés en 5'. PAN2 et PAN3 sont mis en place lors de la première étape de déadénylation sur les premiers nucléotides en s'associant à PABPC1 (Yamashita et al., 2005), tandis que le

complexe CCR4-NOT permettra la dégradation des nucléotides suivants (Figure 21).

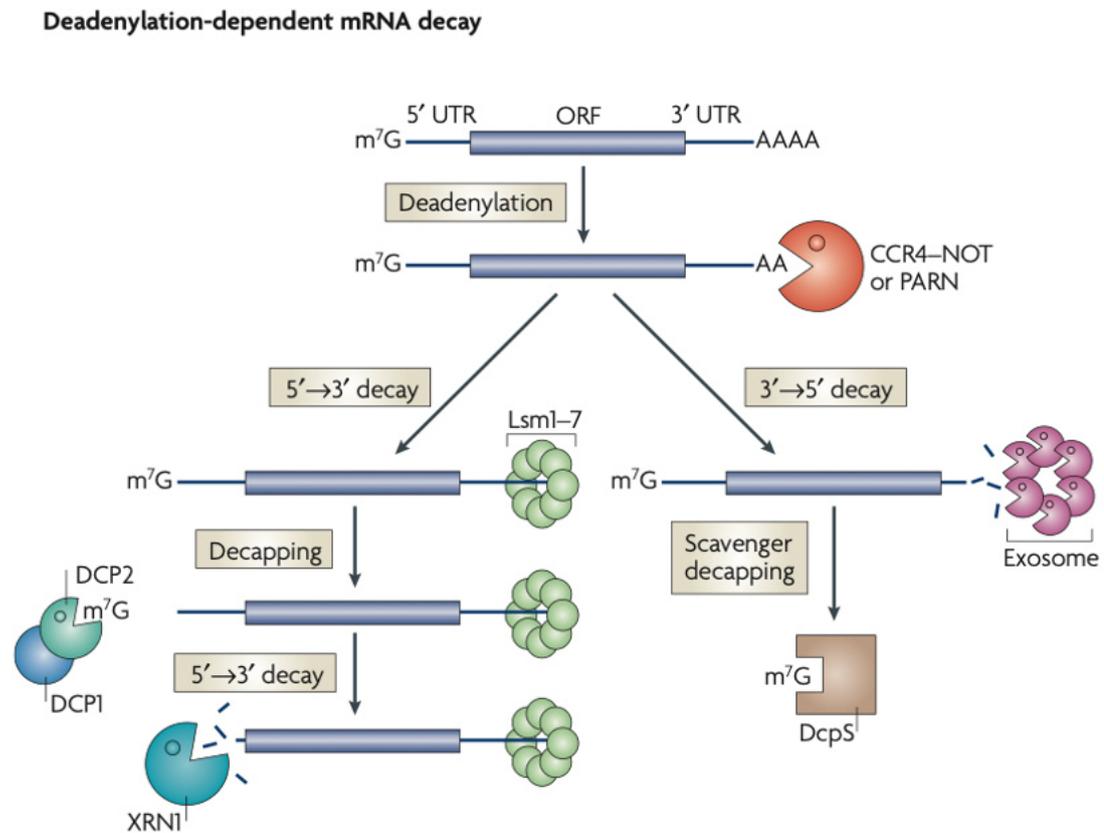


Figure 21 : Représentation de la dégradation des ARNm dépendant de la déadénylation (Garneau et al., 2007).

Un des rôles les mieux caractérisés de *BTG1* est son implication dans la régulation post-transcriptionnelle de ces ARNm. En effet, il a été montré que *BTG1* interagit à travers sa boîte B avec la sous unité mCaf1 (mouse CCR4-associated factor 1) du complexe de déadénylation de la queue poly-A des ARN messagers CCR4-NOT (Rouault et al., 1998). Cette interaction, qui est également possible avec la protéine hCAF1 (également appelée CNOT7 et que nous appellerons CAF1 par la suite), est aussi décrite pour la protéine *BTG2* (Prévôt et

al., 2001). *In vitro*, l'interaction entre BTG1 et CAF1 serait dépendante de la phosphorylation de la sérine 159 de BTG1 (Bogdan et al., 1998). Il a également été montré qu'une surexpression de BTG2, à travers son interaction avec CAF1, augmente la vitesse de dégradation des ARNm *in vitro*. Cette dégradation est médiée par l'augmentation de la vitesse de déadénylation des queues poly-A, et est rendue possible grâce à l'activité catalytique de CAF1 au sein du complexe CCR4-NOT (Mauxion et al., 2008, 2009; Stupfler et al., 2016).

Le complexe CCR4-NOT, bien qu'initialement découvert chez la levure, est présent chez tous les eucaryotes, et contribue très largement à tous les niveaux de régulation de l'expression génique, de la production des ARN messagers dans le noyau, jusqu'à leur dégradation dans le cytoplasme, ce qui renforce l'intérêt de l'étude de l'interaction BTG1-CAF1. Cette interaction a d'ailleurs récemment fait l'objet d'une étude sur l'impact des mutations de *BTG1* dans la lymphomagenèse et a montré qu'un certain nombre de variants réduisaient fortement l'interaction BTG1-CAF1 et modulaient la dégradation des ARNm (Almasmoum et al., 2020). De récentes études montrent que BTG1 et BTG2 peuvent directement interagir avec PABPC1, bien qu'ils ne disposent pas de motif PAM2, à l'inverse des protéines TOB (Ezzeddine et al., 2007), et ainsi moduler la déadénylation des ARN messagers par cette voie. Les queues poly-A sont nécessaires à la protection des molécules d'ARNm, et sont-elles mêmes complexées avec la protéine PABPC1 qui empêche la dégradation des ARNm par des ribonucléases. Bien qu'il ait été décrit que BTG1 et BTG2 pouvaient avoir une activité de régulation post traductionnelle à travers leur interaction avec PRMT1 par la boîte C, il semble que cette boîte C interagit également directement avec PABPC1 et module ainsi la déadénylation des ARNm (Amine et al., 2021; Stupfler et al., 2016).

Bien que l'action de *BTG1* au niveau de la régulation de la dégradation des ARNm soit bien décrite, il est intéressant de noter que *BTG1* ne semble pas avoir d'impact sur une population spécifique d'ARN messagers. En effet, il aurait été possible que *BTG1* agisse comme une RBP, en adressant le complexe de déadénylation à un set spécifique d'ARN messagers. Cependant, une étude récente décrit qu'une inactivation de *BTG1* (et de *BTG2*) dans des lymphocytes T naïfs peut entraîner une augmentation globale de l'abondance en ARN messagers, conduisant à une sortie de quiescence de ces lymphocytes. Cette étude a d'ailleurs montré que les queues poly-A des ARN messagers des cellules T inactivées pour *BTG1* et pour *BTG2* étaient plus longues que celles des cellules T sauvages, alors que la queue poly-A des ARN mitochondriaux n'était pas impactée (Hwang et al., 2020). L'hypothèse avancée est que la réduction globale d'ARNm permet le maintien en quiescence des cellules T naïves. L'activation de ces cellules entraîne par ailleurs une réduction de l'expression de *BTG1* et *BTG2*, ce qui permet une accumulation d'ARNm et qui conduit à une sortie de l'état de quiescence.

2 - Impact de l'expression de *BTG1* dans les cancers

Nous allons maintenant décrire le statut de *BTG1*, de ses délétions ou de ses mutations, dans plusieurs types de cancers et nous nous intéresserons particulièrement à son statut dans les lymphomes B, ainsi que le potentiel impact pronostic qu'il peut y avoir.

Historiquement, *BTG1* a été défini comme un gène dont la surexpression réduit la prolifération cellulaire. Or, en cancérologie, un gène antiprolifératif conduit, en théorie, à la réduction de la croissance tumorale. Comme évoqué précédemment, ces gènes sont fréquemment mutés ou délétés pour permettre à la cellule d'outrepasser leurs effets antiprolifératifs.

En 2014, il a été montré une inhibition transcriptionnelle de l'expression de *BTG1* par l'oncogène c-Myc (Li et al., 2014b). C-Myc est un oncogène régulant l'expression d'un très grand nombre de gènes, permettant, entre autres, l'expression du cluster de micro-ARN *miR-17-92*, expression qui régule négativement celle de *BTG1*. En effet, il a été montré que l'inactivation de c-Myc réduit l'expression de *miR-17-92*, ce qui entraîne une levée de l'inhibition des gènes cibles de ces miRNA et une réduction de la prolifération cellulaire ainsi qu'une augmentation de la sénescence. L'expression de c-Myc entraîne une réduction de l'expression globale de *BTG1*, permettant ainsi leur survie et leur prolifération. Il est également observé qu'une inactivation de c-Myc entraîne une augmentation de la di-méthylation de l'histone H4 sur l'arginine R3, et que cette méthylation est médiée par l'expression de *BTG1* et son interaction avec PRMT1. Or, une augmentation de la méthylation de cette histone entraîne une condensation de la chromatine, conduisant à un ralentissement de la prolifération (Li et al., 2014b).

BTG1 a été décrit en 2012 comme un gène suppresseur de tumeur dans les leucémies lymphoblastiques aiguës pré-B de l'enfant (BCP-ALL), dans lesquelles il est délété dans près de 10% des cas. Ces derniers cas sont associés à un mauvais pronostic et à un taux de rémission complète plus faible (Waanders et al., 2012). Les délétions de *BTG1* étaient localisées au niveau de son second exon (entre les acides aminés 93 et 106, correspondant à la boîte B) entraînant

l'expression d'une protéine tronquée. Il est d'ailleurs intéressant de noter que ces délétions sont très probablement médiées par les protéines RAG1 et RAG2, impliquées dans la recombinaison V(D)J qui se déroule pendant les premières étapes de la lymphopoïèse B. En effet, on retrouve, de part et d'autres des sites de délétions, des séquences proches des séquences consensus RSS, qui sont des cibles de ces protéines RAG, plusieurs fois décrites comme entraînant des délétions ou des translocations dans des leucémies (Marculescu et al., 2002; Mullighan et al., 2008). Il a également été relevé que ces délétions de *BTG1* apparaissent de façon prédominante dans deux sous-types de BCP-ALL, caractérisés par des translocations permettant les évènements de fusion ETV6-RUNX1 (19%) et BCR-ABL1 (31,2%) (Tijchon et al., 2018; Tsuzuki et al., 2007; Xie et al., 2014). Par ailleurs, les sous-clones qui sont porteurs des délétions de *BTG1* au diagnostic, semblent être les clones majoritairement retrouvés à la rechute de la maladie, laissant ainsi penser que *BTG1* est un élément *driver* de la leucémogénèse et qu'il est impliqué dans la sélection clonale de la maladie (Waanders et al., 2012).

Plus récemment, une étude sur une importante cohorte de 533 patients atteints de BCP-ALL a montré que 16% des patients atteints de mutations ou de délétion du gène *IKZF1* comportaient également des délétions mono-alléliques de *BTG1*. Les délétions de *BTG1* seules n'entraînent pas de pronostic particulièrement défavorable, cependant la cooccurrence des délétions d'*IKZF1* et de *BTG1* aggrave le pronostic et réduit fortement le temps de survie sans événement de ces patients (Scheijen et al., 2017). L'impact néfaste des délétions de *BTG1* semble donc être exacerbé ou révélé par la présence d'un ou plusieurs événements génétiques aggravant, suggérant une coopération oncogénique entre *BTG1* et certains partenaires.

Il semble donc que l'expression de *BTG1* soit fortement impliquée dans la tumorigenèse, où un faible taux de *BTG1* est associé à une maladie plus agressive et plus encline à rechuter, confirmant le caractère *driver* de l'inactivation de *BTG1* dans certains cancers.

3 - Implications fonctionnelles de BTG1 dans la tumorigenèse

Du fait de ses interactions protéiques et leurs fonctions précédemment évoquées, *BTG1* peut avoir un impact non négligeable sur la progression tumorale en général, en faisant ainsi un potentiel marqueur de mauvais pronostic lorsqu'il est muté et / ou délété.

3.1 Régulation du cycle cellulaire

BTG1 a été décrit comme un gène ayant un effet antiprolifératif (Rouault et al., 1992). Néanmoins, il a fallu attendre d'autres études pour comprendre de façon claire son rôle dans la cancérogenèse. Au niveau tumoral, l'impact de cette régulation du cycle cellulaire modulée par *BTG1* a été décrit en 2013 dans les cancers du sein, où il a été mis en évidence, d'une part, que l'expression de *BTG1* était réduite dans les prélèvements tumoraux par rapports à des prélèvements effectués sur des tissus sains, et d'autre part, que la surexpression *in vitro* de *BTG1* dans des lignées de cancer du sein entraîne un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1, réduisant ainsi la prolifération cellulaire (Zhu et al., 2013).

Il a été décrit en 2015 dans les carcinomes rénaux une importante réduction de l'expression protéique et transcriptionnelle de *BTG1* par rapport

aux tissus contrôles rénaux non tumoraux. Dans le modèle cellulaire 786-RCC (renal cell carcinoma), la surexpression de BTG1 entraîne un arrêt des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, une augmentation de l'apoptose, ainsi qu'une inhibition de la prolifération cellulaire. Des expériences de co-immunoprécipitation ont également montré que BTG1 interagit directement avec PRMT1 dans ce modèle cellulaire de carcinome rénal et que ses fonctions antiproliférative et pro-apoptotique sont probablement liées à cette interaction. En effet, l'inhibition chimique de PRMT1, dans les lignées surexprimant BTG1, entraîne une réversion de l'action de BTG1 et conduit à la prolifération et à l'inhibition de l'apoptose, suggérant la modulation de l'activité de PRMT1 par BTG1 dans les carcinomes rénaux (Liu et al., 2015).

3.2 L'expression protéique de BTG1 comme biomarqueur

L'expression protéique de BTG1 est explorée dans de nombreux types de cancers et est rapportée comme étant fréquemment plus faible dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains. Sa surexpression est associée à une réduction globale de la prolifération et une augmentation de l'apoptose dans les cancers du sein (Li et al., 2014a; Zhu et al., 2013, 2015) ou les cancers du poumon (Sheng et al., 2014), dans lesquels une faible expression de BTG1 est associée à une invasion tumorale exacerbée. De la même façon, l'expression de BTG1 a été appréciée dans une cohorte de 151 prélèvements de patients atteints de carcinomes hépatiques. L'étude a révélé une forte diminution (dans 85% des cas) de l'expression protéique et de l'ARNm de BTG1 par rapport à des prélèvements effectués sur des tissus hépatiques sains. Il a par ailleurs été mis en relation une forte baisse d'ARNm avec une faible expression protéique. L'étude de cette

cohorte de patients a permis de montrer qu'une faible expression de BTG1 était associée, pour cette pathologie, à des taux de survie plus faible (Kanda et al., 2015).

Une méta-analyse effectuée sur 15 études, regroupant au total 1992 patients atteints de tumeurs solides variées (sein, foie, pancréas, œsophage...), a permis de mettre en avant le caractère pronostic du niveau d'expression de la protéine BTG1 dans les tumeurs solides. Cette étude montre l'association entre une faible expression de BTG1 et un faible de taux de survie chez les patients, ainsi qu'un état de progression tumorale avancée ou encore une invasion métastatique dans les ganglions lymphatiques (Chen et al., 2020).

3.3 Effets de PRMT1 en cancérogenèse

Dans de nombreux cancers, l'expression de PRMT1 (et de PRMT6, qui régulent tous deux la di-méthylation asymétrique sur les arginines) est dérégulée dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains. Son expression est augmentée dans les cancers de la vessie, les cancers du sein, les lymphomes, les cancers gastriques ou encore les cancers des testicules (Yang & Bedford, 2013; Yoshimatsu et al., 2011). Cependant, l'expression d'autres arginines méthyl transférases de type I (PRMT4 et 6) est réduite dans les mélanomes, suggérant que la régulation des méthylations est un phénomène complexe et probablement dépendant du type de cancer étudié.

L'interaction de BTG1 avec PRMT1 a été décrite comme un régulateur positif des récepteurs aux glucocorticoïdes (GC) dans des cellules de leucémies (Van Galen et al., 2010), les glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone ou la

prednisone étant utilisés pour traiter les ALL en première intention. Il a été montré que l'inactivation *in vitro* de *BTG1* dans des lignées de cellules dérivées d'ALL entraîne une forte résistance au traitement à la prednisone et à la dexaméthasone. Les récepteurs aux glucocorticoïdes sont en effet régulés par un phénomène d'auto-induction, médié entre autres par le complexe BTG1 - PRMT1 qui joue ici un rôle de co-activateur transcriptionnel ; la réexpression de *BTG1* dans ces lignées restaure la sensibilité aux glucocorticoïdes (Van Galen et al., 2010). Dans ce cas, il semble qu'une inactivation de *BTG1* soit liée à une résistance aux glucocorticoïdes et donc à une maladie plus agressive.

Enfin, il semblerait que les arginines méthyl transférases de type 1 et 2 soient impliquées dans la progression des DLBCL. Effectivement, l'inhibition des méthylations de PRMT1, induites par des composés pharmaceutiques (GSK3368715), semble montrer un effet anti-tumoral sur des souris, effet renforcé par l'inhibition combinée de PRMT1 et PRMT5 (Fedoriw et al., 2019).

Dans les leucémies, une forte expression de BTG1 serait donc associée à une meilleure prise en charge des leucémies à travers son interaction avec PRMT1, permettant de cibler les tumeurs avec des glucocorticoïdes. Mais il semble que dans d'autres types de cancer, l'inhibition de PRMT1 soit plutôt bénéfique au patient et permettrait de réduire le développement tumoral, faisant de la régulation de la méthylation des arginines une cible d'intérêt, mais dépendante du type de tumeur.

3.4 Impact de BTG1 sur la différenciation cellulaire

Assez récemment, il a été montré que BTG1 et BTG2 sont impliquées dans la différenciation des progéniteurs lymphoïdes B. L'étude de souris inactivées pour *BTG1* et/ou *BTG2* a permis de montrer que l'inactivation de chaque gène réduit significativement la quantité de progéniteurs B dans la moelle osseuse et que l'inactivation conjointe de ces deux gènes renforce le phénotype et aggrave la déplétion en progéniteurs B, à tous les stades de différenciation B (Tijchon et al., 2016). De la même façon, comme nous l'avons présenté plus tôt, BTG1 impacte la différenciation des lymphocytes T en régulant leur état de quiescence par la dégradation des messagers (Hwang et al., 2020).

Actuellement, en clinique, les classifications des lymphomes sont basées sur l'état de différenciation de l'équivalent non tumoral de la cellule, la cellule d'origine. La relation entre la différenciation lymphocytaire B et la lymphomagenèse est donc importante dans la prise en charge des patients, car les mécanismes moléculaires mis en place dans le lymphome dépendent très probablement du stade de différenciation du lymphocyte pré-tumoral qui a subi le premier événement de transformation. Ce qui fait de BTG1 un élément important de la lymphomagenèse B, du fait de son impact sur la régulation de la différenciation cellulaire.

D'autre part, BTG1 est fortement impliquée dans la différenciation musculaire et la neurogenèse. Il a été montré que BTG1 est un co-activateur majeur de la régulation de la différenciation musculaire, et que son activité passe par une interaction directe avec plusieurs facteurs de transcriptions impliqués dans la différenciation des myoblastes (Busson et al., 2005; Rodier et al., 1999). De la même façon, une étude a montré que l'expression de *BTG1* permet de

maintenir la quiescence et le renouvellement des cellules progénitrices et des cellules souches dans le cerveau, en empêchant l'apoptose de ces dernières. En effet, des souris dans lesquelles *BTG1* est inactivé ont été générées pour étudier le potentiel de ce gène à moduler l'apparition de neurones à l'âge adulte et ont permis de montrer qu'à un stade de développement précoce, l'inactivation de *BTG1* augmente fortement la prolifération cellulaire, mais qu'à partir de deux mois, le nombre de neurones et de cellules souches neuronales dans le gyrus dentés des souris *BTG1* inactivé décroît fortement par rapport aux souris sauvages, en réduisant leurs capacités prolifératives et en augmentant le taux d'apoptose de ces cellules. Il apparaît donc que l'expression de *BTG1* est nécessaire au maintien des cellules souches en quiescence, du fait de sa capacité à maintenir les cellules en phase G1 du cycle cellulaire, et que l'inactivation de *BTG1* induit une prolifération cellulaire incontrôlée, conduisant probablement à l'accumulation de mutations et entraînant les cellules à l'apoptose, ou à la transformation tumorale (Farioli-Vecchioli et al., 2012).

L'effet de *BTG1* semble donc être retrouvé au niveau d'une importante diversité de types cellulaires et est toujours décrit comme étant impliqué dans le contrôle de la différenciation et de la régulation du cycle cellulaire, étapes clés de la mise en place tumorale.

4 - Mutations de *BTG1* dans les lymphomes.

BTG1 a été découvert dans un cas de LLC et continue d'être fortement associé aux hémopathies malignes. Son statut mutationnel est de plus en plus mis en avant dans les lymphomes avec l'essor des techniques de séquençages à haut débit.

Une étude récente réalisée sur une cohorte de 1001 cas de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL), intégrant des analyses de profils mutationnels ainsi que les suivis cliniques des patients, montre que 9% de ces patients présentent des mutations de *BTG1*, et que l'expression de ces mutations est associée à un pronostic défavorable lorsqu'elles sont présentes dans des lymphomes de type B Activé (ABC-DLBCL) (Reddy et al., 2017). Un an plus tard, deux études explorant l'aspect de l'hétérogénéité génétique inhérente aux lymphomes B diffus à grandes cellules, avec d'importantes cohortes de patients, proposent d'affiner la classification existante en se basant sur la cooccurrence d'événements génétiques. En effet, comme développé précédemment, la classification communément admise des DLBCL repose sur la provenance de la cellule d'origine, qu'elle provienne du centre germinatif (GCB-DLBCL) ou d'un stade de différenciation plus avancé (ABC-DLBCL). Cependant, le sous-groupe MCD/C5 précédemment décrit (mutations de *MYD88* et de *CD79B*), qui regroupe majoritairement des lymphomes de type ABC et qui présente un pronostic particulièrement défavorable, comprend plus de 45% de patients ayant au moins une altération génétique de *BTG1*, suggérant une implication directe de *BTG1* dans le mécanisme tumoral des lymphomes de mauvais pronostic (Chapuy et al., 2018; Schmitz et al., 2018; Wright et al., 2020). Il en est de même pour la présence de forts taux de mutations de *BTG1* dans les lymphomes primaires du système nerveux central (50%) et des lymphomes testiculaires primaires (35%) (Chapuy et al., 2016).

De manière intéressante, plusieurs études sur les maladies de Waldenström montrent une cooccurrence de mutations activatrices du gène *MYD88*, qui est un des gènes les plus fréquemment muté dans ces hémopathies (dans plus de 90% des cas), avec des délétions de *BTG1* à hauteur de 87% (Hunter et al., 2014, 2016), suggérant une possible interaction fonctionnelle ou un

mécanisme de coopération oncogénique entre les mutations de *BTG1* et la surexpression d'une forme mutée activatrice de MYD88.

Bien que parfois considéré comme *passenger* dans la lymphomagenèse B, *BTG1* pourrait être un gène déterminant dans les lymphomes agressifs et potentiellement associé à une augmentation de la dissémination de la maladie du fait de la fréquence de ses mutations dans les lymphomes à atteintes extra-ganglionnaires. Étant donné que le ou les effets des mutations ou délétions de *BTG1* dans le lymphome ne sont pas encore décrits, l'étude fonctionnelle de ce gène dans ce modèle permettrait de mieux appréhender les mécanismes de la lymphomagenèse liés à *BTG1*, conduisant à l'aggravation de la maladie avec des formes réfractaires au traitement ou ayant un fort potentiel de dissémination.

Points clés :

BTG1 est le prototype d'une famille de gènes antiprolifératifs, dont le rôle reste à ce jour éluif, en dehors de fonctions en lien avec le métabolisme des ARN et le contrôle de la méthylation des arginines. Par ailleurs, BTG1 est aussi connu pour être un gène suppresseur de tumeur dans les LAL pré B de l'enfant ; ce travail vise à déterminer son importance fonctionnelle dans la lymphomagenèse B et plus particulièrement dans les lymphomes extra-ganglionnaires.

Objectifs de la thèse

L'objectif de cette thèse est d'apporter des éléments de réponses quant au rôle du gène *BTG1* dans l'homéostasie des lymphocytes B, ainsi que dans ses dérèglements pathologiques, tel le lymphome. En outre, nous allons également essayer de comprendre pourquoi on le retrouve principalement muté dans des lymphomes de mauvais pronostic, mais surtout associé à des formes extra-ganglionnaires de la maladie, comme les lymphomes cérébraux.

Dans un premier temps, nous avons mis en place un modèle murin de lymphoprolifération B pour comprendre le rôle que peut avoir *BTG1* dans la lymphomagenèse B. Des souris surexprimant l'oncogène *BCL2* dans leurs cellules hématopoïétiques sont croisées avec des souris ayant ou non une inactivation de *BTG1*. Les souris ainsi obtenues nous indiqueront, le cas échéant, si la perte de *BTG1* participe à la lymphomagenèse dans ce modèle. En parallèle, et pour comprendre son impact moléculaire sur les lymphocytes B, nous avons inactivé *BTG1* dans un modèle cellulaire de lymphome de type ABC / MCD, représenté par la lignée TMD8. Par la suite, nous avons également ré-exprimé *BTG1* dans ces cellules sous plusieurs formes mutées qui sont fréquemment retrouvées en clinique, pour s'assurer que l'inactivation de *BTG1* entraîne des conséquences identiques à ses mutations.

Ces différents modèles nous ont permis de montrer que *BTG1* est un gène suppresseur de tumeur, et également qu'il joue très probablement un rôle dans la dissémination cellulaire associée aux atteintes extra-ganglionnaires. Grâce à ces découvertes, nous avons mis en évidence un nouveau partenaire protéique

pour BTG1, BCAR1, qui est un acteur majeur de la migration cellulaire à travers la régulation de la polymérisation de la F-actine médiée par RAC1.

La première partie des résultats de ce travail de thèse sera présentée sous forme d'article en phase de soumission. Une seconde partie de ces travaux a aussi permis le dépôt d'un brevet, axé sur la vulnérabilité thérapeutique des cellules *BTG1* KO à un composé pharmaceutique, qui sera proposé en deuxième partie de résultats. Enfin, une partie axée sur des modifications du métabolisme cellulaire médiées par BTG1 au niveau mitochondrial sera abordée en perspectives de cette étude. L'étude d'un cas clinique effectuée en marge de mon sujet de thèse a fait l'objet de la publication d'un article en 2019 et sera présenté en annexe de ce manuscrit.

- *Deuxième partie* -
RÉSULTATS

Première partie de résultats

L'inactivation de *BTG1* est un driver de la lymphomagenèse B et de la dissémination des lymphomes à travers l'activation de la voie BCAR1/RAC1

-

Lorric Delage¹, Mireille Lambert², Émilie Bardel¹, Dimitri Chartoire¹, Lucas Gorka¹, Patrick Auberger³, Arnaud Jacquél³, Carole Soussain⁴, Olivier Destaing⁵, Henri-Jacques Delecluse⁶, Suzanne Delecluse⁶, Alexandra Traverse-Glehen¹, Gilles Salles⁷, Emmanuel Bachy¹, Hervé Ghesquières¹, Laurent Genestier¹, Jean-Pierre Rouault^{1*}, Pierre Sujobert^{1*}.

-

Article en cours de soumission

***BTG1* inactivation is a driver of B cell lymphomagenesis and lymphoma dissemination by BCAR1/RAC1 pathway activation**

Lorric Delage¹, Mireille Lambert², Émilie Bardel¹, Dimitri Chartoire¹, Lucas Gorka¹, Patrick Auberger³, Arnaud Jacquél³, Carole Soussain⁴, Olivier Destaing⁵, Henri-Jacques Delecluse⁶, Suzanne Delecluse⁶, Alexandra Traverse-Glehen¹, Gilles Salles⁷, Emmanuel Bachy¹, Hervé Ghesquières¹, Laurent Genestier¹, Jean-Pierre Rouault^{1*}, Pierre Sujobert^{1*}.

1. Université Lyon 1, Faculté de médecine et de maïeutique Lyon Sud Charles Mérieux, Lymphoma Immunobiology Team
2. Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 PARIS, France, Plateforme BioMecan'IC, Biomécanique de la cellule.
3. Université Côte d'Azur, Centre méditerranéen de médecine moléculaire (C3M), Inserm U1065.
4. Institut Curie - Hopital René Huguenin
5. Centre de recherche UGA, INSERM U1209, Institute for Advanced Biosciences.
6. German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg.
7. Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York.

Running title: *BTG1* drives lymphomagenesis and lymphoma dissemination

Fundings: this work was supported by grants from the Association pour la recherche sur le cancer (ARC), La Ligue contre le Cancer, Lyrican and from the Hospices Civils de Lyon.

*Co-corresponding authors: Jean-Pierre Rouault and Pierre Sujobert; (jean-pierre.rouault@univ-lyon1.fr , pierre.sujobert@chu-lyon.fr)

ABSTRACT

BTG1 is a recurrently mutated gene in lymphomas, especially in the MCD/C5 subgroup of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), which is characterized by poor outcome and extranodal dissemination. *BTG1* mutations have been considered as passengers of oncogenic transformation, and the functions of this gene in lymphomagenesis have never been investigated. Here, we observe that *Btg1*^{-/-} mice have an increased germinal centre response after antigenic stimulation, suggesting that BTG1 might play essential roles in mature B cells. Moreover, *Btg1* knock out significantly accelerates the development of a lethal lymphoproliferative disease driven by *BCL2* overexpression. Using a MCD/C5 DLBCL derived cell line, we observed that after intrasplenic injection, *BTG1*^{-/-} cells disseminated in the liver of the recipient mice, whereas *BTG1*^{WT} or rescued cells did not. Importantly, expression of BTG1 harbouring any of three missense mutations observed in patients did not rescue this phenotype, supporting the hypothesis that *BTG1* mutations are loss of function ones. As this phenotype mimicked the lymphoma dissemination observed in MCD/C5 DLBCL, we investigated further the molecular mechanisms explaining this observation. Mass spectrometry and co-immunoprecipitation experiments revealed BCAR1 as a new interacting partner of BTG1. BCAR1 plays major roles in signal transduction of the focal adhesion and SRC kinases after cell adhesion to the extracellular matrix. We observed that *BTG1*^{-/-} cells had an over-activation of BCAR1 and its downstream protein RAC1, associated with profound changes of the structure of the actin cytoskeleton, formation of multiple filopodia, and increased capacities of adherence and migration. These modifications were reversed by a rescued expression of BTG1, or by the use of the SRC inhibitor dasatinib. Interestingly, dasatinib fully abolished the hepatic dissemination of

BTG1^{-/-} cells *in vivo*, which suggests that targeting this pathway warrants further clinical evaluation in *BTG1* mutated DLBCL.

INTRODUCTION

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common subtype of lymphoma. Around two thirds of the patients can be cured with intensive immuno-chemotherapy, but this disease remains an unmet medical need for unfit patients or patients with relapse/refractory disease (Sehn & Salles, 2021). Following the description of the transcriptomic heterogeneity of DLBCL (Alizadeh et al., 2000), functional analysis of the activated B cell (ABC) and germinal center (GC) subtypes have revealed specific targetable oncogenic additions (Davis et al., 2010) and synthetic lethal interactions (Yang et al., 2012). However, the randomized clinical trials based on these preclinical data have failed to demonstrate a measurable clinical benefit of adding drugs to immunochemotherapy backbones (Davies et al., 2019; Younes et al., 2019). An interesting explanation of these disappointing clinical results comes from genomic studies, which have further refined the classification of DLBCL with genomic subgroups of clinical significance (Chapuy et al., 2018; Schmitz et al., 2018; Wright et al., 2020). Among them, the MCD/C5 subtype, characterized by *MYD88* L265P and *CD79B* mutations and an ABC transcriptomic profile, is associated with extranodal dissemination, and very poor prognosis. This subtype is also associated with recurrent mutations in other genes, such as *TBL1XR1* (Venturutti et al., 2020) or *BTG1* (40% of the patients).

BTG1 is a highly conserved gene, prototype of an antiproliferative gene family (Matsuda et al., 2001; Rouault et al., 1992; Winkler, 2010; Yuniati et al., 2019). *BTG1* is a *bona fide* tumor suppressor gene in pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL), where deletions are observed in 10% of the patients, and have been associated with corticosteroid resistance (Scheijen et al., 2017; Waanders et al., 2012). The functions of this gene remain elusive

except for its interactions with the mRNA de-adenylation complex CCR4-Not (Mauxion et al., 2009; Rouault et al., 1998) and with the arginine methyl transferase PRMT1 (Berthet et al., 2002; Lin et al., 1996). Regarding lymphomas, most of *BTG1* mutations are missense (85%) with no mutational hotspot. As *BTG1* mutations harbour the signature of activation induced cytidine deaminase (Duke et al., 2013), they are often considered as passengers in lymphomagenesis (Amin et al., 2017). However, many observations suggest that BTG1 mutations might also contribute to lymphomagenesis: 1/ most of the missense mutations tested impair the capacity of BTG1 to interact with its partner CAF1 (Almasmoum et al., 2020); 2/ 15% of mutations are truncating mutations predicted to have a strong functional impact; and 3/ *BTG1* mutations/deletions are especially frequent in lymphomas derived from post-GC B cells such as ABC-DLBCL or Waldenstrom macroglobulinemia (Hunter et al., 2014).

In this work, we provide experimental evidences that *BTG1* inactivation increases the germinal center reaction and contributes actively to lymphomagenesis. Furthermore, we observed that BTG1 inactivation recapitulates the phenotype of lymphoma dissemination observed in patients with the MCD/C5 subtype of DLBCL. Indeed, BTG1 interacts with BCAR1, and the loss of BTG1 is responsible of an over-activation of the BCAR1-RAC1 pathway, leading to profound reorganization of the actin cytoskeleton, and increased capacities of adherence and migration of lymphoma cells. Interestingly, the inhibition of the BCAR1-RAC1 pathway by the SRC inhibitor dasatinib fully blocked the dissemination of BTG1 knock out cells, which opens interesting perspectives for therapeutic developments.

RESULTS

***BTG1* inactivation increases Germinal Centre reaction**

Previous studies have shown that *Btg1* knock out mice have a reduced number of B220 positive B-lymphocytes in the bone marrow, due to increased apoptosis of lymphoid progenitors (Tijchon et al., 2016). However, whether *Btg1* inactivation affects the response of mature B cells to antigenic stimulation has still to be determined. To explore this, we immunized *Btg1*^{-/-} mice and their wild type counterparts with intraperitoneal injection of sheep red blood cells (SRBC), a T cell dependant antigen. Nine days later, we quantified the percentage of splenic germinal centre (GC) B cells (defined as GL7 and CD95 positive B cells) in mice injected with SRBC as compared with mice injected with excipient (figure 1A). Whereas we did not notice any difference in the percentage of B cells, we observed an increase in the percentage of GC-B cells in the spleen of *Btg1*^{-/-} mice as compared with *Btg1*^{WT} mice after immunization (5.8% vs 4.3%, p=0.05, figure 1A). Histological analysis of the spleens confirmed that the germinal centres were larger in *Btg1*^{-/-} mice, as revealed by Ki67 and Peanut agglutinin (PNA) staining (mean size 58.109 μm^2 vs 36.620 μm^2 , p = 0.0212, figure 1B and 1C). These data show that *Btg1* inactivation is associated with an increased GC reaction after immunization with a T-cell dependent antigen. Given the impact of *Btg1* inactivation on mature B cells functions, we decided to explore further the hypothesis that *Btg1* inactivation might also have a role in the neoplastic transformation of these cells.

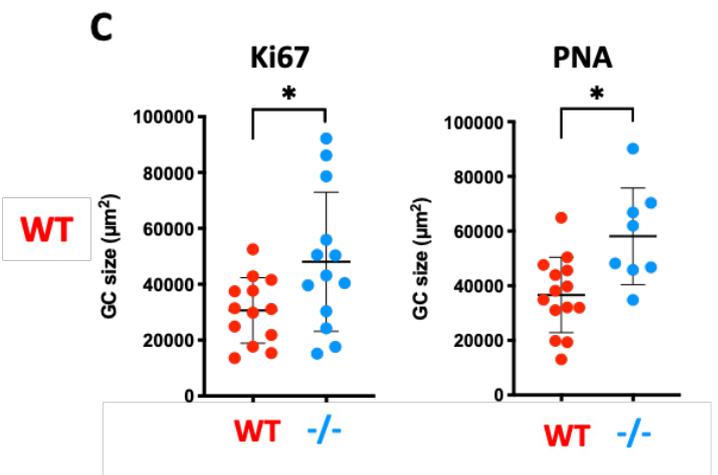
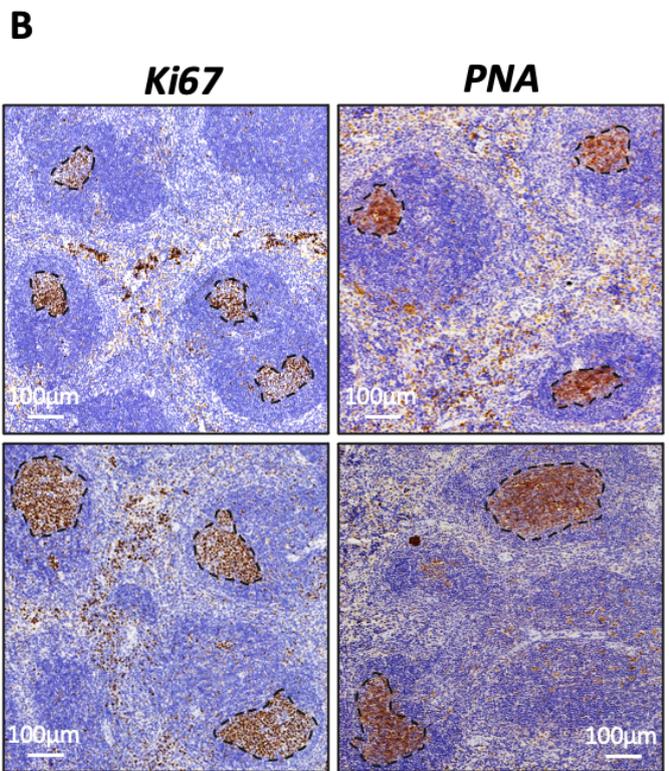
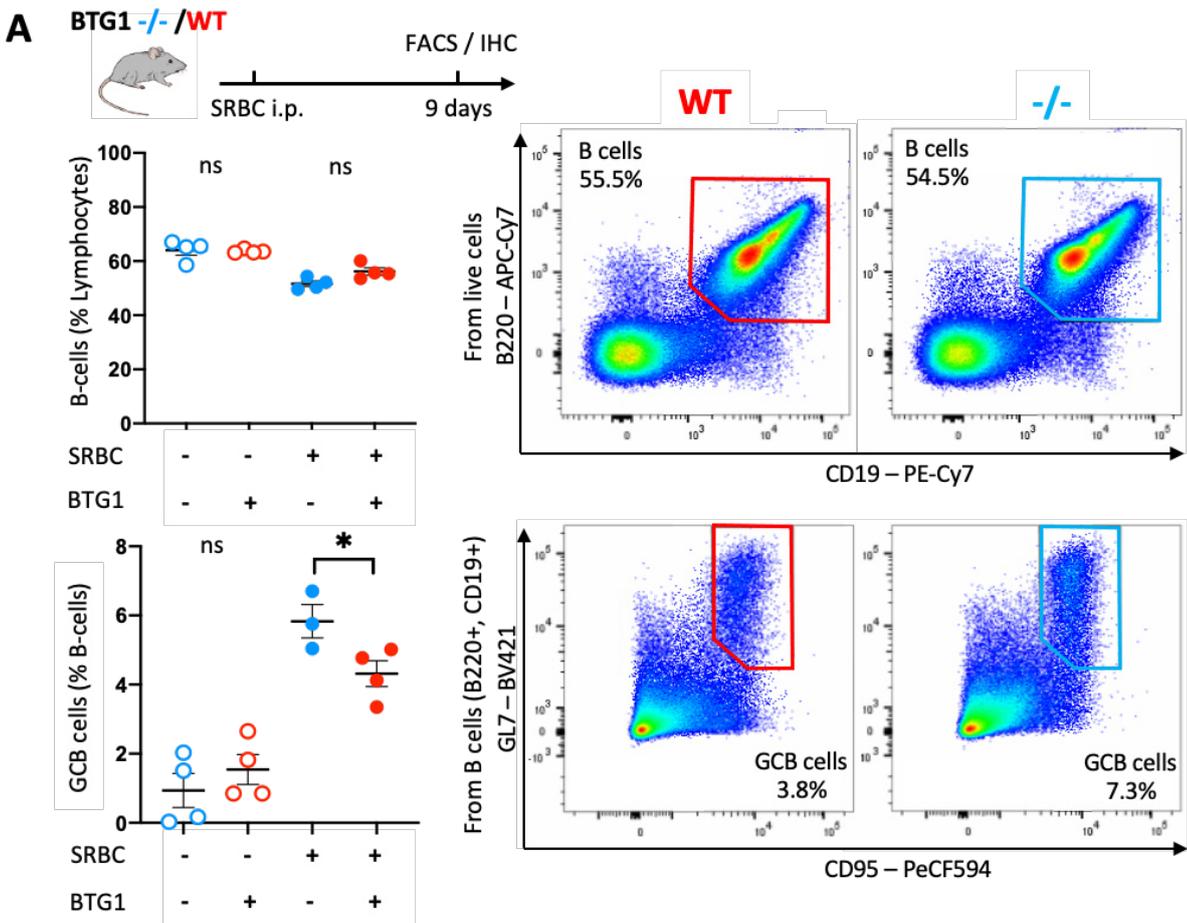


Figure 1: *BTG1* inactivation leads to increased germinal center reaction after immunization.

- (A)** Flow cytometry (FC) quantification of B cells and splenic GCB cells (CD19+, B220+, CD95+, GL7+) 9 days after SRBC immunization in *Btg1*^{-/-} or *Btg1*^{WT} mice. Right panel: example of flow cytometry histograms; left panel: percentage of B cells and GC-B cells in the spleen of *Btg1*^{-/-} or *Btg1*^{WT} mice with or without SRBC immunization (n=4 in each group)
- (B)** Histology of spleen of SRBC immunized *Btg1*^{-/-} or *Btg1*^{WT} mice after PNA or with antibody specific Ki67 staining.
- (C)** Quantification of splenic GC size after Ki67 and PNA labelling using CaseViewer (3DHISTECH) software.

***Btg1* inactivation is a driver of lymphomagenesis.**

Even if *Btg1*^{-/-} mice do not develop lymphoma spontaneously (Scheijen et al., 2017), we hypothesized that the role of *Btg1* inactivation in lymphomagenesis might be revealed in a model of lymphomagenesis driven by BCL2 overexpression. Indeed, the MCD/C5 subtype of DLBCL is associated with BCL2 amplification (Chapuy et al., 2018), and because this model has been recently used to demonstrate the driver functions of TBL1XR1, another gene recurrently mutated in MCD/C5 DLBCL (Venturutti et al., 2020). Hence, we crossed *Btg1*^{-/-} or *Btg1*^{WT} mice with VavP-Bcl2 mice and used their bone marrow to reconstitute haematopoiesis in irradiated syngeneic recipient mice (figure 2A). As expected (Egle et al., 2004), mice became moribund because of a lymphoproliferation associated with hepato-splenomegaly. Importantly, mice receiving *Btg1*^{-/-} bone marrow developed the disease more rapidly than mice receiving *Btg1*^{WT} cells (median overall survival 205 days vs 236 days, p= 0.0089, figure 2B). Moreover,

Btg1^{-/-} recipient mice had a more aggressive disease, with a three-fold increase in the number of B cells in spleen (377x10⁶ vs 145x10⁶, p= 0.0042) and liver (72x10⁶ vs 23x10⁶, p= 0.001) (figure 2C) and higher numbers of GC-B cells and follicular helper T cells in liver (Supplemental figure 1A). HES staining and B220 immunohistochemistry staining of spleens showed a lymphoid hyperplasia in all mice, which was restricted to the white pulp in the recipients of *Btg1*^{WT} cells but was infiltrating also the red pulp in the recipient of *Btg1*^{-/-} cells (figure 2D and 2E). Similarly, the peri-vascular and sinusoidal infiltration of the livers was more pronounced in recipients of *Btg1*^{-/-} cells as compared to recipients of *Btg1*^{WT} cells (Supplemental figure 1B). Finally, we used high throughput sequencing of the genes encoding the variable region of the B cell receptor heavy chain to measure to what extent these lymphoproliferations were clonal. As shown in figure 2E, the lymphoproliferation was more clonally restricted in *Btg1*^{-/-} recipients as compared to *Btg1*^{WT} recipients.

Altogether, these observations demonstrate that *Btg1* inactivation cooperates with Bcl2 overexpression to accelerate the development of an oligoclonal lymphoproliferation, which support the hypothesis that *Btg1* inactivation is a driver of lymphomagenesis.

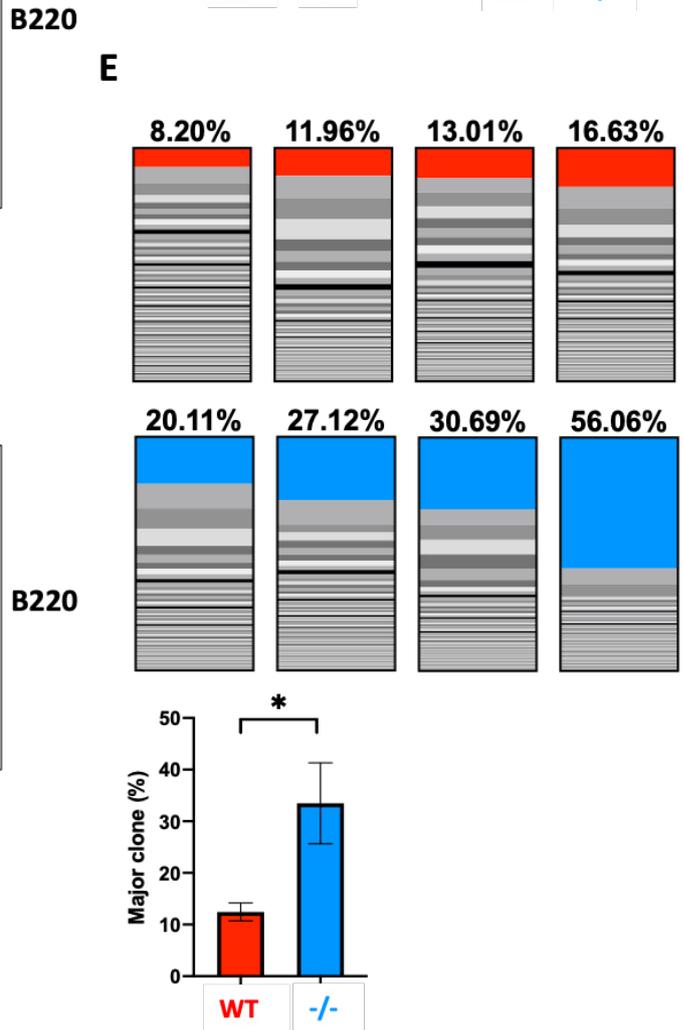
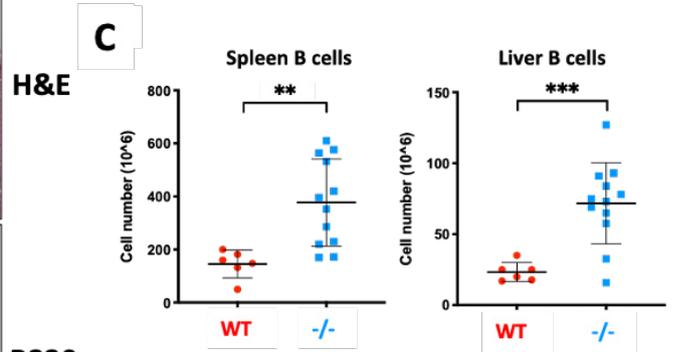
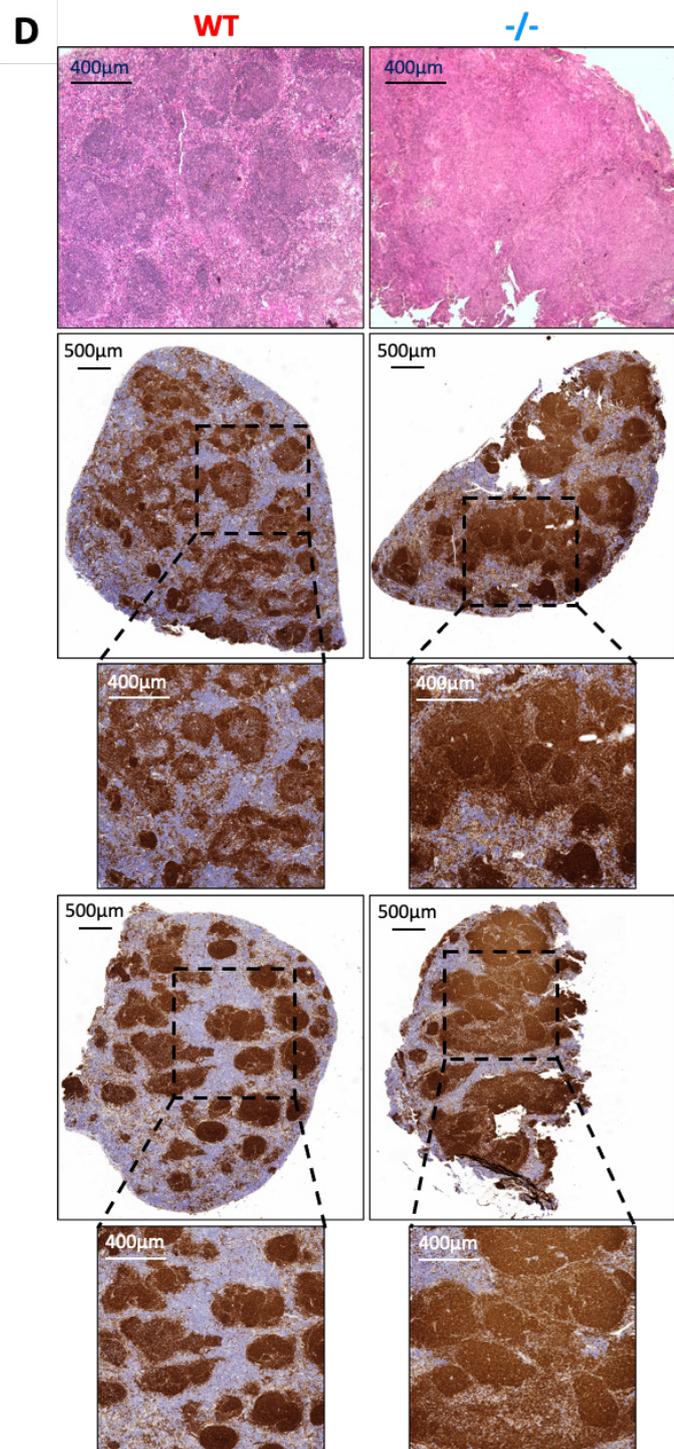
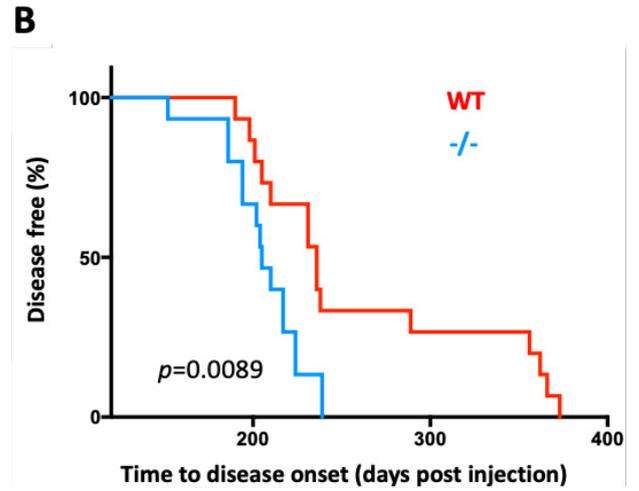
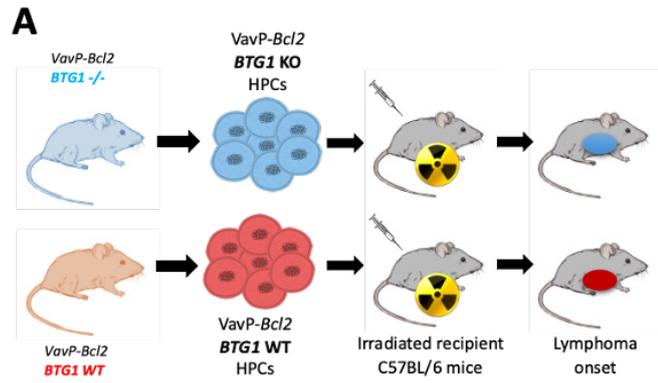


Figure 2: *BTG1* inactivation is a driver of lymphomagenesis.

- (A) Schematic representation of the VavP-Bcl2 model of lymphomagenesis.
- (B) Kaplan-Meier curve of C57BL/6 mice transplanted with VavP-Bcl2, *Btg1*^{-/-} (blue, n = 15), VaVP-Bcl2, *Btg1*^{WT} (red, n = 15). Statistical significance of survival difference was determined by the log-rank test, p= 0.0089.
- (C) Flow cytometry analysis of the total number of B cells in mice spleen (left) and liver (right) (WT, n=6 and KO, n=12; **p=0.0042; ***p=0.001).
- (D) H&E and B220 staining of representative spleen sections from VaVP-BCL2 *Btg1*^{-/-} or *Btg1*^{WT} recipients (x25 and x5) with magnification of spleen portions.
- (E) Representation and quantification of the clonal composition of VaVP-Bcl2 *Btg1*^{WT} or *BTG1*^{-/-} spleens (n=4). The number above histograms represents the percentage of reads corresponding to the largest clone over the 100 most represented. bottom panel: comparison of the mean proportion of the major clone between VaVP-Bcl2 *Btg1*^{WT} or *BTG1*^{-/-} recipients (Mann-Whitney, p=0.0286).

***BTG1* inactivation enhances lymphoma dissemination.**

Given the driving role of *BTG1* inactivation in a model of lymphomagenesis, we hypothesized that *BTG1* could also influence the phenotype of lymphomas. A striking clinical feature of the MCD/C5 subtype is its frequency of extranodal involvement. As *BTG1* is especially mutated in this subtype, we postulated that *BTG1* inactivation might contribute to the dissemination of lymphoma cells. To assess this hypothesis, we developed a model of lymphoma dissemination based on the quantitative analysis of the lymphoma cells in the liver 5 weeks after intrasplenic graft of TMD8 cells in immunocompromised NSG mice (figure 3A). TMD8 is a human lymphoma cell line derived from a *BTG1*^{WT} MCD/C5 DLBCL with

MYD88 L265P and *CD79B* mutations (Tohda et al., 2006). We used two different sgRNA targeting *BTG1* with high specificity, which did not target the closely related gene *BTG2* (supplemental figure 2A). We also developed a rescue of *BTG1* in the TMD8 *BTG1*^{-/-} cell lines, using a lentiviral expression vector encoding the murine orthologue of *BTG1*, which is 100% homologous to human *BTG1* at the protein level, but is not recognized by the sgRNA because of differences at the DNA level (supplemental figure 2B).

Using these different TMD8 cell lines, we assessed the role of *BTG1* on lymphoma dissemination. The total number of TMD8 cells was similar in the spleen of mice having received TMD8 *BTG1*^{WT} or TMD8 *BTG1*^{-/-} cells (figure 3B). However, we observed numerous tumour spots in the liver of recipients of *BTG1*^{-/-} cells (figure 3C). Using flow cytometry, we quantified the absolute number of lymphoma cells in the liver, which was 5-fold higher in mice having received TMD8 *BTG1*^{-/-} cells as compared to mice having received TMD8 *BTG1*^{WT} cells (mean 12.2x10⁶ cells vs 2.4x10⁶ cells p=0.0006; figure 3D). Immunohistochemistry staining of human CD20 confirmed the higher number of TMD8 cells in the liver of TMD8 *BTG1*^{-/-} recipients as compared to the livers of TMD8 *BTG1*^{WT} cells (figure 3E). Importantly, this increased hepatic dissemination was not observed in mice having received TMD8 *BTG1*^{rescue} cells (figure 3B, C), confirming the causal role of *BTG1* inactivation in the hepatic dissemination.

In this model, we did not observe lymphoma cells in the central nervous system of the recipient mice. However, given the frequency of CNS involvement observed in MCD/C5 DLBCL, we explored the consequences of *BTG1* inactivation in this specific environment by using stereotaxic surgery to engraft TMD8 cells inside the brain. Whereas TMD8 *BTG1*^{WT} or TMD8 *BTG1*^{rescue} cells growth were restricted to the brain hemisphere where they were injected, TMD8 *BTG1*^{-/-} cells

invaded both hemispheres (figure 3F), confirming their higher ability to disseminate also inside the CNS.

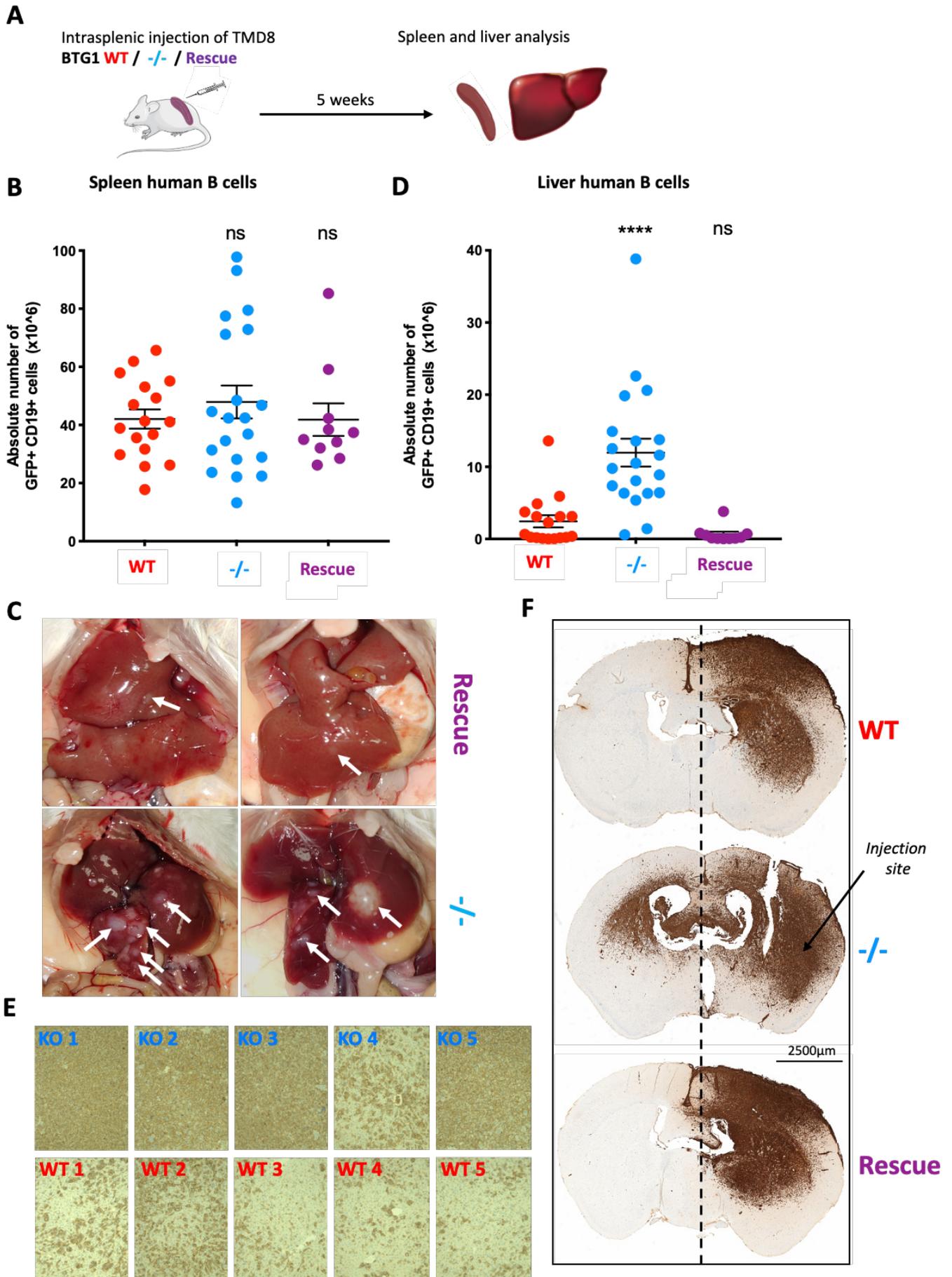


Figure 3: *BTG1* inactivation promotes lymphoma dissemination.

- (A) Schematic representation of the intrasplenic injection model.
- (B) Flow cytometry quantification of TMD8 cells (GFP+, human CD19+) in the spleen of recipient NSG mice 5 weeks after intrasplenic xenograft (TMD8 *BTG1*^{WT} n=17; TMD8 *BTG1*^{-/-} n=20; TMD8 *BTG1*^{rescue} n=10)
- (C) Liver histology of *BTG1*^{Rescue} or *BTG1*^{-/-} 5 weeks after intrasplenic injection of TMD8 cells.
- (D) Flow cytometry quantification of TMD8 cells (GFP+, human CD19+) in the liver of the same mice as in A. (p<0.0001, compared to WT)
- (E) Immunohistochemistry staining of human CD20 in liver of mice xenografted with TMD8 *BTG1*^{-/-} or *BTG1*^{WT} cells (n=5 in each group).
- (F) Immunohistochemistry staining of human CD20 in brain of mice xenografted with TMD8 *BTG1*^{-/-}, *BTG1*^{WT} or *BTG1*^{Rescue} cells on the left hemisphere (n=2 in each group).

***BTG1* missense mutations phenocopy *BTG1* inactivation.**

As only 15 percent of *BTG1* mutations are false sense one predicted to strongly impair *BTG1* functions, the phenotypic consequences of *BTG1* knock out described above might not be relevant for the majority of the patients having missense mutations. To explore this aspect, we used the TMD8^{rescue} model with rescue cDNA harboring missense mutation observed in patients. We developed three different TMD8^{mutant rescue} cell lines using cDNA with either the L26P, G66D or I115V mutation randomly chosen among in different domains of *BTG1*, and described in DLBCL patients. First, we measured the impact of these mutations on *BTG1* protein half-life. As shown in figure 4A, all three mutated *BTG1* proteins

had a significant shorter half-life (BTG1^{WT}: 20 min, BTG1^{L26P}: 10 min, BTG1^{G66D}: 10 min, BTG1^{I115V}: 12 min), which suggests that they are loss-of-function mutations. We then evaluated the functional impact of these missense mutations in the intrasplenic engraftment model. In this model, the rescue of BTG1^{WT} expression fully abolished the hepatic dissemination of TMD8 BTG1^{-/-} cells, but none of the BTG1 mutants had an effect on the dissemination of TMD8 BTG1^{-/-} cells (figure 4B). Altogether, we conclude that the three missense mutations evaluated here phenocopied BTG1 inactivation, suggesting that the conclusions derived from BTG1^{-/-} cells are also relevant for patients with missense mutations.

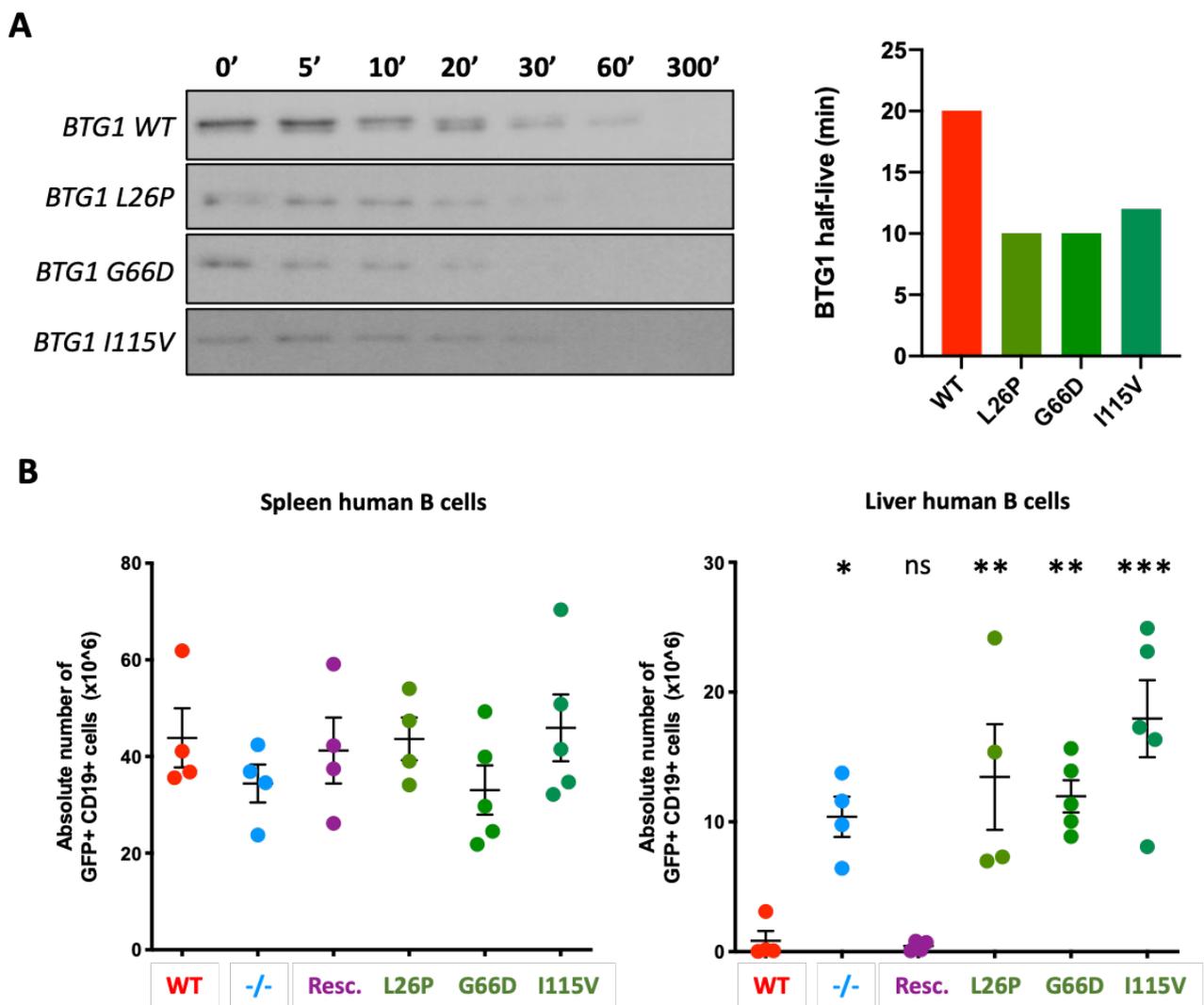


Figure 4 : *BTG1* missense mutations are loss of function

- (A) Quantification of mutant *BTG1* protein expression after 10 μ M of cycloheximide treatment (time 0 to 300 minutes).
- (B) Flow cytometry quantification of TMD8 cells (GFP+, human CD19+) in the spleen and in the liver of recipient NSG mice 5 weeks after intrasplenic xenograft. (TMD8 *BTG1*^{WT} in red, n=4; TMD8 *BTG1*^{-/-} in blue, n=4, p=0.0365 compared to *BTG1*^{WT}; TMD8 *BTG1*^{rescue} in purple, n=4, p=ns; TMD8 *BTG1*^{rescue L26P} in green, n=4, p=0.0048; TMD8 *BTG1*^{rescue G66D} in green, n=5, p=0.0088; TMD8 *BTG1*^{rescue I115V} in green, n=5, p=0.0001)

***BTG1* inactivation has dramatic effects on the organisation of actin cytoskeleton, inducing cell shape changes and adhesion capacities.**

Lymphoma migration and invasion is a poorly known process, since these cells are poorly attaching to the extracellular matrix (ECM) and forms mostly a series of F-actin-dependent membrane extrusions (such as blebs, pseudopods and filopodia (Jacquemet et al., 2015). Given the observation of increased dissemination after the inactivation of *BTG1*, we hypothesized that *BTG1* might have an impact on these processes. To test this, we first analysed the morphology of TMD8 *BTG1*^{-/-} and TMD8 *BTG1*^{WT} cells using phalloidin staining after cytocentrifugation of the cells in suspension. We observed that the F-actin cytoskeleton was different and mainly accumulated in the cellular cortex in TMD8 *BTG1*^{-/-} cells (figure 5A and 5B), suggesting a hyper-polarization of these cells. This observation suggests that *BTG1* inactivation might result in functional modifications of the capacities of adhesion and migration of TMD8 cells. Thereafter, we quantified their capacities to adhere to coated surfaces, using the

Xcelligence device, which enables to monitor the dynamics of high amount of cell adhesion processes over time (70 000 cells per condition). Whereas we did not detect any difference between TMD8 *BTG1*^{-/-} and TMD8 *BTG1*^{WT} cells in uncoated wells or in wells coated with poly-L-lysine or collagen (supplemental figure S3 A), we observed that the loss of BTG1 did not change the kinetics of spreading but rather dramatically increase the maximum spreading capacities on fibronectin as compared to TMD8 *BTG1*^{WT} and TMD8 *BTG1*^{rescue} (figure 5C). Therefore, we further examined if *BTG1* inactivation had an impact on the shape of the cells after adhesion on fibronectin. Confocal 3D analysis clearly showed that TMD8 *BTG1*^{-/-} cells were flattened (figure 5D), and presented numerous long filopodia, whereas TMD8 *BTG1*^{WT} cells kept a round shape, with a reduced number of short filopodia (figure 5D, E and F). These modifications were associated with changes in the dynamics of TMD8 cells. Using time-lapse microscopy to measure the mobility of TMD8 cells on fibronectin-coated surface, we observed that TMD8 *BTG1*^{-/-} cells were significantly more mobile than TMD8 *BTG1*^{WT} cells ($20.3 \times 10^{-2} \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ vs $10.3 \times 10^{-2} \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$, $p < 0.0001$ figure 5G). This phenotype was also validated in a 3-dimensional collagen matrix where TMD8 *BTG1*^{-/-} cells form more cytoplasmic protrusions than wild type counterparts (supplemental figure S3 B). Importantly, rescue of BTG1 expression abolished the increased adhesion capacities of TMD8 *BTG1*^{-/-} and their increased mobility (figure 5C and 5G), which demonstrate a causal role for *BTG1* inactivation in this phenotype.

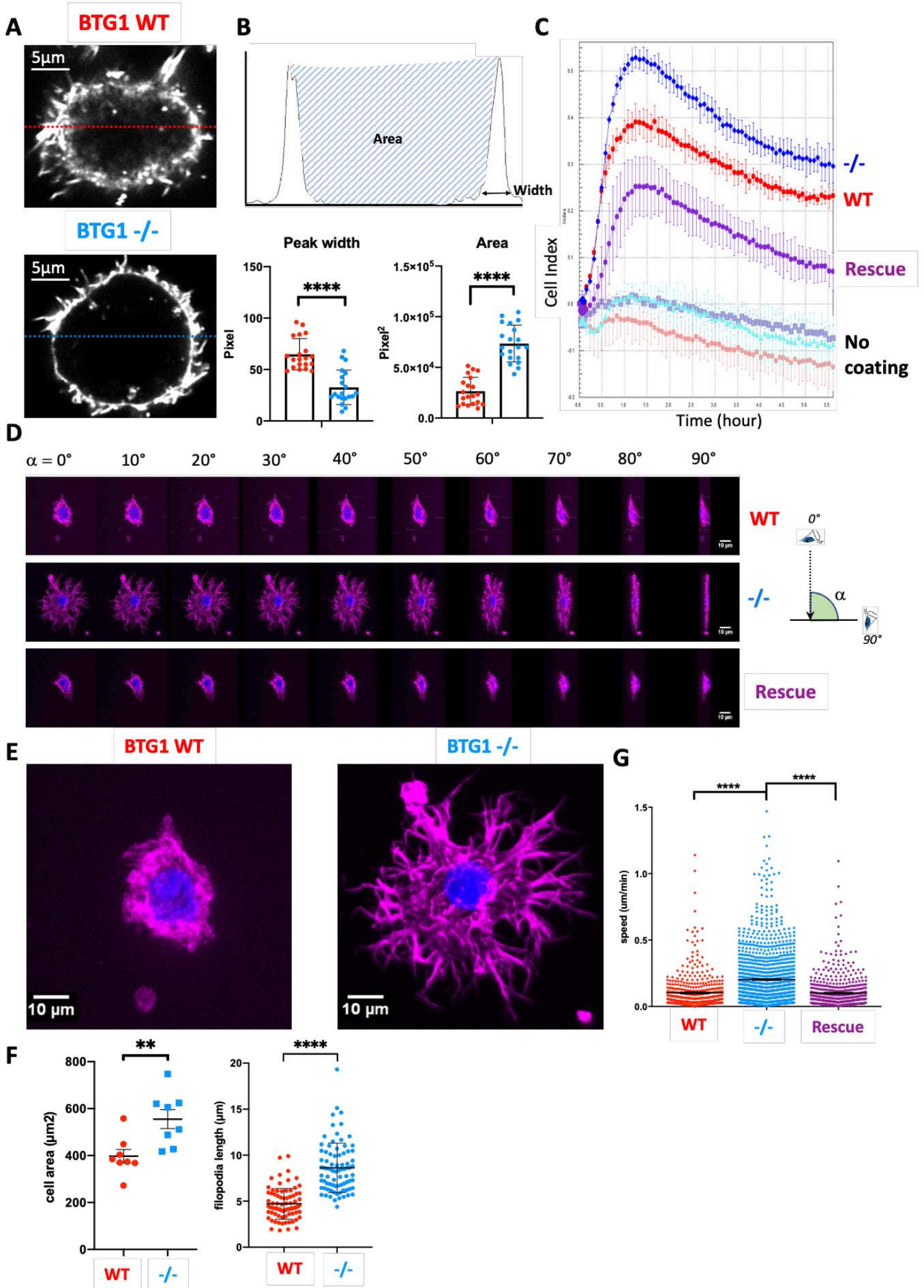


Figure 5: *BTG1* inactivation modifies cells adhesion and migration capacities.

- (A)** Phalloidin staining of TMD8 *BTG1*^{-/-} or TMD8 *BTG1*^{WT} cells imaged on confocal Zeiss LSM800 with Airyscan module without slide coating.
- (B)** Quantification of phalloidin staining intensity (n=20; p<0.0001) (left), and area under the curve between cell edge peaks representing actin cytoplasmic repartition (right) (n=20; p<0.0001). Top panel represent the quantification method, after intensity representation on ImageJ software.
- (C)** Measurement of the evolution of resistivity estimated by the Cell index (Xcelligence) after addition of TMD8 *BTG1*^{-/-} (blue), TMD8 *BTG1*^{WT} (red) or TMD8 *BTG1*^{rescue} (purple) on fibronectin coated or uncoated wells.
- (D)** Phalloidin (purple) and Hoechst (blue) staining of TMD8 *BTG1*^{WT} (top panel), TMD8 *BTG1*^{-/-} (middle panel) and TMD8 *BTG1*^{rescue} (bottom panel) seeded on fibronectin coated slides, and imaged on inverted microscope Zeiss Observer, after z-stacking and 3D reconstruction represented for different observation viewpoint under different angles from $\alpha = 0^\circ$ (vertical observation) to $\alpha = 90^\circ$ (horizontal observation).
- (E)** Vertical observation ($\alpha = 0^\circ$) of a representative TMD8 *BTG1*^{WT} and TMD8 *BTG1*^{-/-} cell after phalloïdine and Hoechst staining on fibronectin coated slides.
- (F)** Quantification of TMD8 *BTG1* WT or *BTG1* KO cell area (n=80; p<0.0001) on fibronectin coated slides, counted on eight field containing 20 cells per field (n=8; p=0.0065) (left) and quantification of filopodia length for TMD8 *BTG1*^{WT} or TMD8 *BTG1*^{-/-} cells on fibronectin coated slides (right).
- (G)** Quantification of cellular mobility of TMD8 *BTG1*^{WT}, TMD8 *BTG1*^{-/-} and TMD8 *BTG1*^{rescue} seeded on fibronectin coated slides imaged on an

Incucyte device for 1 hour, images acquired every 1 minute
(****p<0.0001)

BTG1 interaction with BCAR1 inhibits the BCAR1-RAC1 pathway.

In order to investigate the molecular basis of the effects of *BTG1* inactivation on the actin cytoskeleton, we used an unbiased proteomic approach to identify new *BTG1* interacting proteins which might be involved in this process. Using quantitative mass spectrometry, we identified 104 proteins statistically enriched after anti-HA immunoprecipitation in cells expressing HA-tagged *BTG1* as compared to cells expressing HA-tagged green fluorescent protein (GFP) (figure 6A, and supplemental table S1). Among these proteins were *BCAR1* (also known as p130cas) and *BCAR3*, which form a complex integrating mechanical signals resulting from the interaction of integrins with the extracellular matrix (Sun et al., 2012). *BCAR1* is activated after phosphorylation of its substrate domain by the kinases SRC or FAK, and then activates RAC1, which controls actin cytoskeleton (Sharma & Mayer, 2008). First, we performed co-immunoprecipitation experiments, which confirmed the interaction between *BTG1* and *BCAR1* (figure 6B). Given the phenotype observed in TMD8 *BTG1*^{-/-} cells, we hypothesized that this interaction could inhibit the activity of *BCAR1*, which is correlated with its level of phosphorylation of tyrosine 410 (Jacquemet et al., 2019). Indeed, we observed that the phosphorylation of *BCAR1* tyrosine 410 was increased in TMD8 *BTG1*^{-/-} cells (figure 6C) and we also observed an increased level of activated (GTP-bound) RAC1 in these cells (figure 6D). Altogether, these results show that *BTG1* inactivation disrupts the *BCAR1*-*BTG1* interaction, leading to overactivation of the *BCAR1*-RAC1 pathway.

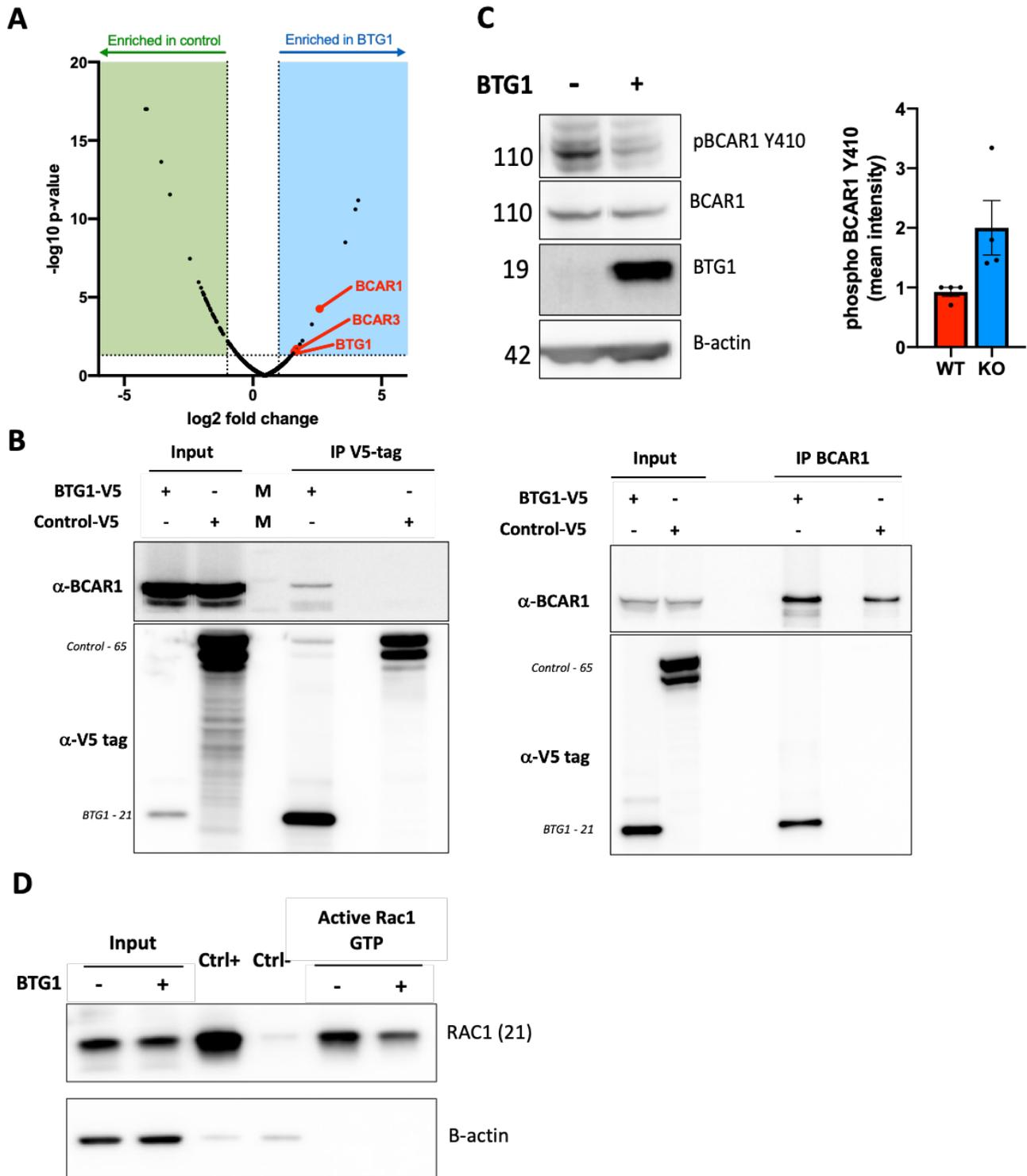


Figure 6: BTG1 – BCAR1 interaction and functional consequences.

(A) Volcano plot of the proteins identified after anti-HA immunoprecipitation in HEK293T cells transfected with HA-BTG1 or HA-control plasmid.

(B) CoIP results for V5 pulldown in HEK293T cells transfected with V5-*BTG1* or V5-*AHCYL2* (control) plasmid (left) and for BCAR1 pulldown in the same transfection conditions.

(C) Western blot analysis (left) and quantification (right) of BCAR1 Y410 phosphorylation on TMD8 *BTG1*^{-/-} or TMD8 *BTG1*^{WT} cells.

(D) Immunoprecipitation of active RAC1 (RAC1-GTP) on TMD8 *BTG1*^{-/-} or TMD8 *BTG1*^{WT} cells.

Interfering with the BCAR1-RAC1 pathway inhibits lymphoma dissemination

To functionally assess the role of the BCAR1-RAC1 pathway in the modifications of the actin cytoskeleton and adhesion capacities observed in TMD8 *BTG1*^{-/-} cells, we used the SRC inhibitor dasatinib to inhibit the activating phosphorylation of BCAR1. Using non-cytotoxic doses of dasatinib, we confirmed that SRC inhibition abolished the phosphorylation of BCAR1 (figure 7A) and led to a decrease of RAC1-GTP levels (figure 7B). Accordingly, dasatinib strongly impaired the ability of TMD8 *BTG1*^{-/-} cells to adhere to fibronectin coated wells as assessed by the Xcelligence assay (figure 7C).

These observations prompted us to analyze the effects of dasatinib *in vivo* in the model of hepatic dissemination after intrasplenic engraftment. Five weeks after intrasplenic engraftment, dasatinib treatment had no effect on the intrasplenic proliferation of TMD8 *BTG1*^{-/-} cells, confirming the absence of cytotoxic effects of SRC inhibition. However, the analysis of the livers showed a dramatic decrease in lymphoma cell numbers in mice treated with dasatinib, confirming *in vivo* that SRC inhibition can inhibit lymphoma dissemination driven by the BCAR1-RAC1 after *BTG1* inactivation (figure 7D).

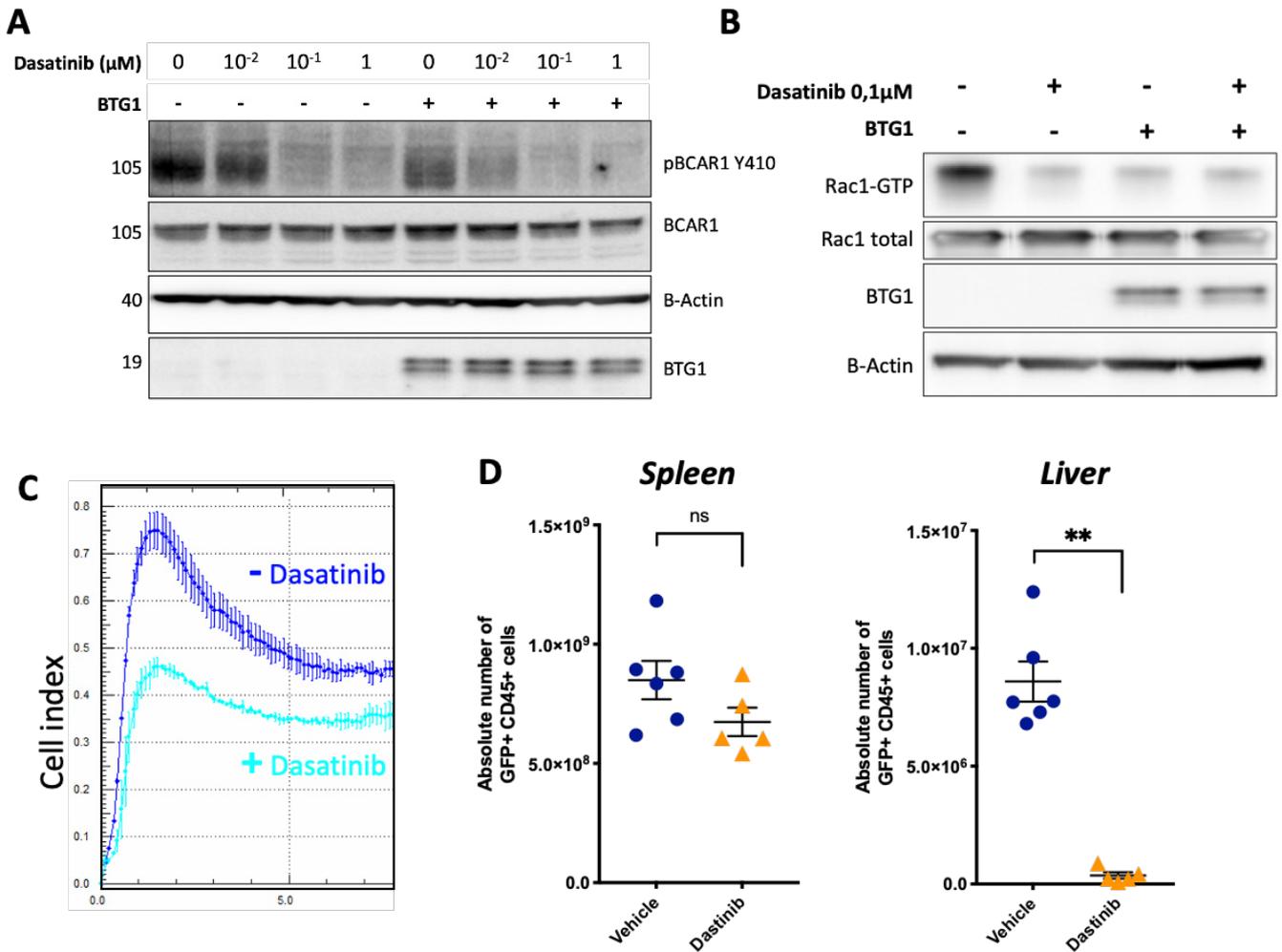


Figure 7: *BTG1* interacts with BCAR1 and modifies its downstream pathway.

(A) Western blot analysis of BCAR1 Y410 phosphorylation on TMD8 *BTG1*^{-/-} or TMD8 *BTG1*^{WT} cells after a 30 min exposure to dasatinib.

(B) Immunoprecipitation of active RAC1 (RAC1-GTP) on TMD8 *BTG1*^{-/-} or TMD8 *BTG1*^{WT} cells after 0.1 μM dasatinib or vehicle pre-treatment for 2 hours.

(C) Measurement of the evolution of resistivity estimated by the Cell index (Xcelligence) of TMD8 *BTG1*^{-/-} cells on fibronectin coated with (dark blue) or without (light blue) dasatinib pretreatment (1 μM , 30 min).

(D)Flow cytometry quantification of TMD8 *BTG1*^{-/-} cells (GFP+, CD45+) in the spleen of recipient NSG mice 5 weeks after intrasplenic xenograft and treatment with 10mg/kg of dasatinib or vehicle (0.5% HPMC, 0.1% Tween80) in intraperitoneal injection daily for 2 weeks (Dasatinib n=5, vehicle n=6, p=0.0043).

DISCUSSION

Following the extensive characterization of the genomic landscape of cancers, the driver/passenger dichotomy has been widely used to prioritize the recurrently mutated genes that warranted further functional analyses. However, this classification relies on algorithms which produce highly variable results, making it difficult to definitively conclude based only on genomic data (Tokheim et al., 2016). In B cell neoplasms, the genes harboring a strong signature of the activity of activation induced cytidine deaminase (AICD), such as *BTG1*, have been mostly considered as passenger genes in lymphomagenesis (Chapuy et al., 2018). However, the data presented here support the hypothesis that *BTG1* mutations are indeed actively driving the process of lymphomagenesis. First, we observed that *BTG1* inactivation increases the germinal center reaction after immunization of the mice by a T cell-dependent antigen, suggesting important functions of this gene in the physiology of mature B cells. Second, by using a classical model of BCL2 overexpression, we observed that *BTG1* inactivation increased the development of an oligoclonal lymphoproliferation, as was previously shown for other drivers of lymphomagenesis such as *CREBBP* (Pasqualucci et al., 2011), *KMT2D* (Ortega-Molina et al., 2015) or *TBL1XR1* (Venturutti et al., 2020). Third, we observed that all the missense mutations tested phenocopied *BTG1* inactivation, suggesting that the conclusions derived

from genetic knock out of *BTG1* are applicable not only to patients with false sense mutations, but also to patients with missense ones. This is in accordance with a recently published report assessing *in vitro* the impact of *BTG1* missense mutations on its ability to interact with the CCR4-Not complex, which also concluded that most of the missense mutations were loss of functions (Almasmoum et al., 2020). Finally, it is not infrequent to observe multiple *BTG1* mutations in cis (on the same allele) in DLBCL (5% of DLBCL, according to (Kurtz et al., 2021)) probably as a result of AID activity, which also supports the hypothesis that BTG1 activity is impaired in mutated DLBCL. In the future, a systematic evaluation of the functional consequences of all the missense *BTG1* mutations observed in patients will be required to help in analysing the sequencing results in the clinical settings. The dissemination model proposed here could be an useful platform to achieve this goal.

Beyond the observation that *BTG1* mutations act as a driver of lymphomagenesis, *BTG1* inactivation has also a strong impact on lymphoma dissemination. Using intrasplenic engraftment of TMD8 cells into NSG mice, we observed that hepatic dissemination was controlled by BTG1. In this model, we did not observe any dissemination of these cells in the central nervous system, suggesting that *BTG1* inactivation is probably not sufficient to allow the spreading through the blood brain barrier. However, when we injected the cells inside the brain, we also observed an increased dissemination of the cells in the brain microenvironment after *BTG1* inactivation. It will be interesting to more directly assess the impact of *BTG1* inactivation on the lymphoma dissemination across the blood brain barrier by using intravenous injection of lymphoma cell lines in immunocompromised mice, which has been proposed as a model of central nervous system involvement (Bosch et al., 2013). Using this model, the

authors have shown that the ability of the lymphoma cells to disseminate to the central nervous system was correlated with an upregulation of BCAR1 expression (Bosch et al., 2013), pointing out the importance of the BCAR1 pathway in lymphoma dissemination. Our study reveals another mechanism of BCAR1 overactivation, after the loss of the inhibitory interaction between BTG1 and BCAR1. The release of this interaction provokes major changes of the actin cytoskeleton leading to the formation of numerous filopodia, associated with increased adhesion and spreading on fibronectin and increased *in vitro* migration, supporting the increased migration capacities *in vivo*. Of note, BCAR1 (formerly known as p130cas) activity is also contributing to the mechanosensitivity of cells to the mechanical properties of the ECM (Matsui et al., 2012) and metastatic spreading of breast cancers (Cabodi et al., 2010a, 2010b), suggesting a broader role of this pathway in cancer. Accordingly, therapeutic targeting of the BCAR1-RAC1 pathway is an interesting avenue, which can be achieved indirectly by Src inhibitors such as dasatinib.

It is worthy of note that BTG2 has already been implicated in cytoskeleton network control in a hepatoma cell line during senescence (Lim et al., 2017). We can thus speculate that this function is largely conserved among the members of the BTG/TOB family. Furthermore, to our knowledge the functional association between BTG1 and BCAR1 is described here for the first time. This observation brings new important insights into understanding of the role of the highly conserved protein BTG1 whose biochemical functions have remained mostly elusive until now; only its association with CAF1 and PRMT1 being extensively studied (Yuniati et al., 2019).

Dasatinib has already been studied in preclinical models of DLBCL, showing cytotoxic activity against cell lines *in vitro* and *in vivo*, mostly due to FYN inhibition (Scuoppo et al., 2019). However, the efficacy of dasatinib as a cytotoxic agent in DLBCL was not confirmed in a phase I-II trial of dasatinib in relapsed or refractory non Hodgkin lymphomas including 8 patients with DLBCL (Umakanthan et al., 2019). The experimental results described here suggest that dasatinib might be an interesting drug in DLBCL beyond its cytotoxic activity, by inhibiting the BCAR1-RAC1 mediated dissemination. Accordingly, dasatinib could be repurposed to prevent extranodal relapse of *BTG1* mutated DLBCL. However, further preclinical work is needed, because conflicting results come from a report showing that dasatinib increases dissemination of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines (Kotaki et al., 2020). In the absence of *BTG1* mutation in this model, the effects of dasatinib on the BCAR1 pathway were probably counterbalanced by the induction of cytokine receptors such as CXCR4 as evidenced after *in vitro* treatment. It could be interesting to evaluate in this specific model if *BTG1* inactivation modulated the effects of dasatinib. This observation also underlies the pleiotropic effects of Src inhibitors, suggesting that more specific inhibitors of BCAR1 could be more efficient in the clinical settings.

To conclude, we provide evidences that *BTG1* mutations are actively contributing to lymphomagenesis, germinal centers reaction and cellular dissemination by modulation of BCAR1-RAC1 pathway.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines

The DLBCL cell line TMD8 (CVCL_A442; male origin) containing Cas9 protein was grown in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 GlutaMAX Supplement (ThermoFisher Scientific, USA), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% penicillin G/streptomycin (5000U/ml) (ThermoFisher Scientific, USA). HEK293T cells (CVCL_0063; female origin) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (11965092; ThermoFisher Scientific, USA), supplemented with 10% FCS, 1% penicillin G/streptomycin. Cells were grown in incubators at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere.

Generation of BTG1-KO cell line

TMD8 cas9 cells were infected using pLKO.1-puro-GFP U6 sgRNA (Addgene #50920) containing BTG1 RNA guides or non-targeting RNA guides (BTG1-KO-1-F: TTCTGTAGGACACTTCATAG, BTG1-KO-2-F: AATGGATCCTCTGATTGGAC, Non-Targeting-1-F: GCAGTACTACTGAGTTTTTC, Non-Targeting-2-F: GCCTAGTCTCGGTAAGAGTG,). Cells were selected with puromycin for 7 days (0.7µg/ml). BTG1 rescue (either WT or mutants) were obtained by infection of TMD8 *BTG1*^{-/-} cells with a pHIV-SFFV-MSC lentivirus (Frecha et al., 2009) allowing co-expression of murine *Btg1* and mCherry via an internal ribosome entry site. GFP and mCherry positive cells were sorted on a FACS ARIA™ cell sorter (BD biosciences, San Jose, CA).

Murine models

BTG1^{-/-} and VaVP-BCL2 mice generation have been described previously (Farioli-Vecchioli et al., 2012; Ogilvy et al., 1999), VaVP-BCL2 mice were kindly provided

by Jerry Adams (WEHI, Victoria, Australia). C57BL/6 WT and NOD.Cg-*Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ* (NSG) mice were purchased from Charles River laboratory (St-Germain sur l'Arbresle, France). All mice were maintained in pathogen-free conditions at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (Ecole Normale Supérieure de Lyon, France). All studies and procedures were performed in accordance with EU guidelines and approved by the local Animal Ethics Evaluation Committee (CECCAPP LS-2017-05).

SRBC immunization

To induce GC formation, *BTG1^{-/-}* or *BTG1^{WT}* mice were immunized at 12 weeks of age by intraperitoneal injection of 0.5ml of a 2% sheep red blood cell (SRBC) (Innovative Research; Michigan, USA) suspension in phosphate buffer saline (PBS), or 0.5ml of PBS. Cells were harvested from spleen and lymph nodes 9 days after immunization and analyzed by flow cytometry and histology.

Bone Marrow transplantation

Bone marrow cells of VavP-BCL2, *BTG1* KO or WT mice were harvested from the tibia and femur of 8-12 weeks old donor mice. After treatment with red blood cell lysis buffer ACK solution (ThermoFisher Scientific, USA) 1 million cells were injected retro-orbitally in lethally irradiated C57BL/6J host mice (10 Gy, on a Rad Source Technologies RS 2000 Biological Research X-ray Irradiator). Mice were monitored weekly until any one of several criteria for euthanizing were met: severe lethargy, more than 10% body weight loss, and palpable hepato- or splenomegaly, in accordance with EU guidelines and the local Animal Ethics Evaluation Committee (CECCAPP).

Antibody Staining and Flow Cytometry Analysis

Single-cell suspension prepared from different organs (spleen, lymph nodes, liver, brain) were stained with a panel of fluorescent-labeled antibodies in FACS Buffer (Phosphate Buffered Saline, 2% FCS, EDTA 0.5mM, Azide Sodium 0.01%). Viability staining was performed with viability dyes efluor780, AnnexinV APC or DAPI. The following mAbs reactive with murine cells were purchased from Becton Dickinson Biosciences (BD Biosciences, USA) or Biolegend (USA).

Flow cytometry data were acquired using a LSR II cytometer (BD Biosciences, USA) and analyzed using FlowJo software (BD Biosciences, USA). (Refer to Antibodies table)

Intrasplenic xenograft model

NSG mice were placed on a heating pad and intraperitoneally anesthetized with ketamine and xylazine solution. They were placed in the right lateral recumbent position. A 1-cm incision was made in the left upper abdominal wall, followed by a 1-cm incision of the peritoneum to expose the spleen. 1×10^6 TMD8 cells in 30 μ l of PBS were gently injected into the spleen. Mice were monitored for 3 hours after surgery to ensure complete recovery.

***In vivo* dasatinib assay**

Dasatinib was obtained from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, USA) and resuspended in DMSO. Working solution was prepared with 0.5% HPMC and 0.1% Tween80 in H₂O (vehicle). Dasatinib in DMSO was incorporated in vehicle solution after heating (50°C) and sonication of the solution. Mice were dosed

once daily for two weeks with 10mg/kg of dasatinib or vehicle by intraperitoneal injection.

Immunohistochemistry

Mouse tissues were dissected and fixed in 10% buffered formalin and paraffin-embedded at the histopathology department of Hôpital Lyon Sud (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France). Tissue sections were subjected to hematoxylin-eosin staining using standard procedures.

To perform immunohistochemistry on murine samples, tissue sections were deparaffinized and endogenous peroxidase (HRP) activity was blocked. Immunohistochemistry was performed with antibodies reactive with human B220, Ki67 or with Peanut agglutinin (PNA) followed by species-specific biotinylated secondary antibodies in the presence of avidin–horseradish peroxidase and DAB color substrate on a BenchMark Ultra/Ventana (Roche Diagnostic, Switzerland, Ref 07098740001).

BCR Repertoire Analysis

BCR repertoire analysis of DNA samples by high throughput sequencing were performed by Adaptive Biotechnologies (Seattle, USA) using the mouse immunoSEQ assay. Data obtained by high throughput sequencing were analyzed with Adaptive Biotechnologies immunoSEQ analyzer proprietary software. 100 major clones were selected and represented as histogram; percentage is the representativity of the major clone over 100.

Western Blot and immunoprecipitation analysis

Western blot analysis were performed after cell lysis using cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Switzerland) with freshly added phosphatase inhibitor cocktails (Sigma Aldrich, USA). For immunoblot detection, refer to antibodies table.

For immunoprecipitations assays, transfected HEK293T cells were lysed using ice-cold non-denaturing lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA pH 8, 0.5% NP-40) supplemented with a protease-phosphatase inhibitor cocktail (120 µg/ml aprotinin, 120 µg/ml leupeptin, 120 µg/ml Soybean Trypsin Inhibitor, 120 µg/ml benzamidine, 120 µg/ml Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride, 120 µg/ml Tosyl-Phenyl-anlanyl-Chlormethyl-Ketone), then sonicated with 10 pulses (Duty cycle : 20 ; Output Control : 3) and centrifugated at 14,000 × g for 10 min at 4 °C to remove insoluble material. V5-BTG1, HA-BTG1 and BCAR1 were immunoprecipitated from 3 mg of cell lysate by incubation for 2h at 4 °C with 5µl of antibody previously crosslinked to 150µl of Protein-A Magnetic Beads (Bio-Rad, USA). Beads were washed 3 times with 1 ml of PBS-Tween 0.1%, then eluted with 20mM Glycine pH 2 buffer. Protein concentrations of the clarified cell lysates were measured using BiCinchoninic acid Assay quantification kit (Interchim, France).

Detection of active RAC1

The activation of RAC1 was assessed by Active RAC1 Detection Kit (#8815, Cell Signaling Technology, USA) according to the manufacturer's instruction. Briefly, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed with lysis buffer containing freshly added phenylmethanesulfonylfluoride 1mM (PMSF, #8553, Cell Signaling Technology, USA) on ice for 5 min. After centrifugation at

16 000 × g for 15 min at 4 °C, the supernatant was mixed with GST-PAK1-PBD/glutathione resins and incubated at 4 °C for 1 h. Then the resin was washed three times with 1× cell lysis/binding/wash buffer. The resin-bound GTP-RAC1 was eluted with 2× SDS sample buffer containing 200 mM dithiothreitol followed by western blot analysis with a mouse against human RAC1 mAb (#8631, 1:1000, Cell Signaling Technology, USA). Total RAC1 in cell lysate was determined by western blotting.

Mass Spectrometry analysis

Analysis was performed by the Protein Science Facility of SFR BioSciences (CNRS UAR 3444, Inserm US8, Lyon, France). Samples were reduced, alkylated, and then digested with trypsin at 37°C overnight. They were desalted on spin column C18, dried and then analyzed in triplicate using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose California) coupled on line with a Q-Orbitrap (Q Exactive HF, Thermo Scientific, San Jose California). Briefly, peptides were separated on a C18 nano-column with a linear gradient of acetonitrile and analyzed in a Top 20 HCD (Higher Collision Dissociation) data-dependent mass spectrometry. Data were processed by database searching using Sequest HT (Thermo Scientific) with Proteome Discoverer 2.4 software (Thermo Scientific) against a human Swissprot database and quantified with a label free quantitation approach. Precursor and fragment mass tolerance were set at 10 ppm and 0.02 Da respectively. Trypsin was set as enzyme, and up to 2 missed cleavages were allowed. Oxidation (M), acetylation (Protein N-terminus) were set as variable modification, and Carbamidomethylation (C) as fixed modification. Peptides were filtered with false discovery rate (FDR) at 1%.

Fibronectin coating and cell migration

Bovine fibronectin (Sigma-Aldrich, France) was prepared as working solutions following the manufacturer's instructions. For pre-coating purposes, the well plates were incubated with 40 μL of the working solution for fibronectin (final concentration of $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$), collagen ($100\mu\text{l}/\text{cm}^2$) and poly-L-lysine (final concentration of 0.1% in H_2O). After 2 hours of incubation, the supernatant was removed, and the wells were air-dried. Once coated, depending on the experiment, between 40 000 and 1 000 000 cells were seeded.

For the migration experiments, cells were seeded on $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin coated wells and acquired from 1 to 3 hours every minute using an inverted microscope Zeiss Observer at 37°C . Migration speed was measured using spot detector and tracking plugin on ImageJ software and validated by manual counting. Experiments were performed with the help of the BioMecan'IC facility (Institut Cochin, Paris).

xCELLigence system

Fifty microliters of cell culture medium were added to each well for the impedance background measurement (Xcelligence, Agilent, USA). After adding the cells and/or drugs, the final volume was 200 μL . The E-Plates were incubated at 37°C with 5% CO_2 and monitored on the RTCA (real time cell analysis) system at 1 minute time intervals for 5 to 10 hours with or without treatment. When indicated, wells were coated with $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin bovine.

Immunostaining

For antibody staining, cells on glass coverslips coated with fibronectin ($3\mu\text{g}/\text{cm}^2$) were fixed with 4% formaldehyde in PBS for 10 min at 37°C to avoid rapid cell

membrane/filopodia retraction. Cells were permeabilized with 0.5% Triton in PBS for 5 min, blocked with 3% bovine serum albumin for 45 min, and labeled with phalloidin for 45 min at room temperature. After staining, cells were labelled with Hoechst for 2 minutes. After being washed, coverslips were mounted with Fluoromount (Thermo Fisher Scientific, USA). Cells were observed on inverted microscope Leica DMI6000 (40x and 63x) or inverted microscope Zeiss Observer.Z1 (40x or 100x).

Antibodies table

Anti-human antibodies	Source	Identifier
Rabbit anti-Phospho BCAR1-	Cell signaling	Cat# 4011
Rabbit anti-BCAR1	Cell signaling	Cat# 13846
Mouse anti-Rac1	Cell signaling	Cat# 8631
Mouse anti-BTG1	Santa Cruz	Cat# sc-81207
Mouse anti-BTG2	Santa Cruz	Cat# sc-517187
Antibodies	Source	Identifier
Mouse anti- β -Actin	Cell signaling	Cat#3700
Mouse anti-HA tag	Cell signaling	Cat# 2367
Mouse anti-V5 tag	Cell signaling	Cat# 80076
Anti-mouse antibodies	Source	Identifier
Hamster CD95-PE CF594	BD bioscience	Cat# 562499
Rat GL7-BV421	BD bioscience	Cat# 562967
Rat B220-APC Cy7	BD bioscience	Cat# 552094
Rat CD4-PE	BD bioscience	Cat# 557308
Rat CD8-BV786	BD bioscience	Cat#563332
Rat CD19-APC Cy7	BD bioscience	Cat# 557655

Rat Cd138-APC	BD bioscience	Cat# 558626
Rat CD21-FITC	Biolegend	Cat# 123408
Rat CD23-PE	BD bioscience	Cat# 553139
Hamster CD3-PE CF594	BD bioscience	Cat# 562332
Rat Thy1-PE Cy7	Biolegend	Cat# 140310
Rat CXCR5-FITC	Biolegend	Cat# 145519
Rat PD1-APC	Biolegend	Cat# 109111

REFERENCES

Alizadeh, A.A., Elsen, M.B., Davis, R.E., Ma, C.L., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* *403*, 503–511.

Almasmoum, H.A., Airhihen, B., Seedhouse, C., and Winkler, G.S. (2020). Frequent loss of BTG1 activity and impaired interactions with the Caf1 subunit of the Ccr4–Not deadenylase in non-Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* *0*, 1–10.

Amin, A.D., Peters, T.L., Li, L., Rajan, S.S., Choudhari, R., Puvvada, S.D., and Schatz, J.H. (2017). Diffuse large B-cell lymphoma: can genomics improve treatment options for a curable cancer? *Mol. Case Stud.* *3*, a001719.

Berthet, C., Guéhenneux, F., Revol, V., Samarut, C., Lukaszewicz, A., Dehay, C., Dumontet, C., Magaud, J.-P., and Rouault, J.-P. (2002). Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. *Genes Cells* *7*, 29–39.

Bosch, R., Moreno, M.J., Dieguez-Gonzalez, R., Céspedes, M.V., Gallardo, A., Trias, M., Grañena, A., Sierra, J., Casanova, I., and Manges, R. (2013). A novel orally available inhibitor of focal adhesion signaling increases survival in a xenograft model of diffuse large B-cell lymphoma with central nervous system involvement. *Haematologica* *98*, 1242–1249.

Cabodi, S., Del Pilar Camacho-Leal, M., Di Stefano, P., and Defilippi, P. (2010a). Integrin signalling adaptors: Not only figurants in the cancer story. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 858–870.

Cabodi, S., Tinnirello, A., Bisaro, B., Tornillo, G., Camacho-Leal, M.D.P., Forni, G., Cojoca, R., Iezzi, M., Amici, A., Montani, M., et al. (2010b). p130Cas is an essential

transducer element in ErbB2 transformation. *FASEB J.* 24, 3796–3808.

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., et al. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat. Med.* 24, 679–690.

Davies, A., Cummin, T.E., Barrans, S., Maishman, T., Mamot, C., Novak, U., Caddy, J., Stanton, L., Kazmi-Stokes, S., McMillan, A., et al. (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. *Lancet Oncol.* 20, 649–662.

Davis, R.E., Ngo, V.N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R.M., Romesser, P.B., Kohlhammer, H., Lamy, L., Zhao, H., Yang, Y., et al. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463, 88–92.

Duke, J.L., Liu, M., Yaari, G., Khalil, A.M., Tomayko, M., Shlomchik, M.J., Schatz, D.G., Kleinstein, S.H., Shlomchik, M.J., Schatz, D.G., et al. (2013). Multiple Transcription Factor Binding Sites Predict AID Targeting in Non-Ig Genes. *J. Immunol.*

Egle, A., Harris, A.W., Bath, M.L., O'Reilly, L., Cory, S., van Ommen, G.J., Schuurin, E., and Kluin, P.M. (2004). VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood* 103, 2276–2283.

Farioli-Vecchioli, S., Micheli, L., Saraulli, D., Ceccarelli, M., Cannas, S., Scardigli, R., Leonardi, L., Cinà, I., Costanzi, M., Ciotti, M.T., et al. (2012). Btg1 is required to maintain the pool of stem and progenitor cells of the dentate gyrus and subventricular zone. *Front. Neurosci.* 6, 1–19.

Frecha, C., Costa, C., Lévy, C., Nègre, D., Russell, S.J., Maisner, A., Salles, G., Peng,

K.W., Cosset, F.L., and Verhoeven, E. (2009). Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood* *114*, 3173–3180.

Hunter, Z.R., Xu, L., Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Manning, R.J., Tripsas, C., Patterson, C.J., Sheehy, P., et al. (2014). The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* *123*, 1637–1646.

Jacquemet, G., Hamidi, H., and Ivaska, J. (2015). Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* *36*, 23–31.

Jacquemet, G., Stubb, A., Saup, R., Miihkinen, M., Kremneva, E., Hamidi, H., and Ivaska, J. (2019). Filopodome Mapping Identifies p130Cas as a Mechanosensitive Regulator of Filopodia Stability. *Curr. Biol.* *29*, 202-216.e7.

Kotaki, R., Kawashima, M., Yamamoto, Y., Higuchi, H., Nagashima, E., Kurosaki, N., Takamatsu, M., Kikuti, Y.Y., Imadome, K.I., Nakamura, N., et al. (2020). Dasatinib exacerbates splenomegaly of mice inoculated with Epstein-Barr virus-infected lymphoblastoid cell lines. *Sci. Rep.* *10*, 1–12.

Kurtz, D.M., Soo, J., Co Ting Keh, L., Alig, S., Chabon, J.J., Sworder, B.J., Schultz, A., Jin, M.C., Scherer, F., Garofalo, A., et al. (2021). Enhanced detection of minimal residual disease by targeted sequencing of phased variants in circulating tumor DNA. *Nat. Biotechnol.*

Lim, I.K., Choi, J.A., Kim, E.Y., Kim, B.N., Jang, S., Ryu, M.S., and Shim, S.H. (2017). TIS21/BTG2 inhibits doxorubicin-induced stress fiber-vimentin networks via Nox4-ROS-ABI2-DRF-linked signal cascade. *Cell. Signal.* *30*, 179–190.

Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1

protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **271**, 15034–15044.

Matsuda, S., Rouault, J.-P., Magaud, J.-P., and Berthet, C. (2001). In search of a function for the TIS21 / PC3 / BTG1 / TOB family. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **497**, 67–72.

Matsui, H., Harada, I., and Sawada, Y. (2012). Src, p130Cas, and Mechanotransduction in Cancer Cells. *Genes and Cancer* **3**, 394–401.

Mauxion, F., Chen, C.Y.A., Séraphin, B., and Shyu, A. Bin (2009). BTG/TOB factors impact deadenylases. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 640–647.

Ogilvy, S., Metcalf, D., Print, C.G., Bath, M.L., Harris, A.W., and Adams, J.M. (1999). Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14943–14948.

Ortega-Molina, A., Boss, I.W., Canela, A., Pan, H., Jiang, Y., Zhao, C., Jiang, M., Hu, D., Agirre, X., Niesvizky, I., et al. (2015). The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat. Med.* **21**, 1199–1208.

Pasqualucci, L., Dominguez-Sola, D., Chiarenza, A., Fabbri, G., Grunn, A., Trifonov, V., Kasper, L.H., Lerach, S., Tang, H., Ma, J., et al. (2011). Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* **471**, 189–196.

Rouault, J.P., Rimokh, R., Tessa, C., Paranhos, G., Ffrench, M., Duret, L., Garoccio, M., Germain, D., Samarut, J., and Magaud, J.P. (1992). BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J.* **11**, 1663–1670.

Rouault, J.P., Prévôt, D., Berthet, C., Birott, A.M., Billaud, M., Magaud, J.P., and Corbo, L. (1998). Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 gene products

with mCaf1, the murine homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional regulatory complex. *J. Biol. Chem.* *273*, 22563–22569.

Scheijen, B., Boer, J.M., Marke, R., Tijchon, E., van Ingen Schenau, D., Waanders, E., van Emst, L., van der Meer, L.T., Pieters, R., Escherich, G., et al. (2017). Tumor suppressors BTG1 and IKZF1 cooperate during mouse leukemia development and increase relapse risk in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients. *Haematologica* *102*, 541–551.

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., et al. (2018). Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* *378*, 1396–1407.

Scuoppo, C., Wang, J., Persaud, M., Mittan, S.K., Basso, K., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Inghirami, G., Grandori, C., Bosch, F., et al. (2019). Repurposing dasatinib for diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 16981–16986.

Sehn, L.H., and Salles, G. (2021). Diffuse large B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* *384*, 842–858.

Sharma, A., and Mayer, B.J. (2008). Phosphorylation of p130Cas initiates Rac activation and membrane ruffling. *BMC Cell Biol.* *9*, 1–15.

Sun, G., Cheng, S.Y.S., Chen, M., Lim, C.J., and Pallen, C.J. (2012). Protein Tyrosine Phosphatase α Phosphotyrosyl-789 Binds BCAR3 To Position Cas for Activation at Integrin-Mediated Focal Adhesions. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 3776–3789.

Tijchon, E., van Emst, L., Yuniati, L., van Ingen Schenau, D., Havinga, J., Rouault, J.-P., Hoogerbrugge, P.M., van Leeuwen, F.N., and Scheijen, B. (2016). Tumor suppressors BTG1 and BTG2 regulate early mouse B-cell development. *Haematologica* *101*, e272–e276.

Tohda, S., Sato, T., Kogoshi, H., Fu, L., Sakano, S., and Nara, N. (2006). Establishment of a novel B-cell lymphoma cell line with suppressed growth by gamma-secretase inhibitors. *30*, 1385–1390.

Tokheim, C.J., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Karchin, R. (2016). Evaluating the evaluation of cancer driver genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 14330–14335.

Umakanthan, J.M., Iqbal, J., Batlevi, C.L., Bouska, A., Smith, L.M., Shostrom, V., Nutsch, H., William, B.M., Gregory Bociek, R., Lunning, M., et al. (2019). Phase I/II study of dasatinib and exploratory genomic analysis in relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* *184*, 744–752.

Venturutti, L., Teater, M., Zhai, A., Chadburn, A., Babiker, L., Kim, D., Béguelin, W., Lee, T.C., Kim, Y., Chin, C.R., et al. (2020). TBL1XR1 Mutations Drive Extranodal Lymphoma by Inducing a Pro-tumorigenic Memory Fate. *Cell* *182*, 297-316.e27.

Waanders, E., Scheijen, B., van der Meer, L.T., van Reijmersdal, S. V., van Emst, L., Kroeze, Y., Sonneveld, E., Hoogerbrugge, P.M., van Kessel, A.G., van Leeuwen, F.N., et al. (2012). The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet.* *8*.

Winkler, G.S. (2010). The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family. *J. Cell. Physiol.* *222*, 66–72.

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., et al. (2020). A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell* *37*, 551-568.e14.

Yang, Y., Shaffer, A.L., Emre, N.C.T., Ceribelli, M., Zhang, M., Wright, G., Xiao, W.,

Powell, J., Platig, J., Kohlhammer, H., et al. (2012). Exploiting Synthetic Lethality for the Therapy of ABC Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* 21, 723–737.

Younes, A., Sehn, L.H., Johnson, P., Zinzani, P.L., Hong, X., Zhu, J., Patti, C., Belada, D., Samoilova, O., Suh, C., et al. (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. *J. Clin. Oncol.* 37, 1285–1295.

Yuniati, L., Scheijen, B., van der Meer, L.T., and van Leeuwen, F.N. (2019). Tumor suppressors BTG1 and BTG2: Beyond growth control. *J. Cell. Physiol.* 234, 5379–5389.

SUPPLEMENTAL FIGURES

FIGURE S1

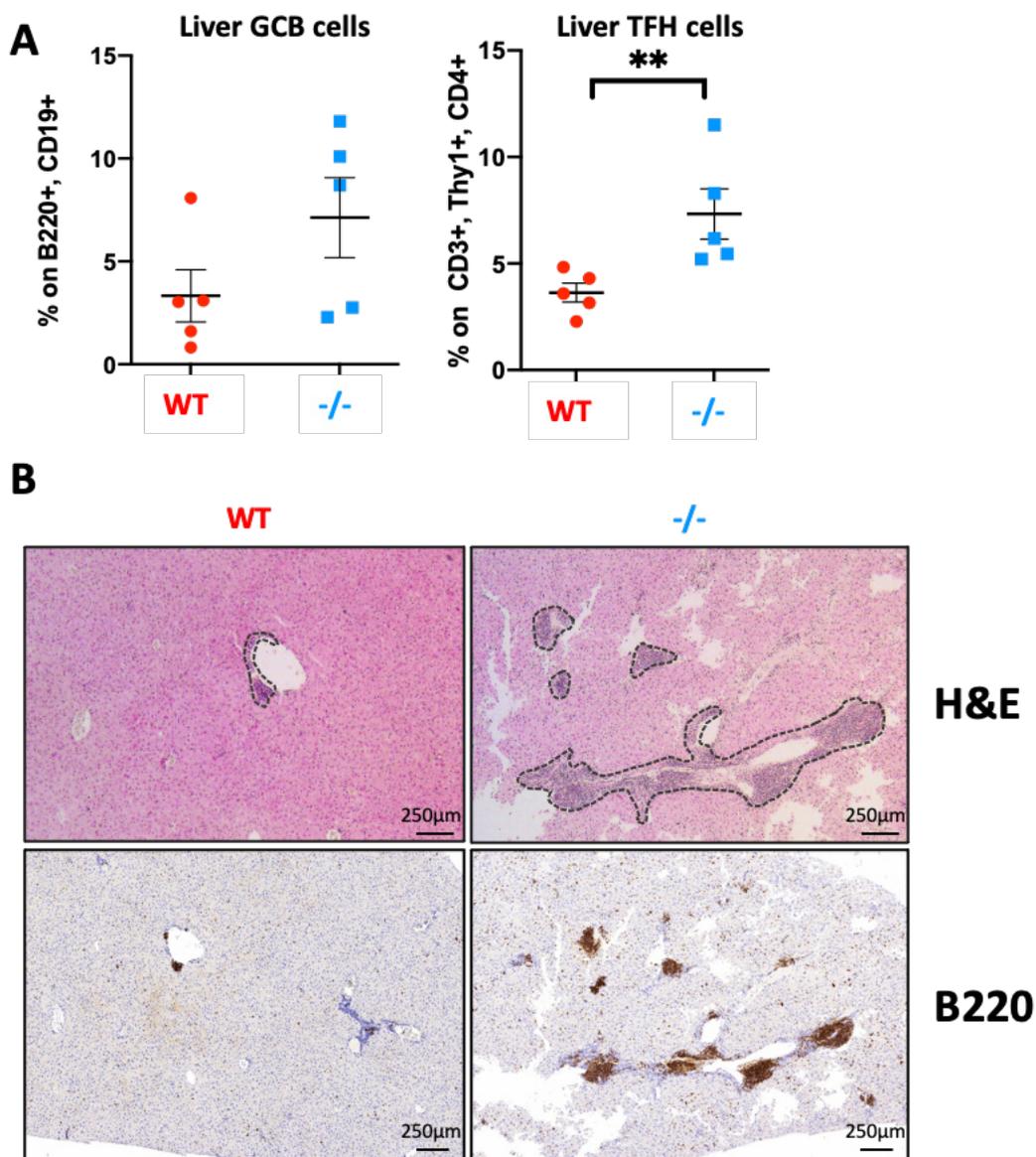


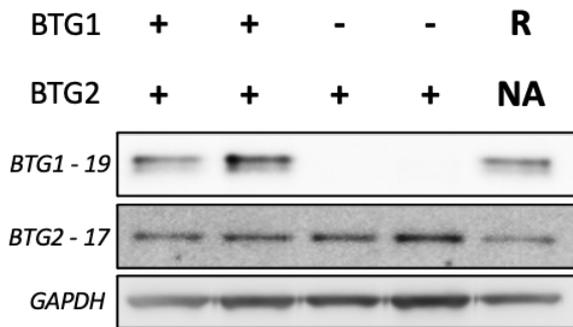
Figure S1 : BTG1 inactivation is a driver of lymphomagenesis.

(A) Flow cytometry analysis of GCB (gated on B220+, CD19+, CD95+, GL7+) cells and TFH (gated on CD3+, Thy1+, CD4+, CXCR5+, PD1+) cells in mice liver (n=5, p=0.0079)

(B) H&E and B220 staining of representative liver sections from VaVP-BCL2 *Btg1*^{-/-} or *Btg1*^{WT} recipients (x25)

FIGURE S2

A



B

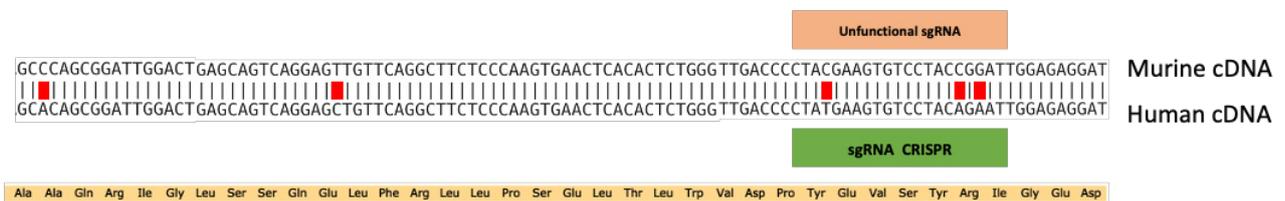


Figure S2 : *BTG1* inactivation promotes lymphoma dissemination.

- (A)** Western Blot analysis of BTG1 and BTG2 expression in TMD8 *BTG1*^{WT} (non targeting sgRNA 1 and 2), *BTG1*^{-/-} (sgRNA 3 and 4), and *BTG1*^{Rescue} (sgRNA 3 and murine *Btg1* cDNA overexpression)
- (B)** Representation of murine and human BTG1 cDNA differences, with display of recognition site of BTG1 CRISPR guides. SgRNA (ctatgaagtgtcctacagaa) is only specific of human *BTG1* DNA and is not functional on murine *Btg1* DNA.

FIGURE S3

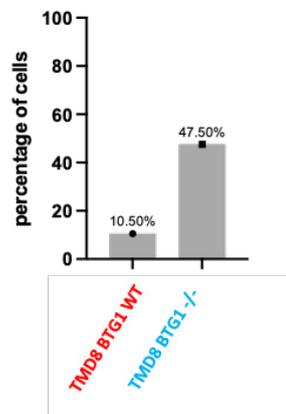
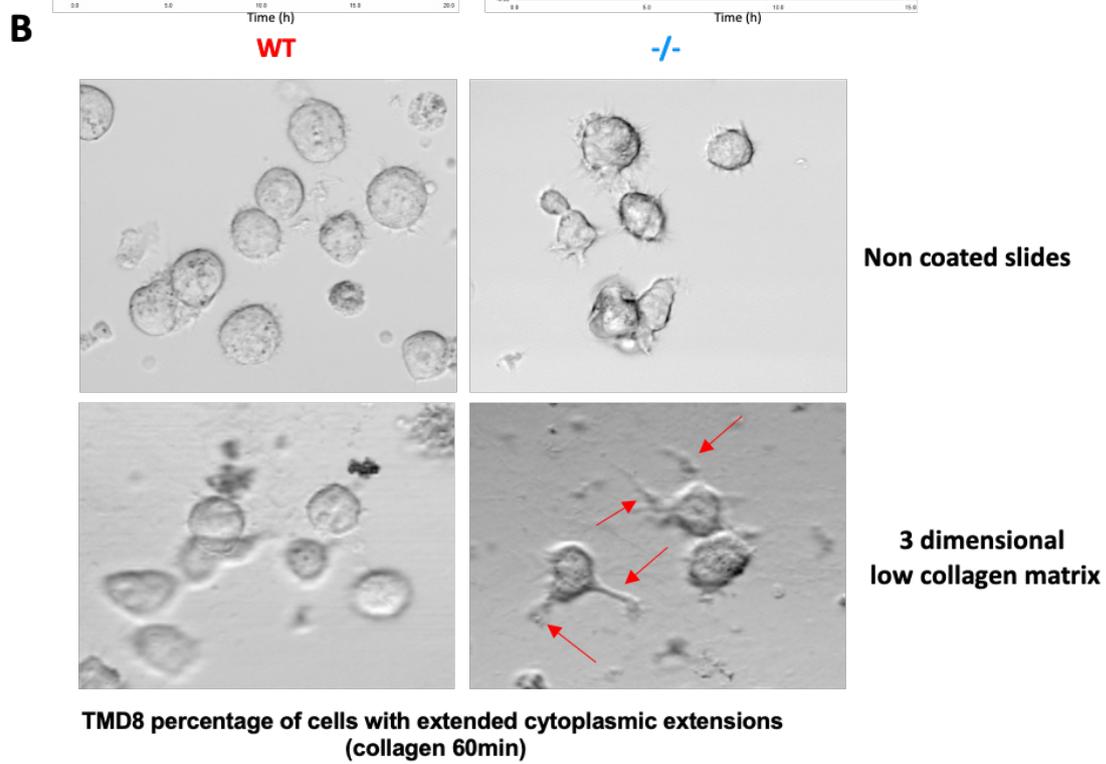
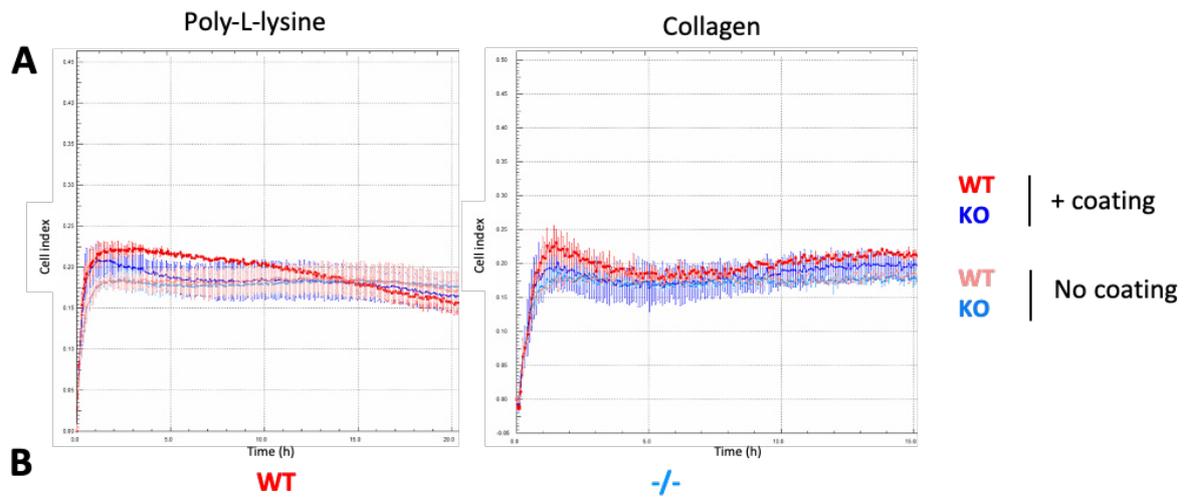


Figure S3 : *BTG1* inactivation modifies cells adhesion and migration capacities.

- (A)** Measurement of the evolution of resistivity estimated by the Cell index (Xcelligence) after addition of TMD8 *BTG1*^{-/-} (blue), TMD8 *BTG1*^{WT} (red) on Poly-L-lysine or collagen coated or uncoated (light color) wells.
- (B)** Capture of live imaging of TMD8 *BTG1* WT or *BTG1*^{-/-} cells on non-coated or coated collagen 3-dimensional matrix (10% RPMI, 60 minutes), and quantification of the percentage of cells harboring cytoplasmic extensions over the course of the experiment.

Table S1

Gene	Abundance ratio (BTG1/Ctrl)	Number of peptides	Abundance p. value
BCAR1	6,029	47	5,4621E-05
ARPC5L	4,888	4	0,00053749
GLG1	3,773	8	0,00589736
C1QBP	3,536	5	0,00999261
RPLP1	3,248	3	0,01911425
BCAR3	3,237	30	0,01958289
LAMTOR5	3,191	3	0,02171381
CALM3	3,168	11	0,02289979
LAMTOR1	3,127	3	0,02512554
MARCKSL1	3,097	9	0,02685749
GNB4	3,09	12	0,02731087
BTG1	3,047	8	0,03010026
HSPE1	2,944	10	0,03800662
GNAQ	2,802	9	0,0524676
TMEM43	2,722	18	0,06291283
TOMM22	2,638	5	0,07590362
PSMD11	2,621	3	0,07901809
GNB1	2,587	19	0,08531216
LIN7A	2,568	3	0,08888517
ATP6V0A1	2,517	12	0,09975154
GLB1	2,47	5	0,11087726
STMN1	2,457	4	0,11397072
GNB2	2,439	21	0,11881969
RAP1B	2,404	10	0,12828386
TTC7B	2,401	7	0,12912079
CKB	2,396	6	0,13070445
RHOA	2,388	5	0,13299237
PSMD1	2,37	3	0,13846112
BASP1	2,342	19	0,14725468
GLIPR2	2,341	5	0,14757078
OGDH	2,293	4	0,16420607
RALB	2,279	15	0,16937478
PGD	2,276	3	0,17036206
PRDX4	2,257	4	0,17764783
ATP6V0D1	2,237	3	0,18583709
CD59	2,234	5	0,18694767
DLD	2,222	6	0,1918192
CCT8	2,214	13	0,19509178
FARSB	2,21	3	0,19674727
EPHA2	2,209	5	0,19732873
PARK7	2,196	3	0,20290257
PTPLAD1; HACD3	2,189	11	0,20617435
GNAO1	2,187	15	0,20691574
MLLT4; AFDN	2,165	4	0,21737935
STOML2	2,161	12	0,21906549
SNAP23	2,154	6	0,22229071
RALA	2,146	17	0,22650383
GPI	2,14	3	0,22948436
EIF5A	2,138	5	0,23000645
GAN	2,136	7	0,23144111
PDIA3	2,134	15	0,23245395
PHB	2,132	15	0,23339408
HIST1H1D	2,122	12	0,2383946
FMNL2	2,122	6	0,23832849
TP11	2,112	15	0,24358802
KTN1	2,098	6	0,25098497
CSDA; YBX3	2,094	4	0,25283127
ILF3	2,088	8	0,25632241
LZTS2	2,077	18	0,26236499
GNAS	2,069	12	0,266812
CASK	2,067	4	0,26795222
CDC42	2,062	8	0,27094579
RPLP2	2,061	9	0,27154272
HADHA	2,059	28	0,27286217
GNA11	2,058	13	0,27333006
HADHB	2,056	14	0,27477712
NONO	2,055	18	0,27516988
AP2M1	2,052	3	0,27678242
PALM	2,051	3	0,27733755
GNAI1	2,05	23	0,27817164
POTEJ	2,043	15	0,28189264
STIP1	2,037	5	0,28594689
HNRNPAB	2,036	3	0,28670933
EFR3A	2,029	10	0,29094084
CNP	2,029	5	0,29050861
CCT7	2,024	15	0,29404046
CFL1	2,018	6	0,29779762
FLOT1	2,013	28	0,30044123
CACNA2D1	2,011	8	0,30207466
LDHB	2,007	11	0,30421727
KRAS	2,005	5	0,30606183
SSBP1	2,004	9	0,30639318
PSMA6	2,002	4	0,30778932

(A) List of proteins identified after anti-HA immunoprecipitation in HEK293T cells transfected with HA-*BTG1* or HA-control plasmid by abundance ratio with BTG1/GFP abundance >2.

Seconde partie de résultats – Demande de brevet

Au cours de l'étude de l'impact de *BTG1* dans la lymphomagenèse, et après la découverte de sa localisation mitochondriale, que nous détaillerons dans la partie discussion de ce manuscrit, nous avons cherché des vulnérabilités thérapeutiques dirigées contre les lymphomes ayant une inactivation de *BTG1* en suivant une stratégie de repositionnement de molécules pharmaceutiques.

Nous avons axé une partie du projet sur l'étude des protéines anti-apoptotiques mitochondriales. Pour cela, nous avons réalisé une étude de « BH3 profiling », qui consiste à tester l'impact de plusieurs peptides inhibiteurs spécifiques des protéines de la famille BCL2 sur les mitochondries. En conditions de stress, les protéines BAX et BAK forment des pores au niveau de la membrane mitochondriale et permettent le relargage du cytochrome C, entraînant l'apoptose. MCL-1 peut alors être recrutée à la membrane et se lier à ces protéines pour empêcher la formation de ces pores et inhiber l'apoptose (Del Gaizo Moore & Letai, 2013). Nous avons observé une augmentation nette de la dépolarisation membranaire des mitochondries des cellules *BTG1* KO par rapport aux cellules WT et Rescue, lorsque les mitochondries sont mises en contact de peptides inhibant spécifiquement la protéine MCL-1 que sont NOXAA, MS1 et MS3. Il n'y a pas de différence de dépolarisation lorsque l'on s'intéresse aux peptides qui ciblent plusieurs protéines (PUMA2A, BIM...) (Voir brevet, figure 2A).

La demande de brevet ci-après propose l'utilisation d'inhibiteur spécifique de MCL-1 dans le traitement de cancers mutés ou inactivés pour *BTG1*.

Demande de brevet numéro EP 21 306 400

Résumé

MÉTHODES POUR PRÉVOIR ET AMÉLIORER L'EFFICACITÉ DE LA THÉRAPIE PAR INHIBITEUR DE MCL-1

En étudiant l'impact de l'inactivation de *BTG1* dans le lymphome, les inventeurs ont démontré son rôle en tant que *driver* de la lymphomagenèse dans un modèle murin. Ils ont également décrit les conséquences phénotypiques de l'inactivation de *BTG1* dans des lignées cellulaires de lymphome humain. En particulier, ils ont démontré que l'inactivation de *BTG1* est associée à une sensibilité accrue à l'inhibition de MCL-1, ce qui ouvre la voie au développement d'un traitement personnalisé pour les patients atteints de lymphomes mutés pour *BTG1* et de cancers comportant une inactivation de *BTG1*.

METHODS FOR PREDICTING AND IMPROVING THE EFFICACY OF MCL-1 INHIBITOR THERAPY

Patent Application EP 21 306 400

FIELD OF THE INVENTION:

The present invention is in the field of medicine, in particular oncology, to predict and improving the efficacy of MCL-1 inhibitor therapies.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

BTG1 is a highly conserved gene, which acts as a tumour suppressor gene in B-cell acute lymphoblastic leukaemia (Rouault et al., 1992; Waanders et al., 2012). The functions of this gene are poorly understood, except for its interactions with members of the mRNA de-adenylation complex (Rouault et al., 1998), and with the arginine methyltransferase PRMT1 (Berthet et al., 2002; Lin et al., 1996).

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common subtype of lymphoma. Around two thirds of the patients can be cured with intensive chemotherapy, but this disease remains an unmet medical need for unfit patients or patients with relapse/refractory disease. In the recent years, genomic studies have defined molecular subgroups of clinical significance (Chapuy et al., 2018; Schmitz et al., 2018). Among them, the MCD/C5 subtype, characterized by *MYD88* L265P and *CD79B* mutations is associated with extra nodal involvement, and very poor prognosis with immunochemotherapy. Interestingly, this subtype is especially enriched in mutations of *BTG1* (40% of the patients). Many observations support the hypothesis of a driver role of *BTG1* mutations : 1/ most

of the missense mutations tested have functional consequences on the capacity of BTG1 to interact with its partner CAF1 (Almasmoum et al., 2020), 2/ around 15% of mutations are truncating mutations predicted to have a strong impact on protein functions, 3/ *BTG1* mutations are highly enriched in post-germinal center derived lymphomas (DLBCL-ABC), and *BTG1* deletions are highly prevalent in Waldenström macroglobulinemia (another lymphoma derived from post-GC B cells)(Hunter et al., 2014), and 5/ *BTG1* mutations confer a dismal prognosis in DLBCL (Reddy et al., 2017).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

Investigating the impact of *BTG1* inactivation in lymphoma, the Inventors have demonstrated its role as a driver of lymphomagenesis in a murine model. They have also described the phenotypic consequences of *BTG1* inactivation in human lymphoma cell lines. Especially, they have demonstrated that the inactivation of *BTG1* is associated with an increased sensitivity to *MCL-1* inhibition, which paves the way to the development of a personalized treatment for patients with *BTG1* mutated lymphomas.

RESULTS

We have established two cell lines models to study the impact of *BTG1* inactivation. Using the CRISPR/Cas9 system, we have inactivated the *BTG1* gene in the TMD8 cell line (**Figure 1A**) (representative of the MCD/C5 subtype of DLBCL) and in the SUDHL4 cell line (**Figure 1B**) (representative of the GC subtype of DLBCL). In the TMD8 cell line, we have rescued the expression of BTG1 with

murine cDNA, using either a wild type sequence or a sequence with one of three missense mutations observed in patients (**Figure 1C**).

Using BH3 profiling, we have demonstrated in the TMD8 cell line that *BTG1* inactivation creates an exquisite sensitivity to MCL-1 targeting peptides (such as NOXA, MS1 or MS3), and this phenomenon was fully reversed by the rescue of *BTG1* expression. Of note, this differential effect was specific to MCL-1 targeting peptides, and not observed with peptides targeting other members of the BCL2 family (**Figure 2A**). The link between *BTG1* inactivation and increased sensitivity to MCL-1 inhibitors was further confirmed using the chemical inhibitor of MCL-1 S63845, which induces significantly more apoptosis in TMD8 *BTG1* KO cells. Of note, the increase sensitivity to MCL-1 inhibitor was abolished by the expression of *BTG1* WT, but not by the expression of mutated *BTG1* engineered with a missense mutation described in patients (either L26P, G66D or I115V), (**Figure 2B**). We confirmed the link between *BTG1* inactivation and sensitivity to MCL-1 in the SUDHL4 cell line derived from a Germinal Centre DLBCL (**Figure 2C**).

CONCLUSION

Our results demonstrate that the inactivation of *BTG1* creates a specific sensitivity to MCL-1 inhibitors, which suggests that clinical trials of MCL-1 inhibitors could be stratified according to the *BTG1* mutational status of the cancer, where the therapeutic effects might be more pronounced.

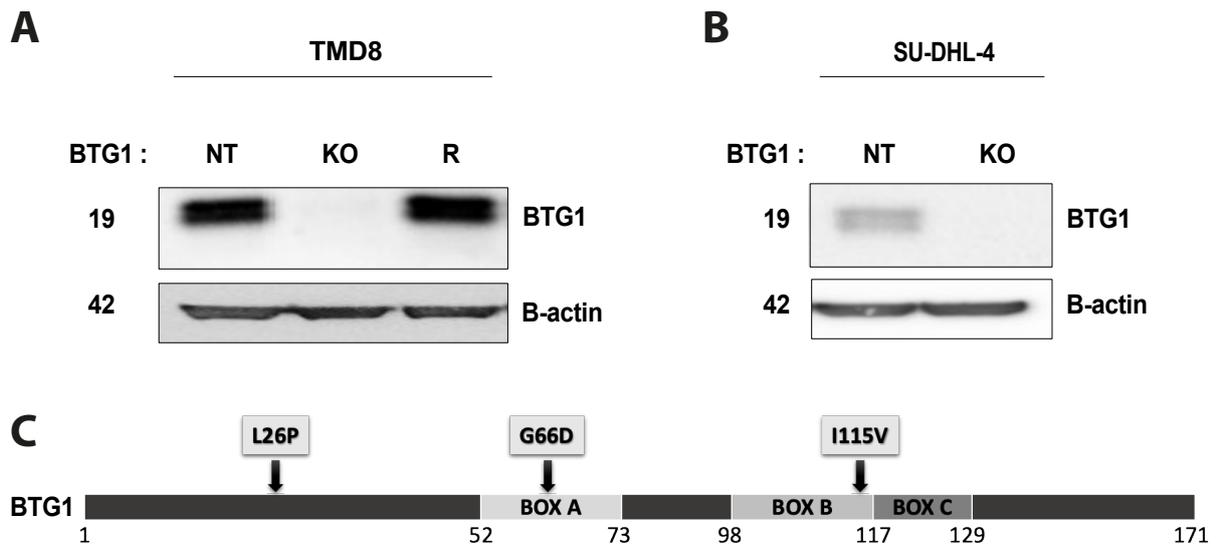


Figure 1: Cellular models of BTG1 inactivation in ABC and GCB lymphoma cell lines. (A) Immunoblot of BTG1 in TMD8 cells, NT = Non-Targeting CRISPR, KO = BTG1 specific CRISPR, R = Re-expression of BTG1 using murine cDNA with 100% protein homology. (B) Immunoblot of BTG1 in SU-DHL-4 cells, NT = Non-Targeting CRISPR, KO = BTG1 specific CRISPR. (C) Representation of BTG1 sequence containing 3 specific boxes, representatives of the BTG family, and the location of the missense mutations.

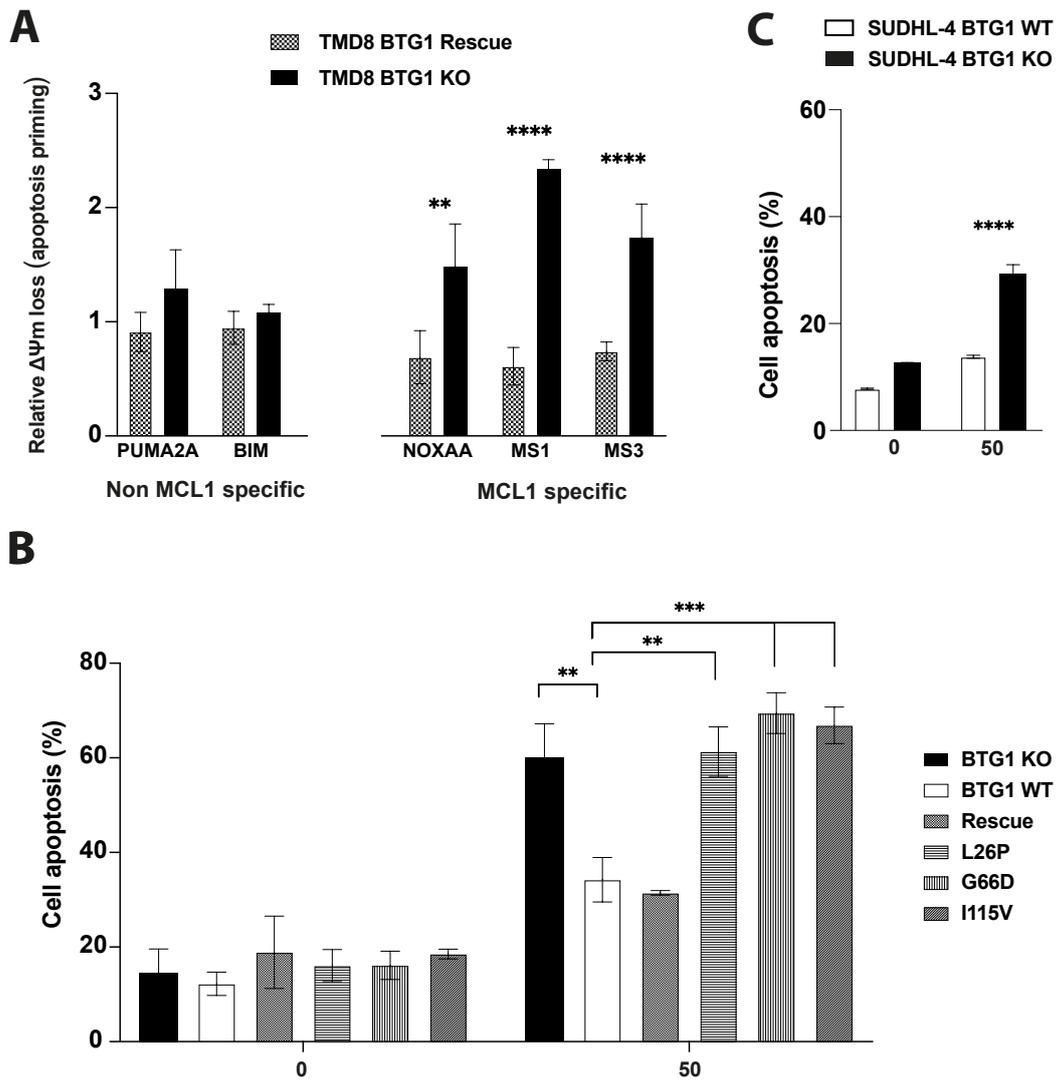


Figure 2: BTG1 inactivation is associated with increased sensitivity to MCL-1 inhibition. (A) Relative mitochondrial membrane potential loss using TMRE measurement (Relative apoptosis priming) of TMD8 BTG1 KO or TMD8 BTG1 KO with rescue as compared to BTG1 WT, after digitonin (5 μ g/ml) and specific BH3 inhibitors treatment (20 μ M each). (B) Proportion of apoptotic cells (Annexin V staining) after 72h exposure to the MCL-1 inhibitor S63845 (0 or 50 nM) in TMD8 BTG1 KO, TMD8 BTG1 WT, TMD8 BTG1 Rescue or TMD8 BTG1 mutated rescues (striped) cell cultures. (C) Proportion of apoptotic cells (Annexin V staining) after

72h exposure to the MCL-1 inhibitor S63845 (0 or 50 nM) in SUDHL-4 BTG1 KO or SUDHL-4 BTG1 WT cell cultures.

Material and Methods

Cell lines

TMD8 and SUDHL-4 were grown in Roswell Park Memorial Institute medium, GlutaMAX Supplement (61870044, Thermofisher), supplemented with 10% FBS, 1% penicillin G/streptomycin. Cells were grown in incubators at 37C, in a 5% CO₂ atmosphere.

Generation of BTG1-KO cell lines

TMD8 and SUDHL-4 expressing cas9 cells were infected using pLKO.1-puro-GFP U6 sgRNA containing BTG1 RNA guides or non-targeting RNA guides (target sequence for BTG1-KO-270: TTCTGTAGGACACTTCATAG (**SEQ ID NO:2**); BTG1-KO-355: AATGGATCCTCTGATTGGAC (**SEQ ID NO:3**); non-Targeting-598: GCAGTACTACTGAGTTTTTC (**SEQ ID NO:4**); non-Targeting-614: GCCTAGTCTCGGTAAGAGTG (**SEQ ID NO:5**)). Cells were selected with puromycin for 7 days, and GFP expression was evaluated with flow cytometry. BTG1 inactivation was validated by Western Blotting after 1 week. BTG1 rescue cell were derived from TMD8 BTG1 KO cells infected with murine BTG1 cDNA (100% protein homology with human) in a mcherry-HIV-based virus. GFP and mcherry positive cells were sorted on a FACS ARIA™ cell sorter (BD biosciences, San Jose, CA).

BH3 profiling

For BH3 profiling, 2×10^5 cells were washed with DTEB buffer (135 mM Trehalose, 20 μ M EDTA, 20 μ M EGTA, 5 mM Succinic Acid, 0.1% BSA, 10 mM HEPES, 50 mM KCl, pH 7.5) and permeabilized with DTEB + 5 μ g/mL digitonin. Loss of mitochondrial membrane potential (ψ_m) was assessed using TMRE (200 nM) after one hour of incubation at 30°C with BH3 peptides as described previously (Del Gaizo Moore & Letai, 2013). TMRE is a cell permeant, positively charged, red-orange dye that readily accumulates in active mitochondria due to their relative negative charge. Depolarized or inactive mitochondria have decreased membrane potential and fail to sequester TMRE. The fluorescence was measured using a MACSQuant[®] Analysers (Miltenyi, France).

In vitro assay of MCL-1 inhibitor

The high affinity MCL-1 specific inhibitor S63845 (Kotschy et al., 2016) was purchased from Selleck Chemical (München, Germany). For in vitro study, it was dissolved in DMSO at a concentration of 1mmol/L. DMSO was also used as a vehicle control in the in vitro study. For cell viability assessment, 100 000 cells were seeded in 24 well plate and incubated for 72h with either S63845 or DMSO. Culture medium was used for further dilutions (typically 5 and 50 nM). For cell viability assessment, cells were stained with Annexin V-APC and propidium iodide, analysed on a FACS LSRII[™] (BD biosciences, San Jose, CA).

REFERENCES:

- Almasmoum, H.A., Airhihen, B., Seedhouse, C., and Winkler, G.S. (2020). Frequent loss of BTG1 activity and impaired interactions with the Caf1 subunit of the Ccr4–Not deadenylase in non-Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 0, 1–10.
- Berthet, C., Guéhenneux, F., Revol, V., Samarut, C., Lukaszewicz, A., Dehay, C., Dumontet, C., Magaud, J.-P., and Rouault, J.-P. (2002). Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. *Genes Cells* 7, 29–39.
- 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., et al. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat. Med.* 24, 679–690.
- Del Gaizo Moore, V., and Letai, A. (2013). BH3 profiling - Measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions. *Cancer Lett.* 332, 202–205.
- Hunter, Z.R., Xu, L., Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Manning, R.J., Tripsas, C., Patterson, C.J., Sheehy, P., et al. (2014). The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* 123, 1637–1646.
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.N., Moujalled, D.M., et al. (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 538, 477–482.
- Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 271, 15034–15044.
- Reddy, A., Zhang, J., Davis, N.S., Moffitt, A.B., Love, C.L., Waldrop, A., Leppa, S., Pasanen, A., Meriranta, L., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., et al. (2017). Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell* 171, 481-494.e15.
- Rouault, J.-P., Prevot, D., Berthet, C., Birot, A.-M., Billaud, M., Magaud, J.-P., and Corbo, L. (1998). Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 Gene Products with mCaf1, the Murine Homolog of a Component of the Yeast CCR4 Transcriptional Regulatory Complex. *J. Biol. Chem.* 273, 22563–22569.
- Rouault, J.P., Rimokh, R., Tessa, C., Paranhos, G., Ffrench, M., Duret, L., Garoccio, M., Germain, D., Samarut, J., and Magaud, J.P. (1992). BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J.* 11, 1663–1670.
- 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., et al. (2018). Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 378, 1396–1407.
- Waanders, E., Scheijen, B., van der Meer, L.T., van Reijmersdal, S. V., van Emst, L., Kroeze, Y., Sonneveld, E., Hoogerbrugge, P.M., van Kessel, A.G., van Leeuwen, F.N., et al. (2012). The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet.* 8.

- *Troisième partie* -
DISCUSSION

L'aspect principal de ce travail a été de déterminer le rôle de l'inactivation de *BTG1* dans la lymphomagenèse B. Dans un premier temps, *in vivo*, en montrant que l'inactivation de *BTG1* entraîne une augmentation de la prolifération de cellules du centre germinatif lors d'une réaction immunitaire, une apparition plus précoce d'un syndrome lymphoprolifératif oligoclonal et aussi une augmentation de la dissémination de lignées de DLBCL humaine. Dans un second temps, *in vitro*, en montrant que l'inactivation de *BTG1* entraînait une migration cellulaire plus rapide avec une augmentation de la taille des filopodes présents à la surface de la cellule. Nous avons par ailleurs montré que cette migration était en partie régulée par l'interaction de *BTG1* avec la protéine *BCAR1*, modulant sa phosphorylation et sa signalisation d'aval, notamment à travers *RAC1-GTP*, fortement impliquée dans la polymérisation de l'actine nécessaire à la migration. D'autre part, nous avançons l'hypothèse thérapeutique d'un ciblage de cette migration induite par l'inactivation de *BTG1* par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique utilisé en clinique, le dasatinib.

Nous avons également pu montrer que dans deux modèles cellulaires de lymphome B (ABC et GCB), l'inactivation de *BTG1* entraîne une hypersensibilité à un traitement par inhibiteur de *MCL-1*, connue pour bloquer l'apoptose induite au niveau mitochondrial. Cette partie fait l'objet d'une demande de brevet.

Au cours de ce travail, nous avons également pu mettre en évidence des modifications du métabolisme mitochondrial et de la biogenèse des mitochondries, liées au statut de *BTG1*. Cette partie n'ayant pas pu être incluse aux résultats précédemment décrits, nous détaillerons les données traitant de la mitochondrie en discussion et les proposerons comme perspectives de prochaines études.

BTG1, un gène driver dans un modèle murin de lymphomagenèse B ?

1) BTG1, un gène driver de la lymphomagenèse B

BTG1 est un gène que l'on retrouve muté à une fréquence assez faible dans les hémopathies prises dans leur ensemble et présente de plus une forte signature de l'activité de la cytidine désaminase induite par activation (AID), ce qui a conduit à avancer qu'il serait un gène *passenger* dans la lymphomagenèse B (Chapuy et al., 2018). Cependant, cette distinction de *passenger* et de *driver* doit être nuancée, vue l'hétérogénéité des algorithmes utilisés pour l'annotation des événements récurrents (Tokheim et al., 2016). Il paraît intéressant d'étudier l'impact fonctionnel de certains gènes classés *passengers*, mais dont la récurrence mutationnelle est particulièrement élevée dans certains sous-types de cancers. C'est d'ailleurs le cas de *BTG1*, qui, bien que muté dans moins de 8% des cas de DLBCL, est muté dans plus de 45% des DLBCL très agressifs de type MCD (Wright et al., 2020) et délété dans 87% des maladies de Waldenström (Hunter et al., 2014). Il est également intéressant de noter que les mutations de *BTG1* sont fortement représentées dans la séquence codante du gène par rapport aux mutations retrouvées dans les régions non traduites (3' et 5' UTR), laissant penser que ces mutations sont sélectionnées et ne sont pas le fruit du hasard.

Nous avons pu montrer que dans un modèle murin de lymphomagenèse B liée à la surexpression de BCL2, l'inactivation de *BTG1* accélère l'apparition des lymphomes, faisant de cette inactivation un événement *driver* de la lymphomagenèse. Plusieurs études ont d'ailleurs montré par le biais de ce

modèle qu'il était nécessaire d'avoir un événement fort conduisant à la lymphoprolifération, ici la surexpression de BCL2, pour apprécier l'effet des mutations d'intérêt, comme cela été décrit pour *KMT2D* (Ortega-Molina et al., 2015; Zhang et al., 2000), *TBL1XR1* (Venturutti et al., 2020) ou *CREBBP* (Jiang et al., 2017). On peut par conséquent penser que les mutations de *BTG1* observées en clinique ne sont pas l'élément déclencheur de la mise en place du lymphome, mais plutôt un événement péjoratif, conduisant peut-être à la dissémination de la maladie. Il a d'ailleurs été décrit l'apparition de mutations de *BTG1* dans deux cas de leucémies lymphoïdes chroniques après traitement au vénétoclax (inhibiteur de BCL2), ce qui semble étayer le fait que les mutations de *BTG1* ne seraient pas un événement initiateur dans cette pathologie (Herling et al., 2018).

2) Avantages et limites du modèle murin *VavP-BCL2*

Une des conclusions de ce travail a été de montrer que l'inactivation de *BTG1 in vivo* accélère la mise en place d'un syndrome lymphoprolifératif oligoclonal et, de ce fait, entraîne la mort des souris plus précocement. Cependant, le choix du modèle murin VaVP-BCL2, qui permet une surexpression de l'oncogène BCL2 dans les compartiments hématopoïétiques, mime plutôt un lymphome de type folliculaire, qui est caractérisé par une translocation t(14,18) avec surexpression de BCL2. On retrouve cependant très fréquemment des gains de chromosomes 18q comportant le gène *BCL2* dans les sous-types MCD/C5, ce qui pourrait tout de même justifier l'utilité de ce modèle dans l'étude de ces DLBCL particulièrement agressifs (Dierlamm et al., 2008). On notera aussi que ce modèle, bien qu'imparfait, est largement utilisé dans plusieurs études s'intéressant à la caractérisation de l'effet d'un gène ou d'une mutation sur la

lymphomagenèse B, mais qu'il apparaît souvent nécessaire de transplanter les progéniteurs hématopoïétiques dans des souris receveuses irradiées pour accélérer l'apparition du lymphome, comme ce qui est fait dans l'étude de *KMT2D*, *TBL1XR1* ou *CREBBP* (Egle et al., 2004; Jiang et al., 2017; Ortega-Molina et al., 2015; Venturutti et al., 2020). Il est également fréquent d'immuniser ces animaux avec des globules rouges de mouton, pour augmenter la réaction des centres germinatifs et accélérer la mise en place du lymphome (Venturutti et al., 2020). Dans notre modèle, nous avons privilégié la transplantation de progéniteurs hématopoïétiques sans immunisation ; cependant il est possible que cette immunisation accélère le développement du lymphome, voire conduise à la mise en place d'un type de lymphome différent.

Dans ces modèles murins de lymphomagenèse, la plupart des études qualifient de « lymphome » l'atteinte des souris VaVP-BCL2. Cependant, bien que l'on observe la plupart du temps une hépato-splénomégalie nette, les études de clonalité du répertoire BCR, effectuées sur ces animaux, montrent une très forte hétérogénéité, ce qui va plutôt à l'encontre de la définition d'un lymphome classique et qui irait plus dans le sens d'une simple lymphoprolifération, en l'occurrence médiée par la surexpression de BCL2.

Pour parfaire ces études, il serait possible d'utiliser d'autres modèles permettant d'obtenir un lymphome plus proche d'un DLBCL, tel que le modèle $E\mu$ -myc. Cependant, il a été montré que ce modèle présente une importante hétérogénéité en termes de développement de la maladie. En effet, il semblerait que la grande majorité des lymphomes issus du modèle $E\mu$ -myc se développent très précocement, autour de 30 - 40 jours, et ressembleraient à des lymphomes de Burkitt, initiés par des cellules B immatures, alors que d'autres lymphomes, moins nombreux, se développeraient bien plus tard, avec plus d'un an de délai

et ressembleraient, pour leur part, plus à des lymphomes B diffus à grandes cellules, mis en place ici à partir de cellules B matures (Mori et al., 2008). Cette cinétique de développement des lymphomes, avec ou non une inactivation de *BTG1*, aurait pu nous permettre d'observer l'apparition d'un lymphome différent de ce que nous avons noté avec le modèle VaVP-BCL2.

Il existe de nombreux modèles murins permettant d'obtenir des lymphomes divers (Figure 22), dont le modèle $E\mu$ -BRD2, qui, lui, permet d'obtenir des lymphoproliférations monoclonales, mais comme le modèle $E\mu$ -myc, présente une cinétique d'apparition du lymphome très rapide, autour de 20-30 jours. Cette mise en place très rapide masquerait probablement l'effet de l'inactivation de *BTG1*, que nous n'avons pu apprécier qu'après 200 jours dans le modèle VaVP-BCL2.

Un modèle récemment décrit, qui serait relevant pour la poursuite de notre étude, serait le modèle murin d'expression de la forme mutée L265P de *MYD88* (L252P chez la souris) (Knittel et al., 2016). Il semble que cette mutation seule n'entraîne pas de développement de lymphome et conduise à une lymphoprolifération comportant des ressemblances avec une maladie de Waldenström (Sewastianik et al., 2019), mais que le croisement de ces souris avec un modèle de surexpression de BCL2 accélère l'apparition de lymphomes oligoclonaux de type ABC. *BTG1* étant fréquemment muté dans les ABC-DLBCL et dans les maladies de Waldenström, avec une forte cooccurrence mutationnelle avec *MYD88*, ce modèle semble très intéressant pour caractériser l'effet d'une possible coopération oncogénique entre *MYD88* L265P et les mutations de *BTG1*.

Name	Lymphoma subtype/origin	Strain (haplotype)
B10 H-2 ^a H-4 ^b _p /Wts	CLL	C57Bl/10 (H-2 ^b)
SL/KH	Pre-B lymphoma	SL/KH (H-2 ¹¹)
E μ -N-myc	Indolent B-NHL	C57Bl/6 x DBA/2 (H-2 ^{b/d})
NFS.V+	Marginal zone lymphoma	NFS.V+ (H-2 ^{sq4})
NMRI/RFB-MuLV	n.d.	NMRI (H-2 ^q)
B6-I-MYC	Burkitt-like lymphoma	C57Bl/6 (H-2 ^b)
VavP-Bcl2	Follicular lymphoma	C57Bl/6 (H-2 ^b)
Lig4/p53 KO	Pro/Pre-B lymphoma	C57Bl/6 x sv129
E μ -BRD2	DLBCL	FVB (H-2 ^q)
Bcl6 Knock in	Germinal center, DLBCL	C57Bl/6 x sv129
Bcl6/Myc transgenic	Post germinal center, DLBCL	C57Bl/6 x sv129
IL-14aTGxc-Myc TG (DTG)	Blastoid variant of mantle-cell lymphoma	C57Bl/6 (H-2 ^b)
Myc/BCR ^{HEL} /HEL	Burkitt-like lymphoma	C57Bl/6 (H-2 ^b)
E μ -myc	From follicular to DLBCL (time dependant)	C57Bl/6 x sv129
RzCD19Cre	NHL, hepatitis C induced	129/Sv (H-2 ^{bc}); BALB/c (H-2 ^d); C57Bl/6 (H-2 ^b)
UVB induced	Mature B-cell lymphoma	C57Bl/6 p53 ^{+/-} (H-2 ^b)

Figure 22: Tableau des principaux modèles murins de lymphomagenèse B avec les équivalences en termes d'origine du lymphome (Donnou et al., 2012).

BCAR1, un nouveau partenaire protéique de BTG1 modulant la migration cellulaire

1) *BTG1 et migration cellulaire*

On sait que *BTG1* est particulièrement muté dans les lymphomes de mauvais pronostic, résistants aux thérapies et associés à des formes extra-ganglionnaires tels que les PCNSL ou les lymphomes testiculaires. Ce travail nous a permis de montrer qu'il est très probable qu'une partie du phénotype de migration extra-ganglionnaire soit due à l'inactivation de *BTG1* et à la sur-activation de la voie de BCAR1 – RAC1. L'étude de l'effet migratoire de l'inactivation de *BTG1* sur des cellules non tumorales permettrait de comprendre si cette inactivation promeut la migration en général, ou si plusieurs éléments supplémentaires mis en place lors de la transformation tumorale sont nécessaires à la modulation de la migration par *BTG1*.

Un des points majeurs de ce travail a été de montrer d'une part, que BCAR1 est un nouveau partenaire protéique de BTG1, et qu'à travers cette interaction, BTG1 est impliqué dans la régulation de la migration cellulaire, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Nous avons pu étudier *in vitro* cet aspect migratoire des cellules *BTG1* KO, en leur permettant d'adhérer au support grâce à l'ajout de fibronectine. La fibronectine est une protéine reconnue, entre autre, par les intégrines de type $\alpha4\beta7$, $\alpha5\beta1$ et $\alpha v\beta3$ (Danen et al., 2002), ou $\alpha4\beta1$ (VLA-4) qui sont connues pour être nécessaires au lymphocyte B pour adhérer aux vaisseaux lors de l'étape d'adhésion précédant l'extravasation, ce qui nous a permis de révéler l'effet de BCAR1 sur ces lignées et l'impact que BTG1 peut y avoir.

Ce phénotype de migration, que nous avons montré *in vitro*, pourrait sembler paradoxal, car nous observons à la fois une augmentation de l'adhésion cellulaire et une augmentation de la vitesse de migration. Cependant, l'activation de RAC1-GTP permet la polymérisation facilitée des filaments d'actine et la formation de protrusions cellulaires, ce que nous observons sous la forme de filopodes beaucoup plus longs et nombreux sur les cellules *BTG1* KO, ce qui va dans le sens d'une augmentation de la vitesse de migration médiée par les filopodes. Pour autant, notre modèle *in vitro* ne permet qu'une observation en deux dimensions de la migration, et il n'est pas à exclure qu'une migration amiboïde soit également efficace dans un environnement confiné pour les cellules *BTG1* WT. Bien que cette observation soit robuste *in vitro*, l'augmentation de la présence de cellules *BTG1* KO ou mutées dans les foies des souris après injection intra-splénique pourrait aussi s'expliquer par une meilleure survie ou adaptation de ces cellules dans une niche spécifique telle que le foie, bien que les résultats observés après traitement au dasatinib semblent favoriser l'hypothèse migratoire.

Suite à la découverte de l'impact de l'inactivation de *BTG1* sur la migration cellulaire, nous avons montré que cette migration pourrait être médiée par BCAR1 et par les Src kinases, que l'on peut cibler grâce à un inhibiteur pharmacologique, le dasatinib, déjà utilisé en clinique pour traiter la leucémie myéloïde chronique ou les LAL avec chromosome Philadelphie en inhibant ABL1. Le dasatinib entraîne une importante réduction de la migration cellulaire *in vivo* induite par le KO de *BTG1* et une réduction de la phosphorylation de BCAR1, ce qui renforce notre hypothèse qui place la migration sous le contrôle de l'inactivation de *BTG1*. Il faudrait maintenant traiter au long court des souris VaVP-BCL2 x *BTG1* KO ou WT et observer si le développement des lymphomes s'en voit ralenti. Il serait également intéressant de poursuivre les essais avec du

dasatinib en clinique et de les axer sur les patients mutés pour *BTG1*. Le ciblage de la voie de migration induite par BCAR1 pourrait être intéressant dans les lymphomes *BTG1* mutés, par exemple en prévention des rechutes extraganglionnaires chez les patients à risque élevé. Les patients atteints de PCNSL ayant d'importantes concentrations en CXCL13 dans les fluides cérébrospinaux, il serait éventuellement intéressant d'observer l'attraction de cellules *BTG1* mutés ou inactivés pour le CXCL13 ou de mesurer si l'expression du récepteur CXCR5 est impactée par l'inactivation de BTG1 (Fischer et al., 2009), qui pourrait expliquer une modulation de la migration médiée par cette chimiokine.

2) Partenaires protéiques de *BTG1*

BTG1 est une protéine dont peu de fonctions sont connues et bien documentées, mais on sait qu'elle interagit directement avec les protéines CAF1 et PRMT1 et module leur activité. Cependant, dans notre modèle cellulaire de lymphome B, nous n'avons pas observé de différence nette ni au niveau transcriptomique (séquençage d'ARN et validation par qPCR ou recherche d'un potentiel rôle de *RNA binding protein* de BTG1 dans le complexe CCR4-NOT par la technique du TRIBE), ni au niveau de la régulation de la méthylation des arginines (méthylation des histones en western blot, spectrométrie de masse, inhibiteur spécifique de PRMT1) en fonction du statut de *BTG1*. Pour comprendre l'effet de BTG1 dans notre modèle, nous avons dû chercher de potentiels nouveaux interactants protéiques. Dans un premier temps, nous avons utilisé la technique de BIO-ID, qui consiste à marquer toutes les protéines au voisinage (10nm) de la construction d'intérêt (BTG1-BirA*) (Roux et al., 2013)

et qui a l'avantage de s'effectuer dans un modèle *in cellulo*, ce qui permet de s'assurer que le marquage n'est pas un artefact qui apparaîtrait post-lyse.

Étant donné le fonctionnement de ce système, le bruit de fond généré est très important et nécessite de nombreux contrôles et réplicats. Cette technique nous a permis de montrer que BTG1 interagit possiblement avec de nombreuses protéines mitochondriales. Un autre inconvénient de cette technique est l'augmentation de la taille de la protéine d'intérêt, qui pourrait voir sa conformation modifiée, ses sites d'activité obstrués ou sa localisation cellulaire impactée. Pour valider les observations faites grâce au BIO-ID, nous avons mis au point des co-immunoprécipitations de BTG1, avec un tag HA ou un tag V5, suivies de détection en spectrométrie de masse, les anticorps spécifiques de BTG1 étant peu nombreux et inefficaces en immunoprécipitation. Nous avons alors découvert quelques protéines, telles que BCAR1 et BCAR3, mais également un certain nombre de protéines mitochondriales. L'inconvénient de cette technique est qu'une partie des interactions observées pourraient être mises en place après la lyse de la cellule et de la perte de confinement des différents organites, ce qui masque une partie importante du signal mitochondrial, la spectrométrie de masse n'étant pas assez sensible pour les détecter.

Nous avons observé un enrichissement fort en protéines mitochondriales grâce au BIO-ID, mais aucune des protéines que nous avons par la suite testées par immunoprécipitation ne s'est révélée être un interactant direct de BTG1, bien que l'internalisation de BTG1 dans la mitochondrie ait été validée par plusieurs approches. L'utilisation de la co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse a montré de meilleurs résultats au niveau interactomique, car nous avons pu montrer l'interaction de BTG1 avec BCAR1 en co-immunoprécipitation

et western blot. Ces deux approches se sont donc révélées complémentaires, même si chacune a apporté une réponse différente.

Une des limites de ces études réside dans le fait que nous n'avons qu'une seule fois retrouvé en co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse les partenaires protéiques « historiques » de BTG1, à savoir CAF1 ou PRMT1, ce qui semble indiquer un manque de sensibilité de ces techniques.

3) Domaine d'interaction de BTG1 et BCAR1

BCAR1 est une protéine très étudiée dans les phénomènes de métastases dans les cancers solides, et semble être une cible d'intérêt pour éviter la dissémination cellulaire (Dai et al., 2011). Cependant, il n'existe pour le moment pas de traitement ou d'inhibiteur spécifique de BCAR1. La solution que nous avons choisie, en utilisant du dasatinib, montre bien un effet sur la signalisation en aval de BCAR1 et sur la migration cellulaire, mais le dasatinib est un inhibiteur à spectre large qui manque de spécificité. Nous avons vu que l'inactivation de *BTG1* active la phosphorylation de BCAR1 sur son site Y410, nous cherchons maintenant un peptide qui inhiberait cette phosphorylation et qui serait issu d'une région de la protéine de BTG1. Nous avons pour le moment montré que l'interaction de BCAR1 est possible avec BTG1 lorsque ce dernier est tronqué jusqu'à l'histidine 74, mais des contraintes techniques ne nous permettent pas, actuellement, de mettre en évidence l'expression d'une protéine tronquée avant H74. Une des perspectives de la suite de ce travail sera la caractérisation de cette région minimale d'interaction de BTG1 avec BCAR1, dans le but de trouver un peptide spécifique inhibiteur de BCAR1.

Coopération oncogénique entre *BTG1* et *MYD88*

Ce travail de thèse sur l'impact de *BTG1* dans la lymphomagenèse a été initié en 2017, à une période où la classification des DLBCL admise était encore basée sur la cellule d'origine (COO). Des études montraient alors une récurrence mutationnelle de *BTG1* dans les DLBCL, associée à un mauvais pronostic dans les types ABC (Reddy et al., 2017), cependant la fréquence de ces mutations était assez faible, proche de 8% sur l'ensemble des DLBCL. La publication des études de classification moléculaire en 2018 a permis de mettre en avant les mutations de *BTG1* et de les corrélérer au sous-type de mauvais pronostic MCD/C5 principalement. Or, ce sous-type est caractérisé par un fort taux de mutations de *MYD88* et de *CD79B*. On pourra d'ailleurs remarquer que les taux de délétions de *BTG1* sont également très élevés dans les maladies de Waldenstrom (87%) (Hunter et al., 2014), elles aussi caractérisées par la mutation de *MYD88* à hauteur de 90% (Treon et al., 2012), de la même façon que dans les lymphomes primitifs du système nerveux central (70%) ou encore dans les lymphomes testiculaires (74%). On peut alors penser qu'il y a un phénomène de coopération oncogénique entre les délétions ou mutations de *BTG1* et les mutations de *MYD88*, et que cette cooccurrence d'événements apporte un avantage sélectif aux cellules tumorales.

Un des axes d'étude pour la suite de ce travail sera donc de s'intéresser à l'impact des mutations de *BTG1* en fonction du statut mutationnel de *MYD88*. En effet, les lymphocytes B sont caractérisés par deux voies de signalisation que sont la voie du BCR (B Cell Receptor), activée par l'antigène, et la voie des TLR (Toll like receptors), qui sont les récepteurs de l'immunité innée et qui permettent, à travers leurs interactions avec les kinases IRAK1 et IRAK4, d'activer

la voie NF- κ B. MYD88 est une protéine impliquée dans la réponse de la voie TLR et contribue, entre autre, à l'internalisation des TLR9 et du BCR, conduisant à la formation d'un endosome (myddosome), entraînant l'activation de la voie NF- κ B également. Il a par ailleurs été montré que la kinase BTK (Bruton's tyrosine kinase), kinase indispensable à la signalisation du BCR et du TLR, était également nécessaire à la mise en place de cet endosome et à sa signalisation, et qu'elle interagit préférentiellement avec MYD88^{L265P} lorsqu'elle est phosphorylée (Kenny et al., 2013). La mutation L265P de *MYD88* est une des seules mutations de ce gène retrouvée lorsque celui-ci est muté et permet d'activer de façon constitutive les kinases IRAK1, IRAK4 et la phosphorylation de BTK. Cette mutation de *MYD88* permet également la mise en place du myddosome sans stimuli externe et conduit donc à l'activation constitutive de la voie NF- κ B (Ngo et al., 2011). Dans ce contexte, il apparaît très intéressant de chercher à comprendre les mécanismes moléculaires utilisés par BTG1 et MYD88, qui sont nécessaires à l'apparition de ces lymphomes.

BTG1, un acteur de la dynamique mitochondriale ?

Les mitochondries sont des organites participant à de nombreuses fonctions, telles que la mort cellulaire programmée (apoptose), la production d'ATP ou encore le catabolisme des acides gras. La plupart des protéines mitochondriales humaines, parmi les 1158 répertoriées par la base de données MitoCarta2.0 (Calvo et al., 2016), sont des protéines codées par le génome nucléaire et transloquées dans la mitochondrie. Cette translocation est généralement médiée par une séquence de 10 à 80 acides aminés, qui sera clivée (Pfanner & Meijer, 1997), entraînant la prise en charge de ces protéines par des protéines chaperonnes de type mtHSP (mitochondrial Heat Shock Protein), leur

permettant d'atteindre leur compartiment cible, qui peuvent être les membranes externes, internes, l'espace intermembranaire ou la matrice mitochondriale. La translocation mitochondriale se fait à travers deux complexes protéiques, TIM (*Translocase Inner Membrane*) et TOM (*Translocase Outer Membrane*) (Pfanner & Meijer, 1997), que nous avons décrits comme interactants de BTG1 par BIO-ID et co-immunoprécipitation (Figure 23A).

Les mitochondries sont des organites très dynamiques qui peuvent fusionner sous forme de longs filaments ou de réseaux, ou au contraire fissionner, générant des mitochondries rondes et divisées. L'état fissionné, ou divisé, permet entre autres la biogenèse de nouvelles mitochondries, dans une optique de division cellulaire, de transport des mitochondries ou encore de dégradation des mitochondries endommagées ou contenant du matériel (ADN, protéines...) endommagé. L'état fusionné, en réseau, permet quant à lui de protéger les mitochondries en augmentant leur résistance à l'induction de l'apoptose, en maintenant le potentiel de membrane et en redistribuant l'ADNmt ou les protéines mitochondriales (Figure 24).

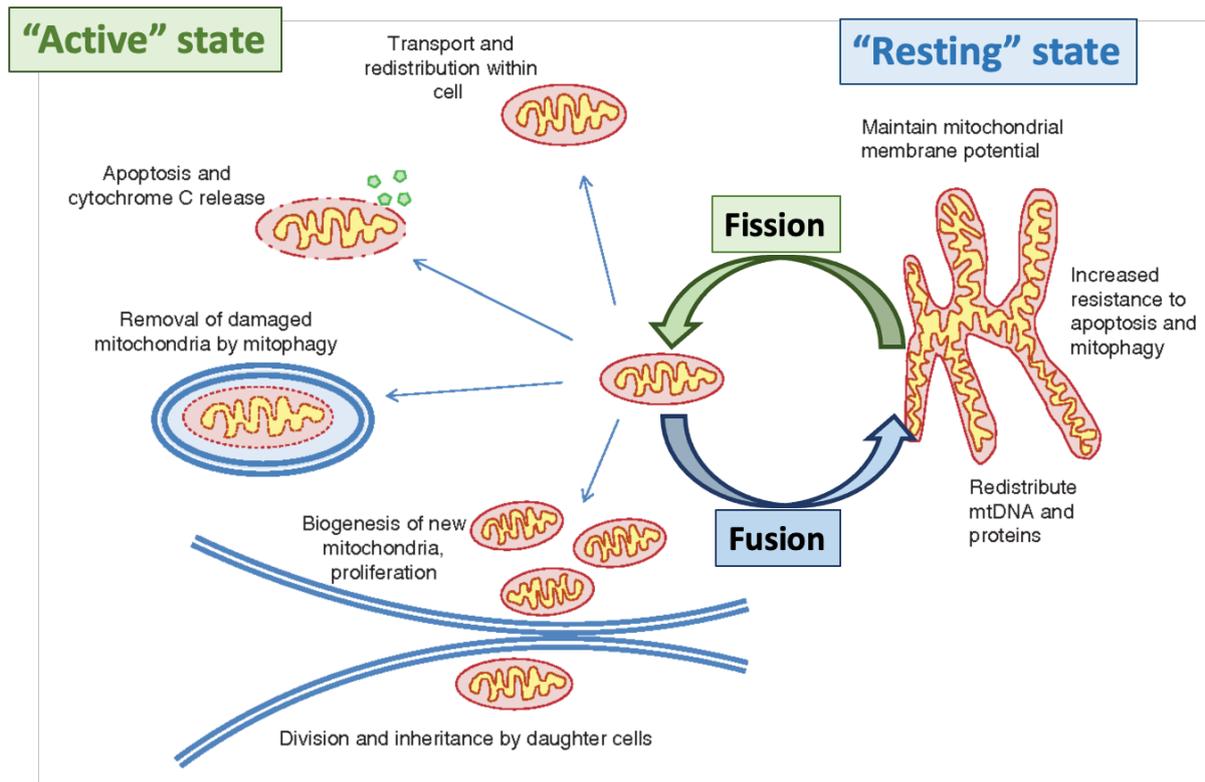
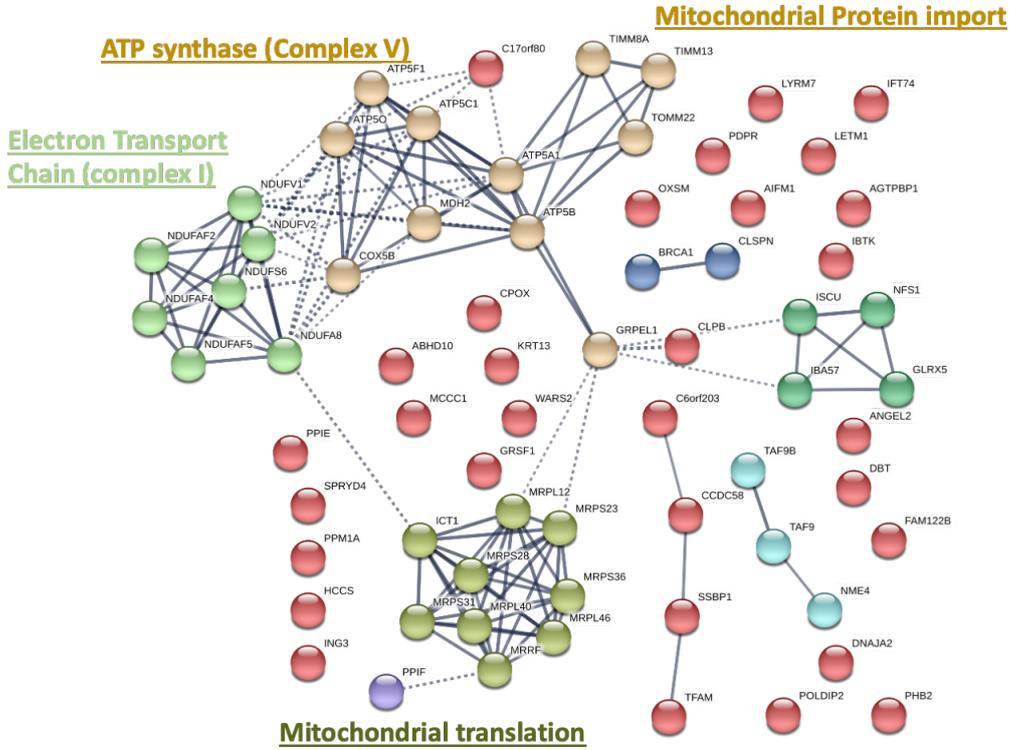


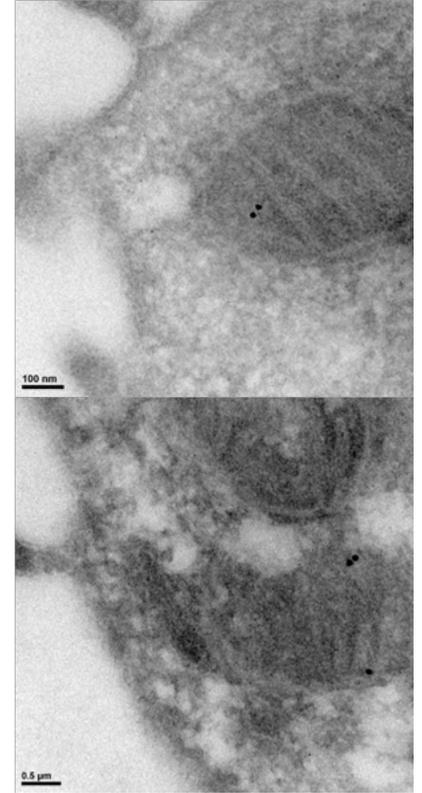
Figure 24 : Différents états de fusion/fission de la mitochondrie et mécanismes biologiques associée. Adapté de (Lennon & Salgia, 2014)

L'étude de l'impact métabolique médié par l'inactivation de *BTG1* a commencé par la découverte de potentielles interactions de *BTG1* avec de nombreuses protéines mitochondriales, dans une analyse d'interactions protéiques par BIO-ID2. L'analyse de ces protéines en spectrométrie de masse nous a permis de découvrir de potentielles interactions entre *BTG1* et des protéines mitochondriales, mais également de montrer que *BTG1* était aussi localisée au niveau de la mitochondrie, ce que nous avons par la suite confirmé par western blot après avoir fractionné les compartiments cellulaires et isolé les mitochondries (Figure 23C), mais également en marquant les protéines *BTG1* par des anticorps couplés à des billes d'or en microscopie électronique à transmission (Immunogold) (Figure 23B).

A



B



C

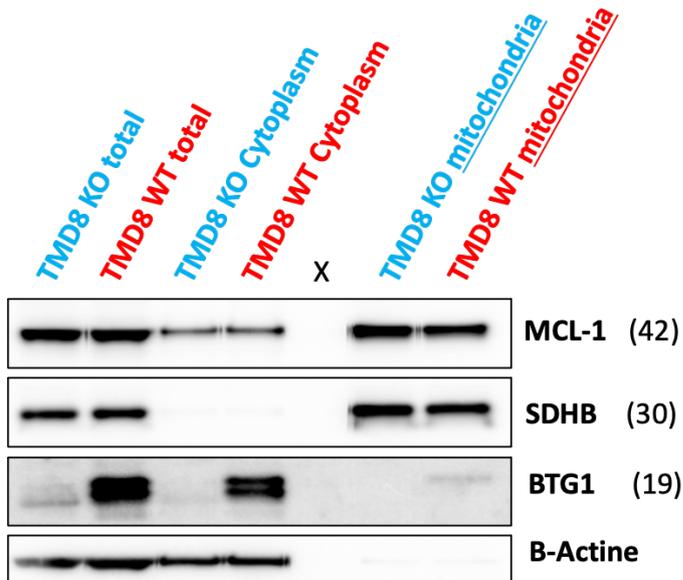
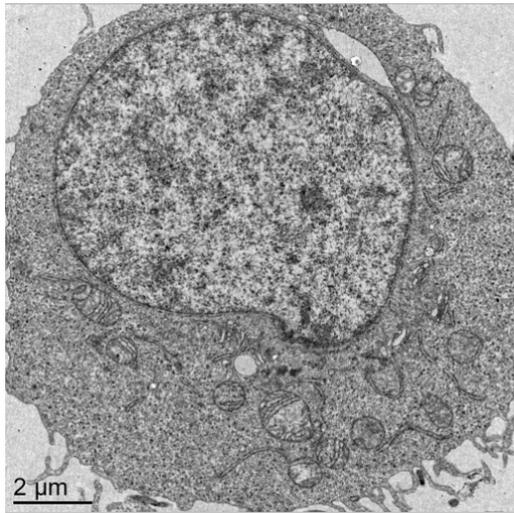


Figure 23 : **(A)** Protéines mitochondriales biotinylées par BTG1-BirA*. Deux plasmides BTG1-BirA* et myc-tag-BirA* (contrôle) ont été transfectés dans des cellules HEK293FT avec ajout de biotine à 50mM, les cellules ont été lysées 48h après transfection et les lysats ont été soumis à des colonnes de billes couplées à de la streptavidine. Les éluats ont été analysés en spectrométrie de masse, seules les protéines présentes dans les lysats BTG1-BirA* et absentes des lysats myc-tag-BirA* ont été conservées (n=3). **(B)** Localisation de BTG1 dans la mitochondrie en microscopie électronique à transmission. Des cellules TMD8 BTG1 WT ont été fixées et perméabilisées avant inclusion en « pure LRWhite gelatine » et découpe extra fines (70nm). Les échantillons ont été incubés avec un anticorps anti-BTG1 humain (1/100^e) et avec un anticorps secondaire couplé à des billes d'or avant observation en microscopie électronique à transmission JEOL 1400JEM (Tokyo, Japan). **(C)** Localisation de BTG1 dans la mitochondrie en Western Blot après fractionnement cellulaire. Les cellules sont lysées et les différents compartiments cellulaires sont séparés sur des gradients de densité, en suivant les instructions du kit d'isolation Qproteome mitochondria (Qiagen, Allemagne).

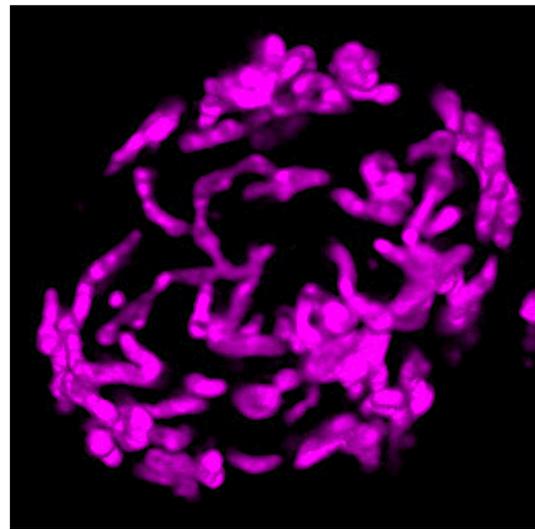
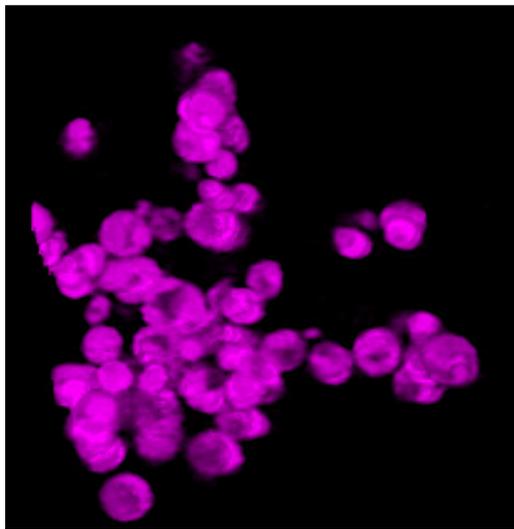
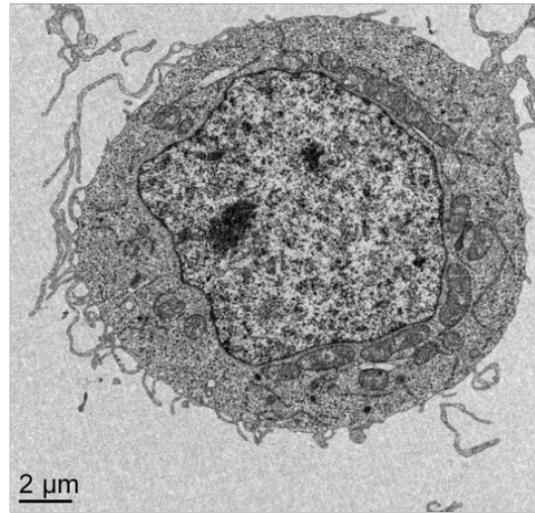
Après avoir montré la localisation mitochondriale de BTG1, restait à en comprendre son rôle. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la morphologie des mitochondries. Dans un premier temps, nous avons pu montrer que les mitochondries des cellules TMD8 inactivées pour BTG1 avaient une forme allongée et en réseau, et que leur masse globale était augmentée (Figure 25A et B), ce qui est également le cas pour la masse globale des cellules B de souris BTG1 WT ou KO (Figure 25C). On peut corrélérer l'inactivation de BTG1 avec ce phénotype mitochondrial, mais pour le moment rien ne nous indique un lien direct causal entre inactivation de BTG1 et mitochondrie, ni même si cet effet est dû à la localisation mitochondriale de BTG1, ou s'il est une conséquence secondaire de l'inactivation de BTG1.

A

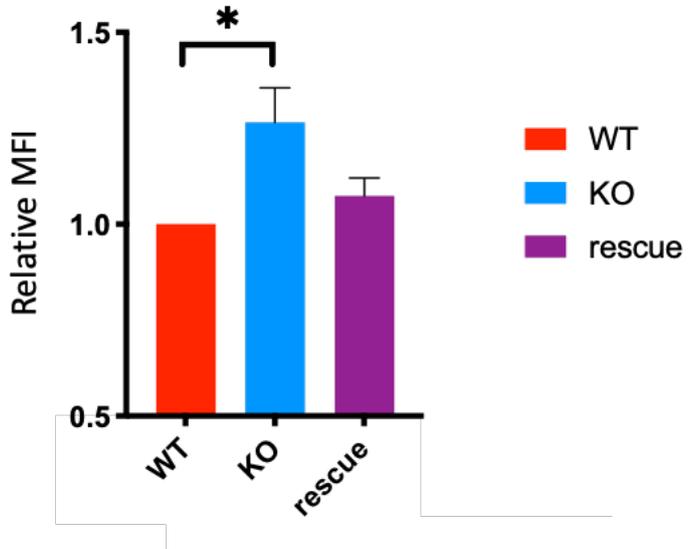
TMD8 BTG1 WT



TMD8 BTG1 KO



B



C

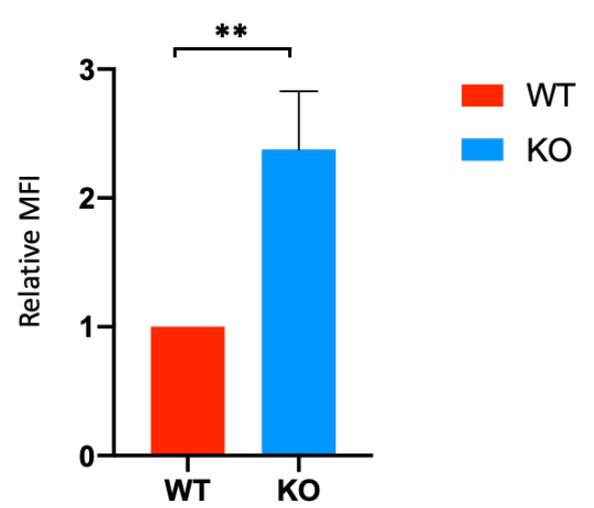


Figure 25 : (A) Observation en microscopie électronique (voir méthode en figure 24B) et en microscopie confocale haute résolution après marquage au Mitotracker des mitochondries de cellules TMD8 BTG1 KO ou WT. Pour la microscopie haute résolution, les cellules sont fixées sur les lames avec de la Poly-L-lysine et maintenues en conditions optimales de cultures (37°C, 5% CO₂) pendant l'acquisition en microscopie confocale (Zeiss LSM800 Airy Scan). (B) Mesure de la masse mitochondriale par cytométrie en flux après marquage au Mitotracker de cellules TMD8 BTG1 KO, WT et Rescue. (C) Mesure de la masse mitochondriale par cytométrie en flux après marquage au Mitotracker de cellules B CD19+ de souris BTG1 KO ou BTG1 WT.

D'autre part, nous avons montré que l'inactivation de *BTG1* entraîne une augmentation globale de la consommation d'oxygène des cellules, en condition basale, mais également après usage d'un agent découplant, permettant d'évaluer les capacités totales de consommation d'oxygène par les mitochondries (Spare capacity) (Figure 26A). Nous n'avons cependant pas observé de différence d'expression des super complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 26B), indiquant probablement que *BTG1* n'influe pas directement sur la production d'énergie mais que l'augmentation de consommation d'oxygène ne serait que le reflet de l'augmentation de la masse moyenne des mitochondries.

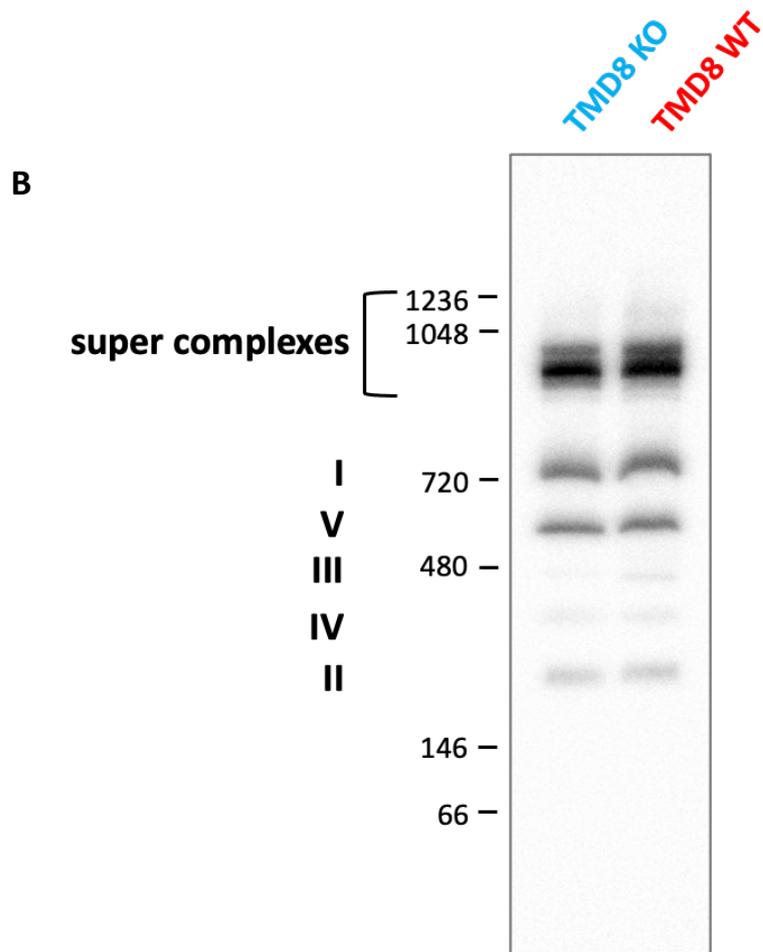
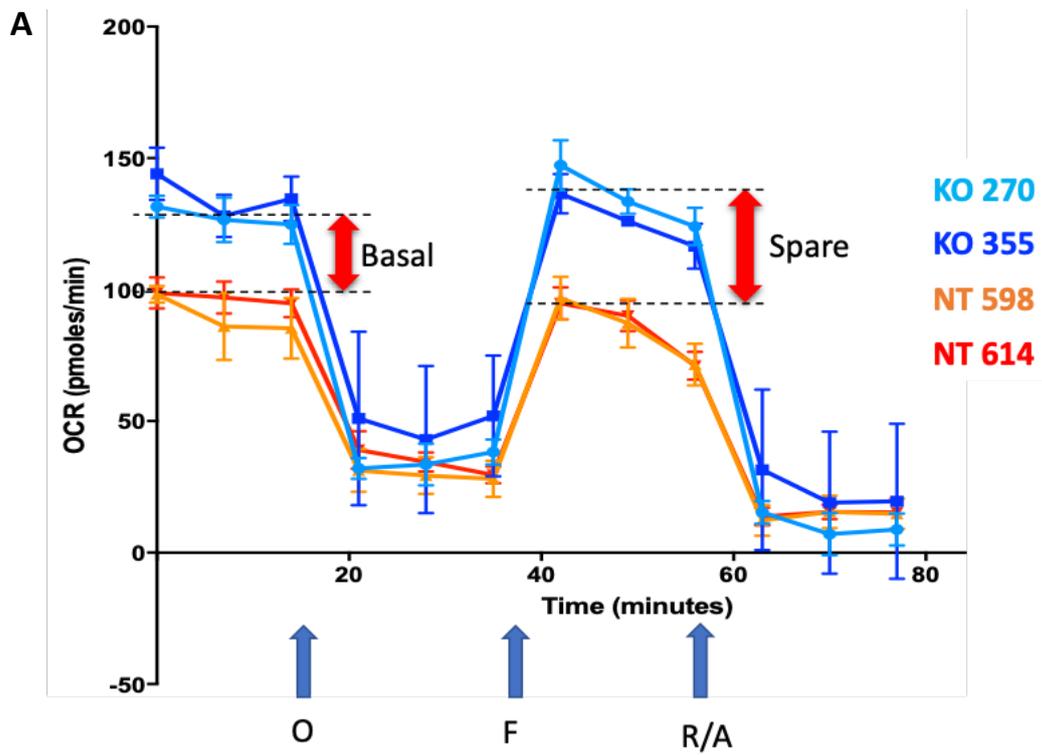


Figure 26 : **(A)** Mesures de la consommation d'oxygène par SeaHorse de deux types de cellules TMD8 BTG1 KO (KO 270 et KO 355) et BTG1 WT (WT 598 et WT 614) (O = oligomycin, F = FCCP, R/A = rotenone / antimycin A), montrant la consommation d'O₂ basale entre 0 et 15 minutes, et la consommation d'O₂ maximale entre 40 et 55 minutes après ajout de FCCP pour découpler la chaîne respiratoire mitochondriale. **(B)** Caractérisation des complexes et super complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale par blue native page (Collaboration Laurence Aubry, CEA, Grenoble). Brièvement, les cellules sont lysées et les fractions cellulaires sont séparées pour ne conserver que les membranes mitochondriales. Les protéines ne sont pas dénaturées, permettant de conserver la conformation des super complexes de la chaîne respiratoire. Pour le détail du protocole, voir (Wittig et al., 2006).

À l'état basal, une cellule B ne peut disposer que d'un apport limité en énergie, en partie dû au fait d'un faible volume cytoplasmique et d'une quantité réduite de mitochondries. Cependant, au cours de leur activation et de leur maturation, les cellules B peuvent avoir un besoin bref d'augmenter leur production et leur consommation énergétique, mais une augmentation prolongée de cette demande en énergie, secondaire à l'expression d'un oncogène ou à une auto-réactivité, entraînerait un stress énergétique important et déclencherait la mort cellulaire, ce qui est proposé comme une protection métabolique (Metabolic gatekeeper) par monsieur Müschen (Müschen, 2019). On pourrait alors penser que l'inactivation de *BTG1* permettrait d'outrepasser cette protection métabolique, en augmentant la quantité d'énergie produite à travers une augmentation de la masse mitochondriale, permettant également à la cellule de migrer plus rapidement ou plus efficacement.

Finalement, bien que l'impact de BTG1 sur la migration à travers l'interaction avec BCAR1 et la modulation de l'activation de sa voie de signalisation semble robuste, le mécanisme moléculaire mis en jeu reste cependant à élucider. Une des hypothèses serait que BTG1, ou une région de la protéine, inhibe de façon physique la phosphorylation de certains sites de BCAR1 et empêche le recrutement des protéines permettant l'activation de RAC1. L'augmentation de la masse mitochondriale sert possiblement la cellule en lui apportant suffisamment d'énergie pour opérer cette migration, mais l'action de BTG1 au niveau mitochondrial reste là encore à comprendre.

ANNEXE

ANNEXE : Au début de mon travail de thèse, j'ai eu l'occasion de participer à la réalisation d'un article, publié dans Haematologica en 2019, qui caractérise un patient atteint de DLBCL ne présentant pas d'expression du marqueur CD19. Ce patient était porteur d'une mutation somatique entraînant la rétention d'un intron entre les exons 3 et 4 de CD19, conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré et donc à l'absence de l'expression de la protéine CD19. La caractérisation de l'existence d'un tel cas est importante au niveau diagnostique, car le marqueur CD19 est un des principaux utilisés pour définir une cellule B, ce qui peut entraîner une erreur de diagnostic. Ce genre de cas serait également plus compliqué à traiter par CAR-T cells, du fait de l'absence de la protéine CD19 à sa surface.

Molecular analysis of a CD19-negative diffuse large B-cell lymphoma

CD19 is widely used as a marker of B-cell lineage because it is expressed as early as the pre-B stage and repressed only during terminal differentiation into plasma cells.¹ This transmembrane glycoprotein is an essential co-receptor of the B-cell receptor (BCR),² although it can also be activated in a BCR-independent manner.³ The deleterious consequences of CD19 inactivation on B-cell development, described both in murine models and in human diseases,^{4,5} are explained by the potential of CD19 to activate pro-survival pathways transduced by phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) or kinases from the Src family. Accordingly, the expression of CD19 is highly conserved in B-cell neoplasms, except in those derived from terminally differentiated cells such as plasmablastic lymphoma and multiple myeloma.⁶ Of note, CD19 has become a therapeutic target for bispecific antibodies (blinatumomab) or chimeric antigen receptor (CAR) T cells in B-cell malignancies.⁷

We report the case of a patient diagnosed with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) that did not express CD19 as assessed by flow cytometry and describe the molecular mechanisms that explain this exceptional observation.

A 76-year-old woman was hospitalized for asthenia,

persistent fever, and night sweats. Physical examination was normal except for massive splenomegaly (craniocaudal length of 20 cm on CT-scan). Analysis of blood and bone marrow aspiration smears detected around 20% atypical lymphoid cells with uncondensed chromatin, visible nucleoli in some cells, and moderately basophilic cytoplasm (Figure 1A). On immunophenotyping these cells strongly expressed CD45 together with B-cell differentiation markers (CD20, CD79b, and CD22) and showed a monotypic kappa light chain expression. However, they were negative for the CD19 antigen, whereas the residual normal B-cells were CD19 positive, as expected (Figure 1B). The lymphoma cells expressed MUM1, but no marker of plasma cell differentiation (CD38, CD138), and they did not express the ALK protein. A bone marrow biopsy confirmed the diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma (Figure 1C) of the activated-B-cell subtype as assessed by reverse transcription multiplex ligation-dependent probe amplification.⁸ Additional cytogenetic analysis by fluorescent *in situ* hybridization on paraffin-embedded sections showed an additional 3q27 locus (*BCL6*) and did not identify rearrangements of *cMYC*, *BCL2* or *CCND1* loci. According to the international prognostic index, this patient was at clinical stage 5 (elevated LDH (840 IU, normal range (240-480), ECOG status = 3, age above 60, extra-nodal involvement (bone marrow), stage IV). HIV serology was negative. She was treated with 8 R-CHOP

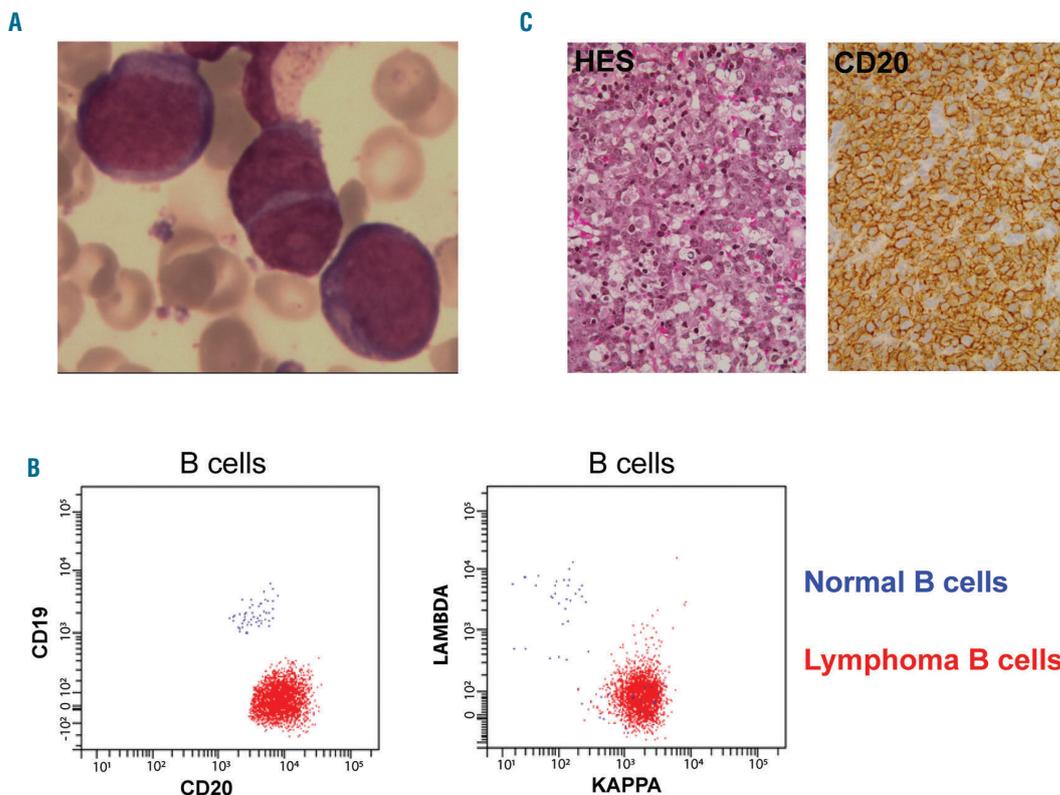


Figure 1. Diagnosis of a CD19-negative DLBCL. (A) Lymphoma cells in bone marrow smears (MGG staining, x500 magnification). (B) Flow cytometry analysis of the lymphoma cells (red dots) and residual normal B-cells (blue dots) in the blood, after staining of CD19 and CD20 (left) and kappa and lambda light chains (right). (C) Bone marrow biopsy showing infiltration by the DLBCL (left panel: hematoxylin eosin saffron staining, x20 magnification, right panel, CD20 staining, x40 magnification).

associated with intrathecal methotrexate prophylaxis. PET scan showed complete metabolic remission after 4 cycles and this finding was confirmed at the end of the treatment (6-month follow up).

In order to understand the unexpected negative results for CD19 expression, lymphoma cells were purified by CD20 cell sorting (RoboSep™, StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Comparative genomic hybridization with single nucleotide polymorphism array (SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K, Agilent, Santa Clara, CA, USA) found an uniparental disomy involving the short arm of chromosome 16, which encompasses the locus coding for CD19 (16p11.2; Figure 2A). Sanger sequencing of the *CD19* gene performed on germline DNA (CD20-negative fraction) did not find any abnormalities, whereas a homozygous splice mutation (c.560-1G>C, NM_001178098.1) was detected in the lymphoma cells (Figure 2B). In order to evaluate the transcriptional consequences of this mutation in the acceptor site of intron 3 (between exons 3 and 4), we extracted RNA from the FFPE bone marrow biopsy after DNase digestion (Maxwell 16 Lev RNA FFPE kit (Promega)). We performed reverse transcription followed by polymerase chain reaction with a forward primer on exon 3 (GACAGCCTGAACCAGAGCCT) and reverse primer on exon 4 (CTAGGCTCAGCAATGACTTAG). PCR conditions were: initial denaturation (94°C, 2 min), 35 cycles

of denaturation (94°C, 30 sec), hybridization (60°C, 30 sec) and elongation (72°C, 30 sec), and a final step of 2 min at 72°C. Patient's amplicon size was larger than that found from a control sample (Figure 2C), and we confirmed by Sanger sequencing that this was due to the retention of intron 3. Importantly, genomic DNA contamination was ruled out because this band was not observed when the PCR was done on mRNA, performing the reverse transcription step without reverse transcriptase. As a consequence, a premature stop codon occurs 23 amino-acids later, which explains the absence of CD19 expression in this case of DLBCL (Figure 2D). It should be noted that we only assessed CD19 expression at the membrane surface, thus we cannot rule out intracellular expression of a truncated CD19 protein which could activate signaling pathways.

As CD19 transduces pro-survival signals, the observation of a DLBCL displaying loss of CD19 expression at the time of diagnosis is unexpected. CD19 negativity is usual in plasmablastic lymphomas that are derived from B-cells committed to plasmacytic differentiation. However, the whole phenotypic profile of these lymphomas reflects this stage of differentiation, with expression of plasma cell markers (such as CD138 or CD38) and loss of expression of all B-cell markers such as CD20 and CD19⁶. The patient described here did not express any plasma cell markers, and did not repress the other B-cell

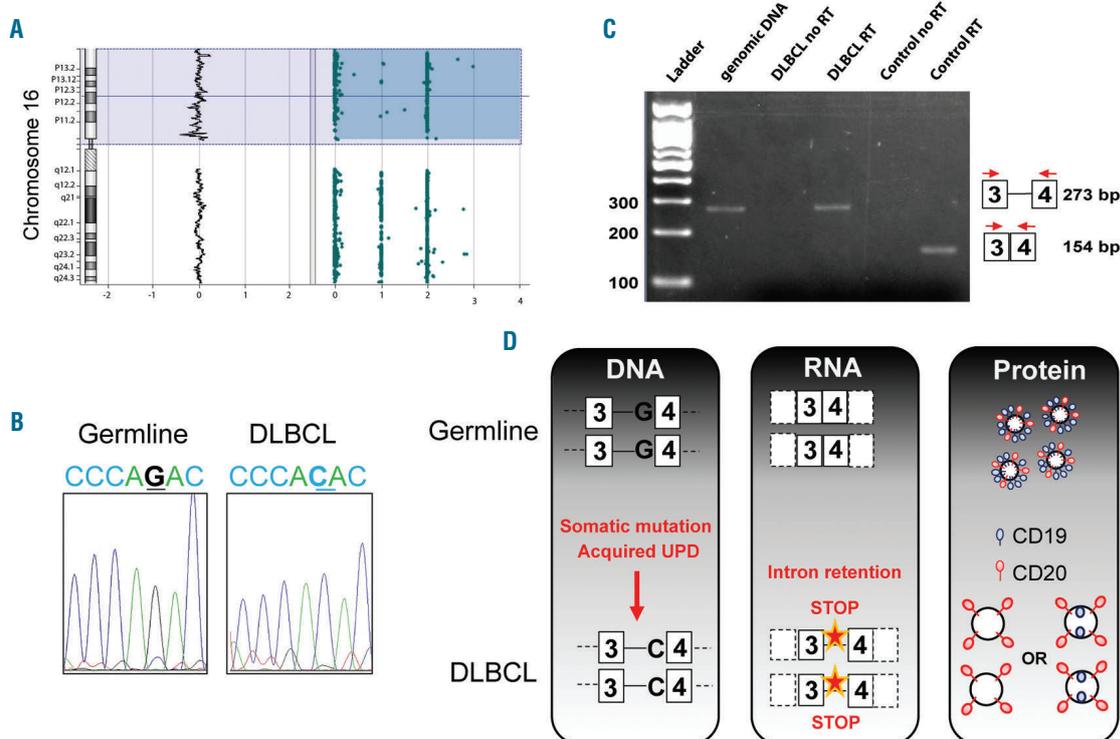


Figure 2. Molecular mechanisms of CD19 inactivation. (A) Single-nucleotide polymorphism analysis showing a uniparental disomy of the short arm of chromosome 16. (B) Sanger sequencing of the *CD19* gene showing no abnormality in the germline material (left) and a homozygous mutation of the splice acceptor site of intron 3 (c.560-1G>C, NM_001178098.1) in the DLBCL cells (right). (C) Polymerase chain reaction analysis using primers on exons 3 and 4 of *CD19*, showing the same amplicon size in genomic DNA and in cDNA from the DLBCL diagnosis sample because of retention of intron 3. Note that no amplification occurs when using a non-reverse-transcribed RNA matrix, thus ruling out genomic DNA contamination. The cDNA from a control patient (CTR) with CD19-positive DLBCL shows a smaller amplicon because the intron 3 was spliced. A schematic representation of the experiment is provided (right). (D) Schematic overview of the molecular mechanisms explaining this CD19-negative DLBCL. Note that we did not rule out intracellular expression of CD19 (right panel, bottom).

markers such as CD20 or CD79b, thus ruling out a diagnosis of plasmablastic lymphoma. Loss of B-cell markers has also been described in ALK-positive DLBCL, but the case described here was negative for ALK protein. Regarding DLBCL, some cases have been described as CD19 negative using immunohistochemistry,⁹⁻¹¹ but this was not confirmed by flow cytometry, which is more sensitive.¹²

To the best of our knowledge, this case is the first report of DLBCL with complete loss of CD19 expression at diagnosis, as demonstrated by flow cytometry, which is the most sensitive technique. This observation is explained by an acquired splice mutation in the CD19 gene, followed by an acquired uniparental disomy, leading to homozygous intron retention and a premature stop codon. Loss of expression of CD19 and other B-cell markers has been described in a case of high grade lymphoid neoplasm with features intermediate between DLBCL and acute lymphoblastic leukemia (TdT-positive) with a t(8;14) translocation involving *cMYC*.¹³ The emergence of subclones with splice mutations of CD19 has been reported in acute lymphoblastic leukemias treated with CAR-T cells targeting CD19, although the mutation referred to this report was never specified.¹⁴ In these cases, the CD19-negative subclones present a competitive advantage under the strong selective pressure exerted by the therapeutic intervention. It is therefore intriguing to observe this genetic inactivation in the absence of any therapeutic selective pressure.

The absence of CD19 expression in DLBCL is a diagnostic pitfall, because this antigen is widely used to gate the B cells for flow cytometry analysis¹⁵. More importantly, our observation suggests that it could be important in cases of DLBCL to evaluate the expression of CD19 when a targeted therapy (e.g., CAR-T cells) is considered, in order to detect those rare CD19-negative cases that are unlikely to benefit from therapies targeting CD19.

Lorric Delage,¹ Delphine Manzoni,² Charles Quinquenet,³ Juliette Fontaine,⁴ Alizée Maarek,⁴ Kaddour Chabane,² Isabelle Mosnier,² Sandrine Hayette,² Evelynne Callet-Bauchu,^{1,2} Beatrice Grange,^{1,2} Adriana Plesa² and Pierre Sujobert^{1,2}

¹Cancer Research Center of Lyon, INSERM U1052 UMR CNRS 5286, Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Université de Lyon; ²Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Sud, Service d'hématologie biologique, Pierre-Bénite; ³Centre Hospitalier Ardèche Nord, Service de Médecine Interne, Annonay and ⁴Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Sud, Service d'anatomopathologie, Pierre-Bénite, France

Correspondence: PIERRE SUJOBERT - pierre.sujobert@chu-lyon.fr
doi:10.3324/haematol.2018.203521

Acknowledgments: we would like to thank Philip Robinson (DRCI, Hospices Civils de Lyon) for help in manuscript preparation.

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

- Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B-cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*. 2012;1(1):36.
- Depoil D, Fleire S, Treanor BL, et al. CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nat Immunol*. 2008;9(1):63-72.
- He X, Kläsener K, Iype JM, et al. Continuous signaling of CD79b and CD19 is required for the fitness of Burkitt lymphoma B cells. *EMBO J*. 2018;37(11):e97980.
- Chung EY, Psathas JN, Yu D, Li Y, Weiss MJ, Thomas-Tikhonenko A. CD19 is a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2257-2266.
- van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med*. 2006;354(18):1901-1912.
- Castillo JJ, Bibas M, Miranda RN. The biology and treatment of plasmablastic lymphoma. *Blood*. 2015;125(15):2323-2330.
- Watkins MP, Bartlett NL. CD19-targeted immunotherapies for treatment of patients with non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(7):601-611.
- Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C, et al. Accurate classification of germinal center B-cell-like/activated B-cell-like diffuse large B-Cell lymphoma using a simple and rapid reverse transcriptase-multiplex ligation-dependent probe amplification assay. *J Mol Diagn*. 2015;17(3):273-283.
- Masir N, Marafioti T, Jones M, et al. Loss of CD19 expression in B-cell neoplasms. *Histopathology*. 2006;48(3):239-246.
- Nakatsuka S, Yutani C, Kurashige M, et al. An unusual case of Epstein-Barr virus-positive large B-cell lymphoma lacking various B-cell markers. *Diagn Pathol*. 2017;12(1):15.
- Kazantseva M, Hung NA, Mehta S, et al. Tumor protein 53 mutations are enriched in diffuse large B-cell lymphoma with irregular CD19 marker expression. *Sci Rep*. 2017;7(1):1566.
- Yang W, Agrawal N, Patel J, et al. Diminished expression of CD19 in B-cell lymphomas. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;63(1):28-35.
- Soliman DS, Al-Sabbagh A, Ibrahim F, et al. High grade B-cell Neoplasm with surface light chain restriction and Tdt coexpression evolved in a MYC-rearranged diffuse large B-Cell lymphoma: a dilemma in classification. *Case Rep Hematol*. 2017;2017:6891957.
- Sotillo E, Barrett DM, Black KL, et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1282-1295.
- van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975.

RÉFÉRENCES

- Agarwal, P., and Zaidel-Bar, R. (2019). Principles of Actomyosin Regulation In Vivo. *Trends Cell Biol.* 29, 150–163.
- Alizadeh, A.A., Elsen, M.B., Davis, R.E., Ma, C.L., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503–511.
- Almasmoum, H.A., Airhihen, B., Seedhouse, C., and Winkler, G.S. (2020). Frequent loss of BTG1 activity and impaired interactions with the Caf1 subunit of the Ccr4–Not deadenylase in non-Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 0, 1–10.
- Aloisi, F., and Pujol-Borrell, R. (2006). Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 205–217.
- Amin, A.D., Peters, T.L., Li, L., Rajan, S.S., Choudhari, R., Puvvada, S.D., and Schatz, J.H. (2017). Diffuse large B-cell lymphoma: can genomics improve treatment options for a curable cancer? *Mol. Case Stud.* 3, a001719.
- Amine, H., Ripin, N., Sharma, S., Stoecklin, G., Allain, F.H., Séraphin, B., and Mauxion, F. (2021). A conserved motif in human BTG1 and BTG2 proteins mediates interaction with the poly(A) binding protein PABPC1 to stimulate mRNA deadenylation. *RNA Biol.* 00, 1–16.
- Avraamides, C.J., Garmy-Susini, B., and Varner, J.A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 604–617.
- Bakker, W.J., Blázquez-Domingo, M., Kolbus, A., Besooyen, J., Steinlein, P., Beug, H., Coffey, P.J., Löwenberg, B., Von Lindern, M., and Van Dijk, T.B. (2004). FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J. Cell Biol.* 164, 175–184.
- Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 172–184.
- Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Mol. Cell* 33, 1–13.
- Bedford, M.T., and Richard, S. (2005). Arginine methylation: An emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* 18, 263–272.
- Berthet, C., Guéhenneux, F., Revol, V., Samarut, C., Lukaszewicz, A., Dehay, C., Dumontet, C., Magaud, J.-P., and Rouault, J.-P. (2002). Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. *Genes Cells* 7, 29–39.
- Blackwell, E., and Ceman, S. (2012). Arginine methylation of RNA-binding proteins regulates cell function and differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* 79, 163–175.
- Bogdan, J.A., Adams-Burton, C., Pedicord, D.L., Sukovich, D.A., Benfield, P.A., Corjay, M.H., Stoltenberg, J.K., and Dicker, I.B. (1998). Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1. *Biochem. J.* 336 (Pt 2, 471–481.

- Bose, P., Batalo, M.S., Holkova, B., and Grant, S. (2014). Bortezomib for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin. Pharmacother.* *15*, 2443–2459.
- Brábek, J., Constancio, S.S., Shin, N.Y., Pozzi, A., Weaver, A.M., and Hanks, S.K. (2004). CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. *Oncogene* *23*, 7406–7415.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R., and Ravichandran, K.S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat. Cell Biol.* *4*, 574–582.
- Buane, P., Corrente, G., Micheli, L., Palena, A., Lavia, P., Spadafora, C., Lakshmana, M.K., Rinaldi, A., Banfi, S., Quarto, M., et al. (2000). Cloning of PC3B, a novel member of the PC3/BTG/TOB family of growth inhibitory genes, highly expressed in the olfactory epithelium. *Genomics* *68*, 253–263.
- Busson, M., Carazo, A., Seyer, P., Grandemange, S., Casas, F., Pessemeesse, L., Rouault, J.P., Wrutniak-Cabello, C., and Cabello, G. (2005). Coactivation of nuclear receptors and myogenic factors induces the major BTG1 influence on muscle differentiation. *Oncogene* *24*, 1698–1710.
- Calvo, S.E., Clauser, K.R., and Mootha, V.K. (2016). MitoCarta2.0: An updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res.* *44*, D1251–D1257.
- Cattoretti, G., Mandelbaum, J., Lee, N., Chaves, A.H., Mahler, A.M., Chadburn, A., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L., and MacLennan, A.J. (2009). Targeted disruption of the S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor gene leads to diffuse large B-cell lymphoma formation. *Cancer Res.* *69*, 8686–8692.
- Chapuy, B., Roemer, M.G.M., Stewart, C., Tan, Y., Abo, R.P., Zhang, L., Dunford, A.J., Meredith, D.M., Thorner, A.R., Jordanova, E.S., et al. (2016). Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood* *127*, 869–881.
- 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., et al. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat. Med.* *24*, 679–690.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: How to migrate without lamellipodia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 730–736.
- Charras, G.T., Hu, C.K., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2006). Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J. Cell Biol.* *175*, 477–490.
- Chen, X. qiong, Meng, F. qiao, Xiong, H., Wang, Y. li, Tang, W. hua, and Zou, Y. mei (2020). Identification of BTG1 Status in Solid Cancer for Future Researches Using a System Review and Meta-analysis. *Curr. Med. Sci.* *40*, 85–94.
- Coiffier, B., Lepage, E., Brière, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Neste, E., Van Den, Salles, G., Gaulard, P., et al. (2002). CHOP chemotherapy plus Rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* *346*, 235–242.
- Cosgrove, J., Novkovic, M., Albrecht, S., Pikor, N.B., Zhou, Z., Onder, L., Mörbe, U., Cupovic, J., Miller, H., Alden, K., et al. (2020). B cell zone reticular cell microenvironments shape CXCL13 gradient formation. *Nat. Commun.* *11*, 1–15.
- Cowling, V.H. (2010). Regulation of mRNA cap methylation. *Biochem. J.* *425*, 295–302.

- Dai, Y., Qi, L., Zhang, X., Li, Y., Chen, M., and Zu, X. (2011). Crkl and p130 Cas complex regulates the migration and invasion of prostate cancer cells. *Cell Biochem. Funct.* *29*, 625–629.
- Danen, E.H.J., Sonneveld, P., Brakebusch, C., Fässler, R., and Sonnenberg, A. (2002). The fibronectin-binding integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* *159*, 1071–1086.
- Davies, A., Cummin, T.E., Barrans, S., Maishman, T., Mamot, C., Novak, U., Caddy, J., Stanton, L., Kazmi-Stokes, S., McMillan, A., et al. (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. *Lancet Oncol.* *20*, 649–662.
- Defossez, G., Le Guyader-Peyrou, S., Uhry, Z., Grosclaude, P., Colonna, M., Dantony, E., Delafosse, P., Molinie, F., Woronoff, A.S., Bouvier, A.M., et al. (2019). National estimates of cancer incidence and mortality in metropolitan France between 1990 and 2018. 1–20.
- Delage, L., Manzoni, D., Quinquenet, C., Fontaine, J., Maarek, A., Chabane, K., Mosnier, I., Hayette, S., Callet-Bauchu, E., Grange, B., et al. (2019). Molecular analysis of a CD19-negative diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* *104*.
- Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2012). Cell surface remodeling by plasmin: A new function for an old enzyme. *J. Biomed. Biotechnol.* *2012*.
- Dierlamm, J., Murga Penas, E.M., Bentink, S., Wessendorf, S., Berger, H., Hummel, M., Klapper, W., Lenze, D., Rosenwald, A., Haralambieva, E., et al. (2008). Gain of chromosome region 18q21 including the MALT1 gene is associated with the activated B-cell-like gene expression subtype and increased BCL2 gene dosage and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* *93*, 688–696.
- Donato, D.M., Hanks, S.K., Jacobson, K.A., Jayasekara, M.P.S., Gao, Z.-G., Deflorian, F., and Papaconstantinou, J. (2012). *Encyclopedia of Signaling Molecules* (New York).
- Donnou, S., Galand, C., Touitou, V., Sautès-Fridman, C., Fabry, Z., and Fisson, S. (2012). Murine models of B-Cell lymphomas: Promising tools for designing cancer therapies. *Adv. Hematol.* *2012*.
- Dubey, L.K., Ludewig, B., Luther, S.A., and Harris, N.L. (2019). IL-4R α -Expressing B Cells Are Required for CXCL13 Production by Fibroblastic Reticular Cells. *Cell Rep.* *27*, 2442-2458.e5.
- Dubois, S., and Jardin, F. (2018). Novel molecular classifications of DLBCL. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *15*, 474–476.
- Ednersson, S.B., Stern, M., Fagman, H., Nilsson-Ehle, H., Hasselblom, S., and Andersson, P.O. (2020). TBLR1 and CREBBP as potential novel prognostic immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* *61*, 2595–2604.
- Egle, A., Harris, A.W., Bath, M.L., O'Reilly, L., Cory, S., van Ommen, G.J., Schuurung, E., and Kluin, P.M. (2004). VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood* *103*, 2276–2283.
- Etienne-Manneville, S. (2008). Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene* *27*, 6970–6980.
- Ezzeddine, N., Chang, T.-C., Zhu, W., Yamashita, A., Chen, C.-Y.A., Zhong, Z., Yamashita, Y., Zheng, D., and Shyu, A.-B. (2007). Human TOB, an Antiproliferative Transcription Factor, Is a

Poly(A)-Binding Protein-Dependent Positive Regulator of Cytoplasmic mRNA Deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7791–7801.

Farioli-Vecchioli, S., Micheli, L., Saraulli, D., Ceccarelli, M., Cannas, S., Scardigli, R., Leonardi, L., Cinà, I., Costanzi, M., Ciotti, M.T., et al. (2012). Btg1 is required to maintain the pool of stem and progenitor cells of the dentate gyrus and subventricular zone. *Front. Neurosci.* **6**, 1–19.

Fedoriw, A., Rajapurkar, S.R., Brien, S.O., Kruger, R.G., Barbash, O., and Mohammad, H.P. (2019). Article Anti-tumor Activity of the Type I PRMT Inhibitor , GSK3368715 , Synergizes with PRMT5 Inhibition through MTAP Loss. *Cancer Cell* **36**, 100-114.e25.

Fischer, L., Korfel, A., Pfeiffer, S., Kiewe, P., Volk, H.D., Cakiroglu, H., Widmann, T., and Thiel, E. (2009). CXCL13 and CXCL12 in central nervous system lymphoma patients. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5968–5973.

Fletcher, B.S., Lim, R.W., Varnum, B.C., Kujubu, D.A., Koski, R.A., and Herschman, H.R. (1991). Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters. *J. Biol. Chem.* **266**, 14511–14518.

Van Der Flier, S.D., Brinkman, A., Look, M.P., Kok, E.M., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G.M., Dorssers, L.C.J., and Foekens, J.A. (2000). Bcar1/p130Cas protein and primary breast cancer: Prognosis and response to tamoxifen treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 120–127.

Flori, M., Schmid, C.A., Sumrall, E.T., Tzankov, A., Law, C.W., Robinson, M.D., and Müller, A. (2016). The hematopoietic oncoprotein FOXP1 promotes tumor cell survival in diffuse large B-cell lymphoma by repressing S1PR2 signaling. *Blood* **127**, 1438–1448.

Freeman, C.L., Savage, K.J., Villa, D.R., Scott, D.W., Srour, L., Gerrie, A.S., Brown, M.J., Slack, G.W., Farinha, P., Skinnider, B., et al. (2021). Long-term results of PET-guided radiation in patients with advanced-stage diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* **137**, 929–938.

Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 445–457.

Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., and Stratton, M.R. (2004). A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 177–183.

Van Galen, J.C., Kuiper, R.P., Van Emst, L., Levers, M., Tijchon, E., Scheijen, B., Waanders, E., Van Reijmersdal, S. V., Gilissen, C., Van Kessel, A.G., et al. (2010). BTG1 regulates glucocorticoid receptor autoinduction in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **115**, 4810–4819.

Garneau, N.L., Wilusz, J., and Wilusz, C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 113–126.

Gifford, V., and Itoh, Y. (2019). MT1-MMP-dependent cell migration: Proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* **47**, 811–826.

Green, J.A., and Cyster, J.G. (2012). S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation. *Immunol. Rev.* **247**, 36–51.

Guéhenneux, F., Duret, L., Callanan, M.B., Bouhas, R., Hayette, S., Berthet, C., Samarut, C., Rimokh, R., Birot, A.M., Wang, Q., et al. (1997). Cloning of the mouse BTG3 gene and definition of a new gene family (the BTG family) involved in the negative control of the cell cycle. *Leukemia* **11**, 370–375.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- 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., et al. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* *103*, 275–282.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* *387*, 733–736.
- Herling, C.D., Abedpour, N., Weiss, J., Schmitt, A., Jachimowicz, R.D., Merkel, O., Cartolano, M., Oberbeck, S., Mayer, P., Berg, V., et al. (2018). Clonal dynamics towards the development of venetoclax resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Commun.* *9*, 727.
- Honda, H., Nakamoto, T., Sakai, R., and Hirai, H. (1999). P130(Cas), an assembling molecule of actin filaments, promotes cell movement, cell migration, and cell spreading in fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *262*, 25–30.
- Horiuchi, M., Takeuchi, K., Noda, N., Muroya, N., Suzuki, T., Nakamura, T., Kawamura-Tsuzuku, J., Takahashi, K., Yamamoto, T., and Inagaki, F. (2009). Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex. *J. Biol. Chem.* *284*, 13244–13255.
- Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* *119*, 3901–3903.
- Hunter, Z.R., Xu, L., Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Manning, R.J., Tripsas, C., Patterson, C.J., Sheehy, P., et al. (2014). The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* *123*, 1637–1646.
- Hunter, Z.R., Xu, L., Yang, G., Tsakmaklis, N., Vos, J.M., Liu, X., Chen, J., Manning, R.J., Chen, J.G., Brodsky, P., et al. (2016). Transcriptome sequencing reveals a profile that corresponds to genomic variants in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* *128*, 827–838.
- Hwang, S.S., Lim, J., Yu, Z., Kong, P., Sefik, E., Xu, H., Harman, C.C.D., Kim, L.K., Lee, G.R., Li, H.B., et al. (2020). mRNA destabilization by BTG1 and BTG2 maintains T cell quiescence. *Science* (80-). *367*, 1255–1260.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* *110*, 673–687.
- Ikematsu, N., Yoshida, Y., Kawamura-Tsuzuku, J., Ohsugi, M., Onda, M., Hirai, M., Fujimoto, J., and Yamamoto, T. (1999). Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases. *Oncogene* *18*, 7432–7441.
- Itoh, Y. (2006). MT1-MMP: A key regulator of cell migration in tissue. *IUBMB Life* *58*, 589–596.
- Jalkanen, S., Joensuu, H., Söderström, K.O., and Klemi, P. (1991). Lymphocyte homing and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Invest.* *87*, 1835–1840.
- Jiang, Y., Ortega-Molina, A., Geng, H., Ying, H.Y., Hatzi, K., Parsa, S., McNally, D., Wang, L., Doane, A.S., Agirre, X., et al. (2017). CREBBP inactivation promotes the development of HDAC3-dependent lymphomas. *Cancer Discov.* *7*, 38–53.

De Jong, D., Rosenwald, A., Chhanabhai, M., Gaulard, P., Klapper, W., Lee, A., Sander, B., Thorns, C., Campo, E., Molina, T., et al. (2007). Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: Validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications - A study from the Lunenburg lymphoma biomarker consortium. *J. Clin. Oncol.* *25*, 805–812.

Kanda, M., Sugimoto, H., Nomoto, S., Oya, H., Hibino, S., Shimizu, D., Takami, H., Hashimoto, R., Okamura, Y., Yamada, S., et al. (2015). B-cell translocation gene 1 serves as a novel prognostic indicator of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* *46*, 641–648.

Keller, H., and Eggl, P. (1998). Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane. *Cell Motil. Cytoskeleton* *41*, 181–193.

Kenny, E.F., Quinn, S.R., Doyle, S.L., Vink, P.M., van Eenennaam, H., and O’Neill, L.A.J. (2013). Bruton’s Tyrosine Kinase Mediates the Synergistic Signalling between TLR9 and the B Cell Receptor by Regulating Calcium and Calmodulin. *PLoS One* *8*, 1–14.

Knittel, G., Liedgens, P., Korovkina, D., Seeger, J.M., Al-Baldawi, Y., Al-Maarri, M., Fritz, C., Vlantis, K., Bezhanova, S., Scheel, A.H., et al. (2016). B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood* *127*, 2732–2741.

Kumbrink, J., de la Cueva, A., Soni, S., Sailer, N., and Kirsch, K.H. (2016). A truncated phosphorylated p130Cas substrate domain is sufficient to drive breast cancer growth and metastasis formation in vivo. *Tumor Biol.* *37*, 10665–10673.

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., et al. (2020). Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: A Haematological Malignancy Research Network report. *Blood* *135*, 1759–1771.

Laird, P.W., Van Der Lugt, N.M. t., Clarke, A., Domen, J., Linders, K., Mcwhir, J., Berns, A., and Hooper, M. (1993). In vivo analysis of pim-1 deficiency. *Nucleic Acids Res.* *21*, 4750–4755.

Lennon, F.E., and Salgia, R. (2014). Mitochondrial dynamics: Biology and therapy in lung cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* *23*, 675–692.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 678–689.

Li, W., Zou, S.T., Zhu, R., Wan, J.M., Xu, Y., and Wu, H.R. (2014a). B-cell translocation 1 gene inhibits cellular metastasis-associated behavior in breast cancer. *Mol. Med. Rep.* *9*, 2374–2380.

Li, Y., Choi, P.S., Casey, S.C., Dill, D.L., and Felsher, D.W. (2014b). MYC through miR-17-92 suppresses specific target genes to maintain survival, autonomous proliferation, and a Neoplastic state. *Cancer Cell* *26*, 262–272.

Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* *271*, 15034–15044.

Liu, C., Tao, T., Xu, B., Lu, K., Zhang, L., Jiang, L., Chen, S., Liu, D., Zhang, X., Cao, N., et al. (2015).

BTG1 potentiates apoptosis and suppresses proliferation in renal cell carcinoma by interacting with PRMT1. *Oncol. Lett.* *10*, 619–624.

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* *2*.

Liu, X., Asokan, S.B., Bear, J.E., and Haugh, J.M. (2016). Quantitative analysis of B-lymphocyte migration directed by CXCL13. *Integr. Biol. (United Kingdom)* *8*, 894–903.

Locke, F.L., Ghobadi, A., Jacobson, C.A., Miklos, D.B., Lekakis, L.J., Oluwole, O.O., Lin, Y., Braunschweig, I., Hill, B.T., Timmerman, J.M., et al. (2019). Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1–2 trial. *Lancet Oncol.* *20*, 31–42.

Malikova, H., Burghardtova, M., Koubska, E., Mandys, V., Kozak, T., and Weichet, J. (2018). Secondary central nervous system lymphoma: Spectrum of morphological mri appearances. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* *14*, 733–740.

Marculescu, R., Le, T., Simon, P., Jaeger, U., and Nadel, B. (2002). V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: A functional assessment of genomic instability by cryptic sites. *J. Exp. Med.* *195*, 85–98.

Mareschal, S., Ruminy, P., Bagacean, C., Marchand, V., Cornic, M., Jais, J.P., Figeac, M., Picquenot, J.M., Molina, T.J., Fest, T., et al. (2015). Accurate classification of germinal center B-cell-like/activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma using a simple and rapid reverse transcriptase-multiplex ligation-dependent probe amplification assay: A CALYM study. *J. Mol. Diagnostics* *17*, 273–283.

Matsuda, S., Kawamura-Tsuzuku, J., Ohsugi, M., Yoshida, M., Emi, M., Nakamura, Y., Onda, M., Yoshida, Y., Nishiyama, A., and Yamamoto, T. (1996). Tob, a novel protein that interacts with p185erbB2, is associated with anti-proliferative activity. *Oncogene* *12*, 705–713.

Matsuda, S., Rouault, J.-P., Magaud, J.-P., and Berthet, C. (2001). In search of a function for the TIS21 / PC3 / BTG1 / TOB family. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* *497*, 67–72.

Mattagajasingh, S.N., Yang, X.P., Irani, K., Mattagajasingh, I., and Becker, L.C. (2012). Activation of Stat3 in endothelial cells following hypoxia-reoxygenation is mediated by Rac1 and protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1823*, 997–1006.

Mauxion, F., Faux, C., and Séraphin, B. (2008). The BTG2 protein is a general activator of mRNA deadenylation. *EMBO J.* *27*, 1039–1048.

Mauxion, F., Chen, C.Y.A., Séraphin, B., and Shyu, A. Bin (2009). BTG/TOB factors impact deadenylases. *Trends Biochem. Sci.* *34*, 640–647.

Meyer, P.N., Fu, K., Greiner, T.C., Smith, L.M., Delabie, J., Gascoyne, R.D., Ott, G., Rosenwald, A., Braziel, R.M., Campo, E., et al. (2011). Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J. Clin. Oncol.* *29*, 200–207.

Mikkers, H., Nawijn, M., Allen, J., Brouwers, C., Verhoeven, E., Jonkers, J., and Berns, A. (2004). Mice Deficient for All PIM Kinases Display Reduced Body Size and Impaired Responses to Hematopoietic Growth Factors. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 6104–6115.

Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: Multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 764–775.

- Mori, S., Rempel, R.E., Chang, J.T., Yao, G., Lagoo, A.S., Potti, A., Bild, A., and Nevins, J.R. (2008). Utilization of pathway signatures to reveal distinct types of B lymphoma in the E μ -myc model and human diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Res.* *68*, 8525–8534.
- Mullighan, C.G., Miller, C.B., Radtke, I., Phillips, L.A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T.P., Le Beau, M.M., Pui, C.H., et al. (2008). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* *453*, 110–114.
- Muppidi, J.R., Schmitz, R., Green, J.A., Xiao, W., Larsen, A.B., Braun, S.E., An, J., Xu, Y., Rosenwald, A., Ott, G., et al. (2014). Loss of signalling via G α 13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature* *516*, 254–258.
- Müschen, M. (2019). Metabolic gatekeepers to safeguard against autoimmunity and oncogenic B cell transformation. *Nat. Rev. Immunol.* *19*, 337–348.
- Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* *69*, 562–573.
- Ngo, V.N., Young, R.M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K.H., Kohlhammer, H., Xu, W., Yang, Y., Zhao, H., et al. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* *470*, 115–121.
- Niggli, V., and Rossy, J. (2008). Ezrin/radixin/moesin: Versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 344–349.
- Nourshargh, S., Krombach, F., and Dejana, E. (2006). The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 714–718.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, Adjacent Genes That Synergistically Activate V(D)J Recombination. *Science* (80-). *248*, 1517–1523.
- Olaru, A., Petrie, H.T., and Liva, F. (2005). Beyond the 12/23 Rule of VDJ Recombination Independent of the Rag Proteins1.
- Ortega-Molina, A., Boss, I.W., Canela, A., Pan, H., Jiang, Y., Zhao, C., Jiang, M., Hu, D., Agirre, X., Niesvizky, I., et al. (2015). The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat. Med.* *21*, 1199–1208.
- Pals, S.T., De Gorter, D.J.J., and Spaargaren, M. (2007). Lymphoma dissemination: The other face of lymphocyte homing. *Blood* *110*, 3102–3111.
- Pan, Y.R., Chen, C.C., Chan, Y.T., Wang, H.J., Chien, F.T., Chen, Y.L., Liu, J.L., and Yang, M.H. (2018). STAT3-coordinated migration facilitates the dissemination of diffuse large B-cell lymphomas. *Nat. Commun.* *9*.
- Paňková, K., Rösel, D., Novotný, M., and Brábek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 63–71.
- Papavasiliou, F., Casellas, R., Suh, H., Qin, X.F., Besmer, E., Pelanda, R., Nemazee, D., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M.C. (1997). V(D)J recombination in mature B cells: A mechanism for altering antibody responses. *Science* (80-). *278*, 298–301.
- Pasqualucci, L., Dominguez-Sola, D., Chiarenza, A., Fabbri, G., Grunn, A., Trifonov, V., Kasper,

- L.H., Lerach, S., Tang, H., Ma, J., et al. (2011). Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* *471*, 189–196.
- Petrie, R.J., Doyle, A.D., and Yamada, K.M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 538–549.
- Pfanner, N., and Meijer, M. (1997). Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Curr. Biol.* *7*, 100–103.
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., and Goodman, M.F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* *424*, 103–107.
- Pollard, T., and Gary, B. (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* *112*, 453–465.
- Pollitt, A.Y., and Insall, R.H. (2009). WASP and SCAR/WAVE proteins: The drivers of actin assembly. *J. Cell Sci.* *122*, 2575–2578.
- Prévôt, D., Morel, A.P., Voeltzel, T., Rostan, M.C., Rimokh, R., Magaud, J.P., and Corbo, L. (2001). Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: Involvement in estrogen receptor α signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 9640–9648.
- Récher, C., Coiffier, B., Haioun, C., Molina, T.J., Fermé, C., Casasnovas, O., Thiéblemont, C., Bosly, A., Laurent, G., Morschhauser, F., et al. (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* *378*, 1858–1867.
- Reddy, A., Zhang, J., Davis, N.S., Moffitt, A.B., Love, C.L., Waldrop, A., Leppa, S., Pasanen, A., Meriranta, L., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., et al. (2017). Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell* *171*, 481-494.e15.
- Richardson, B.E., Beckett, K., Nowak, S.J., and Baylies, M.K. (2007). SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* *134*, 4357–4367.
- Rimokh, R., Rouault, J. -P, Wahbi, K., Gadoux, M., Lafage, M., Archimbaud, E., Charrin, C., Gentilhomme, O., Germain, D., Samarut, J., et al. (1991). A chromosome 12 coding region is juxtaposed to the MYC protooncogene locus in a t(8; 12)(q24;q22) translocation in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosom. Cancer* *3*, 24–36.
- Risler, T. (2011). Cytoskeleton and Cell Motility.
- Rodier, A., Marchal-Victorion, S., Rochard, P., Casas, F., Cassar-Malek, I., Rouault, J.P., Magaud, J.P., Mason, D.Y., Wrutniak, C., and Cabello, G. (1999). BTG1: A triiodothyronine target involved in the myogenic influence of the hormone. *Exp. Cell Res.* *249*, 337–348.
- 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., et al. (2002). The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* *346*, 1937–1947.
- Rouault, J.-P., Falette, N., Guéhenneux, F., Guillot, C., Rimokh, R., Wang, Q., Berthet, C., Caroline, M.-L., Savatier, P., Pain, B., et al. (1996). Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependant component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat. Genet.* *14*,

482–486.

Rouault, J.P., Rimokh, R., Tessa, C., Paranhos, G., Ffrench, M., Duret, L., Garoccio, M., Germain, D., Samarut, J., and Magaud, J.P. (1992). BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J.* *11*, 1663–1670.

Rouault, J.P., Prévôt, D., Berthet, C., Birott, A.M., Billaud, M., Magaud, J.P., and Corbo, L. (1998). Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 gene products with mCaf1, the murine homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional regulatory complex. *J. Biol. Chem.* *273*, 22563–22569.

Roux, K.J., Kim, D.I., and Burke, B. (2013). BioID: A screen for protein-protein interactions. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 1–14.

Ruppert, A., Dixon, J., Salles, G., Wall, A., Cunningham, D., Poeschel, V., Haioun, C., Tilly, H., Ghesquieres, H., Ziepert, M., et al. (2021). International prognostic indices in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): a comparison of IPI ,. *Blood*.

Scheijen, B., Boer, J.M., Marke, R., Tijchon, E., van Ingen Schenau, D., Waanders, E., van Emst, L., van der Meer, L.T., Pieters, R., Escherich, G., et al. (2017). Tumor suppressors BTG1 and IKZF1 cooperate during mouse leukemia development and increase relapse risk in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients. *Haematologica* *102*, 541–551.

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., et al. (2018). Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* *378*, 1396–1407.

Schuh, N.R., Guerrero, M.S., Schrecengost, R.S., and Bouton, A.H. (2010). BCAR3 regulates Src/p130Cas association, Src kinase activity, and breast cancer adhesion signaling. *J. Biol. Chem.* *285*, 2309–2317.

Schuster, S.J., Svoboda, J., Chong, E.A., Nasta, S.D., Mato, A.R., Anak, Ö., Brogdon, J.L., Pruteanu-Malinici, I., Bhoj, V., Landsburg, D., et al. (2017). Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* *377*, 2545–2554.

Scott, D.W., Wright, G.W., Williams, P.M., Lih, C.J., Walsh, W., Jaffe, E.S., Rosenwald, A., Campo, E., Chan, W.C., Connors, J.M., et al. (2014). Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* *123*, 1214–1217.

Sehn, L.H., and Salles, G. (2021). Diffuse large B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* *384*, 842–858.

Sesques, P., Ferrant, E., Safar, V., Wallet, F., Tordo, J., Dhomps, A., Karlin, L., Brisou, G., Vercasson, M., Hospital-Gustem, C., et al. (2020). Commercial anti-CD19 CAR T cell therapy for patients with relapsed/refractory aggressive B cell lymphoma in a European center. *Am. J. Hematol.* *95*, 1324–1333.

Sewastianik, T., Guerrero, M.L., Adler, K., Dennis, P.S., Wright, K., Shanmugam, V., Huang, Y., Tanton, H., Jiang, M., Kofides, A., et al. (2019). Human MYD88L265P is insufficient by itself to drive neoplastic transformation in mature mouse B cells. *Blood Adv.* *3*, 3360–3374.

Sheetz, M.P., Felsenfeld, D., Galbraith, C.G., and Choquet, D. (1999). Cell migration as a five-step cycle. *Biochem. Soc Symp.* *65*, 233–243.

Sheng, S.H., Zhao, C.M., and Sun, G.G. (2014). BTG1 expression correlates with the pathogenesis and progression of breast carcinomas. *Tumor Biol.* *35*, 3317–3326.

- Smith, W.A., Schurter, B.T., Wong-Staal, F., and David, M. (2004). Arginine methylation of RNA helicase A determines its subcellular localization. *J. Biol. Chem.* *279*, 22795–22798.
- Sonnen, R., Schmidt, W.P., Kuse, R., and Schmitz, N. (2002). Treatment results of aggressive B non-hodgkin's lymphoma in advanced age considering comorbidity. *Br. J. Haematol.* *119*, 634–639.
- Soucy, T.A., Smith, P.G., Milhollen, M.A., Berger, A.J., Gavin, J.M., Adhikari, S., Brownell, J.E., Burke, K.E., Cardin, D.P., Critchley, S., et al. (2009). An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* *458*, 732–736.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J., and Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. *Nature* *458*, 719–724.
- Stupfler, B., Birck, C., Séraphin, B., and Mauxion, F. (2016). BTG2 bridges PABPC1 RNA-binding domains and CAF1 deadenylase to control cell proliferation. *Nat. Commun.* *7*.
- Swerdlow, S.H. (2014). Diagnosis of “double hit” diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: When and how, FISH versus IHC. *Hematol. (United States)* *2014*, 90–99.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Lee Harris, N., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* *127*, 2375–2390.
- Swerdlow SH, E, C., NL, H., ES, J., SA, P., H, S., and J, T. (2016). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lyon, France : IARC).
- Tarella, C., Gueli, A., Delaini, F., Rossi, A., Barbui, A.M., Gritti, G., Boschini, C., Caracciolo, D., Bruna, R., Ruella, M., et al. (2014). Rate of primary refractory disease in B and T-Cell non-Hodgkin's Lymphoma: Correlation with long-term survival. *PLoS One* *9*.
- Tijchon, E., van Emst, L., Yuniati, L., van Ingen Schenau, D., Havinga, J., Rouault, J.-P., Hoogerbrugge, P.M., van Leeuwen, F.N., and Scheijen, B. (2016). Tumor suppressors BTG1 and BTG2 regulate early mouse B-cell development. *Haematologica* *101*, e272–e276.
- Tijchon, E., van Emst, L., Yuniati, L., van Ingen Schenau, D., Gerritsen, M., van der Meer, L.T., Williams, O., Hoogerbrugge, P.M., Scheijen, B., and van Leeuwen, F.N. (2018). Tumor suppressor BTG1 limits activation of BCL6 expression downstream of ETV6-RUNX1. *Exp. Hematol.* *60*, 57-62.e3.
- Tokheim, C.J., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Karchin, R. (2016). Evaluating the evaluation of cancer driver genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 14330–14335.
- Treon, S.P., Xu, L., Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Sheehy, P., Manning, R.J., Patterson, C.J., Tripsas, C., et al. (2012). MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* *367*, 826–833.
- Tsuzuki, S., Karnan, S., Horibe, K., Matsumoto, K., Kato, K., Inukai, T., Goi, K., Sugita, K., Nakazawa, S., Kasugai, Y., et al. (2007). Genetic abnormalities involved in t(12;21) TEL-AML1 acute lymphoblastic leukemia: Analysis by means of array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci.* *98*, 698–706.
- Vallénus, T. (2013). Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open Biol.* *3*.

- Venturutti, L., Teater, M., Zhai, A., Chadburn, A., Babiker, L., Kim, D., Béguelin, W., Lee, T.C., Kim, Y., Chin, C.R., et al. (2020). TBL1XR1 Mutations Drive Extranodal Lymphoma by Inducing a Pro-tumorigenic Memory Fate. *Cell* *182*, 297–316.e27.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* (80-.). *340*, 1546–1558.
- Waanders, E., Scheijen, B., van der Meer, L.T., van Reijmersdal, S. V., van Emst, L., Kroeze, Y., Sonneveld, E., Hoogerbrugge, P.M., van Kessel, A.G., van Leeuwen, F.N., et al. (2012). The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet.* *8*.
- Wang, L., Qin, W., Huo, Y.J., Li, X., Shi, Q., Rasko, J.E.J., Janin, A., and Zhao, W.L. (2020). Advances in targeted therapy for malignant lymphoma. *Signal Transduct. Target. Ther.* *5*.
- Wästerlid, T., Biccler, J.L., Brown, P.N., Bøgsted, M., Enblad, G., Mészáros Jørgensen, J., Christensen, J.H., Wahlin, B.E., Smedby, K.E., El-Galaly, T.C., et al. (2018). Six cycles of R-CHOP-21 are not inferior to eight cycles for treatment of diffuse large B-cell lymphoma: a Nordic Lymphoma Group Population-based Study. *Ann. Oncol.* *29*, 1882–1883.
- Wilson, W.H., Wright, G.W., Huang, D.W., Hodgkinson, B., Balasubramanian, S., Fan, Y., Vermeulen, J., Shreeve, M., and Staudt, L.M. (2021). Effect of ibrutinib with R-CHOP chemotherapy in genetic subtypes of DLBCL. *Cancer Cell* 1–11.
- Winkler, G.S. (2010). The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family. *J. Cell. Physiol.* *222*, 66–72.
- Wittig, I., Braun, H., and Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* *1*, 418–428.
- Wolf, K., Müller, R., Borgmann, S., Bröcker, E.B., and Friedl, P. (2003). Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood* *102*, 3262–3269.
- Worthylake, R.A., Lemoine, S., Watson, J.M., and Burridge, K. (2001). RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J. Cell Biol.* *154*, 147–160.
- 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., et al. (2020). A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell* *37*, 551–568.e14.
- Xie, J., Wang, Q., Wang, Q., Yao, H., Wen, L., Ma, L., Wu, D., and Chen, S. (2014). High frequency of BTG1 deletions in patients with BCR-ABL1-positive acute leukemia. *Cancer Genet.* *207*, 226–230.
- Yamashita, A., Chang, T.C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.Y.A., and Shyu, A. Bin (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 1054–1063.
- Yang, Y., and Bedford, M.T. (2013). Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 37–50.
- Yang, X., Morita, M., Wang, H., Suzuki, T., Yang, W., Luo, Y., Zhao, C., Yu, Y., Bartlam, M., Yamamoto, T., et al. (2008). Crystal structures of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity. *Nucleic Acids Res.* *36*, 6872–6881.

- Yoshida, Y., Matsuda, S., Ikematsu, N., Kawamura-Tsuzuku, J., Inazawa, J., Umemori, H., and Yamamoto, T. (1998). ANA, a novel member of Tob/BTG1 family, is expressed in the ventricular zone of the developing central nervous system. *Oncogene* *16*, 2687–2693.
- Yoshimatsu, M., Toyokawa, G., Hayami, S., Unoki, M., Tsunoda, T., Field, H.I., Kelly, J.D., Neal, D.E., Maehara, Y., Ponder, B.A.J., et al. (2011). Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int. J. Cancer* *128*, 562–573.
- Younes, A., Sehn, L.H., Johnson, P., Zinzani, P.L., Hong, X., Zhu, J., Patti, C., Belada, D., Samoilova, O., Suh, C., et al. (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. *J. Clin. Oncol.* *37*, 1285–1295.
- Yuniati, L., Scheijen, B., van der Meer, L.T., and van Leeuwen, F.N. (2019). Tumor suppressors BTG1 and BTG2: Beyond growth control. *J. Cell. Physiol.* *234*, 5379–5389.
- Zaheen, A., and Martin, A. (2011). Activation-induced cytidine deaminase and aberrant germinal center selection in the development of humoral autoimmunities. *Am. J. Pathol.* *178*, 462–471.
- Zhang, J., Dalla-Favera, R., and Pasqualucci, L. (2000). Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Cancer Res.* *60*, 4320–4323.
- Zhang, J., Dominguez-Sola, D., Hussein, S., Lee, J.E., Holmes, A.B., Bansal, M., Vlasevska, S., Mo, T., Tang, H., Basso, K., et al. (2015). Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat. Med.* *21*, 1190–1198.
- Zhang, J., Vlasevska, S., Wells, V.A., Nataraj, S., Holmes, A.B., Duval, R., Meyer, S.N., Mo, T., Basso, K., Brindle, P.K., et al. (2017). The CREBBP acetyltransferase is a haploinsufficient tumor suppressor in B-cell lymphoma. *Cancer Discov.* *7*, 323–337.
- Zhou, K., Rao, J., Zhou, Z. hua, Yao, X. hong, Wu, F., Yang, J., Yang, L., Zhang, X., Cui, Y. hong, Bian, X.W., et al. (2018). RAC1-GTP promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion of colorectal cancer by activation of STAT3. *Lab. Investig.* *98*, 989–998.
- Zhu, R., Zou, S.-T., Wan, J.-M., Li, W., Li, X.-L., and Zhu, W. (2013). BTG1 inhibits breast cancer cell growth through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Oncol. Rep.* *30*, 2137–2144.
- Zhu, R., Li, W., Xu, Y., Wan, J., and Zhang, Z. (2015). Upregulation of BTG1 enhances the radiation sensitivity of human breast cancer in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* *34*, 3017–3024.

Résumé

Les lymphomes sont un groupe de cancers développés aux dépens des lymphocytes B ou T. Parmi les lymphomes B, il existe une grande hétérogénéité de présentations cliniques et de réponses thérapeutiques, résultant de la mise en œuvre de mécanismes oncogéniques différents. Les lymphomes B diffus à grandes cellules, représentant la sous-entité majoritaire des lymphomes B non Hodgkiniens, sont classés selon le stade de différenciation de leur cellule d'origine supposée et sur leur profil mutationnel. Le gène *BTG1* est particulièrement muté dans le sous-groupe MCD/C5, caractérisé par un pronostic défavorable et associé à des atteintes extra-ganglionnaires. L'objet de ce travail a été de comprendre les conséquences fonctionnelles de l'inactivation de *BTG1* dans la lymphomagenèse B.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'inactivation de *BTG1* entraîne une augmentation de la formation des centres germinatifs après immunisation par antigènes T dépendants. De plus, l'inactivation de *BTG1* accélère le développement de lymphomes induits par la surexpression de l'oncogène *BCL2*. Puis nous avons mis au point un modèle murin de dissémination lymphomateuse, dans lequel nous avons observé que *BTG1* promeut la dissémination tumorale, rappelant le phénotype des lymphomes MCD/C5. Grâce à des approches protéomiques, nous avons identifié un nouveau partenaire protéique de *BTG1*, *BCAR1*, qui joue entre autres un rôle de mécano-censeur et participe à la transduction du signal des plaques d'adhésions focales à travers différentes phosphorylations médiées par les kinases Src. Nous avons démontré que les cellules inactivées pour *BTG1* présentent une activation constitutive de la voie *BCAR1-RAC1*, qui se traduit par un remodelage du cytosquelette d'actine, la formation de filopodes, et des capacités d'adhésion augmentées. Ces modifications sont abolies par la réexpression de *BTG1* ou par l'utilisation du dasatinib, un inhibiteur des Src kinases. Enfin, nous avons mis en évidence une vulnérabilité thérapeutique des cellules *BTG1* KO par rapport aux inhibiteurs de *MCL1* (peptides ou composé S63845) qui ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes pour ces lymphomes de mauvais pronostic.

Abstract

Lymphomas are a group of cancers developed at the expense of B or T lymphocytes. Among B lymphomas, there is an important heterogeneity of clinical presentations and therapeutic responses, resulting from the implementation of different oncogenic mechanisms. Diffuse large B cell lymphomas, representing the major entity of non-Hodgkin B lymphomas, are classified according to the stage of differentiation of their presumed cell of origin and their mutational profile. The *BTG1* gene is particularly mutated in the MCD / C5 subgroup characterized by an unfavorable prognosis and associated with extranodal involvement. The object of this work was to understand the functional consequences of the inactivation of *BTG1* in B lymphomagenesis.

We first showed that inactivation of *BTG1* leads to an increase in the formation of germinal centers after immunization with T-dependent antigens. In addition, inactivation of *BTG1* accelerates the development of lymphomas induced by overexpression of the *BCL2* oncogene. Then, we developed a mouse model of lymphoma dissemination, in which we observed that *BTG1* promotes tumor dissemination, reminiscent of the phenotype of MCD / C5 lymphomas. Thanks to proteomic approaches, we have identified a new protein partner of *BTG1*, *BCAR1*, which among other things plays a role of mechanosensor and participates in the signal transduction of focal adhesions through different phosphorylations mediated by Src kinases. We have shown that cells inactivated for *BTG1* exhibit constitutive activation of the *BCAR1-RAC1* pathway, which results in remodeling of the actin cytoskeleton, formation of filopodia, and increased adhesion capacities. These changes are abolished by re-expression of *BTG1* or by the use of dasatinib, an Src kinase inhibitor. Finally, we have demonstrated a therapeutic vulnerability of *BTG1* inactivated cells for *MCL1* inhibitors (peptides or compound S63845) which opens interesting therapeutic prospects for these lymphomas with poor prognosis.