



HAL
open science

Caractérisation épigénétique du lymphome du manteau

Stéphanie Chauvelier-Grouiller

► **To cite this version:**

Stéphanie Chauvelier-Grouiller. Caractérisation épigénétique du lymphome du manteau. Sciences pharmaceutiques. 2010. dumas-00592398

HAL Id: dumas-00592398

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00592398v1>

Submitted on 12 May 2011

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.

Caractérisation épigénétique du lymphome du manteau

MÉMOIRE

DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Conformément aux dispositions réglementaires du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de thèse

THÈSE PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

CHAUVÉLIER épouse GROUILLER Stéphanie

Née le 24 avril 1981 à LAVAL (Mayenne)

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 4 juin 2010

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Pr Emmanuel DROUET

Président de Jury

Dr Mary CALLANAN

Directrice de Thèse

Dr Blandine FABRE-BOCQUENTIN

Dr Rémy GRESSIN

Pr Dominique LEROUX



UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES. TECHNOLOGIE. SANTÉ.



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur Renée GRILLOT
Vice-Doyen et Directeur des Etudes : Mme Edwige NICOLLE

Année 2009-2010

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (N=17)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (LR)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wilhelm	Physique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (GREPI - TIMC)
DROUET	Ermanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2 / PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (Directeur UFR / LAPM, PU-PH)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (Therex, TIMC)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie - Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

Mise à jour le 03/09/2009



UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES. TECHNOLOGIE. SANTÉ.



PROFESSEUR EMERITE (N=1)

FAVIER

Alain

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (N=2)

**RIEU
TROUILLER**

Isabelle
Patrice

Qualitologie (Praticien Attaché - CHU)
Santé Publique (Praticien Hospitalier - CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (N=1)

GAUCHARD

Pierre Alexis

Chimie (D.P.M.)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 03/09/2009



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur Renée GRILLOT
Vice-Doyen et Directeur des Etudes : Mme Edwige NICOLLE

Année 2009-2010

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 32)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B - LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A.)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (U.V.H.C.I. / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
MELO DE LIMA	Christelle	Probabilités Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CIB / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)



ENSEIGNANTS ANGLAIS (N = 3)

COLLE Pierre Emmanuel	Maître de Conférence
FITE Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER Laurence	Professeur Certifié

ATER (N = 5)

ATER	ELAZZOUZI Samira	Pharmacie Galénique
ATER	SHEIKH HASSAN Amhed	Pharmacie Galénique
ATER	MAS Marie	Anglais Master ISM
ATER	ROSSI Caroline	Anglais Master ISM
ATER	SAPIN Emilie	Physiologie Pharmacologie

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord le Professeur Emmanuel Drouet pour avoir accepté la présidence de mon jury de thèse.

Egalement un merci tout particulier à Mary Callanan pour m'avoir proposé ce sujet passionnant et pour son soutien jour après jour.

Vraiment un grand merci au Pr Dominique Leroux, au Dr Rémy Gressin et au Dr Blandine Fabre-Bocquentin d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et pour leur soutien au cours de ce projet et de mon internat.

Occasion particulière pour moi de remercier Martine Chauvet pour son aide et son soutien si précieux qui m'ont beaucoup apporté au cours de ce projet, ainsi que Christine Lefebvre pour ses conseils, son aide, son soutien jour après jour qui m'ont été et me sont indispensables.

Un grand merci à Juliana, Alexandra, Anne et Alicia pour leurs conseils, leurs formations techniques et pour les bons moments passés ensemble.

Sincères remerciements à Sam, Sième, Aurélie, Céline, Laëtitia, Jean Jacques, Isabelle, Sarah pour leur aide technique, leur patience et leur gentillesse.

Remerciements à Catherine B., Catherine C., Julien, Laure, Mélanie et Pauline pour ses années de fac à Angers que je n'oublierai jamais...

Evidemment je n'oublie pas tous mes co-internes (Lauren, Géraldine, Yolande, Marion, Antoine et tous les petits jeunes...) avec qui j'ai partagé tant de bons moments et que je n'oublierais jamais. Merci à vous tous.

Merci à l'ensemble des biologistes, des techniciens, des aides de laboratoire, des secrétaires des différents services où je suis passée pour leur accueil et pour m'avoir appris mon métier.

Encouragements et soutiens indispensables depuis toujours, je remercie mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines pour tous les moments de bonheur que l'on a partagé et que l'on continuera à partager.

Réconfortantes, relaxantes, merci Veela pour nos séances de ronronthérapie !

Clin d'œil particulier à ma gégé qui me soutient, m'encourage, éclaire mes coups de blues depuis presque 15 ans. Merci pour tout.

Incontournablement, un merci particulier pour mes parents et mes deux petites sœurs chéries qui m'ont toujours encouragé et soutenu au cours de ses longues années. Sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui, alors juste pour cela merci.

Enfin, Frédéric, mon petit mari que j'aime tant. Qu'aurais fais je sans toi? Merci pour ton soutien et ton aide au cours de ces longs et nombreux nycthémes. Tu as eu le courage de supporter mes sauts d'humeur, mes énervements répétés sur mon ordinateur, de jouer tout seul à Mario Kart (du coup j'ai pas mal de retard à rattraper !). Merci de partager ta vie avec moi. Je suis heureuse et fière d'être ta femme.

SOMMAIRE

Index des abréviations

Introduction	1
1. L'épigénome	2
a. Définition	2
b. L'organisation de la chromatine, support de l'information épigénétique.....	2
c. Epigénome et modifications chimiques	7
d. L'hétérochromatine et le contrôle de l'expression génique	16
e. Épigénétique et cancer	19
2. Physiologie de la maturation des lymphocytes B	22
a. La lymphopoïèse B médullaire : phase indépendante des antigènes étrangers	23
b. Les cellules B transitionnelles.....	30
c. Maturation antigène dépendante des lymphocytes B dans les follicules lymphoïdes	32
d. La différenciation plasmocytaire	40
e. Épigénome et lymphomagenèse	41
3. Le lymphome à cellules du manteau (MCL).....	45
a. Éléments du diagnostic du lymphome du manteau.....	45
b. Physiopathologie des lymphomes du manteau	55
c. Épigénome et lymphome du manteau.....	64
But et objectifs du projet	66
Matériels et méthodes	67
1. Cellules et échantillons de patients	67
a. Lignées cellulaires et conditions de culture	67
b. Lymphocytes B normaux	68
c. Sélection d'échantillons de patients présentant un MCL	68
2. Profils épigénétiques des lymphomes du manteau.....	70
a. Immunohistochimie (IHC) sur tissus en paraffine	71
b. État de méthylation et d'acétylation des histones H3 et H4 en Western-blot.....	71
c. Technique d'immunofluorescence sur cellules fixées.....	73

d.	Immunoprécipitation de chromatine native (ChIP) sur lignées cellulaires.....	73
3.	Étude des mécanismes épigénétiques dérégulés dans le MCL.....	75
a.	Extraction, purification et qualification des acides nucléiques.....	75
b.	Analyses en PCR quantitative (Q-PCR)	76
c.	Analyses du point de cassure de la t(11;14) et du statut mutationnel en PCR.....	77
	Résultats	79
1.	Quantification et organisation de marques épigénétiques dans des lignées de lymphomes.....	79
2.	Profil épigénétique de cellules primaires de lymphome du manteau.....	81
a.	Profil physiologique des marques d'hétérochromatine au cours de la maturation B antigène dépendante	81
b.	Modifications post-traductionnelles des histones H4 dans les lymphomes du manteau.....	85
c.	Méthylation des lysines de l'histone H3 dans les lymphomes du manteau	86
d.	Patrons des isoformes d'HP1 dans les lymphomes du manteau	87
e.	Un ou des profils épigénétiques dans le lymphome du manteau ?.....	89
3.	Expression de gènes modificateurs de la méthylation de lysines des histones H3 et H4	91
a.	Variations physiologiques.....	91
b.	Dérégulation de l'expression des histones méthyltransférases dans les MCL	92
c.	Corrélation de l'expression de Suv4-20h1 avec le statut MTC.....	95
	Discussion	98
	Perspectives	102
	Conclusion.....	104
	Bibliographie	
	Annexes	
	Serment des Apothicaires	
	Résumé	

INDEX DES ABRÉVIATIONS

Ac : acétylation

ADN : acide désoxyribonucléique

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : adénosine triphosphate

ARN : acide ribonucléique

ARN_i : ARN interférant

ChIP : immunoprécipitation de la chromatine

CGH : Comparative Genomic Hybridization

DNMT : DNA méthyltransférase

DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules

FISH : Fluorescence in situ hybridization

FL : lymphome folliculaire

H2A : histone H2A

H2B : histone H2B

H3 : histone H3

H3K4 : lysine 4 de l'histone H3

H3K9 : lysine 9 de l'histone H3

H3K27 : lysine 27 de l'histone H3

H3K36 : lysine 36 de l'histone H3

H3K79 : lysine 79 de l'histone H3

H4 : histone H4

H4K20 : lysine 20 de l'histone H4

HAT : histone acétyltransférase

HDAC : histone désacétylase

HMT : histone méthyltransférase

Hs : Homo sapiens

Ig : immunoglobuline

IGH : chaîne lourde d'immunoglobuline

IG κ : chaîne légère kappa

IGL : chaîne légère d'immunoglobuline

IG λ : chaîne légère lambda

IHC : immunohistochimie

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LNH : lymphome non Hodgkinien

MCL : lymphome à cellules du manteau

Me : méthylation

MTC : major translocation cluster

P : phosphorylation

pb : paires de bases

PHD : plant homeodomain

RT – Q – PCR : Reverse Transcription – Quantitative – Polymerase Chain Reaction

WB : Western-blot

INTRODUCTION

Les lymphomes à cellules du manteau (MCL) sont des lymphomes B diffus à petites cellules particuliers de par leur pronostic sombre et leur évolution rapide (la maladie est actuellement incurable avec une médiane de survie de 3-4 ans). Bien que décrits dans la classification 2008 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une entité clinico-biologique homogène, les malades ont des évolutions très différentes, certains succombant de la maladie en quelques mois d'autres restant en vie au-delà de 7 ans. La recherche de facteurs prédictifs de réponse aux traitements, de facteurs pronostics de survie et la découverte de thérapies ciblées sont les objectifs pour améliorer le devenir des patients atteints d'un lymphome du manteau.

De nombreuses études ont étayé le rôle important d'anomalies épigénétiques dans l'initiation et la progression des cancers. Dans les lymphomes, ces études portent essentiellement sur la méthylation de l'ADN, celles concernant la méthylation des histones restent rares. Contrairement aux anomalies génétiques, les anomalies épigénétiques sont réversibles et représentent donc de nouvelles cibles thérapeutiques très intéressantes dans les cancers. Ces thérapies dites « épigénétiques » sont déjà bien développées puisqu'au stade d'essais cliniques de phases I et II : le Vorinostat[®] (suberoylanilide hydroxamic acid), inhibiteur d'histones déacétylases, dans le traitement des lymphomes T cutanés ou encore des lymphomes B diffus à grandes cellules ; le Vidaza[®] (azacitidine) inhibiteur de DNA méthyltransférases, dans les syndromes myélodysplasiques.

Dans ce contexte, notre laboratoire développe un projet de recherche visant à comprendre le rôle de l'hétérochromatine constitutive et de la répression génique au cours de la lymphomagenèse. L'intégration du lymphome du manteau dans un contexte épigénétique semble importante à l'heure actuelle pour améliorer la compréhension de son origine, des mécanismes mis en jeu et des solutions thérapeutiques à apporter. Dans ce cadre, l'introduction de ce mémoire vise à montrer comment l'épigénome peut être impliqué dans la régulation de processus physiologiques au cours de la lymphopoïèse et des mécanismes altérés dans les cancers en s'appuyant sur l'exemple du lymphome du manteau. Dans une première partie nous aborderons les notions fondamentales et les grands concepts de l'épigénome. Ensuite, la physiopathologie de la lymphopoïèse B et des lymphomes seront présentés. Enfin, nous définirons et exposerons les caractéristiques du lymphome du manteau.

1. L'épigénome

a. Définition

L'épigénome représente l'ensemble des informations héréditaires et réversibles au cours des divisions cellulaires qui contribuent à la régulation d'états fonctionnels au sein d'une cellule sans affecter directement la séquence d'ADN. Ces informations dites « épigénétiques » au sein de la chromatine sont véhiculées par des modifications chimiques de l'ADN (méthylation), des modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, méthylation par exemple), des variants d'histones, des ARN non codants, et enfin l'organisation spatiale des gènes et des territoires chromosomiques dans le noyau cellulaire (« higher order chromatin structure »)²⁰⁶. L'épigénome présente une plasticité remarquable essentielle à son rôle dans le contrôle de divers processus biologiques (développement, différenciation cellulaire) et pathologiques tel que le cancer^{95,100}.

b. L'organisation de la chromatine, support de l'information épigénétique

Le génome humain est composé de six milliards de paires de bases (pb), organisées en 46 chromosomes, et a une longueur totale d'ADN déroulé d'environ deux mètres. Or, cet ADN est présent au sein du noyau cellulaire, dont le diamètre n'excède pas une dizaine de micromètres. Afin de pouvoir être contenu dans le noyau, l'ADN doit donc être compacté⁸⁸. C'est pourquoi les cellules eucaryotes conditionnent leurs informations génétiques dans la chromatine, un énorme complexe nucléoprotéique composé d'ADN et d'un ensemble de protéines structurales et régulatrices (fig. I.1). Cette organisation est importante pour la régulation de fonctions cellulaires telles que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN⁷³.

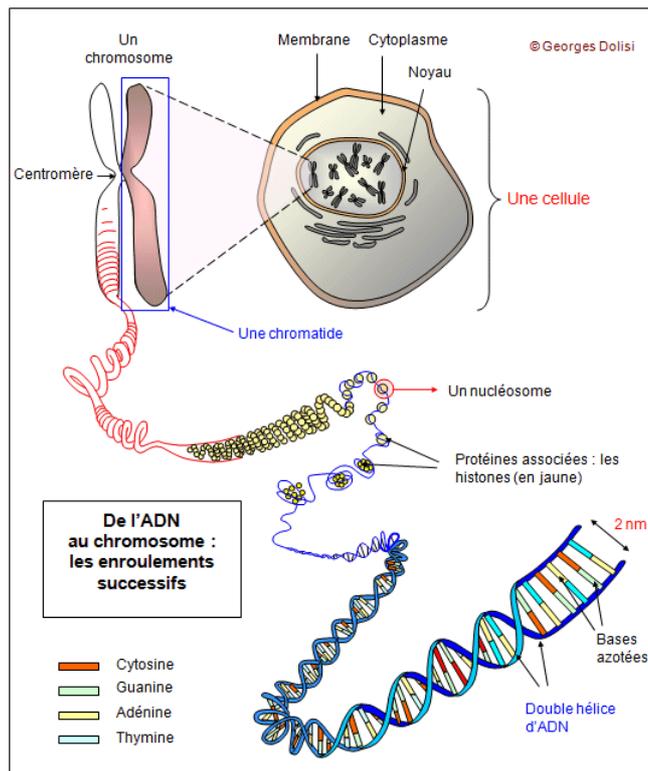


Figure I.1 : Compaction de l'ADN dans le noyau. Enroulement de l'ADN sous forme de nucléosome et compaction en fibre de chromatine pour former le chromosome métaphasique contenu dans le noyau de la cellule. D'après http://georges.dolisi.free.fr/Schemas/ADN_au_chromosome.gif.

i. Structure et organisation

L'ADN eucaryote est condensé dans une structure chromatinienne formée de la répétition de nucléosomes constitués par l'enroulement (environ 1,7 tours) de 147 pb d'ADN autour d'un octamère composé de deux molécules de chaque histones : H2A, H2B, H3 et H4 (fig. I.2)^{15,77,88}.

Les nucléosomes sont reliés entre eux par un fragment d'ADN internucléosomal ou ADN de liaison. Ce dernier interagit avec une autre protéine histone, H1, dite « histone de liaison ». Les histones H1 permettent la compaction des nucléosomes pour former la fibre de 10 nm. Cette dernière peut ensuite être compactée dans une structure hélicoïdale dessinant une fibre de 30 nm via les interactions entre les queues d'histones qui sortent du disque nucléosomal^{94,178}. Les fibres de 30 nm s'organisent en domaines qui composent les chromosomes.

Le noyau cellulaire est à présent considéré comme un compartiment complexe et finement organisé au sein duquel les éléments tendent à occuper des positions non-aléatoires, définissant le concept d'architecture nucléaire. L'architecture nucléaire résulte de l'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle entre différents compartiments subnucléaires au sein du noyau. Deux types de compartiments subnucléaires sont habituellement décrits : les corps nucléaires (nuclear bodies) et les territoires

chromosomiques⁴⁹. Les corps nucléaires sont des régions subnucléaires de différentes tailles dépourvues de membrane lipidique et habituellement caractérisées par une composition définie en protéines. Les territoires chromosomiques désignent la compartimentation spatiale non aléatoire des chromosomes dans le noyau interphasique. En 2001, Cremer *et al* proposent un modèle d'organisation spatiale du génome dans lequel les chromosomes sont compartimentés en territoires distincts, les territoires chromosomiques, localisés de manière non aléatoire dans le noyau³⁷.

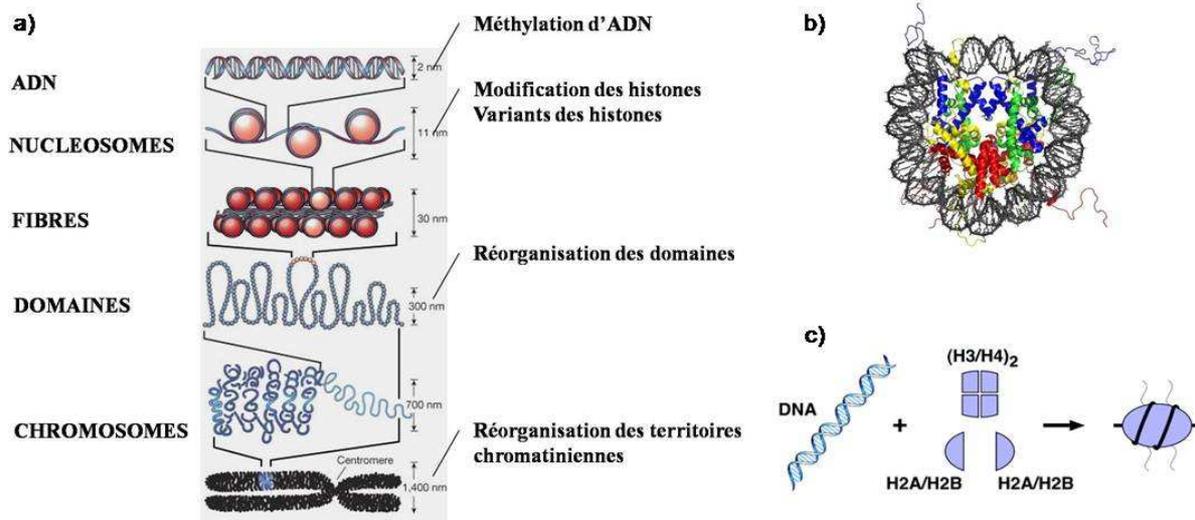


Figure 1.2 : Compaction de l'ADN. a) Les différents niveaux d'organisation de la chromatine dans le noyau des cellules eucaryotes. Adapté de⁵⁴ ; b) Structure du nucléosome par diffraction aux rayons X, montrant la double hélice d'ADN (en noir) enroulée 1,7 fois autour de l'octamère d'histones (4 couleurs). Adapté de¹⁴⁰ ; c) Représentation d'un nucléosome, composé d'un octamère des histones H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel s'enroule l'ADN. D'après⁷⁷.

L'organisation du nucléosome, la composition des sous-unités et les modifications post-traductionnelles des histones peuvent agir comme des sites de nucléation pour les facteurs impliqués dans la régulation chromatinienne et métabolique. Cette organisation permet de définir deux états chromatinien distincts (fig. 1.3)^{12,77,156} :

- l'euchromatine correspond à un état chromatinien ouvert au sein duquel le génome est accessible aux facteurs de transcription ; elle est donc associée aux gènes actifs,
- l'hétérochromatine est associée à un état chromatinien fermé où le génome est inaccessible aux facteurs liant l'ADN avec pour conséquence une répression de l'expression des gènes.

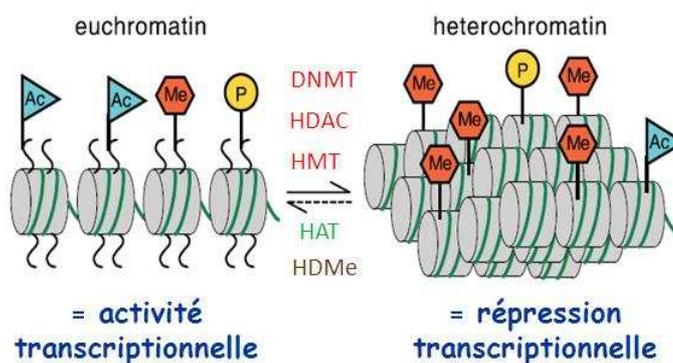


Figure I.3 : Représentation schématique de l'euchromatine et de l'hétérochromatine présentant respectivement des structures relâchée et condensée. Les enzymes mettant en place ou effaçant les modifications chimiques sur l'ADN ou les histones sont indiquées. Ac : acétylation, Me : méthylation, P : phosphorylation, DNMT : DNA méthyltransférase, HDAC : histone déacétylase, HMT : histone méthyltransférase, HAT : histone acétyltransférase, HDMe : histone déméthylase. Adaptée de¹⁰⁰.

ii. Les composants majeurs de la chromatine

L'ADN

L'acide désoxyribonucléique est le support de l'information génétique des organismes vivants. Sa structure en double hélice le rend très stable, ce qui est nécessaire pour conserver les instructions héritées qui vont générer la vie et les transmettre aux générations suivantes. Le code génétique établit une correspondance entre les bases de l'ADN (adénine A, guanine G, cytosine C et thymine T), via la transcription en molécules d'ARN, et les acides aminés qui constituent les protéines, support de l'activité biologique.

LES HISTONES

Les composants principaux de la fibre de chromatine de la famille des histones (H2A, H2B, H3 et H4) sont de petites protéines basiques chargées positivement, contenant un nombre important de lysines et d'arginines. Elles lient directement la fibre d'ADN par des forces non covalentes. La partie C-terminale des histones contient un motif appelé « histone-fold » et est impliquée dans les interactions histone/histone et ADN/histone. Les domaines N-terminaux de 25-40 acides aminés sont très conservés et contiennent les sites cibles des modifications post-traductionnelles (fig. I.4). Les histones H3 et H4 sont peu mobiles étant donné que ce sont des composants clés des nucléosomes, tandis que H2A et H2B sont beaucoup plus dynamiques⁷³.

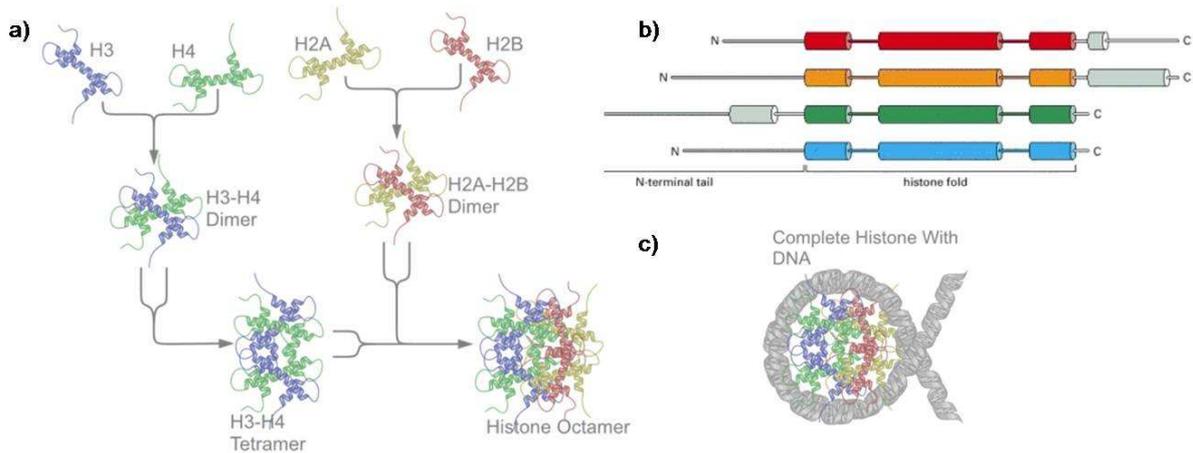


Figure 1.4 : Structure d'un nucléosome. a) L'octamère d'histones est composé de deux molécules de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. On distingue les extrémités N-terminales des histones se projetant à l'extérieur de la partie globulaire du nucléosome ; b) La structure des histones distingue les queues N-terminale du core d'histone ; c) La double hélice d'ADN s'enroule autour de l'octamère d'histone.

D'après <http://fr.wikipedia.org/wiki/Histone> et www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi.

LES PROTÉINES D'HÉTÉROCHROMATINE 1 (HP1)

Les protéines HP1 ont été découvertes chez la Drosophile en tant que composants majeurs de l'hétérochromatine. HP1 est une protéine non-histone qui interagit avec des protéines pour réguler la transcription et l'arrangement de la chromatine. Trois isoformes sont décrites : α , β , γ codées respectivement par les gènes CBX5 (12q13.13), CBX1 (17q21.32) et CBX3 (7p15.2)¹³⁸. Elles sont composées de deux domaines, un chromodomaine N-terminal et un domaine chromoshadow en C-terminal, séparés par une région « linker » de longueur variable, la région charnière (fig. 1.5). Le chromodomaine est capable de se lier aux queues d'histones méthylées sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) tandis que le domaine chromoshadow facilite l'homodimérisation et interagit avec d'autres protéines^{73,82}.

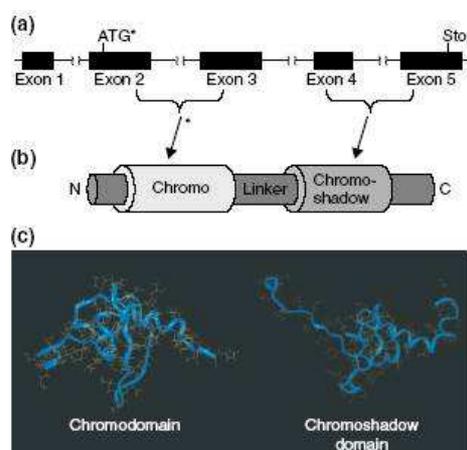


Figure 1.5 : Structure des protéines HP1 et des gènes qui les codent. (a) La structure génomique conservée des gènes codant pour les HP1 de la Drosophile à l'Homme. Chaque gène est composé de 5 exons séparés par 4 introns. (b) La structure linéaire conservée des protéines HP1. N, amino-terminal ; C, carboxy-terminal ; (c) Les structures tridimensionnelles du chromodomaine et du domaine chromoshadow de HP1 β murin. D'après¹³⁸.

HP1 α est généralement localisée au niveau de l'hétérochromatine (péri)centromérique. L'isoforme β est située principalement au niveau des promoteurs des gènes euchromatiques silencieux. HP1 γ est retrouvée au niveau des régions codantes des gènes transcrits²⁰⁰. Leur localisation dépend du contexte cellulaire, de signaux du cycle cellulaire et du stade du développement⁴².

Les protéines HP1 servent de plateformes pour les interactions entre différents facteurs tels que les composants et les modificateurs de la chromatine, les régulateurs transcriptionnels. Elles jouent un rôle d'adaptateur essentiel à la transmission du flot d'informations épigénétiques. Elles peuvent promouvoir la répression et l'activation transcriptionnelle en fonction du contexte chromosomique et des protéines partenaires. La phosphorylation d'HP1 modifie les interactions avec ses différents ligands pouvant expliquer ses fonctions contradictoires. Ces activités dichotomiques sont présentées sur la figure I.6^{21,82}.

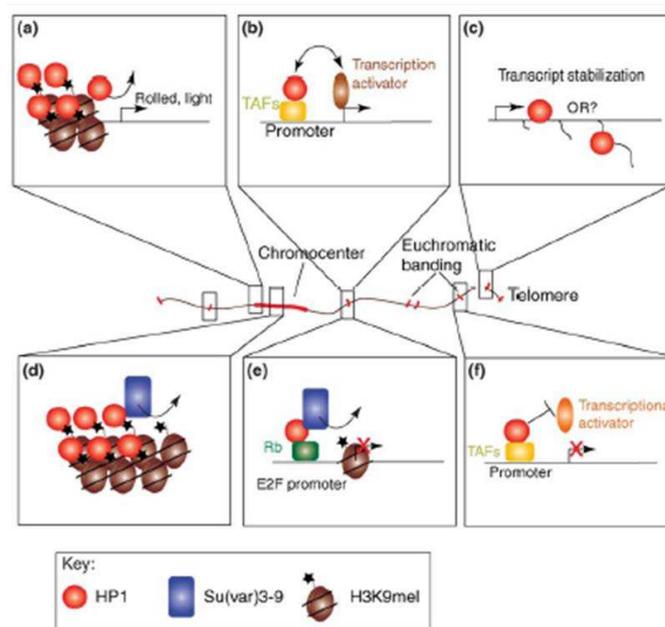


Figure I.6 : HP1 peut promouvoir à la fois la répression (d, e, f) et l'activation (a, b, c) transcriptionnelle en fonction du contexte chromosomique et de ces partenaires d'interaction. (a) Au niveau des sites hétérochromatiques, HP1 colocalise avec Suv39h et H3K9 méthylée, favorisant une structure chromatinienne compacte transcriptionnellement inactive ; (b) Dans le cas de gènes régulés par le promoteur de la cycline E, HP1 peut être recruté par son association avec Rb et facilite la méthylation des histones, et par conséquent la répression génique ; (c) HP1 peut interagir avec des facteurs associés à la machinerie transcriptionnelle. Le facteur associé au TBP TAF III 130 peut recruter HP1 au niveau des promoteurs et des inhibiteurs d'activation en bloquant plus tard l'association d'activateurs. HP1 peut aussi promouvoir la répression en interagissant avec des corépresseurs ; (d) Les gènes présents dans un environnement hétérochromatique requiert une structure chromatinienne péricentrique compacte pour leur expression normale ; (e) L'association d'HP1 aux promoteurs peut promouvoir l'activation par recrutement de coactivateurs ; (f) HP1 peut être lié aux régions codantes et son effet positif sur leur transcription suggère un rôle dans la stabilisation des transcrits d'ARNm. D'après⁸².

c. Epigénome et modifications chimiques

La fibre de chromatine est très dynamique, particulièrement grâce aux phénomènes de méthylation des bases cytosine de l'ADN et de modifications post-traductionnelles des

queues N-terminales des histones¹⁵⁶. Elles influencent la structure de la fibre de chromatine en modifiant la charge électrostatique des histones et/ou en créant des sites de liaison pour des protéines non-histones associées à la chromatine⁷³. Les études en spectrométrie de masse ont détecté 13 sites de modifications sur H2A, 12 sur H2B, 21 sur H3 et 14 sur H4 (fig. I.7)¹²⁸. Le nombre de combinaisons possibles de modifications d’histones est par conséquent très important.

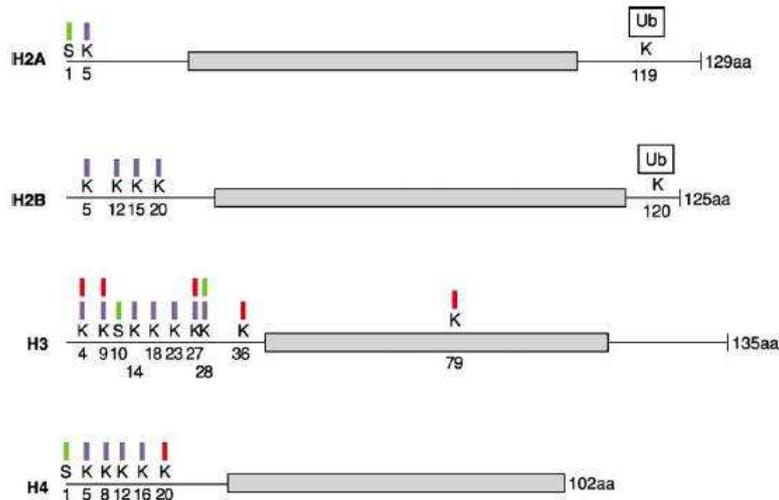


Figure I.7 : Les modifications d’histones. Chaque protéine d’histone comprend des queues N et C-terminales et un domaine globulaire central (rectangle gris). Les queues N- et C-terminales des cores d’histones peuvent être chimiquement modifiées par méthylation (trait rouge), acétylation (trait bleu), phosphorylation (trait vert) ou ubiquitination (Ub) au niveau de plusieurs résidus sur toute la longueur de la protéine. D’après⁷³.

La combinaison de ces modifications et leur association à des processus biologiques spécifiques révèlent un « code histone » qui étend considérablement le potentiel d’informations du code génétique.

i. La méthylation de l’ADN

Dans les cellules normales, la méthylation de l’ADN a lieu généralement par addition d’un groupe méthyle sur le carbone de la position 5 de la cytosine dans les séquences 5’-CG-3’ (CpG avec p pour le groupe phosphate) au cours de la réplication de l’ADN. Approximativement 80% des dinucléotides CpG de l’ensemble du génome sont fortement méthylés, mais certains restent non méthylés dans des régions spécifiques contenant plus de 50-60% de cytosines et de guanines, appelés îlots CpG⁷⁸. La méthylation de l’ADN est catalysée par des ADN méthyltransférases (DNMT). Une étude récente modifie les connaissances sur la régulation de la méthylation de l’ADN, en identifiant les protéines TET. Dans ce papier, les auteurs montrent que TET1, partenaire de fusion du gène MLL dans les leucémies aiguës myéloïdes, est une enzyme à activité oxydative dépendante du 2-oxoglutarate et du fer. TET1 catalyse la conversion des 5-méthyl-cytosine en 5-hydroxyméthylcytosine *in vitro* dans des cellules de mammifères²⁰⁹.

La régulation de l'expression des gènes par la méthylation de l'ADN ciblant les promoteurs est cruciale pour le contrôle de plusieurs processus du développement comprenant l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique et l'hématopoïèse¹⁷⁸. Enfin, la méthylation de l'ADN est connue pour permettre la localisation nucléaire de l'hétérochromatine constitutive⁹.

ii. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les queues amino-terminales des histones exposées à la surface du nucléosome sont sujettes à un grand nombre de modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, ribosylation)^{12,156,206}. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'acétylation et à la méthylation des histones.

L'ACÉTYLATION

L'acétylation des histones est un processus réversible par lequel les histones acétyltransférases (HAT) transfèrent le groupe acétyl de l'acétyl-coenzyme A sur la lysine cible et les histones déacétylases (HDAC) enlèvent ces groupes acétyl (fig. 1.8)^{15,142}.

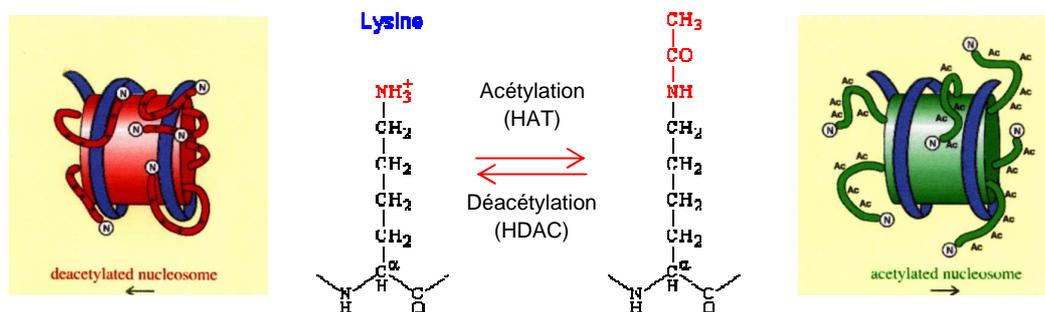


Figure 1.8 : Acétylation par les HAT et déacétylation par les HDAC des lysines des histones. D'après <http://www.web-books.com/MoBio/Free/images/Ch4G1.gif> et <http://bricker.tcnj.edu/Amb/le9/Acy.jpg>

Les HAT sont recrutées au niveau de promoteurs cibles par des facteurs de transcription spécifiques ou peuvent même lier directement l'ADN¹⁷⁸. Elles agissent généralement au sein de complexes protéiques impliquant notamment la machinerie de transcription. Ces enzymes ne semblent pas présenter de spécificité quant à la lysine qu'elles acétylent. L'activité acétyltransférase n'est pas uniquement restreinte aux histones puisque les HAT peuvent également acétyler des protéines non histones telles que des facteurs de transcription (comme le suppresseur de tumeur p53) ou des protéines chaperonnes (HSP)²²⁵.

Les HDAC fonctionnent au sein de complexes multiprotéiques incluant des facteurs de transcription liant l'ADN, des récepteurs nucléaires et des protéines corépresseurs telles que SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and thyroid hormone receptors) et Sin3A¹⁷⁸.

L'acétylation des histones peut modifier les propriétés physico-chimiques de ces protéines en interférant avec l'attraction électrostatique entre les histones chargées positivement et l'ADN chargé négativement¹⁷⁸. Ainsi, elle joue un rôle central dans la régulation dynamique de l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription et aux ARN polymérase au cours de l'interphase⁷³.

LA MÉTHYLATION

Les histones peuvent être méthylées à la fois sur les résidus lysine (K) et arginine (R). Six résidus lysine localisés sur H3 (K 4, 9, 27, 36 et 79) et sur H4 (K 20) sont des sites de mono-, di- et tri-méthylation⁷³ (fig. 1.7). Les histones méthyltransférases (HMT) catalysent le transfert d'un groupe méthyl du donneur S-adénosylmethionine (SAM) au groupe amine d'une lysine ou au guanidinyll d'une arginine (fig. 1.9)⁵³.

Les HMT peuvent être classées en 3 principaux groupes :

- les HMT, contenant un domaine SET responsable de l'activité enzymatique, sont impliquées dans la méthylation de H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 et H4K20. Le domaine SET, qui est un acronyme pour les trois régulateurs prototypes de la chromatine chez les insectes (Su(var)3-9, Enhancer of Zeste et Trithorax), est un motif de 130 à 140 acides aminés retrouvé dans un grand nombre de modificateurs de la chromatine^{20,178}.
- les HMT non-SET impliquées dans la méthylation de H3K79
- les PRMT (proteine arginine métyltransférase) qui méthylent spécifiquement les arginines 2, 17 et 56 de l'histone H3 (H3R2, H3R17, H3R56) et l'arginine 3 de l'histone H4 (H4R3). La méthylation des résidus arginine a été impliquée dans de nombreux processus biologiques dont la régulation de la transcription, la signalisation cellulaire, le transport subcellulaire et la réparation de l'ADN¹⁷⁸.

Il a été récemment démontré que la méthylation des lysines des queues d'histones est dynamiquement régulée par les histones déméthylases (HDM). Il en existe deux classes :

- les amines oxydases dont l'enzyme type est KDM1/LSD1. Elles utilisent FAD (Flavine adénine dinucléotide) comme cofacteur et ciblent les états mono- et diméthylés,
- les protéines de la famille contenant les domaines Jumonji-C (Jmj-C) qui sont des oxygénases dépendantes du fer et de l' α -kétoglutarate qui ciblent les trois états de méthylation des lysines et des arginines¹⁵⁶.

Les HDM font partis de grands complexes multiprotéiques en synergie avec les HDAC, les HMT et les récepteurs nucléaires qui contrôlent les programmes de croissance et transcriptionnels^{35,156}.

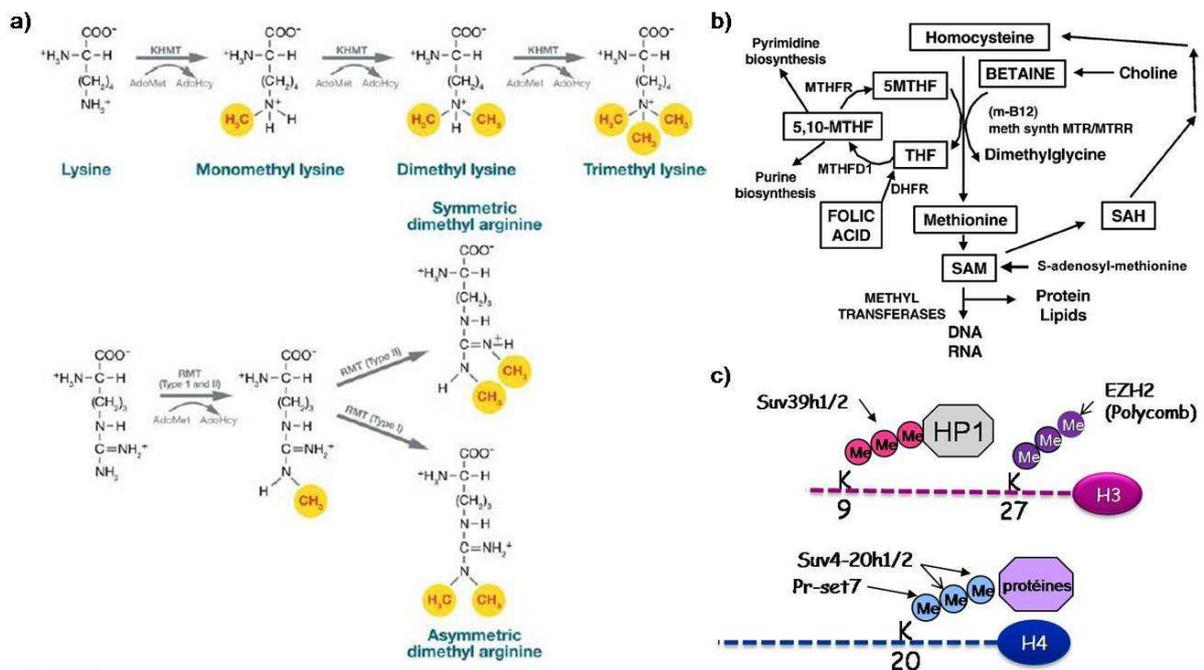


Figure 1.9 : La biochimie de la méthylation des résidus lysine et arginine des queues d’histones. a) Les résidus lysine peuvent être mono-, di- et triméthylés par les histones méthyltransférases. Les résidus arginine peuvent être mono- ou diméthylés. Les histones méthyltransférases de type I et II catalysent respectivement la diméthylation asymétrique et symétrique des arginines. D’après¹⁹⁸ ; b) Le cycle des folates permettant la production de la S-adenosylméthionine (SAM). LA SAM est nécessaire à la méthylation de l’ADN et des histones. SAH : S-adenosyl-homocystéine, DHFR : dihydrofolate réductase, MTHFD1 : méthylènetetrahydrofolate déhydrogénase, THF : tétrahydrofolate, MTHF : méthyltétrahydrofolate. D’après¹⁰¹ ; c) Les modifications post-traductionnelles des histones H3 et H4. La plupart des modifications ont lieu au niveau de la queue N-terminale des histones. Les enzymes responsables de la méthylation des lysines 9 et 27 de l’histone H3 et de la lysine 20 de l’histone H4 sont indiquées par une flèche.

Contrairement à l’acétylation, la méthylation des histones est une modification relativement inerte qui apparaît fonctionner comme un site de nucléation pour les protéines effectrices¹⁵⁶. Les histones méthylées recrutent des protéines qui portent des domaines CHROMO, TUDOR ou WD40 (motifs d’acides aminés spécifiques de protéines associées à des fonctions cellulaires particulières) et qui sont capables d’interagir spécifiquement avec différents résidus lysines méthylés²⁰⁷.

LES VOIES DE MÉTHYLATION DE LA LYSINE 20 DE L’HISTONE H4

Il y a maintenant plus de 5 ans que Suv4-20h1 et Suv4-20h2 (suppressor of variegation 4-20 homolog) ont été identifiées comme deux HMT à SET domaine localisées au niveau de l’hétérochromatine péricentrique¹⁹¹. Suv4-20h1, largement responsable de la diméthylation de H4K20, tandis que Suv4-20h2 régule en premier lieu la triméthylation de H4K20. Toutefois, il est important de noter qu’il peut y avoir une compensation partielle de l’activité Suv4-20h2 par Suv4-20h1¹⁹². La triméthylation de H4K20, localisée au niveau de l’hétérochromatine péricentrique, est impliquée dans divers processus cellulaires tels que l’organisation de la chromatine maintenant la stabilité génomique et régulant la progression du cycle cellulaire^{128,218}.

La triméthylation de H4K20 nécessite des mécanismes séquentiels présentés dans la figure I.10.

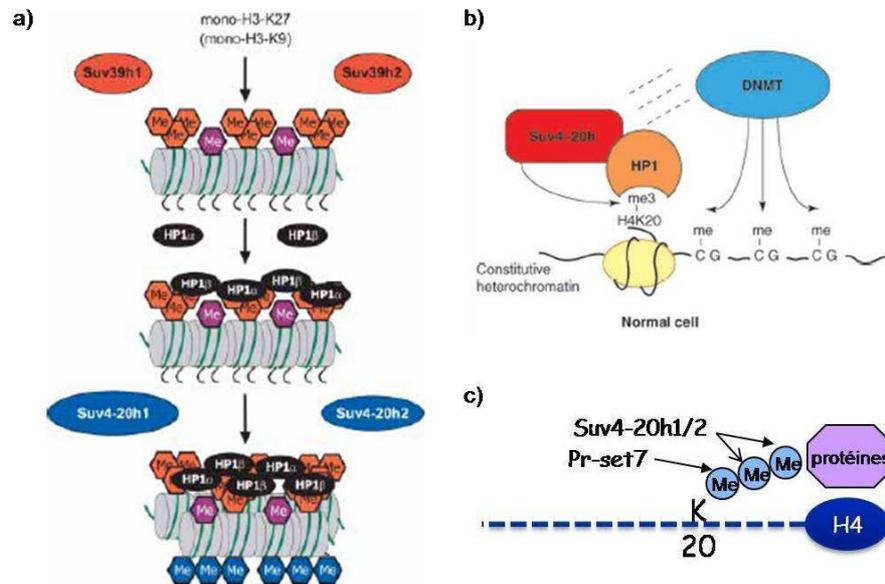


Figure I.10 : La triméthylation de la lysine 20 de l'histone H4. a) Modèle d'induction séquentielle de la triméthylation de H3K9 et H4K20 au niveau de l'hétérochromatine péricentrique. D'après¹⁹¹. b) Modèle du lien entre la méthylation de l'ADN et H4K20me3. Dans les cellules normales, les DNMT peuvent interagir directement ou par l'intermédiaire de HP1 avec les Suv4-20h. D'après⁶⁴. c) L'HMT Pr-set7 monométhyle la lysine 20 de l'histone H4, état nécessaire à la di- et triméthylation de H4K20 par les Suv4-20h1 et Suv4-20h2.

La monométhylation de H4K20 (H4K20me1) est induite par l'HMT Pr-set7/KMT5A, notamment au cours de la phase de synthèse (S) de l'ADN du cycle cellulaire au niveau des foyers de réplication. H4K20 monométhylée est enrichie au niveau des gènes activement transcrits et du chromosome X inactif¹⁹².

LES VOIES DE MÉTHYLATION DE LA LYSINE 9 DE L'HISTONE H3

La lysine 9 de l'histone H3 peut être mono-, di- ou tri-méthylée. La mono- et la diméthylation sont catalysées dans les régions euchromatiques par G9a tandis que la triméthylation résulte de l'activité des Suv39h1/2 (suppressor of variegation 3-9 homolog), au niveau des domaines d'hétérochromatine péricentrique²¹. H3K9me1 et H3K9me2 sont associées aux gènes soumis à l'empreinte⁶⁴.

La triméthylation de H3K9 crée une plateforme favorisant un état chromatinien réprimé (fig. I.11)^{64,127}.

Au niveau des gènes réprimés, H3K9me3 est concentrée dans la région promotrice. Cependant, H3K9 méthylée a été localisée en aval de la région d'initiation de la transcription des gènes exprimés. HP1γ est associé avec H3K9me3 et l'ARN polymérase II phosphorylée au niveau des gènes transcrits, suggérant un rôle pour HP1γ dans l'élongation de la

transcription¹²⁸. La méthylation de H3K9 est par conséquent à interpréter différemment en fonction du contexte dans lequel elle est trouvée.

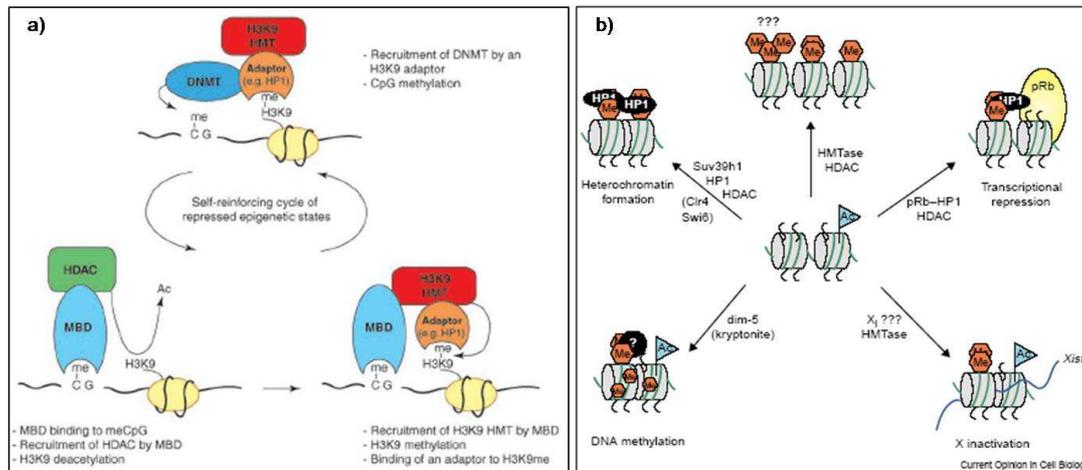


Figure I.11 : La triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3. a) Modèle de la boucle d'activation épigénétique pouvant perpétuer un état chromatinien réprimé. Une DNMT liée à un adaptateur tel que HP1 pourra ajouter un groupe méthyle à l'ADN seulement au niveau d'une chromatine méthylée sur H3K9. La génération d'un ADN méthylé par une DNMT permettra la liaison de protéines MBD à l'ADN. Certaines de ces protéines recrutent les complexes HDAC en plus des H3K9 HMT. La déacétylation de H3K9 est suivie par la méthylation de l'histone qui conduit au recrutement de l'adaptateur HP1. D'après⁶⁴. b) Les multiples rôles de la méthylation de H3K9 dans le contrôle épigénétique de l'expression des gènes. Elle est notamment impliquée dans la formation de l'hétérochromatine, l'inactivation de l'X, la répression transcriptionnelle au niveau de loci euchromatiques. D'après¹²².

LA VOIE POLYCOMB

Les gènes du groupe Polycomb codent des composants des complexes répresseurs de la transcription qui sont essentiels aux processus épigénétiques du développement cellulaire. Au cours de chaque transition du cycle cellulaire, les protéines Polycomb maintiennent l'identité cellulaire en préservant les états de la chromatine contre les processus perturbant tels que la réplication de l'ADN et la transcription. On distingue fonctionnellement et biochimiquement deux complexes répressifs multimériques Polycomb (PRC) appelés PRC1 et PRC2. PRC2 est composé de l'HMT EZH2, de SUZ12 (suppressor of zest 12) et d'EED (embryonic ectoderm development) (fig. I.12a). SUZ12 et EED sont nécessaires à la stabilité du complexe et à l'activité méthyltransférase d'EZH2 qui catalyse l'addition de groupes méthyl sur H3K27 (fig. I.12b). La méthylation de H3K27 sert de point d'ancrage pour le complexe PRC1. PRC2 initie la répression transcriptionnelle par inhibition de l'initiation de la transcription tandis que PRC1 maintient les conditions répressives (fig. I.12a)^{64,177}.

Il a été montré qu'EZH2 sert de plateforme de recrutement pour les DNMT, soulignant ainsi une connexion directe entre deux systèmes clés de répression épigénétique (fig. I.12c et I.12d)²¹⁶. De nombreuses études ont souligné les rôles des protéines Polycomb dans le maintien de la pluripotence des cellules souches en réprimant les gènes codant des facteurs de transcription spécifique de lignée, empêchant ainsi de la différenciation¹⁷⁷.

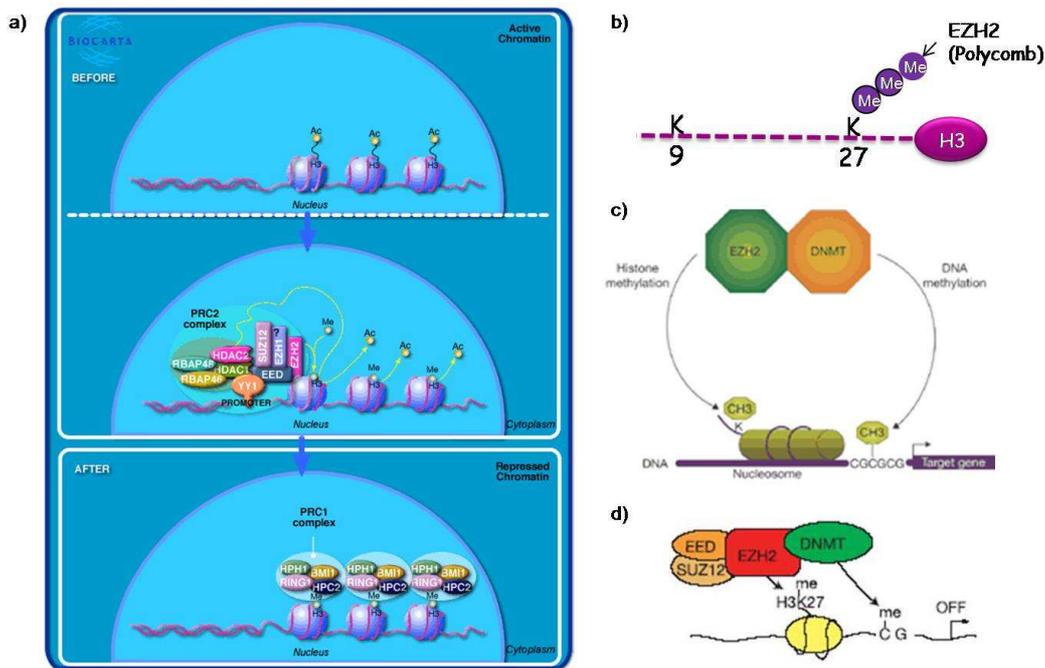


Figure I.12 : La voie répressive Polycomb de l'HMT EZH2. a) Interaction entre les complexes répressifs Polycomb PRC2 et PRC1 permettant la stabilisation et le maintien d'un état chromatinien répressif. D'après http://kugi.kribb.re.kr/KUGI/Pathways/BioCarta/h_prc2Pathway/h_prc2Pathway.gif. b) L'activité enzymatique d'EZH2 permet la triméthylation de H3K27, marque d'hétérochromatine facultative. c) EZH2 recrute les DNMT au niveau de certains gènes cibles. Les DNMT recrutées catalysent alors la méthylation des CpG dans les régions méthylées sur H3K27. D'après²¹⁶. d) EZH2 est requise pour la liaison des DNMT et facilite la méthylation des CpG des promoteurs cible d'EZH2. EZH2 contrôle la méthylation des CpG, dans le contexte des complexes PRC2, par un contact physique direct avec les DNMT. D'après²¹⁶.

iii. Le code histone

Selon l'hypothèse du code histone, les modifications post-traductionnelles des histones agissent seules ou en combinaison spécifiques et forment des plateformes de liaison pour les protéines associées à la chromatine⁶⁵. La capacité du code histone à dicter l'environnement chromatinien lui permet de réguler les processus nucléaires comme la réplication, la transcription, la réparation de l'ADN et la condensation des chromosomes⁹. La mise en place et l'interprétation fonctionnelle de ce code épigénétique sont sous le contrôle de voies de signalisation particulières, elles-mêmes étroitement régulées (fig. I.13). A titre d'exemple, l'acétylation des histones par les histones acétyltransférases favorise la formation de l'euchromatine. La réversibilité de ces marques par les histones déacétylases favorise la formation de l'hétérochromatine. Un deuxième exemple très important concerne la méthylation des histones médiée par les histones méthyltransférases. Contrairement à l'acétylation, elle peut aboutir à l'activation ou à la répression de l'expression génique selon les lysines méthylées et leur degré de méthylation (mono-, di-, tri-). Ainsi, la méthylation des lysines 4, 36 et 79 de l'histone H3 (H3K4, H3K36 et H3K79) est corrélée à l'activation transcriptionnelle. A l'inverse, un taux élevé de triméthylation des histones sur les lysines 9

et 27 de H3 (**H3K9**, **H3K27**) et sur la lysine 20 de H4 (**H4K20**), est associé à l'hétérochromatine^{8,15}.

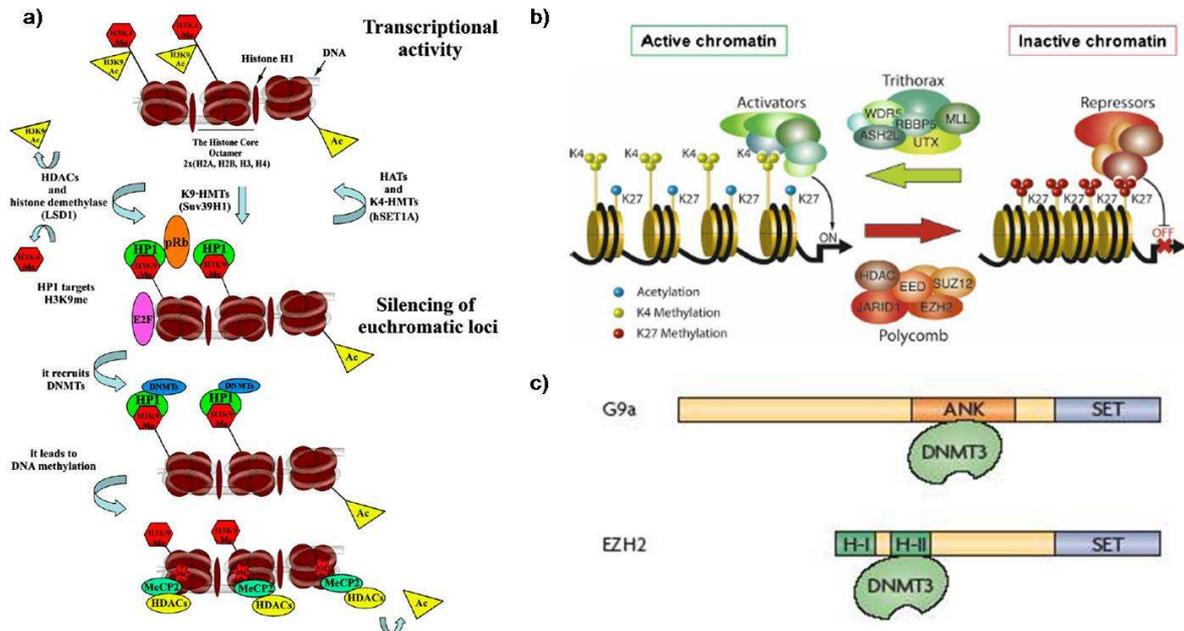


Figure I.13 : Le code histone. a) Modèle de formation par les modifications d'histones de la chromatine transcriptionnellement active et inactive. L'effacement de la méthylation de H3K4 par l'HDM LSD1 amène à l'activation de Suv39h1 qui initie la méthylation de H3K9. Le chromodomaine de la protéine HP1 peut reconnaître H3K9 méthylée entraînant la propagation d'une chromatine transcriptionnellement silencieuse. Dans les loci euchromatiques, ce processus est également médié par des corépresseurs tels que la protéine du rétinoblastome pRb et l'hétérochromatine constitutive est stabilisée par la liaison d'HP1 à H3K9 méthylée ce qui implique aussi l'incorporation d'ARN. Par la suite les DNMTs sont activées aboutissant à la méthylation de l'ADN. L'ADN méthylé est reconnu par les methyl-binding-DNA protéines telles que MeCP2 qui en retour peuvent s'associer à une activité HDAC pour éliminer le reste des histones acétylées. D'après⁹. b) Modèle de l'implication des HDM et des HMT dans la régulation transcriptionnelle des gènes du développement. Les HMT et les HDM sont retrouvées dans les mêmes complexes qui méthylerent une marque tout en effaçant la marque opposée, mis en exemple ici par le complexe d'activation Trithorax MLL2/UTX et le complexe répressif Polycomb PRC2/RBP2. D'après³⁵. c) Les histones méthyltransférases contenant un SET domaine interagissent avec DNMT3A et DNMT3B. Les deux exemples présentés sont impliqués dans l'hétérochromatinisation et la méthylation *de novo* de l'ADN. G9a recrute DNMT3A et DNMT3B par son domaine ankyrine (ANK). EZH2 interagit avec DNMT3A, DNMT3B et DNMT1 *in vitro* par un domaine homologue H-II. D'après²⁸.

Les conséquences fonctionnelles des modifications post-traductionnelles des histones sont médiées par des protéines spécifiques possédant des domaines d'interaction particuliers, capables de reconnaître et de lier une modification donnée. Ainsi, les protéines à bromodomaine lient la chromatine au niveau des lysines acétylées alors que celles à chromodomaine reconnaissent la méthylation des histones. Ces protéines sont des facteurs ayant des fonctions dichotomiques qui, tout en conservant leur rôle de liaison à l'ADN, peuvent avoir une capacité d'activation ou de répression des gènes dictée par les protéines et/ou les acides nucléiques qui leurs sont associés¹². Par exemple, les protéines HP1, protéines à chromodomaine, reconnaissent sélectivement H3K9 méthylée permettant la formation de l'hétérochromatine tandis que la méthylation de H3K27 est impliquée dans la répression génique médiée par les protéines du complexe Polycomb (fig. I.13)^{12,100}.

Depuis peu on connaît l'existence de dialogues complexes entre les différents niveaux de régulation épigénétique, notamment entre la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones (fig. I.13)^{21,200,216}. En effet, la méthylation de l'ADN peut favoriser la méthylation de certaines lysines des queues d'histones⁶⁵. Ces échanges peuvent être médiés par des interactions biochimiques entre les histones méthyltransférases et les DNA méthyltransférases (fig. I.13c)²⁸. La méthylation de l'ADN, la déacétylation des histones et la triméthylation de H3K9 agissent en synergie pour générer un cycle épigénétique d'auto-renforcement qui maintient et perpétue un état chromatinien réprimé⁶⁴.

Les codes histones peuvent être transitoirement modifiés par l'environnement cellulaire. Ceci est lié à l'état physiologique de la cellule et aux signaux environnant qui peuvent varier en fonction du temps¹²⁸.

Enfin, il a été récemment mis en évidence le rôle important d'ARNs non-codant dérivés des séquences répétées du génome, dans l'assemblage et la propagation d'états chromatiniens particuliers^{12,76}. L'importance des molécules d'ARN transcrites mais non traduites a été identifiée par l'isolement des transcrits du gène Xist qui est impliqué dans l'inactivation du chromosome X dans les cellules femelles. Les transcrits Xist recouvrent le chromosome X qui est entrain d'être inactivé⁷³.

Les informations épigénétiques médiées par les modifications chimiques de l'ADN, des histones et les protéines HP1 créent des codes corrélés à l'état de compaction de la chromatine régulant les processus cellulaires clés au cours du développement.

d. L'hétérochromatine et le contrôle de l'expression génique

L'hétérochromatine joue un rôle critique dans l'établissement et la stabilisation des domaines chromosomiques riches en séquences répétées d'ADN, tels que les régions centromériques, péri-centromériques et télomériques. Or, ces régions sont vitales pour la ségrégation des chromosomes et sensibles aux processus de recombinaison entre répétitions homologues. Elle a également un rôle central dans la régulation de l'expression de gènes au cours du développement et de la différenciation cellulaire. Par exemple, elle permet l'inactivation stable de régulateurs du développement et d'un des chromosomes X dans les cellules somatiques^{12,77}. On distingue l'hétérochromatine constitutive de l'hétérochromatine facultative.

i. L'hétérochromatine constitutive : état stable de répression génique

Elle est traditionnellement définie comme une région chromosomique qui reste condensée tout au long du cycle cellulaire. Dans les cellules de mammifères, l'hétérochromatine constitutive est considérée comme génétiquement inerte, transcriptionnellement inactive et

composée de répétitions en tandem appelées satellites. Elle est essentiellement localisée au niveau des régions (péri)centromériques et télomériques et est impliquée dans la répression stable des gènes au cours des divisions cellulaires et du développement.

La formation et/ou le maintien de l'hétérochromatine constitutive sont clairement influencés par la séquence et la méthylation de l'ADN. Elle est caractérisée par des nucléosomes riches en H3K9me3, H4K20me3 et H3K27me1 (fig. I.14). Deux processus cellulaires clés sont associés à cette structure chromatinienne particulière : l'empreinte génomique et l'effet de position^{73,203}.

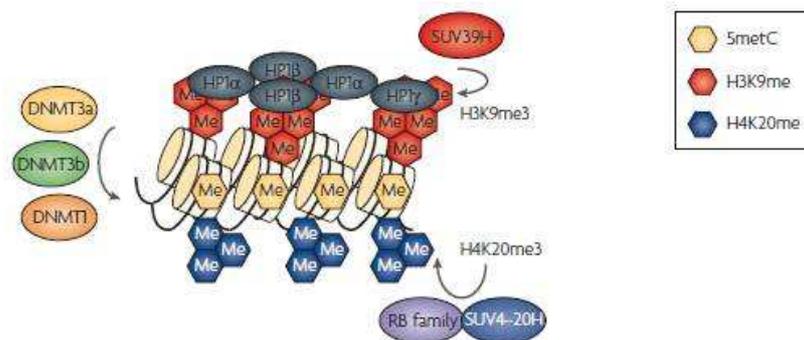


Figure I.14 : Modifications épigénétiques au niveau des régions péri-centromériques chez les mammifères. Les répétitions péri-centromériques sont enrichies en modifications qui sont caractéristiques des domaines d'hétérochromatine constitutive telles que les triméthylations de H3K9 et H4K20 et en protéines HP1. De plus, les protéines Rb interagissent avec les HMT Suv4-20h pour triméthylater efficacement H4K20. L'ADN au niveau des régions péri-centriques est fortement méthylé. D'après¹⁷.

L'EMPREINTE GÉNOMIQUE

L'empreinte génomique est un phénomène par lequel certains gènes sont exprimés spécifiquement en fonction de l'origine parentale. Les gènes soumis à l'empreinte sont exprimés uniquement de l'allèle transmis par la mère (les gènes *H19*, *CDKN1C* par exemple), ou dans d'autres cas de l'allèle paternel (le gène *IGF-2* par exemple). Ils sont importants dans le développement et leur expression est médiée par les régions contrôlant l'empreinte (appelées ICR). Au niveau de l'allèle méthylé, les ICR sont marqués par H3K9me3 et H4K20me3 comme au niveau de l'hétérochromatine péri-centromérique et par HP1 γ . Les HMT Suv4-20h contrôlent la triméthylation de H4K20 au niveau des ICR mais la triméthylation de H3K9 semble indépendante des Suv39h¹⁶⁷.

Il existe des maladies épigénétiques monogéniques pour lesquelles il est mis en évidence une perturbation de l'empreinte génomique ou une instabilité de l'hétérochromatine centromérique. Par exemple, le syndrome de Beckwith-Wiedemann est caractérisé par des malformations et des cancers dus à une altération de l'empreinte génomique au niveau du cluster de gènes soumis à empreinte en 11p15⁵³.

L'EFFET DE POSITION (POSITION EFFECT VARIATION -PEV-)

L'insertion d'un bloc d'hétérochromatine à proximité de séquences codantes peut éteindre leur expression par un phénomène appelé effet de position. Cette extinction d'expression a la particularité d'être complète dans certaines cellules et absente dans d'autres se traduisant par un profil d'expression en mosaïque (d'où le terme de PEV, Position Effect Variegation)⁷³. Un exemple particulièrement bien étudié de ce phénomène est celui du gène *White*, qui code pour une protéine responsable de la pigmentation rouge des yeux de la Drosophile. Lorsque ce gène est juxtaposé à proximité d'un bloc d'hétérochromatine, il présente un niveau d'expression considérablement diminué, induisant un phénotype en mosaïque blanc-rouge (fig. I.15)⁴⁷. Ce phénomène d'inactivation génique en *cis*, a été attribué à un effet de propagation de l'hétérochromatine constitutive sur les séquences adjacentes euchromatiques²¹⁹.

L'existence d'un phénomène identique est prouvée chez les mammifères^{61,217}. Par exemple, dans les lymphocytes où les gènes de globine ne sont pas exprimés, le locus de la β -globine est localisé au niveau de l'hétérochromatine tandis que dans les érythroblastes la localisation euchromatique est prépondérante⁷³.

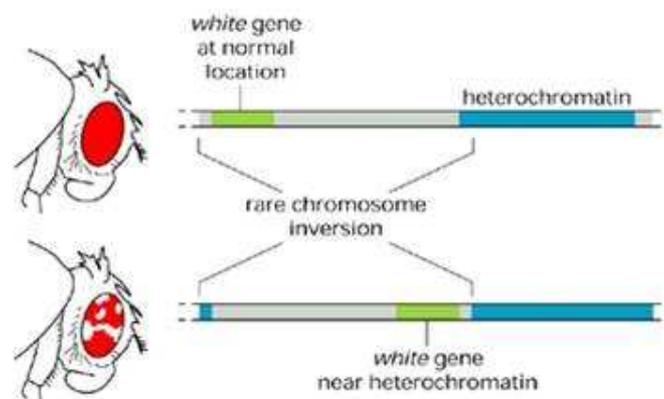


Figure I.15 : L'effet de position au niveau du gène White de la Drosophile. Les Drosophiles sauvages avec un gène White normal ont les yeux rouges, si le gène est inactivé par mutation les yeux deviennent blancs. Une inversion chromosomique qui place le gène *white* près d'une région d'hétérochromatine entraîne un aspect tacheté des yeux, avec des plages rouges et blanches. Les tâches blanches représentent les cellules où le gène *white* est silencieux et les tâches rouges représentent les cellules qui expriment le gène *white*. La différence est due aux variations des régions hétérochromatiques le long des chromosomes précocement dans le développement de l'œil. D'après¹⁸⁶.

ii. Hétérochromatine facultative

L'hétérochromatine facultative est l'euchromatine qui adopte des propriétés hétérochromatiques de façon contrôlée au cours du développement. Ceci suggère la répression temporelle des régions du génome et l'exemple classique de ce phénomène est l'inactivation du chromosome X chez les femmes⁷³.

Le chromosome X inactif (Xi), localisé en périphérie nucléaire, se distingue de son homologue actif (Xa) grâce à l'expression du gène *Xist* localisé dans le centre d'inactivation

de l'X (Xic). Ce processus est accompagné par plusieurs modifications de la chromatine, incluant des modifications d'histones comme H3K9me2 et la méthylation de l'ADN. Les marques H3K27me3 et H4K20me1 sont des marqueurs de l'initiation de l'inactivation de l'X. La réplication tardive, de fort taux de CpG méthylés et l'hypoacétylation de H4 sont également des caractéristiques épigénétiques spécifiques du Xi⁹.

e.Épigénétique et cancer

Si l'étude des causes génétiques du cancer (mutations, gains/amplifications/délétions, translocations) occupe depuis longtemps le devant de la scène biologique, l'explosion récente des connaissances sur les mécanismes de régulation épigénétique a révélé le rôle prépondérant de leurs modifications dans le déclenchement et la progression de nombreuses maladies⁵³. Dans les tumeurs solides (cancers du foie, du colon, du sein notamment), il est désormais clair que les dérégulations épigénétiques précèdent fréquemment la carcinogenèse et plusieurs types de carcinomes sont entourés par une large zone épithéliale portant des anomalies épigénétiques¹⁵⁷.

i. Anomalies épigénétiques globales dans les cellules cancéreuses

L'hyperméthylation de l'ADN des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes inhibiteurs de croissance (conduisant à la perte de leur expression) et l'hypométhylation globale du génome (entraînant une instabilité génomique) sont des marques universelles reconnues des cellules cancéreuses. De même, leurs développements s'accompagnent de dérégulations de l'acétylation et de la méthylation des histones (fig. I.16). Il n'est pas surprenant qu'à la fois la méthylation de l'ADN et les modifications des histones soient altérées dans les cancers étant donné leur interdépendance dans le développement cellulaire normal^{52,53}.

ii. Dérégulation des enzymes modificateuses de la chromatine

Les mécanismes responsables de ces motifs épigénétiques aberrants ne sont pas tous connus à l'heure actuelle. Toutefois, l'hypothèse de la dérégulation de l'activité enzymatique des complexes protéiques mettant en place ou effaçant les modifications chimiques épigénétiques est de plus en plus étayée dans la littérature (fig. I.16). Ainsi, un défaut des histones méthyltransférases Suv4-20h aboutit à une accumulation de H4K20me1 entraînant une augmentation de la sensibilité aux lésions de l'ADN et favorisant les processus de cancérogénèse¹⁹². De plus, 15-20% des myélomes multiples présentent la t(4;14)(p16;q32) qui implique le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines en 14q32 et les gènes FGFR3 et MMSET en 4p16 aboutissant à leur surexpression. MMSET a une activité histone

méthyltransférase et interagit avec des corépresseurs tels que les histones déacétylases suggérant un rôle dans la régulation de la transcription génique. MMSET est impliquée dans la pathogenèse de la t(4;14) en promouvant la progression du cycle cellulaire par le contrôle de régulateurs clés du cycle cellulaire et de l'adhésion cellulaire²². La dérégulation de l'expression d'une enzyme modifiant les queues d'histones peut par conséquent avoir un impact non négligeable dans l'oncogenèse.

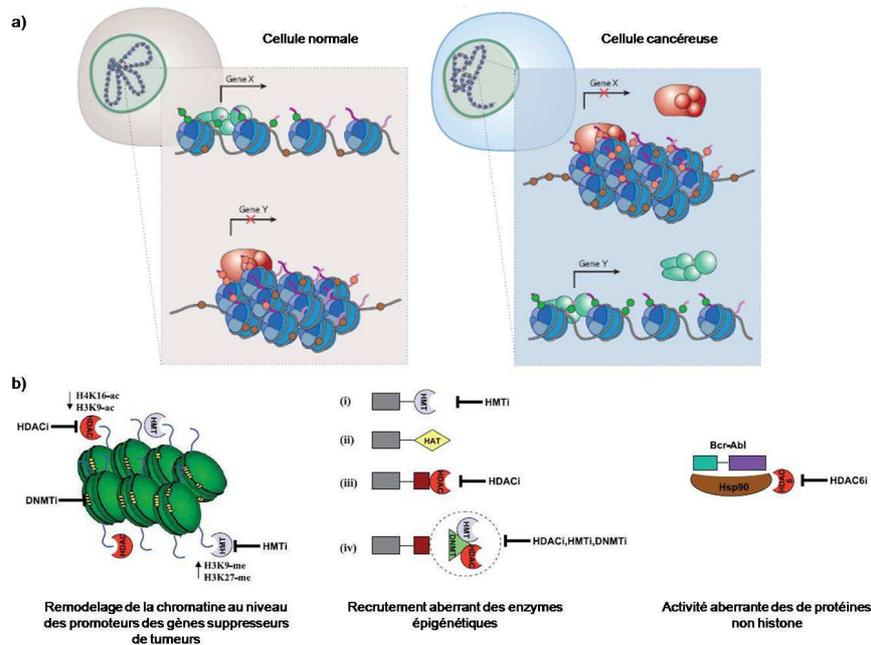


Figure I.16 : Modifications épigénétiques dans les cellules cancéreuses. a) Les gènes transcriptionnellement actifs dans les cellules normales, tels que les gènes suppresseurs de tumeurs, sont réprimés dans les cellules tumorales, tandis que les gènes réprimés, tels que les oncogènes, sont activés dans les cellules tumorales. b) Dans les cellules tumorales, il est observé des anomalies épigénétiques pouvant toucher le remodelage de la chromatine par la mise en place anormale de modifications chimiques au niveau de certains loci, le recrutement ou l'expression aberrante d'enzymes épigénétiques telles que les HDAC, les HMT, les DNMT. Adaptée de ^{48,53}.

iii. Intérêt pronostique des anomalies épigénétiques dans les cancers

Les recherches actuelles s'orientent vers l'identification et l'utilisation de codes histones comme marqueur pronostique et en thérapeutique¹²⁸. L'importance des effets combinatoires des modifications d'histones dans le pronostic des cancers a été montrée dans le cancer de la prostate. En effet, le groupe présentant de faibles taux de H3K4me2 et de H3K18ac a un mauvais pronostic par rapport aux patients présentant de forts taux de ces modifications¹⁹⁴. De plus, 14 gènes marqués par H3K27me3 ont été utilisés pour développer une signature de répression Polycomb qui permet de grouper les patients atteints de cancers de la prostate en deux groupes : bon ou mauvais pronostic²²⁷.

iv. Le modèle épigénétique de la cellule souche cancéreuse

Le modèle épigénétique de progéniteur, dans lequel les cellules tumorales seraient originaires de cellules souches ou progénitrices après altérations épigénétiques, est étayé par la nature précoce et ubiquitaire des changements épigénétiques dans les cancers (fig. I.17)⁵³. La plasticité épigénétique peut être une propriété inhérente des cellules souches dont les cancers proviennent. Par exemple, la nature bivalente de la méthylation adjacente de H3K4 et H3K27 est observée dans plusieurs sites génomiques dans les cellules souches et pas dans les cellules somatiques après différenciation⁵³.

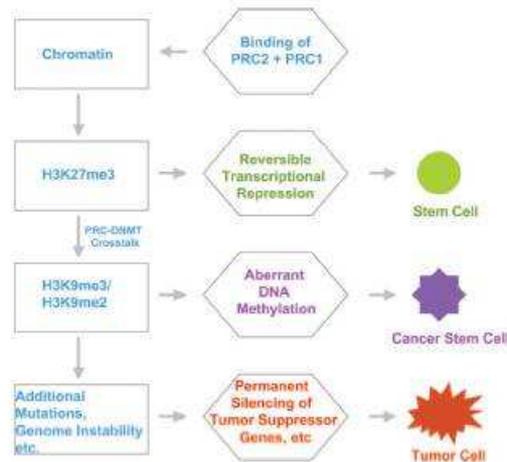


Figure I.17 : Modèle schématique des changements épigénétiques au cours du processus de cancérogenèse. La progression des marques épigénétiques de la répression génique est réversible dans les cellules souches. Dans les cellules précurseurs des cancers (« la cellule souche cancéreuse »), l'hyperméthylation aberrante transitoire de l'ADN des promoteurs est observée. Des anomalies additionnelles vont favoriser la répression génique stable dans les cellules cancéreuses. DNMT : DNA méthyltransférase, PRC : Polycomb repressive complex. D'après¹⁷⁷.

La nature réversible des modifications épigénétiques les identifie comme des cibles thérapeutiques privilégiées. En effet, les modifications épigénétiques sont mises en place ou effacées par de nombreuses enzymes contre lesquelles il existe désormais des inhibiteurs pharmacologiques. Les inhibiteurs des histones déacétylases (HDACi) ou des DNA méthyltransférases en sont des exemples très pertinents puisqu'ils sont actuellement exploités comme agents anti-cancéreux notamment dans les lymphomes malins et les syndromes myélodysplasiques.

2. Physiologie de la maturation des lymphocytes B

Chez l'adulte, l'ensemble des globules blancs dérivent de cellules souches hématopoïétiques multipotentes (CSH) localisées dans la moelle osseuse. Sous l'action de facteurs de croissance et de facteurs de transcription spécifiques, elles se différencient en précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes puis en cellules hématopoïétiques matures, en passant par des types cellulaires intermédiaires définis par l'expression d'antigènes de surface (fig. I.18). Les chercheurs s'accordent sur l'hypothèse selon laquelle les lymphocytes B, T et NK sont originaires d'un précurseur commun, généralement appelé le précurseur lymphoïde commun (CLP)¹⁸. Ces étapes médullaires sont indépendantes de toute activation antigénique.

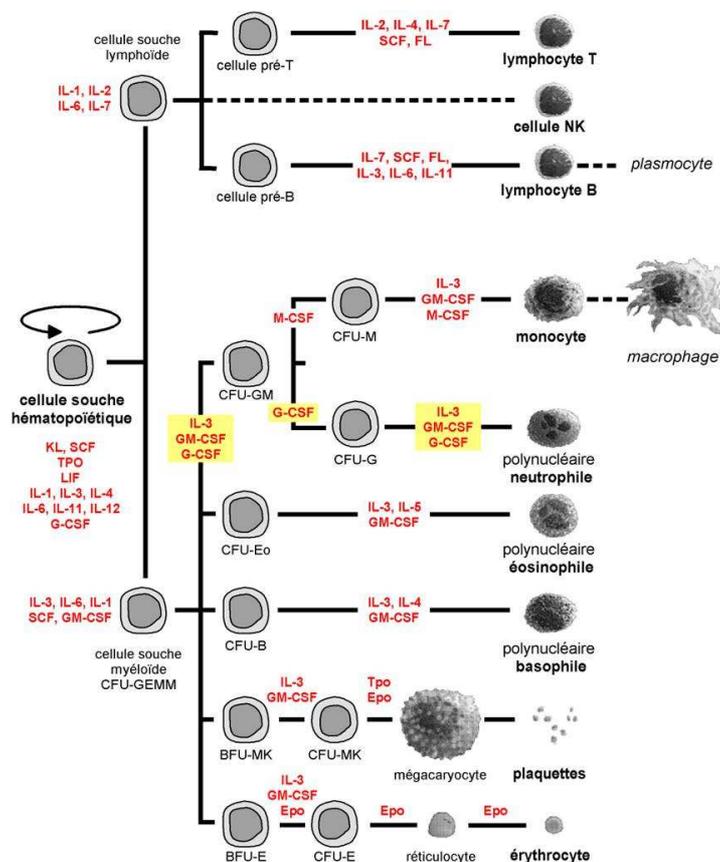


Figure I.18 : Schéma récapitulatif de l'hématopoïèse et des principaux facteurs (en rouge) intervenant dans la régulation des différentes voies de développement des globules blancs chez l'Homme. Tous les précurseurs hématopoïétiques chez l'Homme sont présents dans une population cellulaire médullaire qui exprime le CD34. D'après le cours de master 2 de cancérologie (Paris 11) de L. Delva en 2008.

Les lymphocytes B (pour **b**ursal ou **b**one marrow) sont une population de cellules qui expriment *in fine* de façon clonale diverses immunoglobulines de surface reconnaissant spécifiquement des épitopes antigéniques¹²⁵. Ils sont impliqués dans l'immunité humorale dépendante d'un antigène étranger, étape qui a lieu dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes au sein des organes lymphoïdes périphériques. Cette étape nécessite des molécules de co-stimulation, notamment la présence du récepteur de surface CD40 et de son ligand.

a. La lymphopoïèse B médullaire : phase indépendante des antigènes étrangers

La lymphopoïèse B est un processus multi-étapes associé aux cellules stromales de la moelle osseuse, permettant la prolifération, la différenciation et la maturation des lymphocytes B indépendamment de la présence d'un antigène²⁷. Elle a lieu de la vie fœtale à la mort de l'individu¹⁸. Au moins 10 facteurs de transcriptions distincts régulent les stades précoces du développement des cellules B, dont Ikaros, PU.1, E2A, EBF et PAX5 qui sont particulièrement importants dans la promotion de l'engagement et la différenciation de la lignée B (fig. I.19)^{113,125}.

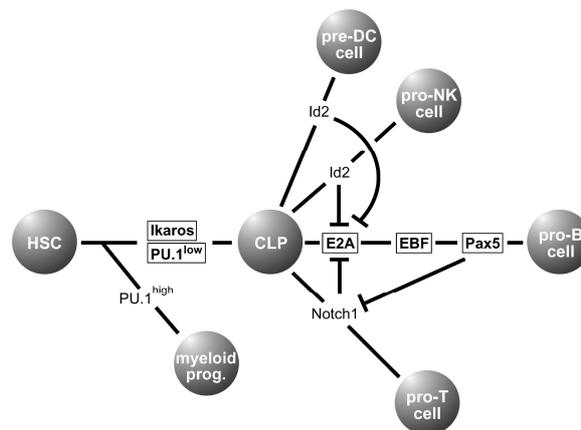
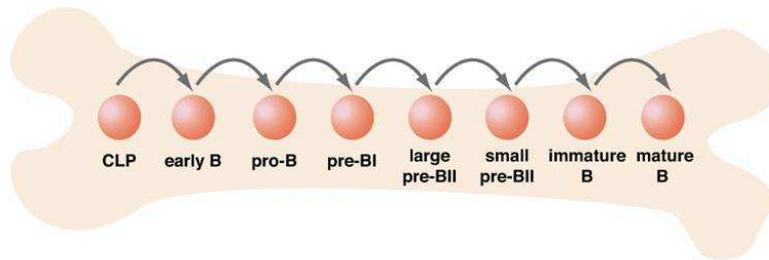


Figure I.19 : Schéma récapitulatif des principaux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation B. D'après¹⁸.

i. Description générale

L'identification de déterminants cellulaires de surface en cytométrie de flux exprimés sur les cellules de la lignée B ont permis de définir une variété de cellules intermédiaires entre la cellule souche hématopoïétique et la cellule B mature produisant des immunoglobulines d'isotype M (IgM) de surface, grâce au processus de recombinaison V(D)J (fig. I.20). Le premier progéniteur lymphoïde B est appelé B cell precursor (BCP). Il prolifère et se différencie progressivement en présence d'IL7. Selon le consensus actuel, les différents stades de la lignée B sont : les B précoces, les pro-B, les grandes cellules proliférantes pré-BI, les grandes cellules proliférantes pré-BII, les petites cellules au repos pré-BII (fig. I.22)^{18,71}.

Après ces 6 étapes qui se caractérisent par une prolifération cellulaire intense, les cellules deviennent matures exprimant le récepteur des cellules B (BCR) et sont appelées cellules B naïves. Ces cellules entrent en contact avec des antigènes du soi et celles qui vont réagir seront inactivées fonctionnellement, ce processus est appelé la tolérance immune. Le lymphocyte B naïf mature passe alors dans les circulations sanguine et lymphatique.



CD34	+	+	+	-	-	-	-	-
CD10	+	+	+	+	+	+	+	-
IL-7R α	+	+	+	-	-	-	-	-
CD19	-	-	+	+	+	+	+	+
CD79a	-	+	+	+	+	+	+	+
TdT	-	-	+	-	-	-	-	-
RAG	-	-	+	+	-	+	+	-
Vpre-B	-	+	+	+	+	-	-	-
μ H	-	-	+/-	+	+	+	+	+
pre-BCR	-	-	-	-	+	-	-	-
IgH	GL	DJ _H	V _H DJ _H					
κ L	GL	GL	GL	GL	GL	V _L J _L	V _L J _L	V _L J _L
cycling	-	-	-	+	+	-	-	-
Pax-5	-	-	+	+	+	+	+	+
sIgM	-	-	-	-	-	-	+	+
sIgD	-	-	-	-	-	-	-	+

Figure I.20 : Modèle consensuel des stades précoces de la lymphopoïèse B et de leur immunophénotype chez l'Homme. Le répertoire d'anticorps primaires est obtenu par recombinaison somatique des segments géniques V(D)J dans les loci des chaînes lourdes (IGH) et légères (IGL) d'immunoglobulines. D'après¹⁸.

ii. Epigénome et ontogenèse B

La lymphopoïèse B médullaire est induite et finement régulée par des facteurs de transcription spécifiques dont certains exercent un rôle sur le remodelage de la chromatine et par conséquent sur l'accessibilité aux gènes.

Ikaros est le prototype d'une nouvelle classe de régulateurs de la chromatine. En effet, cette protéine est présente dans des complexes multimériques qui peuvent lier simultanément les gènes cibles et les séquences répétées péri-centromériques. Ces complexes remodelant la chromatine fonctionnent en promouvant un équilibre dynamique entre les états ouverts et fermés²⁵.

Il est proposé qu'EBF et PAX5 fonctionnent comme des facteurs pionniers dans le contrôle des statuts épigénétiques de leurs gènes cibles, incluant mb-1 qui code pour le CD79a. Récemment, une équipe américaine a montré que l'activation des promoteurs de mb-1 par EBF et Pax5 est dépendante du complexe SWI/SNF et restreinte par le complexe Mi-2/NuRD, qui limite l'extension du remodelage de la chromatine et la déméthylation de l'ADN⁶⁷.

Une étude chez la souris a mis en évidence que la diméthylation de H3K9 est présente dans le locus V_H des cellules hématopoïétiques hormis dans les cellules B et que son effacement accompagne l'expression de Pax5 et l'engagement dans la lignée B. Pax 5 est à la fois requis et suffisant pour l'effacement de la diméthylation de H3K9 dans le locus V_H ¹⁰³.

iii. Le récepteur des cellules B (BCR) : élément fonctionnel majeur de la lignée B

Le développement précoce des cellules B est caractérisé par le réarrangement ordonné des loci des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines. Dans les stades les plus précoces, on observe l'expression d'un pré-récepteur (pré-BCR) puis progressivement le BCR se structure¹²⁵.

LES GÈNES D'IMMUNOGLOBULINES

Chez l'Homme, trois loci codent les chaînes d'immunoglobulines : en 14q32 pour les chaînes lourdes IGH (Heavy), en 2p11 pour les chaînes légères kappa (IGK) et en 22q11 pour les chaînes légères lambda (IGL). Les loci des gènes d'immunoglobulines comprennent différentes régions de segments géniques variable (V), de diversité (D) (non présents au niveau des loci des chaînes légères) et de liaison (J) qui sont combinées et fusionnées pour coder les protéines d'immunoglobulines. Chaque segment génique V, D, J est flanqué par des motifs de signal : les séquences signal de recombinaison (RSS) (fig. I.21)^{39,119}.

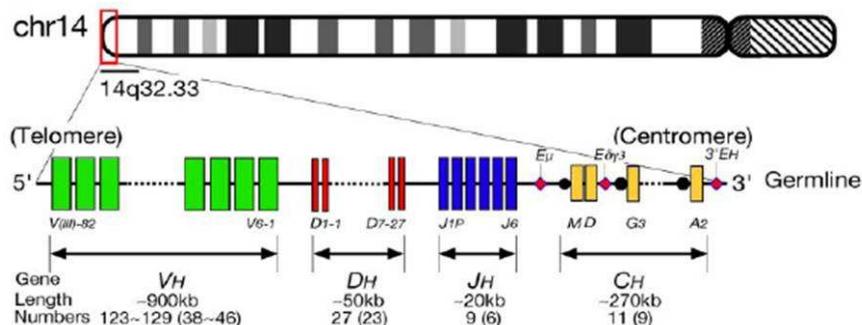


Figure I.21 : Le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IGH). Schéma du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines. Les rectangles représentent les régions variables (en vert), de diversité (en rouge), de jonction (en bleu), constantes (en jaune) du locus IGH. Les losanges roses représentent les enhancers. D'après⁴⁶.

En amont des clusters de gènes V, D et J des loci IGH, il y a des séquences répétées d'ADN, les régions switch, puis les régions géniques constantes (C). Les gènes C, V, D et J sont donc séparés dans l'ADN génomique.

Le locus IGH contient trois enhancers différents : l'enhancer 5' intronique μ (E_μ) localisé dans l'intron entre la région J et les séquences switch μ (S_μ) et deux enhancers en 3' localisés en amont des régions constantes ($E\alpha1$ et $E\alpha2$)¹¹⁹.

Le locus IGH réarrangé et productif est organisé en unités consistant en une région V(D)J, des régions switch qui sont non codantes et les exons codants de la région constante (fig. I.22)¹¹⁷.

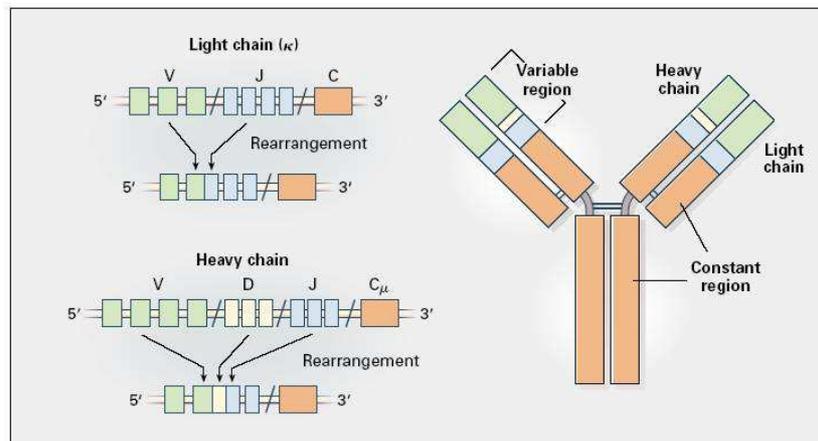


Figure I.22 : Réarrangements des chaînes légères et lourdes d'immunoglobulines par recombinaisons somatiques des segments V(D)J. L'ADN entre les éléments réarrangés est délété. Les gènes réarrangés codent pour les molécules constituant les immunoglobulines. D'après¹²⁰.

La molécule complète d'immunoglobuline comprend 2 chaînes lourdes (H) identiques et 2 chaînes légères (L) identiques liées de façon covalentes par des ponts disulfures (fig. I.22).

STRUCTURE

Le BCR est un complexe moléculaire qui comprend (fig. I.23)^{118,125,143} :

- des molécules CD79a (Igα) et CD79b (Igβ) qui contiennent des immuno-récepteurs transmettant des signaux. Ces molécules associées de façon non covalente à l'immunoglobuline, contiennent des domaines cytoplasmiques avec des motifs très conservés pour la phosphorylation de la tyrosine et l'amarrage des kinases de la famille Src qui sont essentielles à l'initiation de la signalisation du BCR et à l'activation des cellules B.
- plusieurs molécules associées (CD19, CD21, CD31, BTK) (annexe 1). La Burton Tyrosine Kinase (BTK), gène muté dans l'agammaglobulinémie liée à l'X, joue un rôle central dans la signalisation en amont de l'activation du pré-BCR et du BCR, en promouvant le flux calcique.
- une molécule complète d'immunoglobuline.

On distingue 3 zones hypervariables pour chaque domaine V des molécules d'immunoglobulines, formant le site de liaison à l'antigène, V_H 1, 2 et 3 également appelées CDR 1, 2 et 3 « Complementary Determining Regions ». Elles sont créées par la jonction imprécise des segments géniques V, D, J et l'inclusion variable de séquences palindromiques P et de nucléotides N *de novo*. Leur localisation au centre du site de liaison de l'antigène et la

diversité créée par le processus de recombinaison V(D)J permettent aux CDR des domaines V_H et V_L de jouer un rôle décisif dans la reconnaissance et la liaison de l'antigène.

Une des propriétés uniques du segment D_H est la présence de régions charpentes FR1 à 4 (Framework Regions). Ce motif d'acides aminés est particulièrement stable. Ces segments géniques limitent la diversité ce qui va à l'encontre de ce qui est attendu pour un gène nommé pour son potentiel a augmenté la diversité¹⁸⁹.

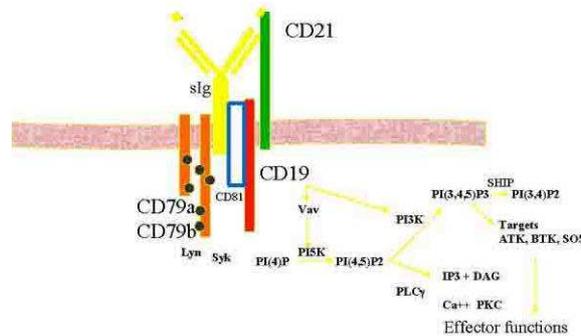


Figure I.23 : Représentation schématique du B cell receptor et des principales voies de signalisation associées. D'après www.bioscience.org.

Initialement, la recombinaison productive VDJ_H aboutit à l'expression d'une chaîne lourde μ ($CH\mu$), premier isotype exprimé. Cette $CH\mu$ est capable de s'apparier avec une chaîne légère de substitution (CLS) codée par les gènes $V\text{pr}\acute{e}B$ et $\lambda 5$, formant le pré-BCR. Par la suite, la CLS est inhibée et la recombinaison productive VJ_L et l'expression de chaîne légère – κ ou λ – remplace la CLS pour assembler le BCR mature^{18,143}.

iv. La recombinaison VDJ des gènes d'immunoglobulines

DÉFINITION ET MÉCANISME

La maturation des lymphocytes B est fortement associée aux réarrangements des gènes d'immunoglobulines. Le mécanisme de la recombinaison V(D)J est un modèle dans lequel l'ADN, les recombinases RAG1 et RAG2 (Recombinase Activating Genes) introduisent des cassures double brins au niveau des séquences RSS. Les jonctions sont caractérisées par des délétions de nucléotides via une exonucléase et l'ajout de nucléotides au hasard grâce à la TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase)³³. Le mécanisme de la recombinaison V(D)J est résumé sur la figure I.24.

La diversité initiale des chaînes lourdes, les segments D_H joignant les segments J_H , a lieu dans les cellules pro-B. Ceci est suivi par la recombinaison d'un gène V_H avec le segment DJ_H , qui aboutit à un réarrangement complet VDJ_H ⁸⁵.

Le succès de la recombinaison aléatoire V(D)J des gènes d'immunoglobulines, grâce aux activités enzymatiques spécifiques de lignée des protéines RAG et TdT, aboutit à l'émergence de lymphocytes B immatures porteur de récepteurs aux antigènes très

diversifiés. Ces lymphocytes B immatures ayant échappé à l'apoptose quittent la moelle osseuse et transitent par voies sanguine et lymphatique pour coloniser les organes lymphoïdes. Cette étape de migration s'accompagnant d'une maturation fonctionnelle définit les cellules B transitionnelles.

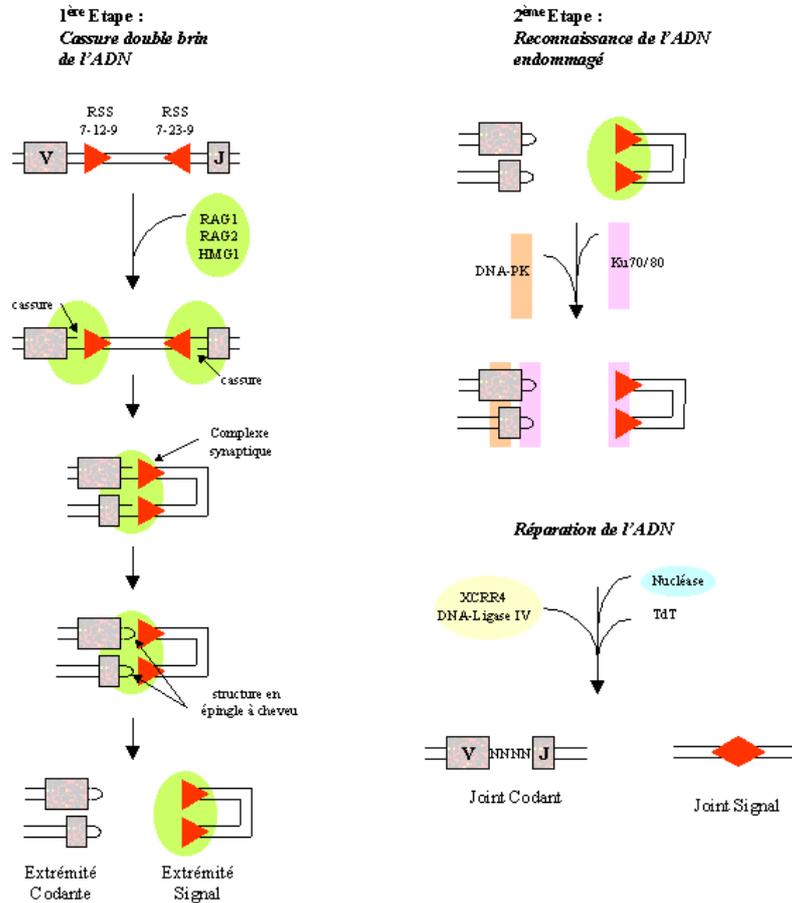


Figure I.24 : Schéma récapitulatif des trois étapes indispensables et finement régulées de la recombinaison V(D)J.

Première étape : initiation d'une cassure double brin. Le réarrangement débute par la reconnaissance entre RAG1 et le nonamère RSS. Ensuite, RAG2 est recruté. Puis, les protéines du groupe de forte mobilité HMG1 et HMG2 stabilisent la structure courbée induite par les complexes RAG1/RSS/RAG2, formant une synapse. Enfin, les recombinases réalisent une cassure simple brin en 5' de l'heptamère, laissant un phosphate en 5' et un hydroxyl en 3'. Le groupement hydroxyl de l'extrémité codante agit comme un nucléophile et attaque la liaison phosphodiester entre l'extrémité signal et l'extrémité codante du brin opposé. Ceci aboutit à une structure en épingle à cheveux au niveau des extrémités codantes et signal contondants. *Deuxième étape : reconnaissance des lésions et modification des extrémités codantes.* La résolution et la fusion des extrémités codantes aboutissent à une jonction codante imprécise. Au cours de cette réaction, des nucléotides peuvent être enlevés des extrémités codantes par digestion exonucléolytique suivie de l'addition de nucléotides (les séquences N) par la TdT, augmentant ainsi la diversité des gènes d'immunoglobulines^{39,119}. *Troisième étape : réparation des cassures d'ADN.* La réparation des extrémités codantes et signal libres se fait grâce au système de réparation NHEJ (Non Homologous End Joining) des cassures double brins de l'ADN. Les protéines Ku70/80 forment un hétérodimère qui lie les structures irrégulières d'ADN, les protégeant de la dégradation et empêchant les activités hélicase et ATPase³⁹. Le complexe Ku est phosphorylé par le complexe actif DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), rendant disponibles les extrémités codantes pour l'ouverture de l'épingle à cheveux et la ligation³³. La ligase IV est le composant final de la machinerie de réparation des cassures double brins participant à la recombinaison V(D)J³⁹.

D'après <http://www.unilim.fr/theses/2003/sante/2003limo0012/images/figure2.gif>.

RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE DE LA RECOMBINAISON V(D)J

Depuis plusieurs années, les recherches ont révélé que des modifications épigénétiques jouent un rôle important dans le contrôle de l'accessibilité des gènes d'immunoglobulines lors du réarrangement V(D)J dans les cellules B et T. Cette hypothèse propose que la régulation précise de ce processus est précédée par l'acquisition d'une structure chromatinienne ouverte, qui permet aux protéines RAG de reconnaître et de cliver l'ADN au niveau des séquences signal de recombinaison RSS^{25,224}. Les éléments du contrôle transcriptionnel dans les loci d'immunoglobulines (les enhancers et les promoteurs) ne jouent pas seulement un rôle essentiel dans la transcription des gènes réarrangés mais également en tant qu'éléments contrôlant l'accessibilité. En effet, ils peuvent recruter des complexes de facteurs de transcription incluant les enzymes modificatrices de la chromatine qui changent la conformation locale des nucléosomes et initient la transcription germinale²²⁴.

On connaît maintenant la nécessité d'une chromatine acétylée et tri-méthylée sur H3K27 pour la promotion de la recombinaison V(D)J alors que la méthylation de H3K9 l'inhibe¹⁵⁵. Plus récemment, la tri-méthylation H3K4, une marque épigénétique active, a été identifiée comme nécessaire au recrutement de la recombinase RAG2 sur les loci V(D)J^{32,135,148}. Cette interaction spécifique dépend d'un domaine PHD (plant homeodomain), nouvellement identifié au niveau de la protéine RAG2. L'enrichissement de H3K4me3 sur les gènes J_H plutôt que sur les gènes V_H ou D_H dans une lignée de cellules pro-B peut être responsable du fait que le réarrangement D_H-J_H précède le réarrangement DJ_H-V_H puisque les doigts PHD de RAG2, interagissant avec H3K4me3, se lient à J_H mais pas à D_H²²⁴. Ainsi, la reconnaissance de l'hyperméthylation de H3K4 par RAG2 permet de promouvoir une recombinaison V(D)J efficace *in vivo*.

L'acétylation des histones dans le locus V_H est régulé à la fois localement et régionalement. Précocement dans l'ontogénie B, les cellules pro-B sont spécifiquement acétylées sur les histones H4 au niveau des segments géniques J_H-V_H proximaux, corrélant avec leur réarrangement préférentiel. En même temps que la progression en cellules pré-B et l'exclusion allélique des chaînes lourdes, l'expression membranaire de la chaîne lourde μ entraîne une baisse significative de l'acétylation de H4 dans les segments géniques J_H-V_H distaux¹⁰².

De façon surprenante, l'acétylation des histones des gènes V_H n'est pas suffisante pour faciliter la recombinaison V_H-DJ_H. En effet, les gènes V_HJ_H distaux acétylés sont réarrangés avec seulement une faible efficacité dans les cellules pro-B en l'absence de l'HMT EZH2²⁵. EZH2 contrôle les réarrangements des segments V_H distaux via son rôle sur la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3²⁰⁷.

En considérant le rôle des HMT Suv4-20h dans les processus de réparation des cassures double brins d'ADN, il n'est pas étonnant d'observer que les lymphocytes B Suv4-20h -/-

chez la souris soient défectueux pour la recombinaison et la commutation de classe des gènes d'immunoglobulines¹⁹².

Les modifications post-traductionnelles des histones interviennent à différents temps spécifiques de la recombinaison V(D)J. Elles sont indispensables à l'initiation de ce processus en favorisant un état chromatinien ouvert et aux mécanismes de réparation des cassures de l'ADN, dernière étape de la recombinaison, en favorisant le recrutement des protéines de la machinerie de réparation.

b. Les cellules B transitionnelles

La phase de transition des cellules B est marquée par une cascade de maturation en différents sous-types transitionnels. Au cours de cette phase, la cellule passe au travers de multiples points de contrôle, migre dans les follicules lymphoïdes spléniques et devient sensible aux signaux induits par les lymphocytes T. La sélection à cette étape est particulièrement importante puisque, selon les estimations, moins de 5% des cellules B nouvellement formées dans la moelle osseuse entrent avec succès dans le compartiment B mature².

L'origine, le développement et les fonctions spécifiques de ce sous-ensemble de lymphocytes B sont moins bien connus chez l'Homme que chez la souris. Trois modèles décrivant les sous-ensembles de cellules B transitionnelles et leur relation avec les cellules B folliculaires et de la zone marginale sont proposés chez l'Homme (fig. 1.25)^{2,27,137}. Les cellules B transitionnelles humaines combinent le phénotype et la distribution tissulaire des cellules B transitionnelles de la souris. Chez la souris, il est possible de distinguer les cellules B1 et les cellules B2, également appelées T1 et T2.

La population lymphocytaire B1 est originaire du foie fœtal et requiert la rate pour sa génération et/ou sa survie chez l'adulte. Ces cellules B1 innées sont mobilisées rapidement lors de l'exposition à des antigènes thymique-indépendants tels que les capsules polysaccharidiques bactériennes. Elles peuvent être subdivisées en deux populations en fonction de l'expression ou non du CD5 (les B1a sont CD5⁺ et les B1b sont CD5⁻). Les cellules B1a sont la source des anticorps naturels de type IgM de faible affinité qui permettent une protection cruciale au cours des premiers stades de l'infection, tandis que les anticorps induits dérivés des cellules B1b sont produits par la suite et sont les clés de la clairance ultime et de la protection à long terme contre les pathogènes. Ces cellules représentent donc la première ligne de défense contre la plupart des infections et la seule contre les bactéries encapsulées^{27,152}.

Les cellules B2 sont produites dans la moelle osseuse au cours de la vie post-natale. Ces cellules exprimant une IgM de surface migrent dans la rate où elles vont subir la maturation d'affinité dans les follicules ou donner les cellules B de la zone marginale¹⁵².

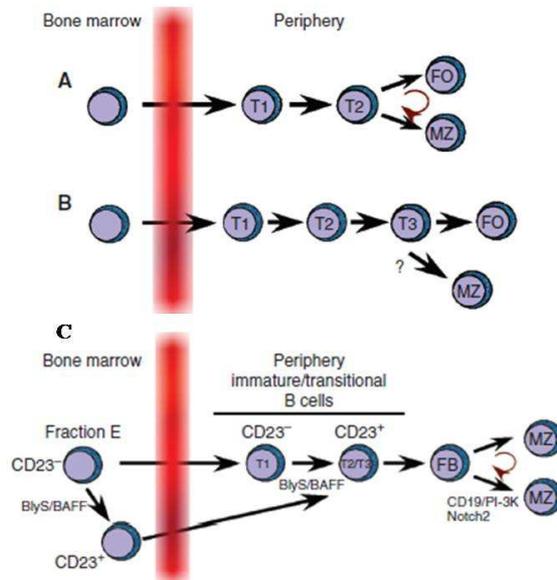


Figure I.25 : Les trois modèles proposés chez l'Homme pour décrire le compartiment des cellules B transitionnelles. D'après ² (A) Modèle proposé par Loder *et al* dans lequel les cellules T2 peuvent donner les populations folliculaires ou de la zone marginale qui ont la capacité de proliférer¹³⁷. (B) Modèle présenté par Carsetti *et al* qui décrit au moins trois sous-populations non-prolifératives (T1 à T3), avec la plus mature d'entre elle qui produit directement les cellules B folliculaires matures²⁷. (C) Modèle proposé par Allman *et al* qui présente les événements de la maturation associés à la génération de lymphocytes B transitionnels comme non restreints aux tissus périphériques. La prolifération des cellules B spléniques décrites par Loder *et al* serait le reflet d'un mécanisme homéostatique qui fonctionne pour générer et maintenir le pool de cellules B de la zone marginale à partir des cellules B folliculaires².

La réussite du transit des cellules B immatures de la moelle osseuse aux cellules B matures périphériques apparaît être contrôlée à la fois par la signalisation du BCR et la disponibilité de BAFF (B cell Activating Factor, de la famille des facteurs suppresseurs de tumeurs TNF). Avec ce système de double contrôle, le répertoire mature sensible est sélectionné par la spécificité du BCR (sinon pas de réponse spécifique), tandis que la taille ultime du pool de cellules B périphériques est contrôlée par la disponibilité de BAFF (sinon auto-immunité favorisée)^{132,212}.

Les cellules B transitionnelles périphériques sont considérées comme des intermédiaires clés du développement pour la génération de cellules B matures à longue vie. Elles sont des cibles importantes de la pression de sélection qui détermine l'ensemble du répertoire de cellules B matures. Ces cellules ne sont pas matures tant qu'elles n'ont pas accédé à l'environnement folliculaire qui leur permettra d'entrer dans le pool de cellules B matures à vie longue. De façon intéressante, certaines caractéristiques de ces cellules rappellent celles des cellules du lymphome du manteau.

c. Maturation antigène dépendante des lymphocytes B dans les follicules lymphoïdes

Dans les tissus lymphoïdes périphériques, l'activation B thymo-dépendante implique une interaction fine entre les lymphocytes B, T et les cellules dendritiques ayant reconnu un antigène²¹⁰. Cette activation a lieu au sein d'un microenvironnement particulier appelé centre germinatif. Typiquement, le développement de la réponse immune acquise requiert au moins une semaine et résulte en la production d'anticorps monospécifiques de haute affinité, d'abord des IgM et plus tard des IgG²⁷.

L'entrée dynamique des lymphocytes dans les follicules et leur sélection pour la migration dans et au sein des centres germinatifs représentent un ballet complexe d'interactions moléculaires orchestrées par des gradients chimiotactiques et l'engagement du BCR. La différenciation des cellules B est notamment dépendante de signaux solubles et de contacts (contact CD80-CD28 et contact CD40-CD40L) délivrés aux cellules B différenciées par les cellules T, les cellules dendritiques folliculaires et possiblement par les protéines de la matrice extracellulaire dans les centres germinatifs^{114,125}.

i. Les organes lymphoïdes périphériques

La rate et les ganglions lymphatiques sont le lieu de prolifération et de différenciation terminale des cellules B. Ils servent de filtres pour les particules étrangères. En effet, les vaisseaux lymphatiques vont amener un antigène des tissus jusqu'à la rate et aux ganglions, ce qui permet d'activer la réponse immunitaire spécifique au niveau des follicules lymphoïdes primaires. Ils sont alors le siège de l'immunopoïèse.

LES FOLLICULES LYMPHOÏDES SECONDAIRES

Après l'activation dans les zones T spléniques et ganglionnaires, les lymphocytes B et T migrent dans les follicules lymphoïdes primaires et s'accumulent dans la trame de cellules dendritiques folliculaires qui exposent l'antigène à leur surface. Les lymphocytes B initient la réaction du centre germinatif, formant les follicules lymphoïdes secondaires et vont alors rapidement proliférer et subir des processus stringents de sélection positive et de maturation d'affinité acquérant ainsi de nouvelles caractéristiques phénotypiques¹⁰⁷. Le centre germinatif fournit un microenvironnement important pour ces processus cruciaux de la maturation des lymphocytes B¹⁹⁵.

Des marqueurs spécifiques ont été identifiés ces 30 dernières années permettant l'identification et la distinction des différents sous-ensembles cellulaires présents dans les follicules lymphoïdes secondaires¹³⁶. Trois compartiments de lymphocytes B sont ainsi

distingués au niveau des follicules lymphoïdes secondaires, de l'extérieur vers l'intérieur (fig. I.26) : la zone marginale, la zone du manteau et le centre germinatif.

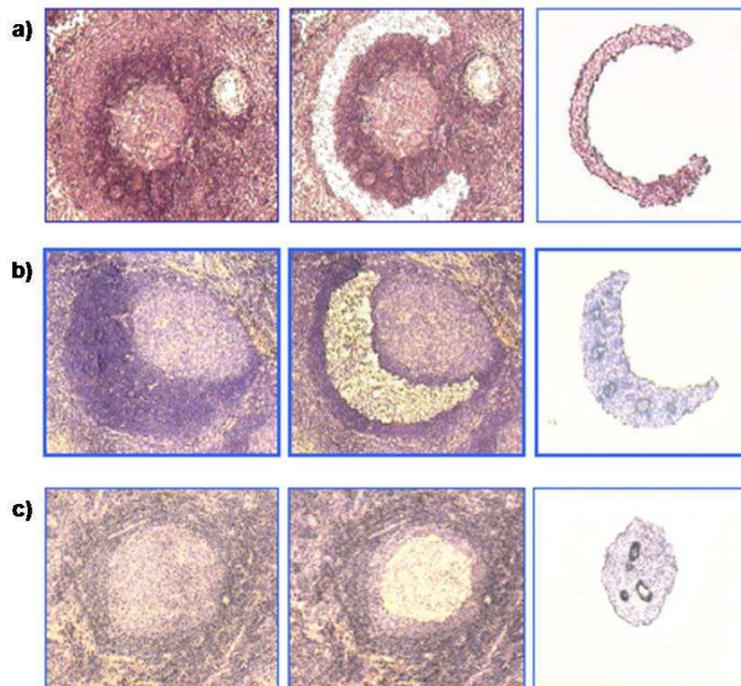


Figure I.26 : Les trois compartiments de cellules B des follicules lymphoïdes secondaires isolés par microdissection de ganglions ou de rate congelés. a) Zone marginale splénique ; b) Zone du manteau ganglionnaire ; c) Centre germinatif ganglionnaire. Immunomarquage par un anticorps anti-CD3. Objectif 10. D'après¹⁹⁵.

Le profil d'expression génique de ces trois compartiments reflète des attributions fonctionnelles distinctes des populations résidentes. En effet, les cellules B du centre germinatif ont une signature génique de forte prolifération tandis que les cellules des zones du manteau et marginale sont caractérisées par des signaux qui aident à maintenir un état quiescent¹⁹⁵.

Les centres germinatifs

Les centres germinatifs vont produire en continu des populations oligoclonales de cellules B mémoires et de plasmocytes. Tout de suite après la période initiale d'expansion, le centre germinatif se polarise pour former la zone sombre et la zone claire, riche en trame de cellules dendritiques folliculaires. La zone sombre contient les grandes cellules B proliférant rapidement, appelées centroblastes. Par la suite, ils migrent dans la zone claire et sont alors appelées centrocytes. Les centrocytes qui survivent aux modifications génétiques induites par la réaction du centre germinatif réentrent dans la zone sombre et initient de nouveaux cycles de prolifération. Les lymphocytes qui tournent entre l'état centroblastique et centrocytique acquièrent des mutations sélectionnées qui augmentent leur affinité pour l'antigène^{39,107,210}.

La zone du manteau

Dans les follicules où se développent des centres germinatifs, les cellules B au repos qui ne prennent pas part à la réponse du centre germinatif sont repoussées vers l'extérieur pour former la zone du manteau ou corona qui entoure les cellules B du centre germinatif (fig. I.26). La cellule de la zone du manteau est une cellule B pré-centre germinatif, immunologiquement naïve qui est la cellule présumée à l'origine du lymphome du manteau. Ces cellules B expriment des gènes d'immunoglobulines non mutés, une IgM et/ou D de surface et sont pour la plupart restreintes à la zone du manteau folliculaire. Cette zone contient ainsi plus de 90% de cellules B naïves dans un état quiescent qui peuvent participer aux réactions du centre germinatif dès leur stimulation¹⁹⁵.

La zone marginale

Située à la frontière entre pulpe blanche et pulpe rouge spléniques, la zone marginale est peu reconnaissable au sein de l'architecture histologique ganglionnaire. Elle occupe toutefois une position stratégique dans la rate, à l'interface avec la circulation sanguine. Elle est composée de macrophages, de cellules dendritiques, de lymphocytes B, de quelques plasmocytes et polynucléaires neutrophiles. L'afflux important d'antigènes est à l'origine d'une intense activation et d'une prolifération des cellules B de la zone marginale. Le phénotype des lymphocytes B de la zone marginale peut rendre leur distinction difficile avec les lymphocytes B de la zone du manteau¹⁹⁵.

PATHOLOGIES DES ORGANES LYMPHOÏDES PÉRIPHÉRIQUES

De nombreuses pathologies peuvent être à l'origine d'adénopathies aboutissant à une augmentation de volume des ganglions qui deviennent palpables. Ces adénopathies peuvent être le signe de nombreuses infections en particulier virales. On parle alors d'hyperplasies ganglionnaires, mais elles peuvent également être le signe de pathologies tumorales. Lorsque la rate augmente et qu'il devient possible de la palper, on parle de splénomégalie. De nombreuses pathologies sont à l'origine d'une splénomégalie : certaines maladies infectieuses (paludisme, mononucléose infectieuse, septicémie), maladies hémolytiques (thalassémie), maladie de surcharge (amylose), hépatopathie (cirrhose hépatique), certaines pathologies cancéreuses (lymphomes).

Les tumeurs les plus fréquentes dues à une prolifération anormale de lymphocytes matures au sein des organes lymphoïdes périphériques sont appelées lymphomes. En fonction de la cellule d'origine et du mécanisme physiopathologique, différents types de lymphomes sont définis (fig. I.27) (annexe 2).

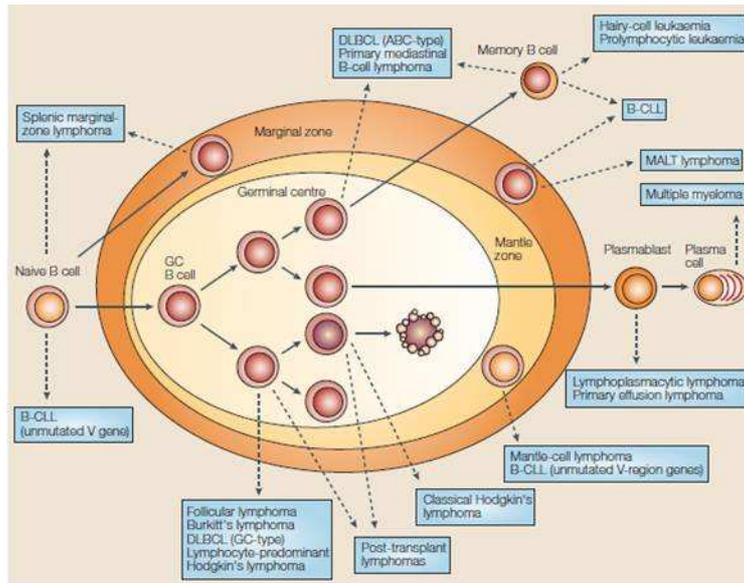


Figure I.27 : Origines cellulaires des lymphomes B humains. La plupart des lymphomes B sont issus de lymphocytes B du centre germinatif ou post-centre germinatif. DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules ; B-CLL : leucémie lymphoïde chronique B ; MALT : lymphome des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. D'après¹¹⁸.

ii. Caractéristiques de la maturation B dans le centre germinatif

PRÉSENTATION GÉNÉRALE

Le centre germinatif est un microenvironnement cellulaire remarquable nécessaire à l'expansion, la sélection et la maturation des lymphocytes B activés par des antigènes spécifiques et peut purger les clones auto-réactifs¹⁰⁶. Les cellules B du centre germinatif sont destinées à mourir, via c-myc, p53, Fas et Bax, à moins qu'elles soient positivement sélectionnées par les antigènes et le CD40 ligand¹³⁶. Le CD40 (membre de la superfamille des récepteurs au TNF α) est un récepteur jouant un rôle essentiel dans les réactions immunitaires et inflammatoires notamment en stimulant la commutation de classe des lymphocytes, le développement des cellules B et la formation des centres germinatifs. On le retrouve principalement sur les cellules présentatrices d'antigènes mais il est également présent à la surface d'autres types cellulaires dont les lymphocytes B.

Les principales étapes de la maturation B sont résumées sur la figure I.28.

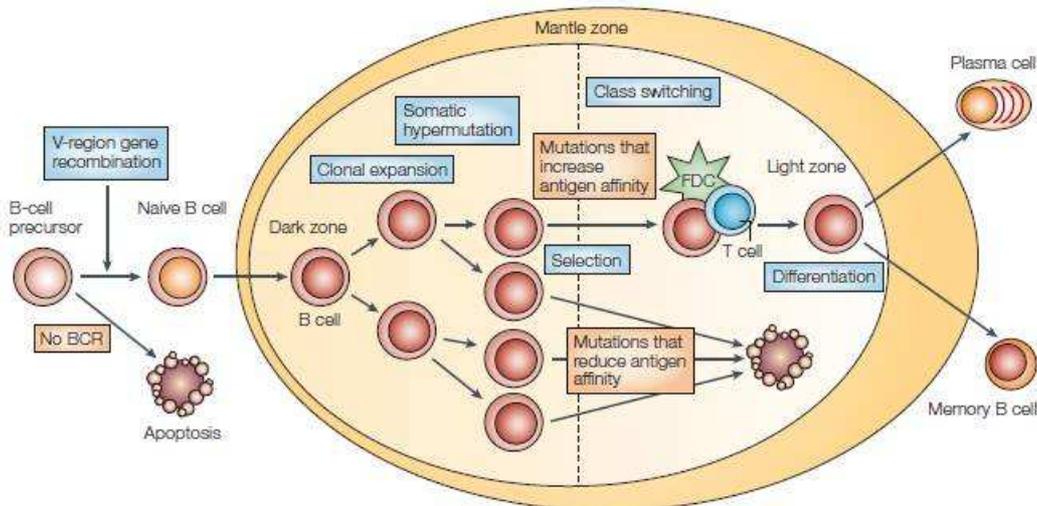


Figure I.28 : La différenciation des cellules B dans le centre germinatif. Les cellules B naïves matures activées par les antigènes arrivent dans les follicules primaires où ils forment les centres germinatifs (en jaune clair). Dans les cellules B prolifératives du centre germinatif, le processus d'hypermutations somatiques mène à l'introduction de mutations à fort taux dans les gènes des régions V d'immunoglobulines. La plupart de ces mutations sont délétères pour les cellules, puisque certaines aboutissent à une réduction de l'affinité pour l'antigène, entraînant leur apoptose. Quelques cellules B du centre germinatif vont acquérir des mutations dans le BCR qui augmentent leur affinité pour l'antigène. Ces cellules seront positivement sélectionnées probablement dans la zone claire, où les cellules B du centre germinatif sont en contact étroit avec les cellules T CD4⁺ et les cellules dendritiques folliculaires. Une fraction de ces cellules B du centre germinatif subit la recombinaison de classe. Finalement, elles se différencient en cellules B mémoires ou en plasmocytes. D'après¹¹⁸.

La réaction du centre germinatif supporte trois processus clés indispensables à l'augmentation de la spécificité et de l'affinité des anticorps envers les antigènes étrangers (fig. I.29) :

- les hypermutations somatiques modifient l'affinité des gènes V des chaînes lourdes d'immunoglobulines pour un antigène.
- la commutation de classe permet l'expression d'un nouvel isotype G, A ou E.
- la révision du récepteur serait le processus par lequel la chaîne légère de l'anticorps exprimée à l'origine est remplacée par une autre. Il y a maintenant plus de 10 ans que des équipes ont décrit la réexpression des gènes RAG *in situ* et *ex vivo* dans les cellules B activées^{79,84}. Ce processus pourrait être le dernier recourt pour produire un récepteur de haute affinité et éliminer les clones autoréactifs¹²⁰.

La commutation de classe et l'hypermutation somatique sont dépendantes de l'action de l'activation-induced cytidine deaminase (AID) spécifique des cellules B⁴⁵. AID est une enzyme qui initie ces réactions par déamination des bases cytosines générant des uraciles qui sont alors réparés par des processus pouvant générer des mutations ou induisant des cassures double brins d'ADN. Malheureusement, générer un répertoire d'immunoglobuline diversifié peut être délétère puisqu'AID peut collaborer avec d'autres enzymes pour générer des translocations chromosomiques impliquant le locus IGH^{125,160}. Ainsi, il est critique que son action soit restreinte aux régions switch, épargnant les autres segments du locus IGH et le reste du génome. Une des hypothèses est le rôle des modifications d'histones dans les régions cibles de ces deux processus. Elles offrent un mécanisme plausible pour expliquer

comment ces régions spécifiques des IGH sont ciblées¹¹⁷. L'activité d'AID est également contrôlée par des facteurs de transcription tels qu'E2A et PAX5^{74,188}.

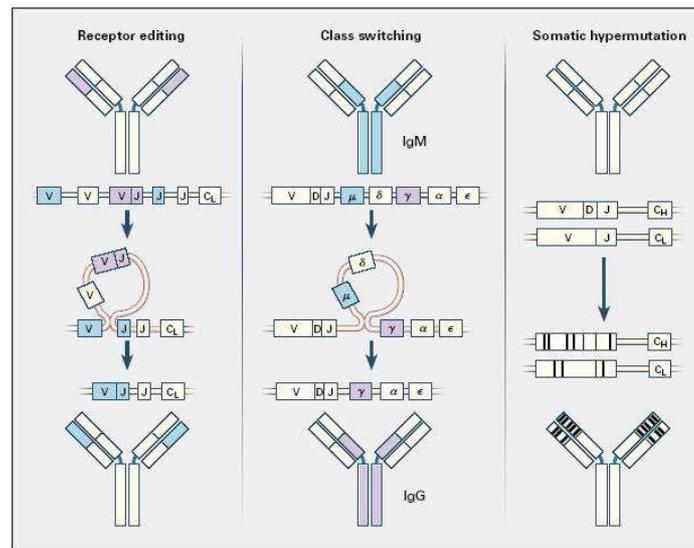


Figure I.29 : Processus moléculaires modifiant les gènes codant pour les molécules d'immunoglobulines dans les centres germinatifs : la révision du récepteur, la commutation de classe, le processus d'hypermutation somatique. D'après¹²⁰.

iii. Les mutations somatiques

GÉNÉRALITÉS

L'hypermutation somatique est un processus par lequel les substitutions de nucléotides (principalement des mutations mais aussi dans environ 5% des événements des délétions et des duplications) sont introduites à fort taux (1/1000 pb par cycle de division). L'évolution clonale est indépendante entre chaque centre germinatif¹⁰⁷. Ce processus a lieu dans les centroblastes²¹⁰.

Les mutations somatiques des gènes d'immunoglobulines concernent les trois loci et sont restreintes à une zone de 1-2 kb de la région variable V, la région C étant épargnée^{45,106,119}. Initialement, ces mutations sont réparties uniformément dans les exons V mais au cours du temps elles se focalisent plus fréquemment dans les CDR, les régions en contact direct avec l'antigène.

Schématiquement, les gènes d'immunoglobulines possédant plus de 98 % d'homologies avec la séquence germinale, sont considérés comme non mutés. Dans le cadre d'un lymphome, le statut non muté détermine l'origine de la cellule lymphomateuse comme naïve (ou pré-centre germinatif)¹²³.

Les étapes conduisant aux mutations somatiques sont illustrées sur la figure I.30.

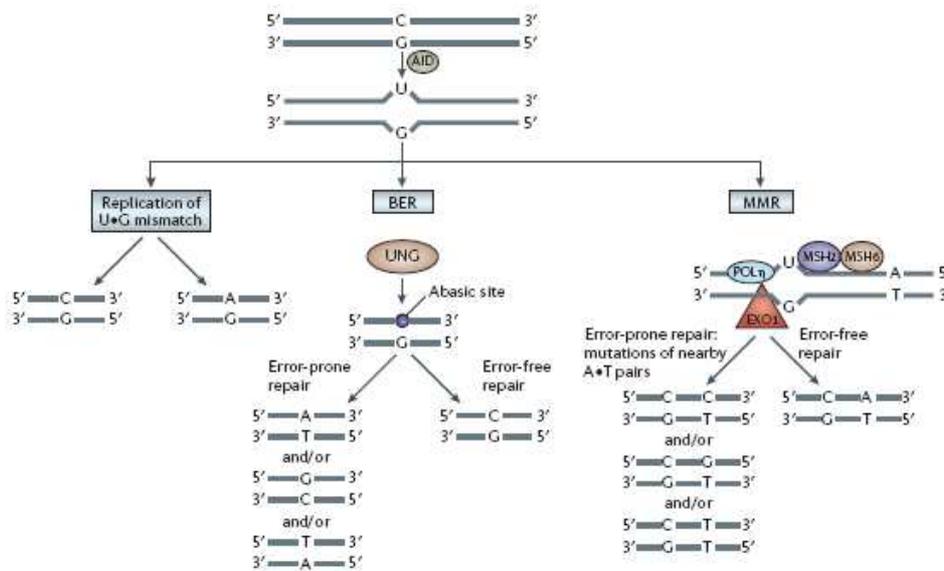


Figure I.30 : Mécanismes moléculaires générant les mutations somatiques. Schématiquement, la première étape consiste en une déamination du résidu cytosine (C) en uracile (U) induite par la protéine AID. Elle est à l'origine d'un mésappariement U:G. Ces lésions sont ensuite réparées selon différentes voies, conduisant soit à une réparation parfaite soit à des erreurs, les mutations somatiques. (1) si le mésappariement U:G n'est pas réparé, la réplication peut aboutir à l'insertion d'un nucléotide A en face du résidu U, créant une transition C:G → T:A, (2) si le résidu U est reconnu par l'UNG (Uracile DNA Glycosylase), protéine du système BER (Base Excision Repair), le résidu U sera excisé et formera un site abasique, pouvant être à l'origine de mutations ponctuelles de type transition ou transversion, (3) enfin, le mésappariement peut être détecté par l'hétérodimère MutS homologue 2/6 (MSH2/MSH6), protéine du système MMR (MisMatch Repair) ; l'exonucléase 1 associée à MSH2-MSH6 excise quelques bases encadrant le mésappariement, avec création de mutations au niveau de l'appariement A:T, proche de la lésion U:G. D'après¹⁶¹.

RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE

Les mutations somatiques sont corrélées à des modifications épigénétiques locales : la phosphorylation de l'histone H2B sur la serine 14 aurait un rôle potentiel dans le recrutement et/ou la rétention des protéines de réparation de l'ADN⁵⁵.

iv. La commutation de classe

GÉNÉRALITÉS

La commutation de classe permet l'expression d'un nouvel isotype d'immunoglobuline dans le BCR, modifiant les propriétés physiques des anticorps et leurs fonctions effectrices^{39,119}. Elle a lieu principalement dans les centrocytes de la zone claire du centre germinatif¹²⁰.

La commutation de classe des chaînes lourdes est un évènement de recombinaison d'ADN qui a lieu entre les séquences répétées de la région switch en amont du gène C μ et une seconde région switch en amont d'un des gènes des chaînes lourdes γ , α ou ϵ ¹²⁰. Bien que les lymphocytes B ne portent qu'un seul réarrangement fonctionnel des gènes V_H, la commutation de classe a souvent lieu sur les deux allèles¹¹⁹.

Le mécanisme de la commutation de classe est résumé sur la figure I.31.

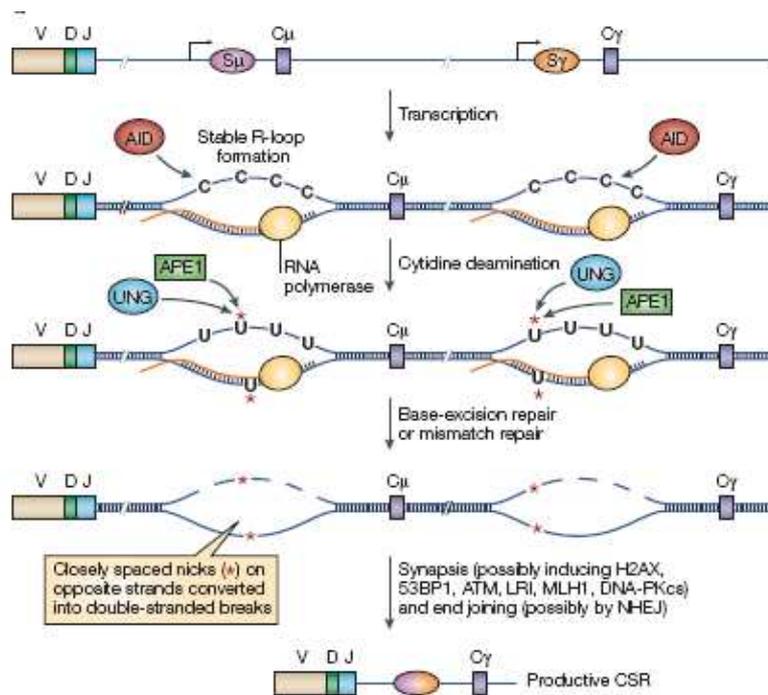


Figure I.31 : Modèle actuel de la commutation de classe. Les transcrits des gènes C_H non réarrangés, appelés transcrits germinaux, représentent la première phase de la commutation de classe, car permettent l'ouverture de la chromatine⁴⁵. Il semble qu'une des fonctions de la transcription germinale est de créer une synapse de transcription et une R-boucle, aboutissant à une région switch simple brin. L'ADN simple brin est alors le substrat d'AID qui initie la commutation de classe par déamination des résidus cytosine²⁰. Le fragment d'ADN entre les régions switch est enlevé du chromosome et les régions switch sont jointes de façon à ce qu'un nouveau gène C_H soit placé en amont de l'exon de la région V. La recombinase potentiellement impliquée n'est pas encore connue, mais le complexe DNA-PK qui est impliqué dans la recombinaison V(D)J et la réparation non homologe des cassures double brins d'ADN est également nécessaire à la commutation de classe¹¹⁹. D'après²⁹.

Le choix de l'isotype est régulé par un sous-ensemble de cellules T qui expriment le CD40 ligand et sécrètent l'IL-4, les cellules présentatrices d'antigène et le site anatomique de la présentation antigénique²⁰.

RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE

Récemment, une équipe a identifié l'acétylation et la triméthylation de H3K9 comme des modifications d'histones corrélées aux régions switch donneuses et réceptrices. Ceci suggère que ces deux modifications peuvent jouer un rôle important dans le ciblage de la commutation de classe¹¹⁷.

d. La différenciation plasmocytaire

Les réponses immunes acquises génèrent des pools séparés de plasmocytes à longue vie dans la rate, qui migrent à la moelle osseuse où ils occupent l'essentiel des niches de survie et peuvent persister pendant toute la vie de l'homme sans avoir besoin de se renouveler¹²⁵.

Les cellules B mémoires sont générées au cours de la deuxième semaine des réponses primaires humorales grâce aux efforts joints des lymphocytes B, T et des cellules dendritiques. Elles expriment une immunoglobuline mutée non auto-réactive, switchée d'une IgM vers un autre isotype. En conséquence, les cellules B mémoires switchées secrètent des anticorps de haute affinité capable de reconnaître les pathogènes précédemment rencontrés et protège l'hôte d'une réinfection^{27,125}. Chez l'adulte, les cellules B mémoires constituent environ 40% de toutes les cellules B¹²⁰.

Des antigènes, des cytokines, des signaux des Toll-like récepteurs, le CD40L peuvent conduire le pool de cellules B mémoires à se différencier chroniquement en plasmocytes à longue vie¹²⁵.

Les cellules B mémoires générées après chaque cycle de stimulation ont un potentiel diminué pour la production de nouvelles cellules mémoires et un potentiel augmenté pour subir la différenciation terminale. Cette hypothèse peut expliquer comment le système immunitaire contrôle la taille de la population des cellules B mémoires. Elle peut conférer deux capacités importantes au système immunitaire : 1) une génération rapide d'un grand nombre de cellules effectrices pour éliminer efficacement les pathogènes, 2) prévenir la sur-expansion et l'accumulation chronique d'un clone particulier de cellules B mémoires qui bloquerait la capacité du répertoire périphérique¹³⁶.

En conclusion, les étapes médullaires de la lymphopoïèse B correspondent aux modifications moléculaires qui accompagnent les réarrangements géniques nécessaires à la production et à l'expression d'une immunoglobuline membranaire, avant toute rencontre avec un antigène. Les lymphocytes B naïfs cheminent ensuite dans tous les tissus de l'organisme à la rencontre de l'antigène qui pourrait s'adapter à la molécule d'immunoglobuline de leur BCR. L'activation antigénique a lieu au niveau des organes lymphoïdes périphériques et aboutit à la formation de follicules lymphoïdes secondaires, siège de la maturation B terminale. Le microenvironnement du centre germinatif est crucial pour les modifications génétiques indispensables à la maturation d'affinité antigène-dépendante mais est un site potentiel d'erreurs oncogéniques. Les différents sous-ensembles de cellules B des follicules lymphoïdes contribuent à la circulation du pool d'anticorps naturels, aux réponses IgM thymiques-indépendantes et à l'immunité acquise par la différenciation terminale en plasmocytes, les cellules effectrices de l'immunité humorale.

e.Épigénome et lymphomagenèse

Il existe plusieurs arguments en faveur du rôle important des facteurs épigénétiques dans l'initiation et la progression des lymphomes. L'incidence élevée des anomalies génomiques impliquant les loci des gènes d'immunoglobulines chez les patients atteints de lymphomes laisse supposer un dysfonctionnement des mécanismes épigénétiques contrôlant les recombinaisons V(D)J, les hypermutations somatiques, la commutation de classe au cours de la lymphomagenèse.

i. Dérégulation de la méthylation de l'ADN

L'identification de signatures de promoteurs hyperméthylés dans certaines leucémies suggère qu'il existe une interaction entre les facteurs de transcription et les complexes de méthylation de l'ADN régulant la différenciation normale des cellules. La méthylation de l'ADN est particulièrement perturbée au niveau des îlots CpG proches de gènes suppresseurs de tumeurs. Par exemple, p15^{INK1b} (CDKN2B) et p16^{INK4a} (CDKN2A), impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, sont réprimés dans les hémopathies lymphoïdes et myéloïdes par hyperméthylation⁵¹.

De façon remarquable, les gènes sujets à l'hyperméthylation et au silencing épigénétique dans les cancers correspondent en grande partie à des gènes réprimés par la voie Polycomb (H3K27me3), dans les compartiments souches embryonnaires^{162,190,220}. Une étude très élégante (Illumina Bead array – 1505 CpG sur 807 promoteurs humains), sur une cohorte relativement grande de patients (83), a récemment identifié 56 gènes, méthylés *de novo* dans tous les sous-types de lymphomes. Fait remarquable, cette liste de gènes est enrichie en gènes de types cellules souches embryonnaires (cibles Polycomb). Ceci évoque la possibilité que les cellules lymphomateuses dérivent d'un compartiment de type cellule souche lymphoïde, ou bien qu'elles acquièrent ces caractéristiques au cours de la lymphomagenèse¹⁴⁴.

ii. Perturbation de l'hétérochromatine dans les hémopathies malignes

Notre équipe a démontré pour la première fois que les réarrangements de l'hétérochromatine constitutive 1q12 induisent des altérations profondes de l'organisation et de la fonction de la chromatine dans des cellules de lymphome B. Les conséquences majeures de ces anomalies sont des « appariements » intra-chromosomiques à longue distance entre le domaine d'hétérochromatine 1q12 transloqué et le domaine d'hétérochromatine centromérique, formant ainsi des foyers hétérochromatiques aberrants qui se trouvent relocalisés vers la périphérie nucléaire. Ces foyers sont associés à un enrichissement de l'euchromatine adjacente en marques épigénétiques répressives, et à la

dérégulation de l'expression de gènes, dont certains sont de nouvelles cibles pertinentes dans les lymphomes⁵⁹.

De manière remarquable, la perte de l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16) et de la triméthylation de H4K20 au niveau des séquences répétées de l'ADN sont des anomalies épigénétiques précoces et communes à tous les cancers et en particulier des lymphomes malins⁶⁰. En tenant compte du fait que H4K20me3 est un marqueur important pour la répression des domaines d'hétérochromatine, il est posé le postulat selon lequel la perte de H4K20me3, associé à l'hypométhylation de l'ADN, contribue à l'instabilité génomique fréquemment observée dans les cellules tumorales. Le rôle de H4K20 dans la réponse aux lésions de l'ADN chez la levure est un autre mécanisme par lequel la perte de la méthylation peut toucher de façon aberrante les points de contrôle normaux du cycle cellulaire¹⁷⁸.

iii. Dérégulation de l'expression des enzymes modifiant la chromatine

Le rôle important des enzymes modificatrices de la chromatine au cours de l'hématopoïèse est souligné par le fait que leur surexpression et leur dérégulation sont identifiées dans de multiples hémopathies malignes. MLL, qui est réarrangé et activé dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), méthyle H3K4 activant l'expression génique⁵³. De plus un certain nombre des partenaires de fusion de MLL interagissent avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. A titre d'exemple la protéine AF4, partenaire de fusion de MLL au cours de la translocation t(4;11)(q21;q23), interagit avec l'histone méthyltransférase responsable de la méthylation de la lysine 79 de l'histone H3, DOT1L. Dans les cellules leucémiques exprimant la protéine de fusion MLL-AF4, cette interaction est maintenue et aboutit à la méthylation aberrante de la lysine 79 de l'histone H3 au niveau de gènes cibles de MLL¹¹⁶. En accord avec ce résultat, les profils globaux de méthylation de la lysine 79 de l'histone H3 (ChIP-chip) distinguent les cas de LAL portant des réarrangements MLL des cas non-réarrangés pour MLL. De plus, la suppression de l'expression de DOT1L inhibe l'expression de cibles critiques de la protéine de fusion MLL-AF4¹¹⁶. Des mécanismes similaires sous-tendent la leucémogénèse MLL-AF10 -dépendante, chez la souris¹⁶³.

Le modèle du mécanisme de la t(15;17)(q24;q21)/PML-RAR α de la leucémie aiguë promyélocytaire est également un joli exemple (fig. I.32). L'expression ectopique du facteur de transcription chimérique aboutit au recrutement aberrant d'activités modifiant la chromatine au niveau des gènes cibles qui jouent un rôle important dans la différenciation cellulaire.

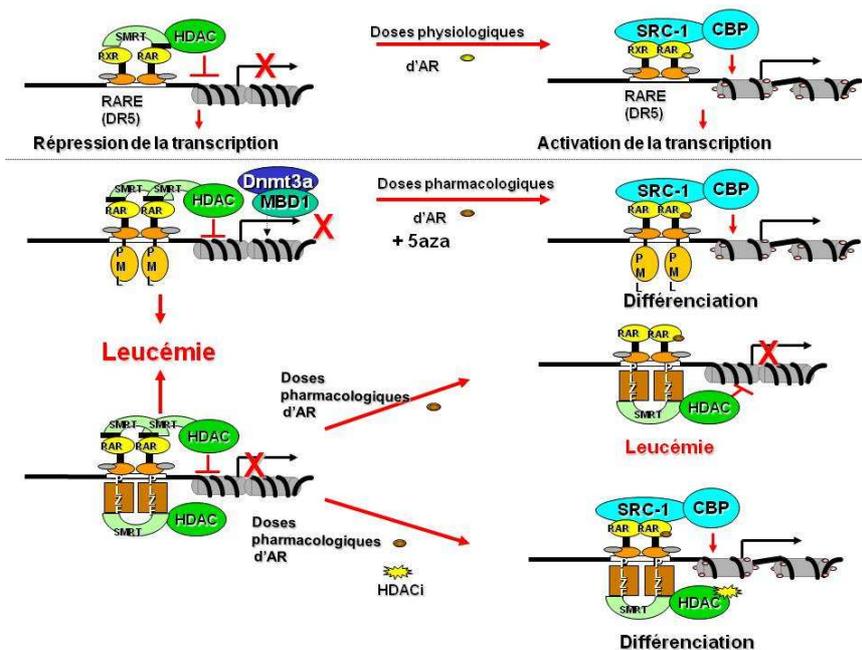


Figure I.32 : Modèle de dérégulation des activités d'enzymes modifiant la chromatine dans les leucémies promyélocytaire avec réarrangements des gènes PML/RAR α et PLZF/RAR α . Les protéines de fusion permettent le recrutement anormal de complexes répressifs insensibles à la présence d'acide rétinoïque à doses physiologiques. La présence d'acide rétinoïque à doses pharmacologiques associée à des inhibiteurs des DNMT et des HDAC rendent à nouveau accessibles les gènes cibles impliqués dans la différenciation de la lignée granuleuse. D'après le cours de master 2 de cancérologie (Paris 11) de L. Delva.

Des translocations touchant des histones déacétylases (HAT) sont également impliquées dans la tumorigénèse en promouvant une acétylation aberrante. Par exemple dans les leucémies aiguës myéloïdes, les t(8;16)(p11;p13) et t(10;16)(q22;p13) fusionnent les HAT MOZ et MORF avec CBP (CREB Binding Protein, coactivateur de facteurs de transcription CREB)¹⁷⁸.

Les souris «knock-out» pour les histones méthyltransférases Suv39h1/2 développent des lymphomes B, suggérant que la perte de la méthylation des H3K9 constitue un facteur de risque de lymphome¹⁷⁰.

La dérégulation de l'expression d'EZH2 est associée à une croissance dérégulée des cellules et est commune dans les cancers de la prostate et les lymphomes (fig. I.33). Les souris déficientes en EZH2 ont un défaut du développement des cellules B et une baisse du réarrangement de la chaîne lourde d'immunoglobuline¹⁷⁸. Une équipe canadienne a mis en évidence récemment des mutations somatiques récurrentes dans le gène codant pour EZH2 dans 21 % des cas de lymphomes diffus à grandes cellules (sous-type B du centre germinatif) et dans 7 % des lymphomes folliculaires. Ces mutations aboutissent à la substitution d'une seule tyrosine (Tyr641) dans le domaine SET de la protéine EZH2 qui présente une activité enzymatique réduite *in vitro* (fig. I.33)¹⁵³.

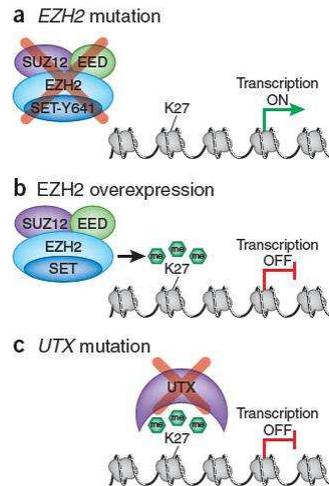


Figure I.33 : Anomalies de la voie Polycomb H3K27me3. a) La mutation de l'HMT EZH2, mise en évidence dans les lymphomes issus de cellules du centre germinatif, a pour conséquence une haploinsuffisance de l'activité enzymatique *in vitro*. Ceci peut entraîner une hypométhylation de l'ADN et une perte de l'état triméthylé de H3K27 favorisant la transcription d'oncogènes. b) La surexpression d'EZH2 est relativement bien décrite dans les cancers de la prostate et du sein et semble être un facteur pronostique dans ces pathologies. c) La mutation inactivante de l'HDM UTX, favorisant un état répressif, a été décrite dans certains myélomes multiples. D'après¹⁴⁶.

En conclusion, la plasticité et la dynamique de l'épigénome sont fortement impliquées dans les divers processus spécifiques de la maturation B médullaire et périphérique. Ainsi, il n'est pas surprenant d'observer des perturbations épigénétiques favorisant les processus de lymphomagenèse.

3. Le lymphome à cellules du manteau (MCL)

a. Eléments du diagnostic du lymphome du manteau

i. Généralités - épidémiologie

Le lymphome du manteau est un sous-type maintenant bien défini de lymphome non Hodgkinien (LNH). Il résulte de la prolifération anormale de lymphocytes B matures présents normalement au niveau de la zone du manteau des follicules lymphoïdes et disséminant dans tout l'organisme y compris les territoires ne contenant pas de cellules lymphoïdes. Dans la plupart des cas, les cellules tumorales du MCL sont caractérisées par la présence d'une translocation impliquant le gène de la cycline D1 et le gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines : la t(11;14)(q13;q32). Cette translocation aboutit à la surexpression de la cycline D1.

Le MCL représente 5 à 10 % des LNH. Son incidence est approximativement de 2-3/100 000 habitants/an en Amérique du Nord et en Europe^{7,98,129,159}. Le lymphome du manteau est diagnostiqué de façon prédominante chez les personnes de plus de 50 ans (âge médian : 60 ans), chez les hommes avec un sexe ratio ♂/♀ de 6,5^{7,13,98,158}. Cette tumeur est considérée comme une des néoplasies lymphoïdes les plus agressives et de plus mauvais pronostic du fait d'une médiane de survie de 3-4 ans, de la courte réponse, d'un fort degré de résistance, du très faible taux de guérison avec les traitements actuels et des rechutes fréquentes^{13,98,130,213}. Bien que décrits dans la classification 2008 de l'OMS comme une entité clinico-biologique homogène, les patients ont des évolutions très différentes, certains décédant de la maladie en quelques mois, d'autres (10 à 15 %) restant en vie au-delà de 7 ans et présentant une forme indolente^{26,98,129,208}.

ii. Manifestations cliniques

Le MCL est une pathologie se présentant fréquemment à des stades avancés (stade III ou IV selon la classification d'Ann Harbor) (annexe 3). Plus de la moitié des patients présentent des symptômes B (perte de poids, sueurs nocturnes). Typiquement, des adénopathies souvent disséminées et peu volumineuses, fréquemment associées à une atteinte extraganglionnaire (environ 90% des cas), sont retrouvées au diagnostic^{98,129,184,226}. Le site extraganglionnaire le plus souvent atteint est la moelle osseuse (80-90% des cas)^{7,68,98,214}.

iii. Caractéristiques cytologiques et histologiques

L'observation au microscope des cellules tumorales a pour objectifs l'identification et la classification selon les critères de la classification des hémopathies malignes de l'OMS 2008.

CARACTÉRISTIQUES ET VARIANTS MORPHOLOGIQUES DES MCL

Du point de vue cytologique, trois formes de lymphome du manteau sont décrites à partir de prélèvements sanguins, de moelle osseuse et d'appositions ganglionnaires colorés au May Grünwald Giemsa (MGG) : la **forme classique** qui représente 80 à 90 % des cas, la **forme blastique** (environ 10 % des cas) et la **forme pléiomorphe**. Ces deux dernières sont des formes agressives (tableau I.1)^{7,98,184}.

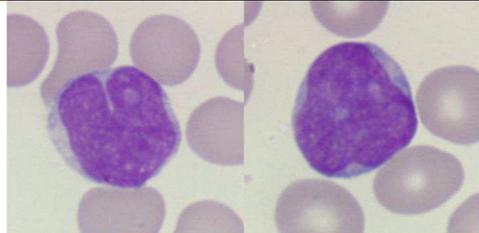
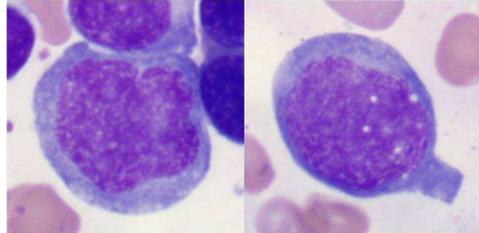
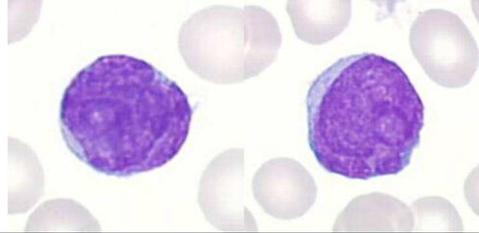
Formes	Représentation	Description
Classique		Cellules lymphoïdes de taille petite à moyenne avec un noyau contourné ressemblant aux centrocytes et un cytoplasme peu basophile. La chromatine est légèrement dispersée. On peut distinguer un nucléole.
Blastique		Cellules lymphoïdes de taille moyenne et de morphologie semblable aux lymphoblastes. Le cytoplasme est peu abondant et légèrement basophile. La chromatine est fine et un nucléole est facilement observé. Le noyau est contourné.
Pléiomorphe		Cellules de taille moyenne et assez hétérogène, rapport nucléo-cytoplasmique élevé, chromatine mature et hétérogène, avec nucléole parfois visible, noyau très irrégulier avec de profondes encoches et un contour polycyclique.

Tableau I.1 : Description des différentes formes cytologiques de lymphome du manteau. Photos des formes classiques et blastiques prises à partir de cas de lymphomes du manteau du C.H.U. de Grenoble, MGG obj. 100. Les photos de la forme pléiomorphe sont issues de http://www.med.univ-angers.fr/discipline/lab_hema/LNH/morpholnh.html, MGG obj. 50.

L'avantage de l'analyse cytologique est sa rapidité qui peut donner une piste diagnostique en très peu de temps. Cependant, l'existence de formes à petites cellules, pléiomorphes et blastiques, qui sont rares, peuvent poser des problèmes diagnostiques. Dans certains cas, les cellules ont un noyau rond semblable à ceux observés dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC)¹⁸⁴. La reproductibilité des classifications cytologiques est un problème en diagnostic de routine²¹³.

CARACTÉRISTIQUES ET CLASSIFICATION HISTOLOGIQUES

Trois motifs histologiques ont été définis dans le lymphome à cellules du manteau par l'European Task Force on Lymphoma et sont présentés dans le tableau I.2^{7,13,92,213}.

En immunohistochimie, le marquage devenu indispensable des cellules lymphomateuses du manteau est celui de la cycline D1. L'étude de la protéine Mib1, marqueur des cellules en

cycle, permet d'établir le score de prolifération du Ki67, particulièrement intéressant dans le MCL.

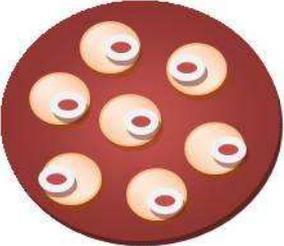
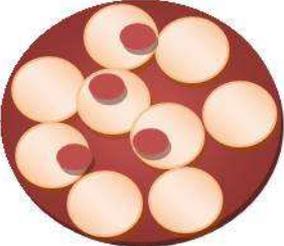
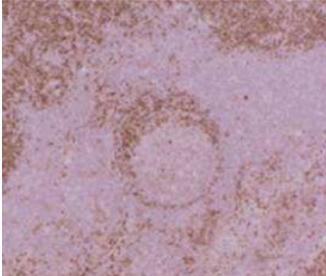
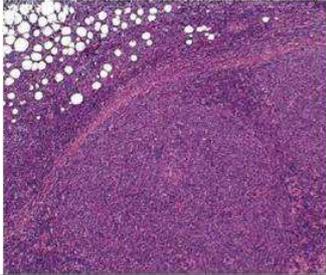
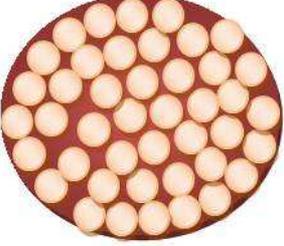
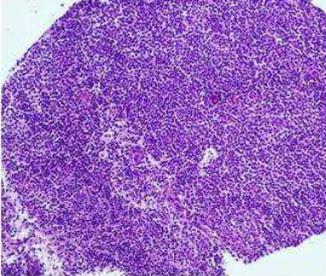
Motifs	Représentation schématique	Photo	Description
Follicule lymphoïde non tumoral			Le centre germinatif est entouré par la zone du manteau puis la zone marginale. Répartition hétérogène des follicules lymphoïdes secondaires au sein des follicules primaires
Zone du manteau			Infiltration néoplasique limitée à la zone du manteau entourant les centres germinatifs. Stade précoce d'invasion lymphoganglionnaire.
Nodulaire			Infiltration nodulaire sans présence de centres germinatifs et remplacement du follicule lymphoïde secondaire. Présence de foyers structurés ou non de cellules dendritiques
Diffus (80% des cas)			Invasion et oblitération des centres germinatifs et des zones interfolliculaires. Infiltration diffuse avec effacement de l'architecture du ganglion lymphoïde

Figure I.2 : Tableau récapitulatif des différents motifs structuraux pouvant être observés dans les lymphomes du manteau. La photo représentant le motif de la zone du manteau est un immunomarquage de la cycline D1, les autres sont des HES, obj. 10. La photo du follicule secondaire est issue de¹³, celle du motif de la zone du manteau de²¹³, celle du motif nodulaire de¹¹⁰ et celle du motif diffus est une photo prise à partir des tissus macroarrays étudiés dans ce projet.

IMMUNOPHÉNOTYPAGE

L'immunophénotypage est réalisé par cytométrie de flux, grâce à des anticorps marqués par des fluorochromes qui reconnaissent des antigènes membranaires et cytoplasmiques. Les cellules MCL expriment des marqueurs antigéniques caractéristiques des cellules B matures naïves (fig. I.34) (annexe 1).

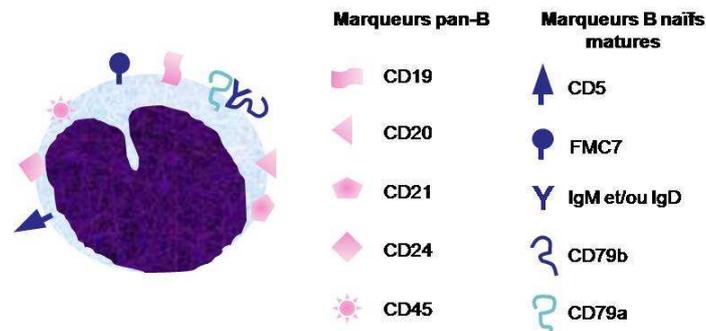


Figure I.34 : Antigènes membranaires définissant l'immunophénotypage des cellules du lymphome du manteau. Ces cellules possèdent des marqueurs pan-B et des marqueurs des lymphocytes B matures naïfs. CD : cluster of differentiation. Adapté de^{124,149,159}.

La présence du CD5 au niveau des cellules tumorales est très caractéristique du MCL même si l'existence de variants phénotypiques CD5- est maintenant bien décrite^{182,226}. Le CD5 est une molécule de 67 kDa présente sur les cellules T et sur des lymphocytes B circulants à des fréquences faibles et variables²⁷. Le CD5 est un régulateur négatif de la signalisation du BCR^{80,185}. Il est important de noter qu'on observe une restriction d'utilisation des chaînes légères dans le MCL puisque les chaînes légères λ sont beaucoup plus souvent retrouvées que les chaînes légères κ ^{7,13,184}.

Lors de l'analyse des résultats de cytométrie de flux, il est indispensable de noter l'intensité d'expression des marqueurs et notamment du CD20 et des immunoglobulines de surface qui sont utiles à la distinction entre LLC et MCL²²⁶.

iv. Diagnostic différentiel

Le MCL est une pathologie de présentation clinique variable par conséquent peu spécifique et sa définition est avant tout biologique. Le diagnostic nécessite une approche multidisciplinaire (études cytologiques, anatomopathologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire) permettant une prise en charge thérapeutique et un suivi adaptés, indispensables dans cette pathologie de mauvais pronostic.

Outre l'existence de cas MCL cycline D1 négatif, la t(11;14)(q13;q32) peut être observée dans différents désordres lymphoprolifératifs incluant le myélome multiple (15-20%), la LLC_B atypique (<5%). La surexpression de la cycline D1 est décrite dans la leucémie à tricholeucocytes (50-75% expriment l'ARNm de CCND1)^{1,16,165,201}. Le problème de diagnostic différentiel le plus souvent rencontré est la distinction entre MCL et LLC^{5,38,165}. Dans ce cas l'immunophénotypage, l'étude histologique et l'étude attentive du caryotype sont des outils qui vont aider à la distinction entre ces deux pathologies dont les taux de survie et les pronostics sont considérablement différents.

v. Formes variantes cycline D1 négatives

Il y a une dizaine d'années on pensait que l'expression aberrante d'une protéine exclusive, comme la cycline D1, constituait un critère indispensable au diagnostic du MCL. Les études transcriptomiques à haut débit ont permis d'identifier un sous-groupe très minoritaire (moins de 5%) de lymphomes du manteau, dépourvus de t(11;14), sans surexpression de la cycline D1, mais montrant une surexpression des cyclines D2 ou D3 voire d'autres cyclines (la cycline E par exemple)^{13,70,182}. Une trentaine de cas sont actuellement décrits dans la littérature (annexe 4)^{63,70,83,222}. Ces lymphomes sont ainsi d'authentiques MCL, indiscernables sur les plans morphologiques et phénotypiques, partageant le même profil transcriptomique et les mêmes anomalies génétiques secondaires que les MCL « classiques », ce qui suggère leur appartenance à la même entité^{13,70,182}. La dérégulation de l'expression des cyclines D2 et D3 pourrait être une voie alternative favorisant la progression du cycle cellulaire en l'absence de cycline D1. Elle a pu être reliée dans certains cas à des anomalies chromosomiques impliquant le gène de la cycline D2 en 12p13 ou le gène de la cycline D3 en 6p21 et les gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines en 14q32 ou des chaînes légères κ en 2p11^{70,83,222}. Par exemple, la t(2;12)(p11;p13) juxtaposant le gène CCND2 aux gènes des chaînes légères κ a été décrit par plusieurs équipes^{70,83,222}.

vi. Traitements du lymphome du manteau

La stratégie commune est basée sur des polychimiothérapies d'induction contenant des agents alkylants et des anthracyclines de type CHOP (cyclophosphamide, adriamycine, vincristine et prednisone), proposée depuis 1989. Les résultats sont relativement homogènes d'une étude à l'autre : la réponse clinique complète est de l'ordre de 20 à 60 % des cas avec une survie médiane de 3 ans et des rechutes fréquentes^{98,145,150}. L'apport du Rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20) dans le traitement des lymphomes agressifs est maintenant prouvé et sa synergie avec la chimiothérapie a permis d'améliorer le taux de réponse et la survie des patients (taux de rémission complète de 0-7% dans les bras sans Rituximab contre 34-48% dans les bras avec, en première ligne)^{36,90,130}. Il est donc de plus en plus évident que le Rituximab en association avec une polychimiothérapie doit être proposée en première intention^{3,43,130}. Par ailleurs, une étude récente du groupe français du GOELAMS montre l'intérêt (efficacité et faible toxicité) d'un schéma de type R-VAD+C (Rituximab, Vincristine, Adriamycine, Dexaméthasone et Chloraminophène)⁷⁵.

L'intensification qui s'en suit est souvent basée sur la greffe autologue de cellules souches périphériques ou autogreffe. Elle consiste en la perfusion de cellules souches hématopoïétiques du patient récupérées en phase de rémission clinique et réinfusées 24 heures après un traitement myéloablatif. L'ensemble de la littérature étaye la réalisation en première rémission d'un traitement intensif avec autogreffe dans les MCL des sujets les plus jeunes, le taux de rémission complète post-autogreffe étant supérieur à 80 %. Toutefois, la diversité des types de conditionnements des autogreffes ne permet pas de définir une

procédure standardisée de traitement^{41,72,108,126,211}. Une majorité de patients finit par rechuter, probablement à cause d'une contamination de la récolte de cellules souches avec des cellules lymphomateuses car les procédures immunologiques *ex vivo* standard pour purger ne permettent pas d'éradiquer les cellules MCL circulantes¹²⁹.

L'allogreffe est une solution thérapeutique qui peut être proposée aux patients jeunes^{98,150}. Elle correspond à la greffe de cellules souches hématopoïétiques provenant d'un donneur compatible pour le complexe majeur d'histocompatibilité, apparenté ou non. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est la seule thérapie curative du MCL à l'heure actuelle. Comme dans les autres hémopathies, la toxicité de l'allogreffe limite actuellement le recours de cette approche dans les MCL en première ligne. Une étude rétrospective du Nebraska Lymphoma Study Group a comparé l'allogreffe à l'autogreffe. L'allogreffe diminue le risque de rechute en comparaison à l'autogreffe : 21% à 5 ans comparé à 56 % mais la survie est similaire : 49 % versus 47 %⁶⁶. L'ensemble des auteurs s'accorde sur le fait que l'allogreffe n'est pas une option de traitement de première ligne dans les MCL étant donné la comorbidité de la procédure. Par contre, elle est une stratégie efficace à privilégier pour les patients jeunes en rechute ou réfractaire avec un donneur compatible¹⁵⁹.

Le choix de l'approche thérapeutique pour les patients ayant un MCL reste un problème complexe requérant une discussion et une considération importante. En effet dans la balance bénéfique/risque, rémission longue/toxicité du traitement, il est indispensable de prendre en compte les symptômes liés à la pathologie du MCL, les risques du traitement (infections...), l'âge, la morbidité, l'état général.

TRAITEMENT D'ENTRETIEN

Une étude allemande a comparé la pertinence d'un traitement d'entretien par Rituximab (réinduction tous les 6 mois par quatre injections) après un traitement de deuxième ligne par R-FCM (Fludarabine, Cyclophosphamide, Mitoxantrone) dans 47 MCL. Quarante cinq pour cent des patients dans le bras entretien étaient en rémission à 2 ans contre 9 % dans le bras surveillance. Les effectifs de l'étude ne permettaient pas d'avoir une puissance statistique suffisante pour conclure définitivement sur le bénéfice du Rituximab⁵⁸.

Dans une étude récente sur 74 patients en rémission complète après autogreffe, 26 patients présentant une rechute moléculaire (en moyenne 18,5 mois post-greffe) ont reçu un traitement préventif par Rituximab (une fois par semaine toutes les 4 semaines). L'étude a montré que le traitement préventif par Rituximab à partir de la mise en évidence de la rechute moléculaire en PCR permet le rétablissement de la rémission moléculaire et pouvait prévenir la rechute clinique³.

A la lumière des données de la littérature, la pertinence d'un traitement d'entretien par Rituximab est donc une approche attractive dans les MCL ; cependant une seule étude a évalué cette stratégie en première ligne et en post-autogreffe.

NOUVELLES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES

Le développement de nouvelles cibles thérapeutiques est un vrai challenge pour l'allongement de la survie sans progression et de la survie globale dans le MCL. Deux grandes stratégies sont actuellement étudiées : d'une part l'inhibition pharmacologique de la fonction de gène connu comme étant surexprimé ou hyper-activé dans le cancer et d'autre part l'utilisation d'agents thérapeutiques altérant la fonction de plusieurs protéines intracellulaires et induisant sélectivement la mort des cellules cancéreuses (fig. I.35)^{158,159}.

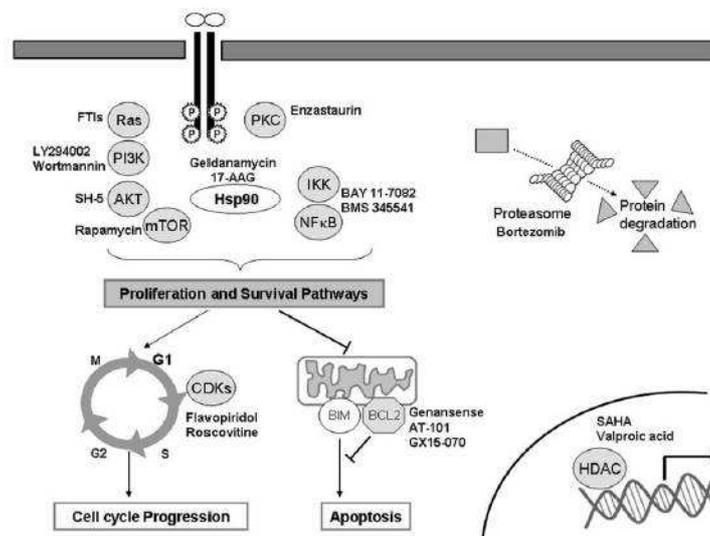


Figure I.35 : Les nouvelles molécules ciblant les voies de signalisation clés et les processus cellulaires essentiels dans le MCL. Les composants principaux des voies de signalisation PI3K et NFκB sont des protéines qui peuvent être inhibées par de multiples molécules. D'autres composés sont également inclus dans la catégorie des thérapies ciblées touchant les processus cellulaires généraux tels que la progression du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, les protéines chaperonnes, les modifications des histones et la dégradation médiée par le protéasome qui sont tous dérégulés dans les cellules cancéreuses. Tous les composés représentés sur la figure ont des résultats significatifs dans des études précliniques ou cliniques dans le MCL. D'après¹⁵⁹.

Les inhibiteurs de mTOR. mTOR est une kinase très conservée au cours de l'évolution qui régule la traduction de protéines importantes pour la prolifération et la croissance cellulaire. L'inhibition de mTOR permet de réduire la formation des complexes cycline/cdk (cyclin dépendant kinase) causant l'arrêt du cycle en G1. Cette stratégie semble particulièrement attractive dans le MCL. De nouveaux inhibiteurs de mTOR ont été développés tel que le Temsirolimus qui vient d'avoir l'autorisation de mise sur le marché dans les MCL en rechute ou réfractaires. Des études cliniques de phase II ont montré que le Temsirolimus comme agent seul a une activité anti-tumorale dans les MCL réfractaires ou en rechute avec un taux de réponse de 38 % et une médiane de survie augmentée de 6,5 mois^{159,184}.

Les inhibiteurs du protéasome. Il est estimé que 80-90 % des protéines cellulaires sont dégradées par le système d'ubiquitination-protéasome 26S (qui est un agrégat d'enzymes protéolytiques). Le Bortezomib (Velcade®) est le premier inhibiteur du protéasome 26S qui peut augmenter l'accumulation de protéines pro-apoptotiques dans la membrane mitochondriale et induire une diminution de la dégradation des inhibiteurs des cdk. Cinq études de phase II sont en cours dans le traitement des MCL réfractaires ou en rechute. Une

première étude montre qu'un traitement par Bortezomib (en IV 2 fois/semaine pendant 2 semaines toutes les 3 semaines) permet l'obtention d'une réponse à 6 mois de 80 % et une médiane de survie augmentée de 9,3 mois^{57,129,159,168,184}.

La thérapie épigénétique. Elle est en plein essor avec le début d'applications anti-cancéreuses, notamment un inhibiteur des histones déacétylases, le SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid, Vorinostat®) dans le traitement des lymphomes T cutanés ou encore des lymphomes B diffus à grandes cellules¹⁴². Une étude *in vitro* a montré que le SAHA diminue rapidement les taux de cycline D1 dans des lignées de MCL en bloquant sa traduction par inhibition de la voie PI3K/AKT/mTor¹⁰⁴. De plus, des inhibiteurs des histones méthyltransférases (dithiodichetopiperazine, dérivé de la chaetocine, qui inhibe Suv39h) et des histones déméthylases (pargyline, par exemple, qui bloque les déméthylases de type LSD1) sont en développement et constituent de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les lymphomes¹⁴¹. Les résultats encourageants de ces nouveaux médicaments devraient permettre d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Toutefois il reste à évaluer leur efficacité et leur toxicité dans des études cliniques à grande échelle.

La prise en charge thérapeutique du lymphome du manteau est encore à l'heure actuelle un vrai challenge. Les traitements conventionnels basés sur une polychimiothérapie à hautes doses associée à une autogreffe ne permettent pas la guérison. Des efforts restent à faire et malheureusement le MCL reste encore à ce jour une maladie incurable.

vii. Pronostic

Le lymphome du manteau est considéré comme une des néoplasies lymphoïdes les plus agressives et de plus mauvais pronostic avec une médiane de survie de 3-4 ans^{13,98}. Cependant, il existe une variabilité au niveau de l'agressivité puisque certains patients vont décéder en moins d'un an tandis que 10 à 15% des patients, présentant une forme indolente, survivent 5 à 10 ans et sont considérés comme des longs survivants^{26,129,208}. Les recherches actuelles se focalisent sur l'identification de marqueurs permettant une classification pronostique au diagnostic afin d'adapter au mieux la prise en charge thérapeutique et médicale.

FACTEURS PRONOSTIQUES NON SPÉCIFIQUES

Certains marqueurs cliniques et biologiques non spécifiques du MCL sont associés à un bon ou un mauvais pronostic lors du diagnostic ou au cours de la maladie. Ainsi, une forme blastique, un âge avancé, un fort taux de lactates déshydrogénases (LDH), une architecture ganglionnaire diffuse sont des facteurs de mauvais pronostic au diagnostic^{4,7,165,213}. Une grande étude rétrospective sur 350 cas confirmés de MCL a montré que les différents indices

de prolifération tels que le score du Ki67 et l'index mitotique sont des marqueurs pronostiques puissants¹²⁹.

Des études ont montré la pertinence pronostique de certaines anomalies chromosomiques. La complexité caryotypique et l'augmentation du nombre de gains (gains du 3/3q, 18q) sont associés à une survie globale plus courte^{13,38,183,187}. La délétion du locus INK4a/ARF en 9p21 (CGHarray) semble être associée à une survie globale plus courte (13 vs 46 mois)¹⁸³.

LE MIPI (MCL INTERNATIONAL PRONOSTIC INDEX)

L'IPI (International Pronostic Index) et le FLIPI (Follicular Lymphoma International Pronostic Index) constituent les deux index pronostiques utilisés en pratique courante pour les patients porteurs d'un lymphome folliculaire. Cependant, ces index ne sont pas adaptés au MCL¹⁵¹. L'équipe d'E. Hoster a étudié la pertinence pronostique de l'IPI, du FLIPI et d'un nouvel index, le MIPI, sur 455 patients ayant un MCL. L'IPI et le FLIPI montrent une faible séparation des courbes de survie comparativement au MIPI dans cette étude. Le MIPI est basé sur quatre facteurs pronostiques indépendants : l'âge, l'ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performance status (annexe 5), le taux de LDH, le compte de leucocytes, le Ki67. Le MIPI permet la distinction de trois groupes de risques :

- faible (44%) avec une survie globale médiane non atteinte au moment de l'étude.
- intermédiaire (35%) avec une survie globale de 51 mois.
- élevé (21%) avec une survie globale de 29 mois.

Il s'agit du premier index pronostique dans le MCL, facilitant les décisions thérapeutiques adaptées au risque⁸⁹.

LA SIGNATURE DE PROLIFÉRATION

Le développement et l'utilisation de différentes technologies basées sur les puces/microarrays (Comparative Genomic Hybridization arrays, Single Nucleotide Polymorphism arrays, DNAarrays...) ont permis l'étude de l'expression et du nombre de copies de milliers de gènes. Les profils d'expression établis sont une aide au diagnostic moléculaire, à la compréhension de la pathogenèse du MCL et permettent de prédire la longueur de la survie des patients présentant un MCL^{159,182}.

L'étude de l'expression génique par Rosenwald *et al* a permis de mettre en évidence d'une part une signature spécifique du MCL différente de celles des lymphomes lymphocytiques, des lymphomes B diffus à grandes cellules et des cellules B activées (« MCL signature genes ») (fig. I.36a). D'autre part, la mesure précise de la prolifération tumorale par l'expression de certains gènes a permis d'identifier un sous-ensemble de patients qui diffèrent de plus de 5 ans au niveau de la médiane de survie avec une significativité

statistique importante (fig. I.36b). La signature de prolifération est composée de 4 gènes s'exprimant à plus fort taux dans les cellules en division que dans les cellules quiescentes et inclus des gènes requis pour la réplication de l'ADN, la progression du cycle cellulaire et les demandes métaboliques nécessaires à la prolifération : CDC2 (CDK1/CCNB), ASPM (Abnormal Spindle-like Microcephal index), tubuline α et CENP-F (complexe centromère-kinétochore)¹⁸².

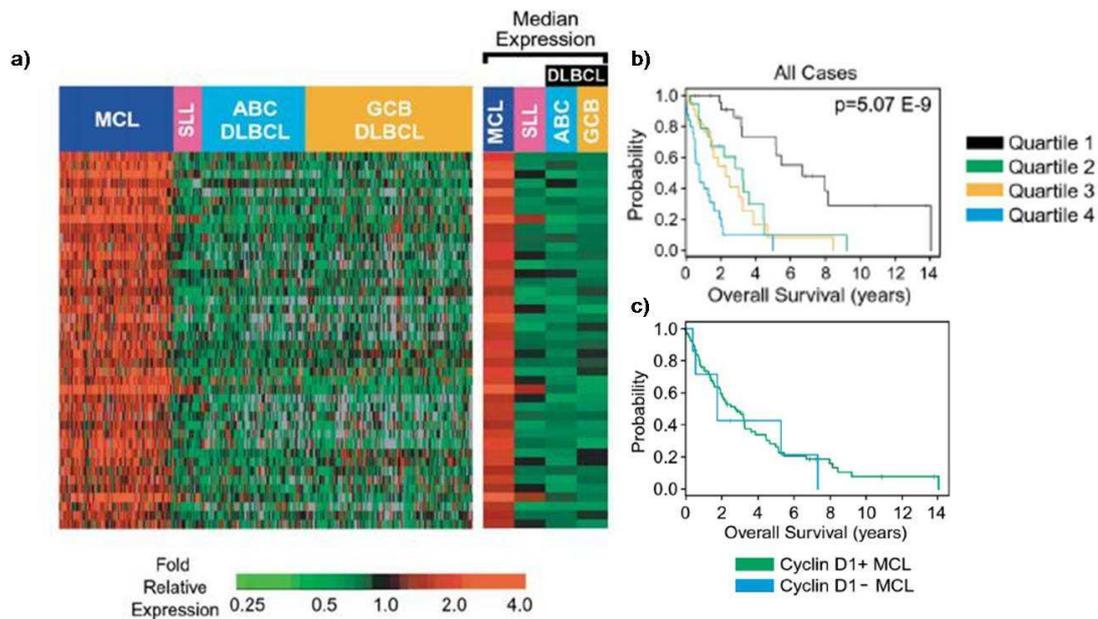


Figure I.36 : Marqueurs pronostiques dans le MCL. a) Profils d'expression transcriptomiques de MCL comparés à d'autres lymphomes (lymphomes lymphocytiques SLL, lymphomes diffus à grandes cellules B DLBCL). b) Courbes de survie globale de patients MCL en fonction de la signature de prolifération établie par analyse transcriptomique. c) Courbes de survie globale des MCL classiques cycline D1 positif et des MCL variants n'exprimant pas la cycline D1. D'après¹⁸².

Le sous-type blastique a la plus forte expression pour cette signature de prolifération et la survie la plus courte. Cette signature de prolifération semble par conséquent intéressante comme test pronostique dans le MCL pour la prise en charge thérapeutique en fonction du groupe de risque mais n'est actuellement pas réalisable en routine¹⁸².

PERSPECTIVES : LA MALADIE RÉSIDUELLE

Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, la surveillance séquentielle quantitative de la maladie résiduelle et l'évolution de la rémission moléculaire semblent être des indicateurs puissants dans le suivi du traitement des MCL, en particulier après autogreffe, permettant de définir des sous-groupes de patients avec différents pronostics. En effet, la rémission moléculaire après autogreffe est fortement prédictive d'une médiane de survie sans progression plus longue (92 mois pour le groupe MRD négative et 21 mois pour le groupe MRD positive)¹⁷³.

Les prises en charge clinico-biologiques et thérapeutiques nécessitent encore à l'heure actuelle d'être améliorées dans les lymphomes du manteau. Ceci passe obligatoirement par une meilleure compréhension de la physiopathologie de cette maladie.

b. Physiopathologie des lymphomes du manteau

i. Classification du lymphome du manteau

PLACE DANS LA CLASSIFICATION 2008 DE L'OMS

Si la première description d'un lymphome a été faite en 1832, ce n'est qu'un siècle plus tard qu'apparaît la première classification des hémopathies lymphoïdes malignes. La classification 2008 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des hémopathies malignes tient compte de la lignée d'appartenance, du degré de maturité de la cellule maligne sur des critères cytologiques et immunophénotypiques, de paramètres cliniques et de caractéristiques cytogénétiques (fig. I.37). Elle prend en compte des facteurs pronostiques pour certaines pathologies telles que le lymphome folliculaire et le lymphome diffus à grandes cellules⁹⁶.

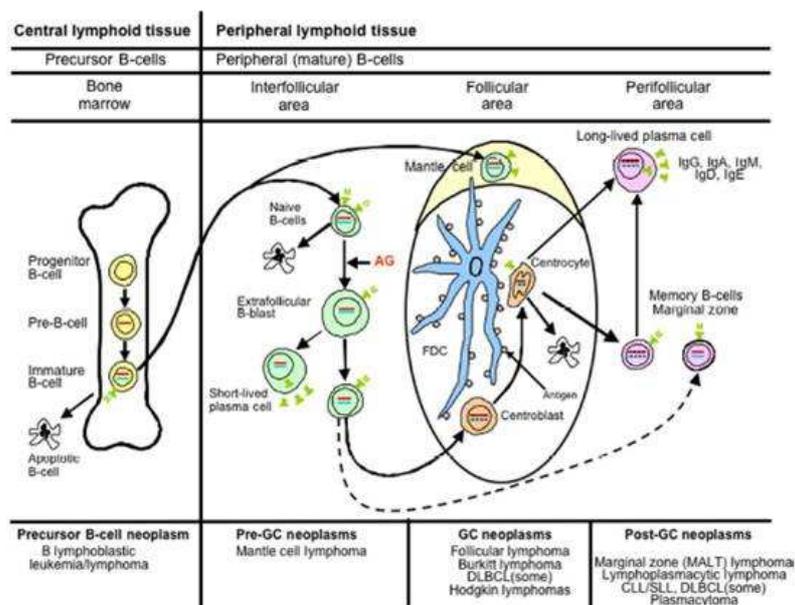


Figure I.37 : La différenciation B et relations avec les principales hémopathies B. Les néoplasies B correspondent à différents stades de la maturation B, bien que la contrepartie cellulaire normale précise ne soit pas connue dans tous les cas. AG : antigène, FDC : cellule dendritique folliculaire. Les barres rouges représentent le réarrangement des chaînes lourdes d'immunoglobulines, les barres bleues, le réarrangement des chaînes légères, les insertions noires dans les barres rouges et bleues indiquent les mutations somatiques. D'après⁹⁶.

Quatre-vingt quinze pour cent des lymphomes sont des lymphomes B ce qui peut paraître surprenant si on tient compte de la fréquence des lymphocytes B par rapport à celle des lymphocytes T dans le corps humain. La classification OMS distingue 25 types de néoplasies de cellules B matures en fonction de la pathogenèse et de marqueurs pronostiques (annexe 2)¹¹⁸.

Cette classification est désormais indispensable car elle favorise la découverte des bases moléculaires des néoplasies lymphoïdes et est nécessaire à la reproductibilité et à l'interprétation des études cliniques internationales.

HISTORIQUE DE LA CLASSIFICATION DU MCL

A l'origine le MCL a été défini dans les classifications de Rappaport (1956) et de Kiel (1988) respectivement comme une lymphome à différenciation intermédiaire et un lymphome centrocytique sur la base des critères cytomorphologiques semblables aux cellules du centre germinatif que sont les centrocytes et sur des critères immunophénotypiques (fig. I.38)^{92,213}. Depuis 30 ans, les évolutions dans la classification du MCL soulignent à la fois la complexité physiopathologique et les particularités de cette entité.

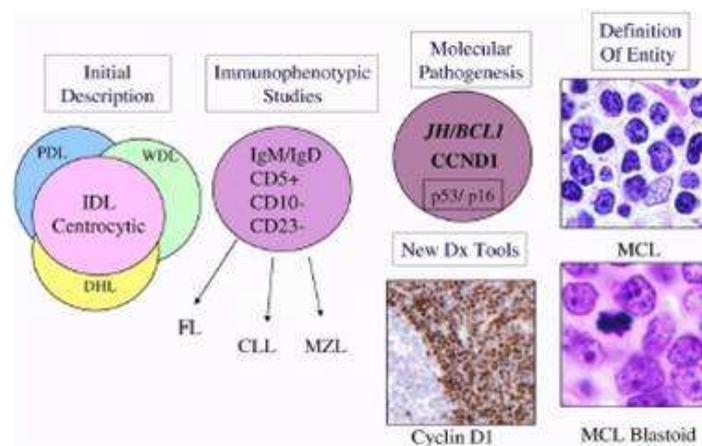


Figure I.38 : Diagramme illustrant l'évolution de l'entité MCL. La reconnaissance de critères morphologiques et immunophénotypiques caractéristiques a permis de mieux définir l'entité « lymphome du manteau ». L'identification de la t(11;14)(q13;q32) dans quasiment tous les cas de MCL a amené l'utilisation de la détection de la cycline D1 en immunohistochimie pour le diagnostic. Des événements génétiques secondaires tels les délétions/mutations de p53 et p16 ont été identifiés dans les variants de haut grade de MCL, reconnus histologiquement comme des sous-types blastiques. PLD : lymphocytique faiblement différencié ; WDL : lymphocytique bien différencié ; DHL lymphome histocytique diffus ; MZL : lymphome de la zone marginale. D'après⁹⁶.

En 1992, plusieurs équipes, en décrivant leurs expériences cliniques et en corrélant cette entité à la t(11;14)(q13;q32), ont proposé le terme « Mantle cell lymphoma », retrouvé pour la première fois dans la REAL classification en 1994 qui est la première classification à intégrer des données cytogénétiques¹³¹. Depuis, le MCL est une pathologie bien décrite et le terme reste employé dans la classification de l'OMS 2008^{6,97,176}.

ii. Physiopathologie

La contrepartie normale supposée des cellules du lymphome du manteau correspond à des lymphocytes résidant dans les follicules lymphoïdes primaires et dans les zones du manteau des follicules lymphoïdes secondaires⁷. Cette hypothèse est aujourd'hui discutée.

ORIGINE DE LA CELLULE TUMORALE

Au début des années 90, la mise en évidence des segments géniques V_H présentant pas ou peu de mutations somatiques dans les cellules de la zone du manteau et les cellules du MCL préconisait une origine pré-centre germinatif des cellules du MCL, se distinguant ainsi du lymphome folliculaire dont l'origine représente le centre germinatif (fig. I.39)^{92,121}.

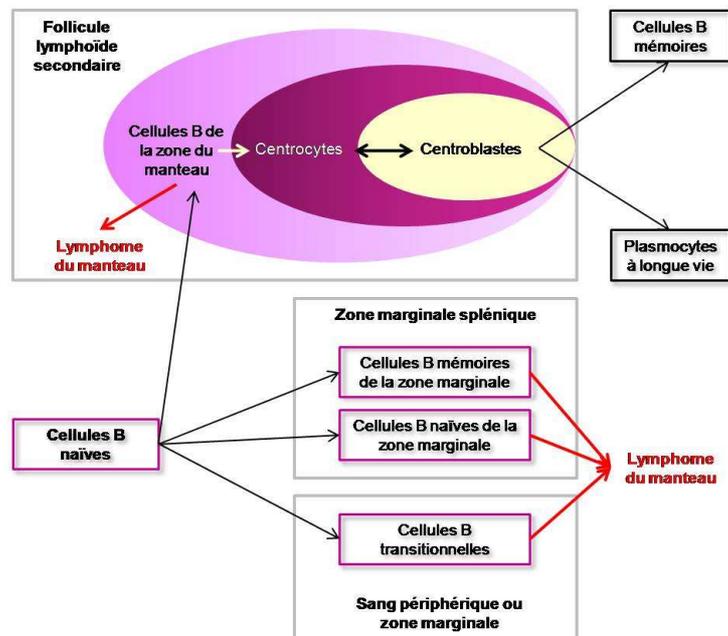


Figure I.39 : Origine(s) cellulaire(s) du lymphome du manteau. Les différentes étapes de la maturation B dépendante des antigènes et les origines supposées du lymphome du manteau. Adaptée de¹³.

Néanmoins depuis maintenant plusieurs années, cette hypothèse ne paraît pas si claire et l'origine des cellules du lymphome du manteau ne semble pas si simple (fig. I.39). En effet, en fonction des techniques utilisées, 1/3 à 2/3 des cas de MCL présentent des mutations somatiques des chaînes lourdes d'immunoglobulines avec toutefois des taux de mutations plus faibles que ceux observés dans les cas de lymphomes post-centre germinatif^{14,123,129,165,184,187,193}.

Dans le sous-ensemble non muté, la mise en évidence d'une évolution intra-clonale et d'un réarrangement V_H non productif indique que ce groupe de cas semble avoir été stimulé par un antigène. Pour le sous-ensemble muté, plusieurs hypothèses sont posées en fonction de l'observation d'une hétérogénéité intra-clonale ou non : cellules B mémoires post-centre germinatif ou cellules B pré-centre germinatif non mutées subissant un évènement ultérieur^{44,123,165}. Cette dernière hypothèse est également appuyée par une étude réalisée en 2007. Cette étude décrit une population de cellules B pro-centre germinatif représentant des cellules en début d'activation exprimant AID sans mise en évidence d'hypermutations somatiques extensives¹¹². Par ailleurs, plusieurs études ont montré une utilisation biaisée des gènes V_H dans le MCL laissant supposer une sélection antigénique commune. Ce biais est renforcé par les différences entre les origines géographiques des patients et une origine auto-réactive (les cellules B $CD5^+$ normales sont primairement auto-réactives)^{13,44,68,184,193}.

Aux vues de ces données, on peut penser que la stimulation antigénique a lieu au cours de la lymphomagenèse et que l'absence de phénotype muté peut être due à un défaut des mécanismes de l'hypermutation somatique. En effet, il a été mis en évidence dans la leucémie lymphoïde chronique qu'AID était en défaut dans un sous-ensemble de cas très homologues et que cela aboutissait à un phénotype non muté¹²³.

LA t(11;14)(q13;q32) : CARACTÉRISTIQUE CYTOGÉNÉTIQUE DU MCL

Physiopathologie de la translocation

Sur le plan génétique, le MCL est caractérisé par la translocation t(11;14)(q13;q32), désormais considérée comme un critère diagnostique essentiel^{26,131}. Elle juxtapose le gène CCND1 (11q13) et le gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (14q32). Cette translocation a lieu précocement dans la moelle osseuse au stade pré-B de la différenciation B lors du réarrangement primaire D_H-J_H des gènes d'immunoglobulines^{62,184,205}. Toutefois, R. Garcia-Munoz a montré récemment que les cellules B ayant un BCR autoréactif peuvent acquérir la t(11;14) au cours du processus d'édition du récepteur dans la moelle osseuse⁶⁸.

Les points de cassure de la t(11;14) sont dispersés sur une large zone en 11q13. La plupart ont lieu en 5' du locus CCND1 mais dans certains cas ils sont décrits en 3'²²¹. Trois points chauds ont été mis en évidence (fig. I.40)^{179,180} :

- le MTC (Major Translocation Cluster), région de 2 kb, où sont observés la plupart des points de cassure (30 à 50% des cas de lymphomes du manteau). Il existe un espace de 120 kb entre ce cluster et le gène CCND1.
- le mTC1 (minor Translocation Cluster) localisé approximativement à 22 kb télomérique du MTC.
- le mTC2 situé dans les régions flanquantes 5' du gène CCND1.

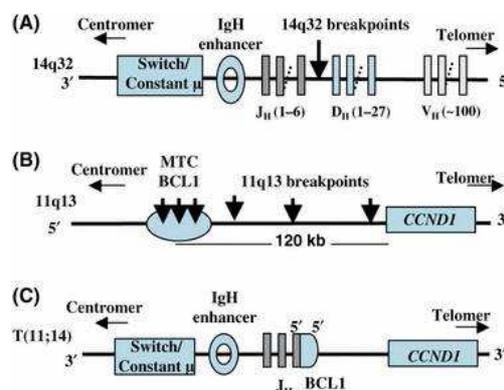


Figure I.40 : La translocation t(11;14) (q13;q32) dans le lymphome du manteau. (A) Le gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (14q32). (B) Le gène de la cycline D1 (11q13). (C) Le gène de fusion après la t(11;14)(q13;q32). MTC : Major Translocation Cluster. D'après⁹⁸.

La translocation t(11;14) observée dans le MCL a pour conséquence la juxtaposition directe de l'enhancer 5'-E μ dans la région J $_H$ en 14q32 au gène CCND1^{40,204,205}. L'addition d'un nombre variable de nucléotides par la TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) a lieu à la jonction MTC / J $_H$ et contribue à la variabilité de la jonction IGH-CCND1²⁰⁵.

Ce réarrangement a pour conséquence l'expression ectopique et dérégulée de la cycline D1⁹⁹. Également appelée BCL1 (B-cell CLL/lymphoma 1), PRAD1 (parathyroid adenomatosis 1), cette protéine a été identifiée pour la première fois dans un adénome parathyroïdien⁷. Le gène CCND1, localisé en 11q13.3, est composé de 5 exons et donne différents transcrits. Deux isoformes majeurs issus de l'épissage alternatif différent sur la longueur de la région 3' non codante (3'UTR) (fig. I.41). L'expression de l'isoforme court (isoforme b) est corrélée à une augmentation de la quantité totale de l'ARNm et de la protéine^{182,202,221}. Dans 4 à 10 % des MCL, le transcrit long (isoforme a) est absent et il est observé l'expression d'un transcrit variant auquel il manque la région 3'UTR contenant les séquences de déstabilisation (fig. I.41b)^{99,179,221}.

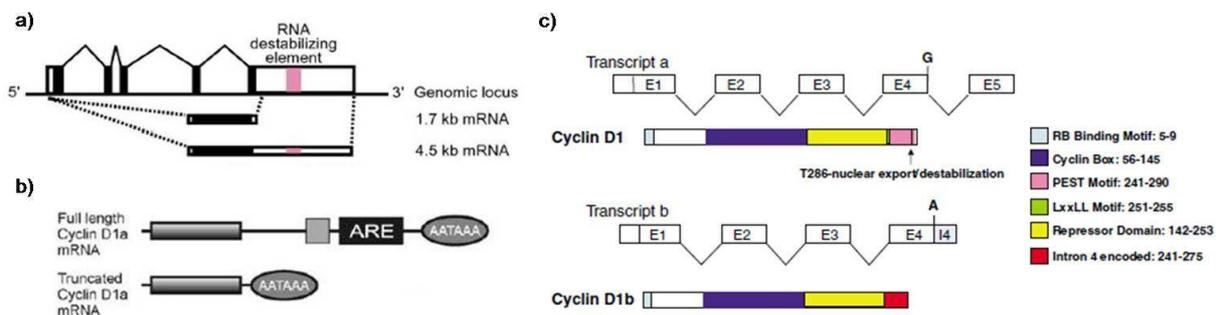


Figure I.41 : Les isoformes de la cycline D1. a) Représentation schématique du locus du gène de la cycline D1 et des deux isoformes d'ARNm. D'après¹⁸². b) Représentation schématique du transcrit long de l'isoforme a et de son transcrit variant. Ce dernier ne possède pas les séquences régulatrices AUUUA (ARE) de la région 3'UTR. D'après²²¹. c) Structure protéique de la cycline D1 et de ses isoformes a et b. Les domaines prédominants et leur localisation dans la séquence primaire sont représentés. La transcription de l'isoforme b est stoppée au niveau de l'intron 4. PEST : séquence polypeptidique nécessaire à la dégradation de la protéine enrichie en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S), thréonine (T). D'après¹⁰⁹.

La cycline D1 fait partie de la famille des cyclines D, protéines nucléaires impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire de la progression de la phase G1 et de la transition G1/S. Ces protéines sont strictement tissu-spécifiques. Ainsi, les lymphocytes expriment normalement la cycline D3 et un peu de cycline D2 mais pas la cycline D1. L'expression aberrante de la cycline D1 dans les cellules lymphoïdes est toujours associée à un phénotype anormal de prolifération^{159,171,201}.

Diagnostic cytogénétique du lymphome du manteau

L'analyse cytogénétique peut permettre de mettre en évidence directement la t(11;14)(q13;q32). La cytogénétique conventionnelle, c'est-à-dire le caryotype, ne révèle cette anomalie que dans environ 65 % des cas⁵⁰. Il est par conséquent indispensable d'utiliser une technique plus sensible comme la FISH (Fluorescence *in situ* hybridization).

Cependant, l'étude du caryotype peut donner des informations complémentaires importantes comme la mise en évidence d'altérations chromosomiques secondaires et la complexité caryotypique observées dans plus de 80 % des MCL (fig. I.42)¹²⁹.

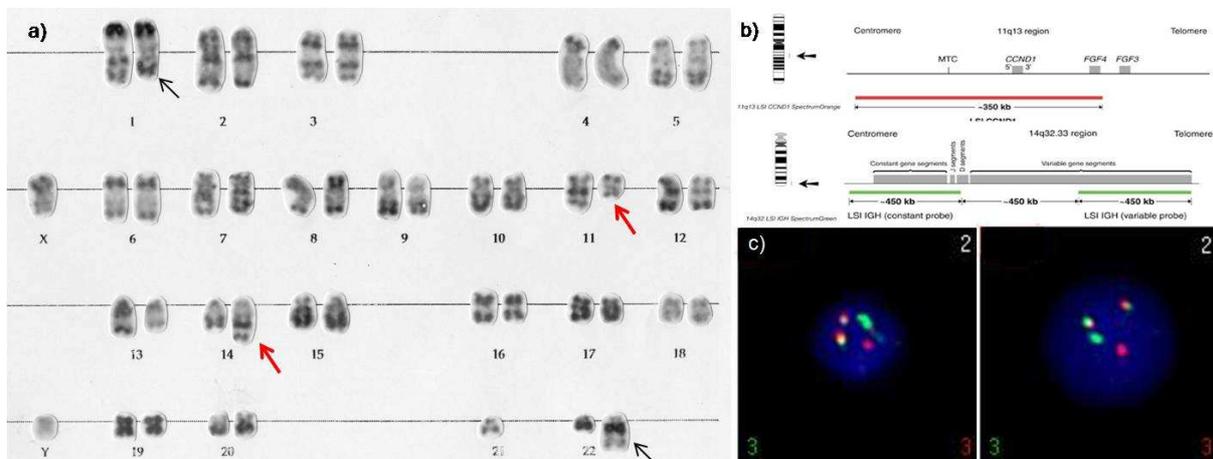


Figure I.42 : Diagnostic cytogénétique du lymphome du manteau. a) Caryotype en bandes R d'un patient présentant une atteinte splénique d'un lymphome du manteau : 45,XY,del(1),t(11;14)(q13;q32),add(15),-21,add(22) ; b) Schéma de sondes FISH spécifiquement dirigées contre les loci CCND1 (en rouge) et les loci des chaînes lourdes d'immunoglobulines (en vert) ; c) Photos de deux noyaux hybridés avec les sondes en b) et présentant deux signaux de fusion (orange) signes d'un réarrangement IGH/CCND1. Photos issues de cas du C.H.U. de Grenoble.

La FISH en interphase est la technique de choix pour mettre en évidence la t(11;14) car plus sensible (détection de 95-100% des cas) et plus spécifique. Elle doit être réalisée systématiquement dans les cas avec une présentation aberrante pour prévenir un mauvais diagnostic (fig. I.42b)^{14,69}.

Diagnostic moléculaire de la t(11;14)

Elle peut être détectée par la mise en évidence des points de cassure en 11q13 et en 14q32 en Southern-blot ou en PCR (Polymerase Chain Reaction). En PCR classique, les primers sont dirigés sur la région du point de cassure au niveau du chromosome 11. Cette technique présente un fort taux de faux négatifs (détection dans 40 à 60 % des cas). Cette difficulté s'explique par le fait que le point de cassure en 11q13 peut survenir dans une large zone de 15 à plus de 400 kb de distance du gène CCND1^{5,13,226}. Cependant, la détection par PCR du point de cassure de la t(11;14) est un marqueur moléculaire unique des cellules tumorales permettant la détection de la maladie minimale résiduelle^{13,16}.

Une des stratégies pour palier aux difficultés de la PCR classique est la détection des taux d'ARNm de la cycline D1 par RT-PCR (reverse transcription – PCR). Le problème potentiel de cette analyse est la contamination par des cellules non néoplasiques (les cellules épithéliales par exemple expriment la cycline D1)^{7,16,226}.

La maladie minimale résiduelle (MRD)

La mesure quantitative de la maladie minimale résiduelle permet le monitoring dynamique de la maladie, de la réduction ou de la présence de la maladie active. L'étude de la maladie minimale résiduelle s'effectue sur prélèvements sanguins ou médullaires. Elle est désormais bien implantée en routine et dans les protocoles de recherche. Elle est de plus en plus utilisée pour guider la thérapeutique en estimant la réponse aux traitements et pour évaluer l'efficacité de nouvelles modalités de traitement²³.

Le suivi de l'expression aberrante de la cycline D1 par PCR en temps réel dans la moelle osseuse au cours de la maladie montre des changements quantitatifs significatifs de la cycline D1 accompagnant la rechute, la réponse aux traitements ou la survie sans maladie²³. Cette approche semble par conséquent intéressante. Le suivi moléculaire de la maladie résiduelle minimale par le biais du réarrangement clonal V(D)J paraît particulièrement attractif dans le MCL contrairement à la détection de la t(11;14) par PCR génomique car amplifiable chez la majorité des patients et très spécifique^{24,173}.

iii. Les anomalies secondaires

Des études menées chez la souris ont montré que la surexpression de la cycline D1 n'est pas suffisante pour promouvoir le développement de lymphomes et que des anomalies additionnelles sont nécessaires au processus de lymphomagenèse^{19,139}. De plus, la mise en évidence de la t(11;14)(q13;q32) chez 1 à 2 % des individus sains et le développement d'hyperplasies lymphoïdes chez des souris transgéniques mimant cette translocation sont des arguments en faveur de la nécessité d'évènements secondaires (tableau I.3)^{86,98,105}.

	Gènes candidats	Fréquence (%)	Bibliographie
Gains			
3q26.3	ECT2	46-55	111,183
7p21.1-p22.3	CARD11, ETV1	16	183
8q24.1	MYC	19	183
9p24.1	JAK2	3	183
10p12.2	BMI1	12	183
11q13	CCND1, Suv4-20h1	9-11	111,183
12q13.1-q14.1	CDK4	3	183
18q21.33	BCL-2	5-15	111,183
Pertes			
1p21.2-p21.3	CDC14A, miRNA-137	31	183
6q21	FOXO3A	25	183
6q23.2-q24.1	IFNGR1	26	183
8p21	TNFRSF10B	26-34	111,183
8p23.3	FBOXO25, DLGAP2	29	183
9p21.3	INK4A	18-36	111,183
9q21.33-q22.33	CDC14B, FANCC	18	183
10p14	PRKCQ, KIN	18-21	111,183
11q22.3	ATM	21-43	111,183
13q14.2-q14.3	MiRAN15, miRNA16	25-55	111,183
13q33.3-q34	ING1, TNFSF13B	28-49	111,183
17p13.1	TP53	22	183

Tableau I.3 : Les altérations chromosomiques secondaires les plus fréquemment observées ou impliquant des oncogènes dans le lymphome du manteau, en Comparative Genomic Hybridization array (CGH-array).

Différentes études en CGHarray ont montré qu'au moins 80 % des patients présentaient des anomalies chromosomiques additionnelles multiples et non aléatoires pouvant être liées à des sous-types histologiques ou ayant un intérêt pronostic. Ce sont notamment le gain en 3/3q et les délétions 13q (13q14 et q33-q34) qui ont une fréquence élevée, des gains en 7p, 8q24, 11q13, 12q, des pertes en 1p21, 6q, 9p, 9q, 11q22, 12q, 17q (tableau I.3)^{10,11,111,133,169,187}.

De telles anomalies secondaires pourraient affecter directement ou indirectement la machinerie épigénétique des MCL et déréguler par là-même l'expression d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (tableau I.4).

Gènes	Localisation	Anomalies génétiques			Bibliographie
		Perte	Gains	aUPD	
Suv4-20h1	11q13.2		10%	24%	105,111,183
Suv4-20h2	19q13.42		<2%		111
Pr-set7	12q24.31		18%		111
Suv39h1	Xp11.23	Commun			105
Suv39h2	10p13		4%		111
EZH2	7q36.1	Commun			105
Histone H3	1q21.2	18%	3%		105,183
Histone H4	6p22.1-22.2		X		111
CBX5 (HP1a)	12q13.13		3-17%		111,183
CBX1 (HP1b)	17q21.32		X		111
CBX3 (HP1g)	7p15.2	/	/	/	/

Tableau I.4 : Récapitulatif des anomalies génomiques observées dans la littérature touchant des gènes de structure de la chromatine ou d'histones méthyltransférases dans le MCL. Les résultats observés en SNP-array (Single Nucleotide Polymorphisme) sont en noir et ceux en CGH-array en bleu. Les croix bleues signalent des anomalies observées en CGH-array dans de rares cas et pour lesquels les auteurs n'ont pas précisé la fréquence.

La t(11;14) a lieu dans les précurseurs B. Elle mène à la dérégulation constitutive de la cycline D1 et à une expansion de cellules B tumorales dans la zone du manteau des follicules lymphoïdes. L'acquisition d'anomalies secondaires va faciliter le développement du MCL^{98,99}.

iv. Voies moléculaires impliquées dans la pathogenèse du MCL

Les altérations secondaires, via leurs gènes cibles respectifs, ont en général trois types de conséquences (fig. I.43) :

- une dérégulation du cycle cellulaire due à des altérations oncogéniques des deux principales voies de régulation INK4a-CDK4-RB1 et ARF-MDM2-p53 ou par hyperexpression de BMI1 (10p11). Le mauvais fonctionnement de ces deux voies est associé à des formes plus agressives et plus prolifératives que celles présentant une inactivation seule de p53^{11,13,56,159,182}.
- une altération des voies de réparation de l'ADN. L'anomalie la plus souvent observée dans le MCL (20-75% des cas) est la délétion 11q22-23 où est localisé le gène ATM (Ataxia Telangiectasia mutated)^{56,159,184}. La protéine ATM est une kinase de la superfamille des phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) impliquée dans la réponse aux lésions de l'ADN via la protéine p53⁹⁹.

- une dérégulation des différentes voies de l'apoptose et de la survie. Par exemple, il est observé dans quelques cas des délétions homozygotes de BIM, protéine pro-apoptotique, l'amplification et la surexpression de Bcl2 ou Bclx, protéines anti-apoptotiques^{87,99,159}.

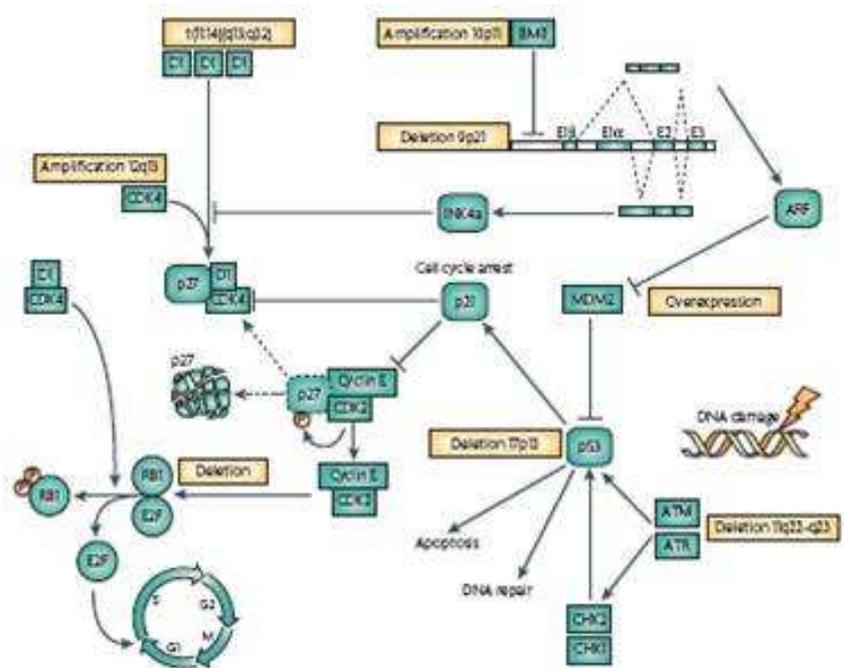


Figure I.43 : Voies moléculaires impliquées dans la pathogenèse du MCL. La $t(11;14)(q13;q32)$ aboutit à la surexpression constitutive de la cycline D1. Cette dernière se lie à la cyclin-dépendante kinase 4 (CDK4) et contrôle la transition G1-S du cycle cellulaire. La dérégulation de la cycline D1 et la surexpression de CDK4 favorise l'hyperphosphorylation et par conséquent l'inactivation de la protéine du rétinoblastome Rb1. De plus, la présence de fort taux de complexes cycline D1/CDK4 permet la décomplexation de p27 des complexes cycline E/CDK2, menant à l'activation du complexe. Les délétions homozygotes du locus CDKN2A qui code pour l'inhibiteur des CDK INK4A favorisent la présence d'une forte activité des complexes cycline D1/CDK4. Une alternative à la perte d'INK4A, l'oncogène BMI1 peut être amplifié et/ou fortement exprimé dans certains cas de MCL. Le locus CDKN2A code également pour ARF qui régule négativement MDM2 (mouse double minute 2 homologues) qui promeut la dégradation de p53. Ces altérations et les mutations de TP53 mènent fréquemment à la dérégulation de la voie p53. Il peut également y avoir une dérégulation de la voie de réponse aux lésions de l'ADN, incluant ATM. D'après⁹⁹.

Si l'origine cellulaire des lymphomes du manteau est encore discutée, l'identification de la $t(11;14)(q13;q32)$ associée à une expression anormale de la cycline D1 comme marqueur caractéristique est bien établie. Enfin, le MCL est un paradigme de la dérégulation de processus cellulaires clés (le cycle cellulaire et les voies de réparation de l'ADN, notamment) favorisant la lymphomagenèse.

c.Épigénome et lymphome du manteau

Si les anomalies génétiques observées dans les lymphomes du manteau sont bien documentées, les données épigénétiques sont encore peu nombreuses, en particulier la recherche d'éventuelles modifications anormales au niveau de la t(11;14)(q13;q32) et leur conséquences physiopathologiques.

i. Modifications épigénétiques au niveau des loci CCND1

Le promoteur de la cycline D1 est composé d'îlots CpG susceptibles d'être méthylés. Le promoteur et les régions s'étendant jusqu'à une centaine de kilobases en amont du gène sont hypométhylés et hyperacétylés dans des lignées cellulaires et les échantillons de patients exprimant la cycline D1 contrairement à celles ne l'exprimant pas^{115,134}. Cependant, une étude portant sur des lignées cellulaires de myélome multiple avec une t(11;14)(q13;q32) et des lymphocytes B normaux a montré que le gène CCND1 était réprimé dans la lignée B par un mécanisme distinct de la méthylation de l'ADN ou de l'acétylation des histones, puisque les inhibiteurs des ADN méthyltransférases et des histones déacétylases n'ont pas d'effet sur la transcription de CCND1¹¹⁵.

Par ailleurs, il a été récemment mis en évidence un phénomène de transvection médié par la translocation du locus CCND1 aboutissant à la perte de la méthylation en amont du locus CCND1 non réarrangé¹³³. La transvection est un phénomène épigénétique qui résulte de l'interaction entre un allèle d'un chromosome et l'allèle correspondant sur le chromosome homologue. Elle peut aboutir à l'activation ou à la répression génique¹⁷².

Très récemment, il a été montré que l'expression du gène jumonji (jnj, Jarid2) recrute les histones méthyltransférases de H3K9 G9a au niveau du promoteur CCND1 favorisant la méthylation de H3K9. Ceci a pour conséquence la répression de CCND1¹⁹⁹. Par conséquent, une anomalie de cette voie peut favoriser une expression accrue de la cycline D1.

ii. Anomalies secondaires et épigénome

L'expression aberrante de certaines histones méthyltransférases dans le lymphome du manteau, telles que PRMT5 qui méthyle H3R8 et H4R3, peut être à l'origine d'altérations de modifications de la chromatine avec un impact sur la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs et la croissance de cellules transformées. PRMT5 est capable de réprimer la transcription de gènes tels que les régulateurs du cycle cellulaire p14 et p16¹⁶⁶.

Les méthylations aberrantes du locus INK4 en 9p21 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b} et p14^{ARF}) ne semblent pas être des mécanismes oncogéniques primaires mais des mécanismes physiologiques de la régulation cellulaire. Les méthylations du promoteur et des altérations génétiques de p16

sont directement corrélées à la prolifération cellulaire et sont ainsi considérées comme des altérations additionnelles impliquées dans la dérégulation du cycle cellulaire dans le MCL⁹³.

Une équipe chinoise a montré dans le MCL une hyperméthylation fréquente de SHP1. Il s'agit d'une tyrosine phosphatase antagoniste de la promotion de la croissance et des effets oncogéniques potentiels de tyrosine kinases dans les cellules hématopoïétiques, en particulier les lymphocytes. Cette hyperméthylation de SHP1 semble avoir pour conséquence l'activation épigénétique constitutive de la voie JAK/STAT dans le MCL³¹.

Enfin, une étude du profil d'expression génique de lignées cellulaires de MCL traitées ou non par un inhibiteur de DNA méthyltransférase a mis en évidence une méthylation anormale du promoteur du gène PARG1 qui pourrait être un gène suppresseur de tumeur contribuant à la progression du MCL¹⁸¹.

BUT ET OBJECTIFS DU PROJET

Notre laboratoire développe un projet de recherche visant à comprendre le rôle de l'hétérochromatine constitutive et du silencing génique au cours de la lymphomagénèse. En s'appuyant sur un modèle d'étude original, les lymphomes B diffus à grandes cellules avec anomalies de l'hétérochromatine constitutive 1q12, nous avons engagé un projet ambitieux de « profiling épigénétique » (immunohistochimie / techniques d'immunoprécipitation de la chromatine) couplé à une analyse transcriptomique par puces Affymetrix. L'objectif immédiat est d'éclairer les mécanismes potentiels et les conséquences pathologiques de ces anomalies de l'hétérochromatine constitutive dans ces maladies. Ce travail est effectué en étroite collaboration avec des équipes de recherche spécialisées dans l'épigénétique (Saadi Khochbin, Claire Vourc'h – Inserm U823, Grenoble, Eric Gilson, ENS Lyon, Robert Feil, Montpellier) dans le cadre de réseaux nationaux de « profiling épigénétique » des cancers. Notre équipe a ainsi démontré pour la première fois que les réarrangements de l'hétérochromatine constitutive 1q12 induisent des altérations profondes de l'organisation et de la fonction de la chromatine dans des cellules de lymphomes B. Les conséquences majeures de ces anomalies sont associées à un enrichissement de l'euchromatine adjacente en marques épigénétiques répressives et à la dérégulation de l'expression de gènes, dont certains sont de nouvelles cibles pertinentes dans les lymphomes⁵⁹. Nous avons également montré l'existence de profils transcriptomiques particuliers associés aux profils épigénétiques mis en évidence dans les lymphomes B diffus à grandes cellules.

Fort de cette expérience et au vue de notre investissement important dans des projets de recherche clinique dans le lymphome du manteau, le projet présenté ici vise à élargir cette étude épigénétique / transcriptionnelle à ces maladies de pronostic particulièrement grave. Dans le but d'établir un profil épigénétique dans le lymphome du manteau, des approches diverses ont été utilisées. Un premier criblage large du statut épigénétique de cellules lymphomateuses du manteau a été effectué en immunohistochimie à l'aide d'anticorps spécifiques. D'autres approches complètent ces analyses pour permettre notamment d'identifier des modèles cellulaires *in vitro* : l'étude de l'état de méthylation et d'acétylation des histones en Western-blot et en immunofluorescence. De plus, des essais de CHIP locus spécifique (séquences répétées) ont été réalisés afin de localiser au niveau de régions spécifiques du génome les anomalies épigénétiques observées. Enfin, les mécanismes et les éventuelles conséquences seront recherchés par trois approches : l'étude de l'expression d'histones méthyltransférases clés en RT-Q-PCR, la recherche du point de cassure de la t(11;14) en PCR et l'analyse du statut mutationnel des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines des cellules tumorales par séquençage direct.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Cellules et échantillons de patients

a. Lignées cellulaires et conditions de culture

i. Lignées cellulaires

La lignée **Granta 519** a été établie en 1991 à partir du sang périphérique d'une patiente de 58 ans en rechute d'un lymphome du manteau (forme leucémique). Cette lignée est notre principal modèle d'étude dans ce projet.

BL136 est une lignée issue d'un lymphome de Burkitt qui nous a été fournie par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) de Lyon.

La lignée **B593** a été obtenue par greffe hétérologue sur souris immunodéprimées NUDE (M. Jacrot) d'un lymphome folliculaire humain transformé. Elle a été établie *in vitro* par T Bonnefoix (équipe 7, Institut Albert Bonniot, Grenoble).

La lignée cellulaire **Jurkat** a été établie à partir du sang périphérique d'un jeune garçon de 14 ans présentant une leucémie aiguë lymphoïde T.

Lignée	Source	Pathologie	Caryotype
Granta 519	ATCC	MCL	42-44, XX -1[19], del(3)(p21p25)[10], +7[7], add(9)(p13)[19], +add(9)(p13)[5], t(11;14)(q13;q32)[19], -12[19], add(13)(p12)[19], -14[19], add(16)(p13)[9], -17[19], -18[19], add(18)(q2?1)[19], -20[19], +M1[19], +M2[19][cp19]/84, idem x2[2]
BL136	CIRC	BL	46,XY,dup(1)(q11q41),add(4)(q35),t(8;14)(q24;q32),add(15)(qter)
B593	Equipe7-INSERM U823	FL/DLBCL	47,X,Y,t(1;22)(q24;q11),+7,t(8;14;18)(q24;q32;q21),t(9;15)(?p21;?q23),del(16)(q21q24)[14]
Jurkat	ATCC	Lymphome T	46, XY, del(2)(p21p23), del(18)(p11.2)

Table II.1 : Caryotype et origine des lignées lymphoïdes malignes. MCL : lymphome du manteau ; FL, lymphome folliculaire ; DLCL, lymphome diffus à grande cellules ; BL, lymphome de Burkitt. ATCC : *American Type Culture Collection*. CIRC, Centre International de Recherche sur le Cancer, Lyon ; Equip7-INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble.

ii. Conditions de cultures des lignées cellulaires

Les cultures se font en atmosphère à 5% de CO₂, 100% d'humidité et à 37°C. Les cellules sont cultivées dans un milieu Dulbecco's MEN (Granta) ou RPMI 1640 Medium (BL136, B593, Jurkat), avec des antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine), des acides aminés non essentiels (1%) et du pyruvate de sodium (1%). Ces milieux sont complétés avec du sérum de veau foetal décomplémenté (SVF 10% pour Granta, B593 et Jurkat, 20% pour BL136). L'absence de contamination des lignées cellulaires par les mycoplasmes est testée régulièrement.

iii. Contrôle du caryotype de la lignée Granta

L'intérêt d'établir le caryotype après décongélation est de contrôler la stabilité génétique de la lignée par rapport à sa description initiale. La lignée Granta 519 est le principal modèle *in vitro* dans ce projet.

Le caryotype est la classification par paire et par taille de l'ensemble des chromosomes d'une cellule. Les chromosomes sont photographiés et disposés selon un format standard.

Les métaphases sont obtenues à partir de $10 \cdot 10^6$ cellules incubées pendant une nuit en présence de colchicine à 0,01 µg/ml final. Puis, les cellules subissent un choc hypotonique par du KCl 75 mM. Enfin, le culot de cytogénétique est fixé dans un mélange de méthanol - acide acétique, prêt à être étalées sur une lame de verre. La préparation subit une dénaturation thermique et est ensuite colorée au Giemsa permettant de faire apparaître les bandes « R » dont la topographie est caractéristique d'une paire de chromosome.

Le caryotype de la lignée Granta 519 utilisée dans cette étude est présenté en annexe 6.

b. Lymphocytes B normaux

Des lymphocytes B du sang périphérique, de rate et d'amygdales ont été obtenus à partir de donneurs sains, et triés par sélection positive sur colonnes immuno-magnétiques anti-CD19 (CD19 Microbeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). La pureté des cellules a été évaluée par double marquage B/T anti-CD19/anti-CD3 analysé en cytométrie en flux. Les lymphocytes B au repos ont été soit utilisés directement (culot sec pour l'ADN et trizol pour l'ARN), soit activés *in vitro* par du CD40 ligand (CD40L) à 0,5 µg/ml pendant 48h en milieu RPMI complet 10% SVF (cf conditions de culture ci-dessus). L'activation par le CD40L permet de simuler une activation antigène-dépendante *in vitro*. L'activation est contrôlée en cytométrie de flux par un marquage anti-CD69.

c. Sélection d'échantillons de patients présentant un MCL

Ce projet de thèse s'appuie sur une collection de 120 biopsies (tissus, culots secs et cellules vivantes) bien annotées (clinique, immunophénotype, cytogénétique) de patients atteints de lymphomes du manteau et pris en charge au CHU de Grenoble, ce qui représente un nombre important s'agissant d'une tumeur rare. Les études porteront sur 20 échantillons de 19 malades comportant chaque sous-type clinique, histologique et génétique connus : MCL agressifs/indolents (5/19 cas), MCL spléniques/ganglionnaires (5/19 cas), MCL blastiques/classiques (2/19 cas), MCL sans t(11;14) (1/19 cas), MCL avec caryotype de complexité variable (annexe 7). L'âge moyen au diagnostic de ces patients est de 60 ans. La médiane de survie est de 5,3 ans. Il y a 5 femmes pour 14 hommes.

Une sélection de cas parfaitement annotés sur le plan clinico-biologique a également été opérée à partir de la banque de tissus macroarrays (TMA) et de la tumorotheque disponible au sein du groupe coopératif du GOELAMS. 39 patients ont été étudiés sur les TMA. Du matériel (ADN et ARN) sanguin et/ou médullaire n'étant disponible pour l'instant que pour 8 patients, les résultats obtenus ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

Des hyperplasies ganglionnaires (3 cas), des cellules du sang (6 sujets cas) et de la moelle (6 cas) de 15 personnes saines sont étudiés en parallèle en tant que série témoin.

i. Confirmation de diagnostic en FISH

PRINCIPE

L'Hybridation fluorescente *in situ* (en anglais *Fluorescent in situ hybridization* ou FISH) est une technique de biologie moléculaire d'hybridation utilisant des sondes marquées à l'aide d'un fluorochrome et utilisées sur des noyaux, des métaphases fixés et observés en microscopie. Ces sondes peuvent être utilisées sur de l'ADN ou de l'ARN, ou sur des protéines. La FISH est une technique de cytogénétique permettant d'identifier des anomalies chromosomiques.

TECHNIQUE

Étalement

Le culot de cytogénétique, fixé dans un mélange méthanol/acide acétique, est étalé sur une lame de verre. Les lames sont ensuite vieillies une nuit à température ambiante.

Hybridation

200 µL de RNase diluée au 1/100^{ième} dans du 2XSSC (standard saline citrate 2X) sont déposés sur chaque lame. Les lames sont disposées dans une boîte en atmosphère humide à 37°C pendant 40 min. Après 2 lavages dans du 2XSSC de 2 min chacun, les lames sont déshydratées dans des bains d'alcool de degrés alcooliques croissants. Après séchage, 5µl de sondes sont déposés sur les lames placées sur une plaque chauffante à 37°C. Puis les lames sont hybridées à 73°C pendant 1 min et mises à l'étuve à 37°C en atmosphère humide toute la nuit.

Lavages et contre-coloration

Les lames sont lavées dans une solution 0,4XSSC/0,3% Tween à 37°C pendant 2 min puis dans un mélange 2XSSC/0,1% Tween à température ambiante pendant à 1 min sous agitation manuelle.

Ensuite, 20 μ L de contre-colorant DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) à 2 μ g/mL sont déposés entre lame et lamelle.

Lecture

Les noyaux (objectif 40) et les métaphases (objectifs 10 puis 63) sont observés au microscope à fluorescence Axio Zeiss et analysés à l'aide du logiciel MétaSystem.

Cette technique a permis de confirmer le réarrangement d'un des gènes IGk en 2p12 pour le cas ne présentant pas la t(11;14)(q13;q32) ni au caryotype ni en FISH. Elle a également permis de confirmer le diagnostic de lymphome du manteau ou de redéterminer le diagnostic (grâce à une relecture anatomopathologique associée) des cas de la base de données des lymphomes du manteau du C.H.U. de Grenoble.

2. Profils épigénétiques des lymphomes du manteau

Pour les raisons mentionnées dans l'introduction, nous nous focaliserons particulièrement sur trois grandes voies de répression épigénétique: (i) **la voie H4K20me3** impliquée dans la formation de l'hétérochromatine constitutive et dans l'empreinte génomique ; (ii) **la voie H3K9me3** médiée par la protéine **HP1** impliquée dans la formation, le maintien et la propagation de l'hétérochromatine ; (iii) **la voie H3K27me3** impliquant les protéines du complexe Polycomb responsables de la régulation des gènes du développement.

L'ensemble des anticorps utilisés dans ce projet est récapitulé dans le tableau ci-dessous.

Anticorps primaires	PM (kDa)	Fournisseur	Anticorps primaires				Anticorps secondaires	
			IHC	WB	IF	ChIP	WB	IF
H3K9me2	17	Millipore (07-441)	1/100	1/2000	/	/	1/2000	/
H3K9me3	17	Millipore (07-523)	1/400	1/1000	1/200	1/250	1/2000	1/300
H3K27me3	17	Millipore (07-449)	1/200	1/1000	1/200	/	1/2000	1/300
H4K20me1	10	Millipore (07-748)	1/100	1/2000	1/500	/	1/2000	1/300
H4K20me3	10	Millipore (07-749)	1/100	1/500	1/150	1/250	1/2000	1/300
H4panAc	10	Millipore (06-598)	1/100			/	1/2000	1/300
HP1α	22	Euromedex	1/100	1/2000	1/200	/	1/2000	1/300
HP1β	21	Euromedex	1/100	1/2000	1/500	/	1/2000	1/300
HP1γ	21	Euromedex	1/1000	1/2000	1/500	/	1/2000	1/300
α-tubuline	50	Sigma	/	1/5000	/	/	1/5000	/
MIB1		Dako	1/75	/	/	/	/	/
Cycline D1	36	Neomarkers	1/25	/	/	/	/	/

Tableau II.2: Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie, le western-blot, l'immunofluorescence et l'immunoprécipitation de la chromatine. Les anticorps sont polyclonaux mis à part les anticorps primaires anti-tubuline, anti-H4K20 monométhylé et les anti-HP1.

a. Immunohistochimie (IHC) sur tissus en paraffine

i. Principe

L'immunohistochimie est une technique permettant la détection par des anticorps spécifiques d'antigènes nucléaires et/ou cytoplasmiques sur tissus paraffinés. La révélation est effectuée grâce à une réaction enzymatique colorée (peroxydase). Un contrôle positif, une hyperplasie ganglionnaire dans le cadre de ce projet, est réalisé en parallèle lors de chaque manipulation.

ii. Technique

Des coupes de tumeurs primaires et de tissu-macroarrays paraffinées de 3 µm d'épaisseur sont apposées sur lames puis déparaffinées dans des bains de toluène et d'alcool. Les lames sont plongées dans un tampon au sein d'un bain-marie à 100°C pendant 60 min pour démasquer les antigènes. La suite de la technique est automatisée sur Ventana Discovery Autostainer® (Ventana Medical International, Inc.). Après blocage des peroxydases endogènes par de l'eau oxygénée et des sites aspécifiques par du sérum d'âne à 2%, le premier anticorps (tableau II.2) est incubé entre 30 min et 1 h suivi de l'anticorps secondaire polyclonal pendant 2 min. La révélation est réalisée par la Diamino-3,3'benzidine (DAB) et la contre-coloration par l'hématoxyline.

Les lames sont observées au microscope aux objectifs 20 et 40. Le score anatomopathologique est déterminé par estimation du pourcentage de cellules marquées et l'intensité du marquage (lorsque 100% des cellules sont marquées à une intensité estimée à +++ le score anatomopathologique est défini à 300).

En immunohistochimie, la phase pré-analytique est particulièrement importante. Des problèmes au niveau de la qualité du matériel étudié et la sensibilité particulière de certains épitopes à l'oxydation notamment peuvent aboutir à des faux négatifs.

b. État de méthylation et d'acétylation des histones H3 et H4 en Western-blot

Nous avons souhaité savoir si les résultats observés dans la littérature concernant l'acétylation et la méthylation des histones sont universels dans les hémopathies malignes⁶⁰. Pour ce faire, des expériences de Western-blot sont effectuées pour détecter, par des anticorps spécifiques, certaines modifications d'histones dans des lignées cellulaires correspondant à un panel assez représentatif des différentes pathologies lymphoïdes B et T.

i. Extraction protéique à l'urée 8M

PRINCIPE

Cette technique vise à lyser totalement les cellules et à casser l'ADN par sonication permettant alors de récupérer toutes les protéines cytoplasmiques et nucléaires, et notamment les histones.

TECHNIQUE

Les lysats protéiques totaux sont préparés à partir de 5 millions de cellules. Les cellules sont lavées en PBS (tampon phosphate salin) 1X froid, et centrifugées 5 min à 1200 rpm à +4°C. Le culot est repris dans 1ml de PBS 1X froid, puis centrifugé 5 min à 1200 rpm à +4°C. Après avoir cassé le culot, 100 µl d'urée 8M sont ajoutés. Après homogénéisation et 5 min d'incubation à température ambiante (TA), les échantillons sont soniqués sur glace, puis incubés 10 min à TA. Après centrifugation 5 min à 13000 rpm à +4°C, le surnageant (contenant l'extrait protéique) est récupéré, et conservé à -80°C. Le dosage protéique est effectué avec la méthode BCA (test à l'acide bicinchoninique) (Pierce, Rockford, IL, USA).

ii. Western-blot (SDS-PAGE)

PRINCIPE

L'étude de l'état de méthylation et d'acétylation des histones H3 et H4 est réalisée à partir de lysats protéiques totaux. Le Western-blot est une technique permettant la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse et leur reconnaissance par des anticorps spécifiques détectés par auto-radiographie.

TECHNIQUE

Après dénaturation 5 min à 95°C, les lysats protéiques (15 µg/10 µl) sont déposés sur un gel à 15% polyacrylamide (pour étudier les protéines de faible poids moléculaires, entre 10 kDa et 25 kDa) en conditions dénaturantes, et migrent par électrophorèse environ 2 h à 150 V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF - PolyVinylidene Fluoride - (Millipore, Billerica, MA, USA) pendant 1 h à 100 V. La membrane est bloquée dans une solution de lait écrémé à 5% en PBS-Tween 0,1% pendant 30 min à TA sous agitation. Puis, le premier anticorps dilué dans du tampon de blocage est incubé une nuit à +4°C sous agitation. Après 3 lavages en PBS-Tween 0,1%, l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase est incubé 45 min à température ambiante suivi de 3 nouveaux lavages. La révélation est réalisée par l'intermédiaire d'un réactif chimiluminescent permettant l'émission d'une lumière qui va marquer un film photographique (kit Covalight, Covalab, France).

c. Technique d'immunofluorescence sur cellules fixées

i. Principe

L'immunofluorescence sur cellules fixées permet la détection *in situ* d'antigènes nucléaires et/ou cytoplasmiques grâce à des anticorps spécifiques marqués par un fluorochrome. L'observation se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence.

ii. Technique

Les cellules de chaque lignée sont lavées en PBS 1X puis centrifugées 5 min à 1400 rpm avant d'être reprises dans du PBS 1X glacé. Les cellules sont alors fixées pendant 30 min avec du PFA 4% puis lavées en PBS 1X et centrifugées 5 min à 1000 rpm. Les cellules sont reprises dans du PBS 1X de façon à avoir 2 millions de cellules/ml. 0,2 millions de cellules (100 µl) sont cytopspinées 3 min à 750 rpm sur une lame. Les cellules fixées sur lames sont perméabilisées 5 min par une solution de Triton X100 0,5%/Saponine 0,5%/PBS 1X. Après blocage des sites aspécifiques par incubation de 30 min dans une solution de lait 5%/PBS 1X, les cellules sont incubées avec l'anticorps d'intérêt (tableau II.2) dilué dans du lait 1%/PBS 1X pendant 1 h à 37°C (100 µl/lame). Après 3 lavages en PBS/Tween 20 0,1%, la révélation est effectuée avec un anticorps secondaire (tableau II.2) couplé à l'AlexaFluor 488 (100 µl/lame) pendant 30 min à TA. Les lames sont lavées en PBS/Tween 20 0,1% et en PBS 1X puis égouttées et montées en DAPI/Vectashield (15 µl/lame de solution à 1 µg/ml).

La lecture et l'acquisition des images se font à l'aide d'un microscope à fluorescence Axiokop avec des objectifs à immersion 50 et 100, muni d'une caméra utilisant le logiciel Quick PathVysion®. Les lames sont lues en FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) et en DAPI.

d. Immunoprécipitation de chromatine native (ChIP) sur lignées cellulaires

i. Principe

La ChIP est une technique permettant l'étude des protéines liant la chromatine ou des modifications d'histones au niveau de séquences d'ADN d'intérêt. Après extraction des noyaux, la chromatine est fragmentée par sonication puis immunoprécipitée à l'aide d'anticorps spécifiques de certaines modifications d'histones. L'ADN associé aux histones immunoprécipitées est extrait et analysé par PCR quantitative avec des amorces spécifiques des régions d'intérêt.

Cette technique est utilisée pour étudier les modifications post-traductionnelles des histones au niveau de régions répétées d'ADN Satellite 2.

ii. Préparation de la chromatine

Les cellules (20 millions de cellules) sont lysées dans du tampon RIPA (Tris 1M pH8, NP-40 1%, DOC 0,5%, SDS 0,1%, NaCl 150mM, DTT 1mM, TSA 100 ng/ml, EDTA, eau) pendant 20 min, puis centrifugées 10 min à 20 000g. Les culots sont repris dans du RIPA puis soniqués à 150 et à 100 joules pour fragmenter la chromatine. Après une incubation d'1 h, les lysats sont centrifugés comme précédemment et les surnageants récupérés. Un contrôle de la qualité de la fragmentation de la chromatine est réalisé par migration d'1 µg de chromatine sur gel d'agarose 1% à 100 V.

iii. « Pre-clear » de la chromatine

Cette étape permet d'éliminer les fragments de chromatine se liant de façon aspécifique aux billes de protéine A Sepharose préalablement préparées. Un volume adapté de billes est hydraté en PBS 1X et incubé O/N en rotation à température ambiante avec de la BSA (Bovine Serum Albumine) (10 µg/µl) et de l'ADN de sperme de saumon (10 µg/µl) pour bloquer les sites aspécifiques. Les billes lavées et remises à 50% en RIPA sont ajoutées à la chromatine (200 µl de billes à 50%). Le tout est mis en rotation à 4°C pendant 15 min puis centrifugé 2 min à 300 rpm. La phase supérieure est récupérée et la chromatine est dosée à 260/280 nm permettant de calculer le nombre d'immunoprécipitations (IP) pouvant être réalisées.

iv. Immunoprécipitation

50 µg de chromatine par IP sont répartis dans différents tubes : un 'input', un 'none-antibody' (NA), un pour chaque anticorps. La chromatine est mise en présence de 7,5 µg d'anticorps par IP O/N à 4°C sous agitation douce (tableau II.2). Le lendemain, 40 µl de billes à 50% en RIPA par IP sont ajoutés et incubés 15 min à 4°C en rotation douce. Les tubes sont centrifugés 1 min à 1000 rpm et la phase supérieure est jetée. Les billes sont lavées 2 fois en RIPA avant d'être réparties en fractions protéiques et génomiques dans différents tubes. Les fractions protéiques sont lavées et reprises dans du tampon de charge 2X, sauf pour les 'input', puis stockées à -20°C. Après un 3^{ème} lavage en RIPA, les fractions génomiques sont éluées 2 fois dans 100 µl/IP de tampon d'éluion (NaHCO₃ 50mM, SDS 1%) pendant 15 min en rotation suivie d'une centrifugation de 2 min à 3000 rpm.

v. Extraction de l'ADN

Au préalable, la chromatine est traitée par 10,4 µl de mix protéinase K par IP pendant 30 min à 50°C. L'ADN est extrait par Phénol/Chloroforme puis Chloroforme/alcool iso-amylque. La phase aqueuse est récupérée et l'ADN précipité avec 1 µl de glycogène, NaOAc 2,5N au

1/10^{ème} du volume aqueux et avec 2,5 volumes d'éthanol absolu glacé. Les tubes sont vortexés et mis O/N à -20°C.

Après centrifugation de 25 min à 20 000g, les culots sont lavés dans de l'éthanol 70% glacé et centrifugés 10 min à 20 000g. Enfin, les culots séchés sont resuspendus dans un volume adapté de Tris-EDTA 10 :1. Les ADN sont dosés sur Nanodrop et dilués à une concentration finale de 5 ng/µl avant l'étude en PCR quantitative.

3. Étude des mécanismes épigénétiques dérégulés dans le MCL

Nous avons débuté une étude des mécanismes pouvant être à l'origine des anomalies épigénétiques observées. Pour cela, nous avons analysé en reverse transcriptase-PCR quantitative l'expression de certaines histones méthyltransférases (tableau II.3).

Modifications	Enzymes	Localisation génomique
Monométhylation H4K20	Pr-Set7/Set8	12q24-31
Di-,Triméthylation H4K20	Suv4-20h1	11q13.2
	Suv4-20h2	19q13.42
Triméthylation H3K9	Suv39H1	Xp11.23
	Suv39H2	10p13
Triméthylation H3K27	EZH2	7q35-q36

Tableau II.3 : Histones méthyltransférases responsables de modifications post-traductionnelles d'histones chez l'Homme.

Nous nous sommes également intéressés aux éventuelles conséquences du point de cassure de la t(11;14)(q13;q32) au niveau du chromosome 11 sur l'expression des gènes avoisinant celui de la cycline D1. Pour cela, la recherche du Major Translocation Cluster (MTC) a été réalisée sur l'ADN en PCR qualitative et comparé aux données cliniques et biologiques précédemment obtenues.

Enfin, nous avons analysé le statut mutationnel des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines des cellules tumorales par séquençage direct.

a.Extraction, purification et qualification des acides nucléiques

i. Préparation des ARN

Les ARN totaux sont extraits par la technique TRIzol[®]/Chloroforme (Invitrogen, Life Technologies) à partir de cellules de lignées de lymphomes, d'échantillons normaux et de cellules tumorales de patients. Pour les culots secs cellulaires (en absence de prélèvements conservés dans le TRIzol[®]), ils sont resuspendus dans le TRIzol[®] et bien homogénéisés. Les ARNs sont extraits par du chloroforme, puis précipités par de l'isopropanol. Les ARNs sont purifiés par lavages à l'éthanol absolu et 75%. Enfin, les culots sont repris dans de l'eau stérile (volume adapté en fonction de la taille du culot). La concentration en ARN est déterminée sur NanoDrop[®] (Thermo Scientific). La qualité et l'intégrité sont contrôlées par Agilent[®] Bioanalyser 2100 ou sur gel dénaturant MOPS.

ii. Préparation des ADN

Les cellules sont suspendues dans un tampon d'extraction (Tris-HCl 0.1M pH 7.4 / EDTA 10mM pH 8 / NaCl 0.1mM / SDS 0.5% / Protéinase K 100µg/ml) et incubées O/N à TA sous rotation. La solution est extraite avec un mélange de phénol/chloroforme (1/1), puis avec un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1). L'ADN est précipité par 1/20^{ème} de volume de Chlorure de Sodium 5N et 2 volumes d'éthanol 100% glacé, récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur, rincé dans de l'éthanol 70%, séché puis dissous dans du tampon Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM pH 7.4 / EDTA 1mM pH 8). L'ADN est dosé au Nanodrop, et sa qualité est vérifiée par migration sur un gel à 0.8% d'agarose.

b. Analyses en PCR quantitative (Q-PCR)

i. Principe

La Q-PCR consiste en l'amplification *in vitro* de séquences d'ADN grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. Il s'agit d'une méthode fonctionnant selon un processus exponentiel. La Q-PCR permet de déterminer la concentration d'un acide nucléique (ADN ou ARN) dans un échantillon biologique. Son principe est basé sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent émis par un fluorophore dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés pendant la PCR.

ii. Technique

Les ADNc utilisés pour l'étude de l'expression des gènes d'intérêt (tableau II.4) en Q-PCR sont synthétisés à partir d'1 µg d'ARN total avec un kit Superscript III Invitrogen dans un appareil PCR Biometra puis dilués au 1/20^{ième}. En parallèle, 1 µg d'ARN est préparé selon le mode opératoire ci-dessus mais sans la reverse transcriptase et servira de témoin négatif.

Les PCR quantitatives ont été réalisées sur Stratagène MX3000P et utilisent du SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Les ADN_c et ADN ChIP sont amplifiés, après dénaturation 10 min à 95 °C, au cours de 40 cycles (15 s à 95°C et 1 min à 60°C). La courbe de dissociation est ensuite établie (1 min à 95°C puis 30 s à 60°C et 15 s à 95°C). Les échantillons sont passés en duplicat. Les primers spécifiques utilisés pour l'amplification des différents ADN étudiés sont récapitulés dans le tableau II.4.

Pour les analyses d'expression des gènes, la quantification est effectuée sur des courbes standards (dilutions croissantes d'ADN_c de la lignée Granta 519). Le gène U6 est utilisé comme gène contrôle pour la normalisation des données d'expression.

Pour les analyses ChIP, l'enrichissement est quantifié en normalisant l'IP sur l'Input, selon la formule : $IP/Input = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-[Ct(IP)-Ct(Input)]}$.

Gène	Séquence sens	Séquence antisens
Pr-set7	GGGCAGTCAAAGATCTATTC	TACTGCGTTCCCAGCATTTTC
Suv4-20h1	CAGTCGAGAGGAGGTCGAACA	CAAACCTGGTTGCTAGGTCATCAT
Suv4-20h2	CGGTGAGAATGACTTCAGCA	CTCACAGGTGTGGCATTACAC
Suv39h1	GGCAACATCTCCCACCTTTGT	CAATACGGACCCGCTTCTTA
Suv39h2	CCACCTGGTACTCCCATCTATG	GATGCAAAGCGAATACTGTGTG
EZH2	AAGCACAGTGCAACACCAAG	CAGATGGTGCCAGCAATAGA
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
Sat2	TGAATGGAATCGTCATCGAA	CCATTTCGATAATTCCGCTTG

Tableau II.4 : Primers utilisés pour les Q-PCR étudiant les taux d'expression de gènes modificateurs de l'hétérochromatine, les régions répétées Satellite 2 après CHIP et le gène contrôle U6.

c. Analyses du point de cassure de la t(11;14) et du statut mutationnel en PCR

i. Principe

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

La réaction PCR comprend trois étapes : (1) la dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simple brin ; (2) l'amorçage de la réplication à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques ; (3) la polymérisation du brin complémentaire.

ii. Technique

Pour déterminer si le point de cassure de la t(11;14) est au niveau du MTC ou non dans les cellules tumorales des patients étudiés ainsi que le statut mutationnel, les ADN sont extraits selon les conditions présentés ci-dessus et dilués à la concentration de 50 ng/μl. Un témoin positif (l'ADN d'un patient connu pour être MTC positif), un témoin négatif (l'ADN de la lignée GRANTA, MTC négatif) et un blanc (eau physiologique) sont réalisés en parallèle des séries de patients.

Les PCR ont été réalisées sur Biometra Thermocycler T3000 et utilisent du Gold Buffer 1X (Applied Biosystems), du MgCl₂ 2,5 mM, des dNTP 200 μM (Promega), des primers à 200 nM et de la Taq Gold 1U (Applied Biosystems). Les ADN sont amplifiés, après activation de la Taq 7 min à 95°C, au cours de 35 cycles (45 s à 95°C, 45 s à 60°C et 1 min 30 à 72°C), suivi d'une étape d'élongation finale 10 min à 72°C. Les primers spécifiques utilisés pour l'amplification des ADN étudiés en PCR sont récapitulés dans le tableau II.5.

Le couple d'amorces pour l'étude du point de cassure est localisé au niveau de la région CCND1/MTC en forward et au niveau de la JH des gènes d'immunoglobulines en reverse. La détection des produits PCR est faite par électrophorèse sur gel agarose à 2 %.

Concernant l'étude du statut mutationnel, on réalise une PCR multiplex appelée FR1 avec six amorces localisées dans la région VH des gènes d'immunoglobulines en forward et une amorce consensuelle dans la région JH des gènes d'immunoglobulines en reverse. La détection des produits PCR est faite par électrophorèse sur gel polyacrylamide (29/1) 6%.

Gène	Séquence des Primers	Taille des produits (pb)
CCND1/MTC	GGATAAAGGCGAGGAGCATAA	150-350
JH	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	340
VH1	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG	340
VH2	GTCTGGTCTACGCTGGTCAAACCC	340
VH3	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG	340
VH4	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG	340
VH5	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT	340
VH6	TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG	340

Tableau II.5 : Primers utilisés pour les PCR étudiant le point de cassure de la t(11;14)(q13;q32) et la région variable des gènes d'immunoglobulines en vue du séquençage pour analyser le statut mutationnel²¹⁵.

iii. Amplification et séquençage de l'ADN pour la détermination du statut mutationnel

Une PCR FR1 est à nouveau réalisée dans le but d'obtenir assez de produits PCR final pour le séquençage : 2 tubes par patients de 100 µl en volume final. Les produits de la PCR sont dénaturés pendant 5 minutes à 95°C. Les 100 µl de produits PCR sont ensuite migrés sur un gel 2 % d'agarose. Les bandes d'intérêts sont révélés dans le BET et observées sous un rayonnement U.V. Les bandes sont découpées et récupérées à l'aide d'un scalpel propre. L'ADN est purifié sur colonne à l'aide du kit Nucléospin selon les indications du fabricant. Puis, la concentration de l'ADN pour chaque patient est évaluée sur un gel d'agarose 2 % à l'aide d'une échelle de poids moléculaire.

Les séquençages de l'ADN en JH puis en VH sont effectués par GENOMICS® (MEYLAN) et analysés sur le site IMGT/V-QUEST. Les gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines sont considérés mutés si le pourcentage d'homologies est inférieur à 98%.

RÉSULTATS

Nous avons souhaité faire un état des lieux dans le lymphome du manteau du statut de méthylation de H3K9, H4K20, pour l'hétérochromatine constitutive, de H3K27, pour l'hétérochromatine facultative, et du statut d'acétylation de H4 pour l'euchromatine. Nous nous sommes également intéressées aux trois isoformes d'HP1. Par ailleurs, nous cherchons à comprendre les mécanismes pouvant expliquer les profils épigénétiques observés au niveau des cellules tumorales de patients atteints de lymphome du manteau. Pour cela, nous avons analysé l'expression de certaines histones méthyltransférases mettant en place les marques épigénétiques étudiées.

Ce projet de recherche vise à étudier « l'intégrité » des voies de signalisation épigénétique contrôlant la formation et le maintien des compartiments d'hétérochromatine dans les lymphomes du manteau, et à comprendre les mécanismes potentiels et les conséquences pathologiques de toutes les anomalies identifiées. *In fine*, nous émettons une hypothèse nouvelle selon laquelle les anomalies des compartiments d'hétérochromatine constitutive du génome provoqueraient non seulement une instabilité génétique mais aussi la perturbation de phénomènes clés tels que la répression stable de gènes spécifiques de lignées dans les cellules lymphomateuses.

1. Quantification et organisation de marques épigénétiques dans des lignées de lymphomes

Cette étude a eu pour objectif d'étudier le statut de modifications post-traductionnelles clés des histones et l'analyse du taux d'expression des isoformes d'HP1 dans un panel de lignées de lymphomes B et T comparé à des lymphocytes B normaux ganglionnaires au repos et activés *in vitro* par le CD40 ligand (CD40L). Pour cela, des analyses en western-blot, en immunofluorescence et en immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont été réalisées.

L'activation des lymphocytes B normaux via la voie CD40 / CD40L s'accompagne d'une diminution du taux de H4K20me1 et à un degré moindre des taux de H4K20me3, H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3 par rapport aux lymphocytes B au repos. On note une augmentation nette de HP1 β au cours de l'activation lymphocytaire B alors que les isoformes HP1 α et γ diminuent (fig. III.1a).

De façon remarquable, le taux de H4K20me3 est diminué dans l'ensemble des lignées lymphomateuses et plus particulièrement dans la lignée MCL Granta par rapport aux lymphocytes B repos et activés témoins (fig. III.1a). Cette perte ne semble ni cibler les séquences répétées Satellite 2 du génome comme cela a pu être rapporté dans la littérature, ni s'associer à une accumulation de la forme monométhylée H4K20me1 (sauf pour la lignée BL136) (fig. III.1a et b)⁶⁰.

La protéine HP1 est exprimée à des taux variables dans les lignées lymphomateuses. Toutefois, on observe des quantités d'HP1 β et d'HP1 γ plus importantes dans les lignées Granta et Jurkat par rapport aux autres lignées et aux lymphocytes B normaux (fig. III.1a).

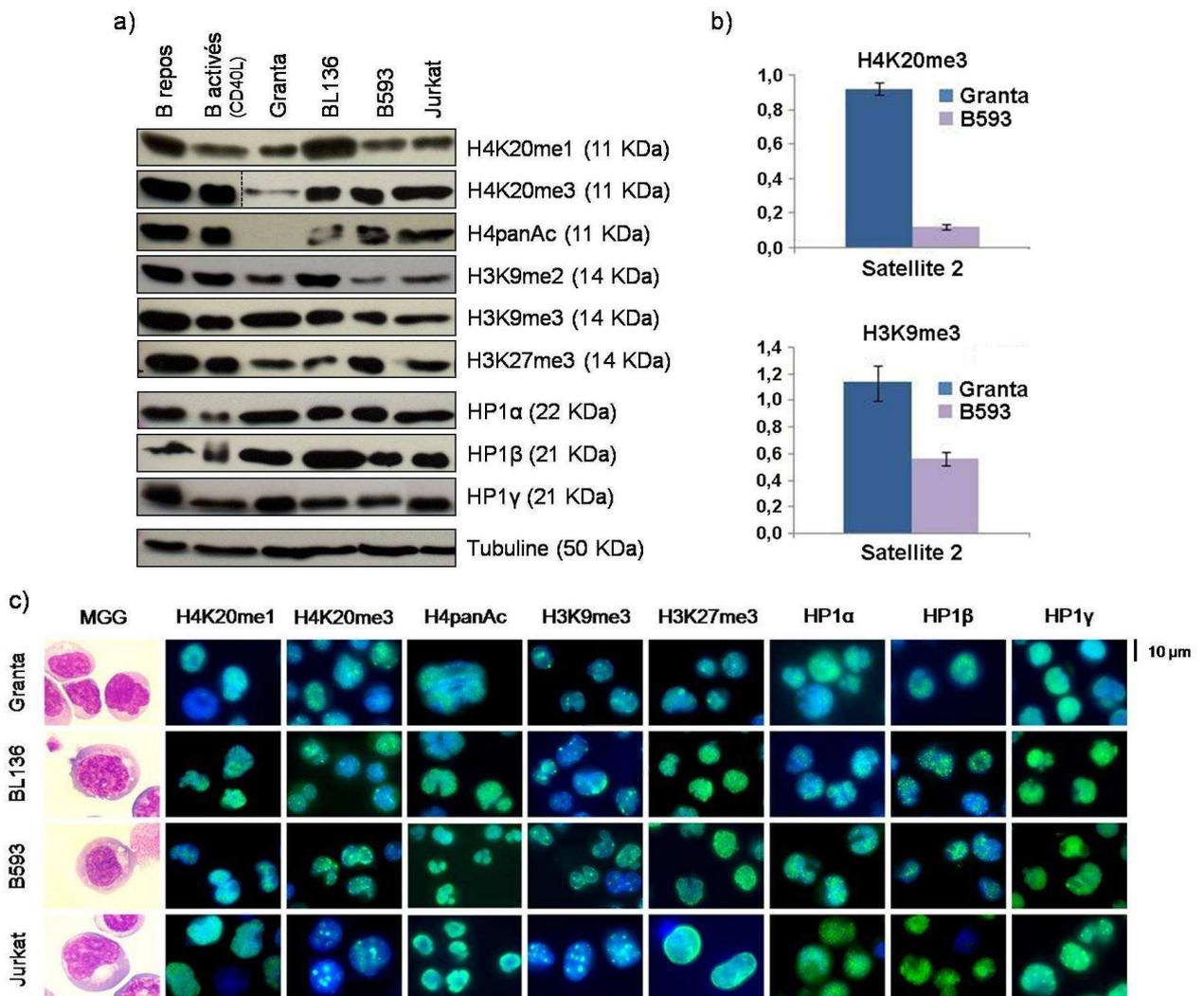


Figure III.1 : Quantification et organisation des marques d'hétérochromatine dans des lignées lymphomateuses. a) Résultats obtenus en western-blot sur lignées lymphomateuses et sur lymphocytes B repos et activés isolés à partir d'amygdales. La photo de H4K20me3 pour les lymphocytes B repos et activés a été prise avec un temps d'exposition plus court par rapport à celle des lignées cellulaires, dans un souci de clarté. L'étude de la tubuline est utilisée comme contrôle de dépôt. b) Histogrammes représentant les résultats obtenus en CHIP analysée par Q-PCR pour les marques H4K20me3 et H3K9me3 sur les séquences Satellite 2 dans les lignées Granta et B593. c) Photos de cellules de lignées lymphomateuses au May-Grünwald-Giemsa et immunomarquées pour des modifications post-traductionnelles d'histones et les 3 isoformes de HP1 (obj. x50).

Afin de mieux comprendre le lien entre les profils des modifications d'histones et des HP1, les mêmes marques ont été étudiées par immunofluorescence (IF). Les marques d'hétérochromatine constitutive H3K9me3 et H4K20me3 présentent une organisation en foyers dispersés de façon hétérogène au sein des noyaux. On note que dans la lignée Granta, une fréquence moins importante de ces foyers pour H4K20me3 comparativement aux autres lignées. Pour H4K20me1, la fluorescence est homogène et est très faible au niveau nucléolaire. La marque d'hétérochromatine facultative H3K27me3 montre une organisation

différente entre les lignées. La lignée Granta présente des foyers importants en plus d'un aspect moucheté homogène du noyau. Pour les lignées B593 et BL136, la fluorescence est mouchetée au sein du noyau et est renforcée au niveau périnucléaire. Enfin, pour la lignée Jurkat, la fluorescence est d'aspect homogène. Concernant les isoformes α et β d'HP1, la fluorescence observée est d'aspect moucheté dans les quatre lignées étudiées. Par contre, pour l'isoforme γ , la fluorescence est homogène dans toutes les lignées associée à la présence de gros foyers hormis dans la lignée Granta.

Globalement, les profils IF sont très similaires d'une lignée à une autre sauf pour H4K20me3, H3K27me3 et la protéine HP1 γ qui présentent une organisation légèrement différente dans les cellules de la lignée MCL Granta comparé aux autres lignées B / T tumorales.

Au total, ceci suggère l'existence de perturbations au niveau de l'organisation non seulement des voies H4K20me3, H3K27me3 mais aussi des compartiments HP1 dans la lignée MCL Granta.

2. Profil épigénétique de cellules primaires de lymphome du manteau

Dans le but de comprendre s'il pouvait exister une signature épigénétique unique au sein des lymphomes du manteau, une étude en immunohistochimie des principales marques épigénétiques définissant les compartiments d'hétérochromatine et d'euchromatine a été menée sur une série pilote de 19 cas de lymphomes du manteau. Des prélèvements de rates et de ganglions de ces patients ont été immunomarqués pour six marques épigénétiques (H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3, H4K20me1, H4K20me3 et H4panAc) ainsi que les trois isoformes d'HP1 et comparés à des hyperplasies ganglionnaires.

a. Profil physiologique des marques d'hétérochromatine au cours de la maturation B antigène dépendante

i. Dynamique des modifications d'histones

La coloration des coupes histologiques de ganglions lymphatiques réactionnels à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) permet de distinguer les centres germinatifs (cellules de grandes tailles) des zones du manteau et marginales (cellules de plus petites tailles) qui les entourent. L'étude du score de prolifération du Ki67 met en évidence les cellules proliférantes au niveau d'un prélèvement. Ainsi, au niveau des hyperplasies ganglionnaires on observe un marquage intense de cellules uniquement au niveau des centres germinatifs où les cellules ayant rencontré l'antigène prolifèrent. Le marquage via des anticorps anti-cycline D1 confirme l'absence d'expression de la protéine par les lymphocytes B et T au sein des ganglions lymphatiques (fig. III.2).

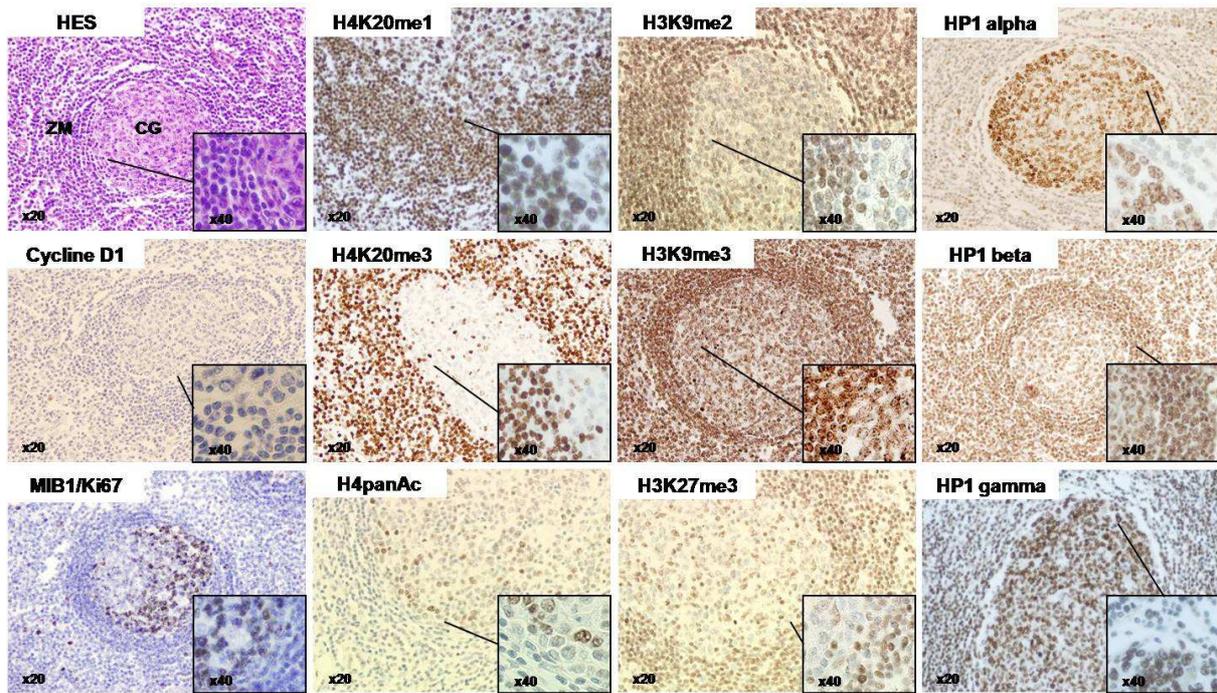


Figure III.2 : Profil épigénétique des follicules lymphoïdes secondaires. Les coupes paraffinées de ganglions hyperplasiques, c'est-à-dire réactionnels, sont immunomarquées par les anticorps indiqués dans les encadrés blancs. Les photos sont prises aux objectifs 20 et 40. L'HES permet la coloration de toutes les cellules d'un échantillon facilitant leur description morphologique. Les lymphocytes B normaux n'expriment pas la cycline D1 quelque soit leur degré d'activation et/ou de maturation. L'antigène MIB1 permet d'établir le score de prolifération du Ki67. Dans les follicules lymphoïdes secondaires, on observe un marquage des cellules B proliférantes au niveau des centres germinatifs. HES : Hématoxyline Éosine Safran.

De façon tout à fait remarquable, les résultats sur ganglions lymphatiques réactionnels soulignent le rôle potentiellement important de certaines modifications d'histones au cours de la prolifération/différentiation lymphoïde B antigène-dépendant. En effet, des marquages H3K9me2 (hétérochromatine facultative) et H4K20me3 (hétérochromatine constitutive) intenses sont observés au niveau de la zone du manteau des follicules lymphoïdes secondaires (cellules B naïves/mémoires) alors que les centres germinatifs contiennent très peu de cellules marquées (cellules B au contact de l'antigène et subissant des recombinaisons génétiques de type hypermutation somatique et commutation de classe) (fig. III.2). Le profil immunohistochimique observé pour H4K20me3 a été également retrouvé par une équipe japonaise, confirmant ainsi nos observations¹⁴⁷.

Par contre, très peu de différences de marquage sont observées entre cellules du centre germinatif et cellules des zones du manteau/marginales pour H3K9me3 (hétérochromatine constitutive) et H3K27me3 (hétérochromatine facultative). Pour ces deux marques, il semble que l'intensité du marquage soit légèrement plus faible dans les cellules du centre germinatif. Toutefois, les différences de densités cellulaires et de tailles nucléaires entre les deux compartiments ne permettent pas d'affirmer ces observations. Une étude plus fine utilisant des lecteurs laser par exemple pourrait peut-être confirmer.

Les différentes marques ont été également étudiées sur un échantillon de ganglion hyperplasique fixé en formol et les profils observés sont similaires à ceux obtenus sur les échantillons fixés en alcool-formol-acide acétique. Ainsi, il semble que la phase pré-analytique de fixation des prélèvements ne modifie pas les profils épigénétiques étudiés en immunohistochimie sur coupes paraffinées.

Les profils observés en western blot sur des lysats protéiques de lymphocytes B ganglionnaires triés au repos et activés par du CD40L sont semblables aux observations faites en immunohistochimie pour H4K20me3, H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3. Les différences mises en évidence pour les autres marques peuvent être dues à des modifications de la chromatine en lien avec la technique de conservation des cellules qui diffèrent entre les deux techniques.

ii. Profil des isoformes d'HP1

Comme attendu, les profils immunohistochimiques observés des trois isoformes d'HP1 sont différents (fig. III.2)^{42,82}. En effet, l'isoforme α a un profil associé au centre germinatif puisque les noyaux γ sont fortement marqués tandis que ceux des zones du manteau/marginale le sont très faiblement. L'isoforme β est présent dans les deux compartiments des follicules lymphoïdes avec un marquage nucléaire. Enfin, l'isoforme γ présente un marquage nucléaire plus intense dans le centre germinatif comparativement aux zones du manteau/marginales.

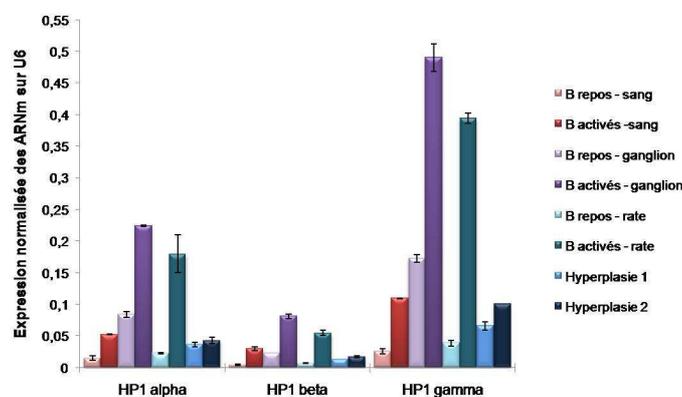


Figure III.3 : Expression des isoformes d'HP1. Histogrammes récapitulatifs des taux normalisés sur le gène contrôleur U6 des transcrits des trois isoformes d'HP1 de lymphocytes B normaux périphériques, ganglionnaires, spléniques et de deux cas d'hyperplasies ganglionnaires.

L'étude en PCR quantitative montre une expression augmentée des ARNm des trois isoformes d'HP1 lors de l'activation des lymphocytes par le CD40L *in vitro* mimant l'activation antigène dépendante. L'augmentation observée est variable (de 3 à 10 fois) en fonction des isoformes et du microenvironnement dont sont issus les lymphocytes B (fig. III.3). Ces résultats sont corrélés à ceux observés en immunohistochimie pour les isoformes α et γ . Pour l'isoforme β les profils obtenus en PCR quantitative (expression des ARNm) et

immunohistochimie ou en western-blot (expression des protéines) sont différents (fig. III.1a, 2 et 3). On peut penser que la transcription de cet isoforme est augmentée du fait de l'environnement cellulaire globalement activé et qu'en contrepartie la traduction est régulée dans les lymphocytes B activés.

Par ailleurs, on observe une dissociation entre les résultats obtenus en IHC et en western-blot pour les isoformes α et γ (fig. III.1a et 2). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les lysats protéiques utilisés sont issus de cellules B en suspension triées et activées *in vitro* tandis que les coupes en paraffine sont un reflet de l'organisation et de l'environnement *in vivo* des lymphocytes B. De plus, les western-blot n'ont pu être réalisés que sur un échantillon de lymphocytes B activés. Les profils observés n'ont par conséquent pas pu être confirmés sur un autre échantillon contrairement aux profils en immunohistochimie (observés sur échantillons différents fixés en formol ou en alcool-formol-acide acétique).

Ces marques généralement corrélées à l'hétérochromatine (état fermé transcriptionnellement inactif) sont associées à un statut cellulaire de prolifération au sein des ganglions réactionnels. Ceci peut s'expliquer par la dualité fonctionnelle décrite dans la littérature⁸². Leur localisation et leur présence semblent ainsi dépendre du contexte cellulaire, de signaux de prolifération et du stade de maturation.

iii. Marqueurs épigénétiques du centre germinatif

Physiologiquement, H4panAc (marque d'euchromatine) et HP1 α semblent être des marqueurs des cellules présentes dans les centres germinatifs. L'immunomarquage montre une coloration intense des noyaux dans ce compartiment où ont lieu les mécanismes accompagnant la maturation B antigène-dépendante (prolifération, hypermutations somatiques, commutations de classe) (fig. III.2). En western-blot, les résultats obtenus pour H4panAc semblent confirmer ceux obtenus en immunohistochimie (fig. III.1). Ces deux marques semblent donc associées à un phénotype B particulier dans les organes lymphoïdes périphériques.

L'isoforme γ d'HP1 semble enrichi dans les noyaux des cellules du centre germinatifs par rapport à ceux des zones du manteau/marginales. Son recrutement accentué pourrait participer aux phénomènes spécifiques se déroulant dans les centres germinatifs.

Le profil d'H4K20me1 se rapproche de celui d'HP1 γ . En effet, on observe une intensité de l'immunomarquage nucléaire renforcé dans certaines cellules du centre germinatif. Il est difficile d'établir le type cellulaire qui leur correspond avec les données que l'on a. Toutefois, le phénotype épigénétique H4K20me1 qu'elles présentent peut laisser envisager une activité particulière à une étape clé de la maturation antigène-dépendante.

iv. Profil épigénétique de la zone du manteau

Pour rappel, les lymphocytes B présents dans la zone du manteau sont des cellules naïves quiescentes. Il n'est donc pas étonnant d'observer une accentuation des marques d'hétérochromatine (H4K20me3, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3 et HP1 β) et un marquage faible pour H4panAc (marque d'euchromatine). Dans la zone du manteau, pas ou peu de lymphocytes B sont en cycle, la chromatine est majoritairement transcriptionnellement inactive (fig. III.2). Les observations faites en immunohistochimie sont par conséquent en accord avec la physiologie B des follicules lymphoïdes secondaires.

b. Modifications post-traductionnelles des histones H4 dans les lymphomes du manteau

L'étude immunohistochimique sur échantillons tumoraux de lymphome du manteau révèle des perturbations importantes des patrons de modifications d'histones au sein des MCL (fig. III.4). En particulier, la perte totale ou partielle de H4K20me3 est observée chez 9 patients sur 19 (47,4%). Cette perte est associée dans 1 cas (patient 13) à une accumulation de H4K20me1.

La perte partielle ou totale d'H4K20me1 est observée uniquement chez 3 patients sur 19 (15,6%). Cette marque semble par conséquent stable au cours du processus de cancérogenèse. Chez 2 de ces patients, on note une perte totale de H4K20me3 associée laissant supposer une anomalie globale de la voie de méthylation de la lysine 20 de l'histone H4. Concernant le troisième cas, le score anatomopathologique d'H4K20me3 est à 100. Le mécanisme semble différent des deux autres cas et oriente vers un défaut de déméthylation.

Les profils observés pour ces 19 cas pilotes ont été confirmés pour les cas présents sur les tissu-macroarrays (TMA) étudiés dans le cadre de protocoles du groupe du GOELAMS.

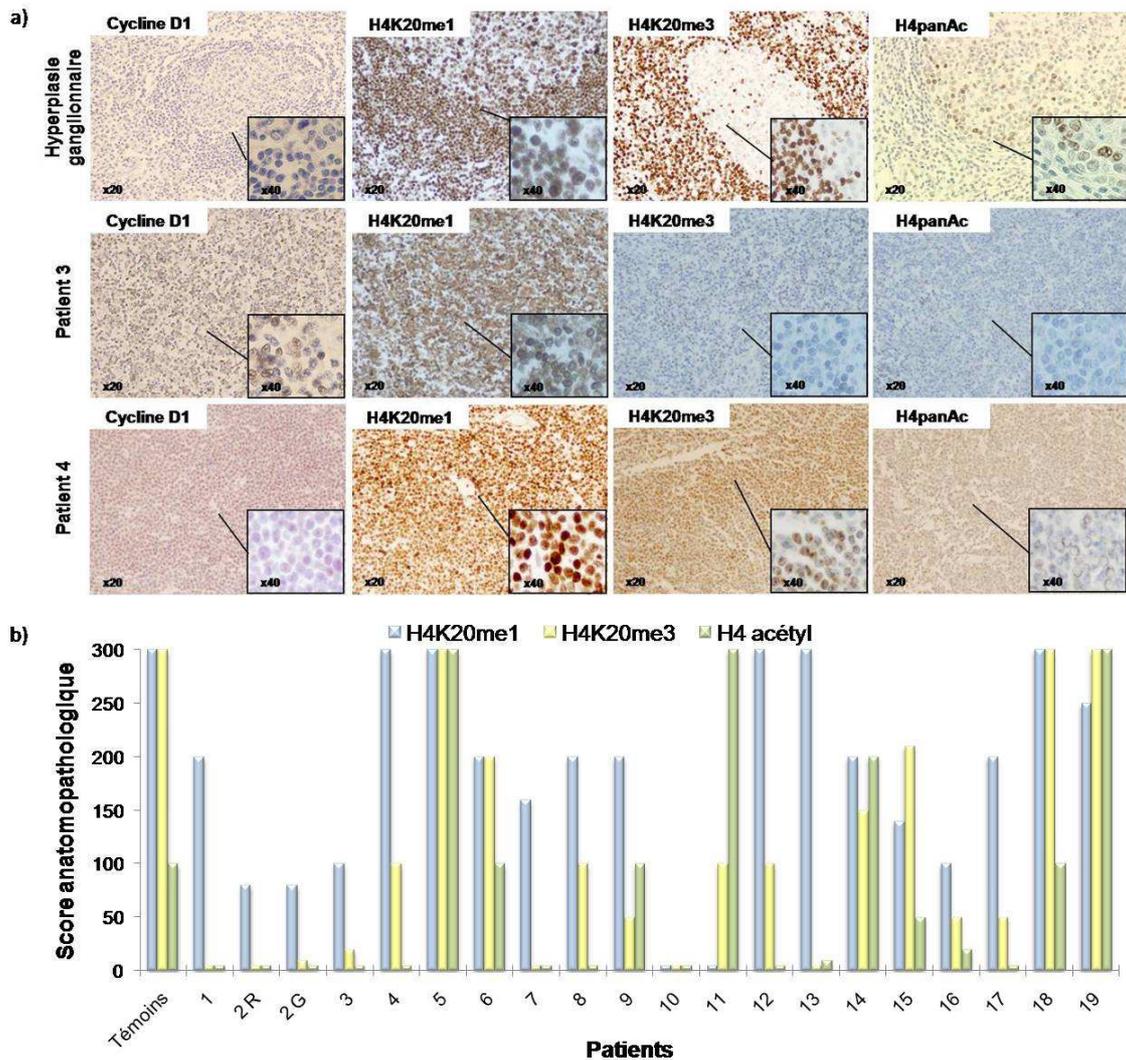


Figure III.4 : Profils des modifications post-traductionnelles touchant la queue N-terminale de l'histone H4 dans les lymphomes du manteau. a) Profil immunohistochimique de deux patients représentatifs des deux motifs observés pour les marques H4K20me1, H4K20me3 et H4panAc. La détection de la cycline D1 permet le marquage des cellules tumorales du MCL. L'intensité de marquage de la cycline D1 varie entre les patients. b) Histogramme récapitulatif de la fréquence des scores anatomopathologiques (pourcentage de cellules et intensité du marquage) des prélèvements de 19 patients MCL.

c. Méthylation des lysines de l'histone H3 dans les lymphomes du manteau

Pour H3K9me2 et H3K27me3, il y a une conservation de ces marques d'hétérochromatine facultative respectivement chez 11 (57,9%) et 6 (31,6%) patients sur 19. Les patrons modifiés par rapport aux témoins normaux pour H3K27me3 permettent d'envisager une perturbation de la voie répressive Polycomb dans les cellules tumorales chez certains patients (fig. III.6). La perte partielle ou totale de H3K9me2 semble fréquemment retrouvée dans les lymphomes du manteau et pourrait ainsi être une marque épigénétique de cette pathologie. On remarque également une perte partielle ou totale de H3K9me3 chez 7 patients sur 19 (36,8%). Cette perte est associée à une accumulation de H3K9me2 dans 1 cas.

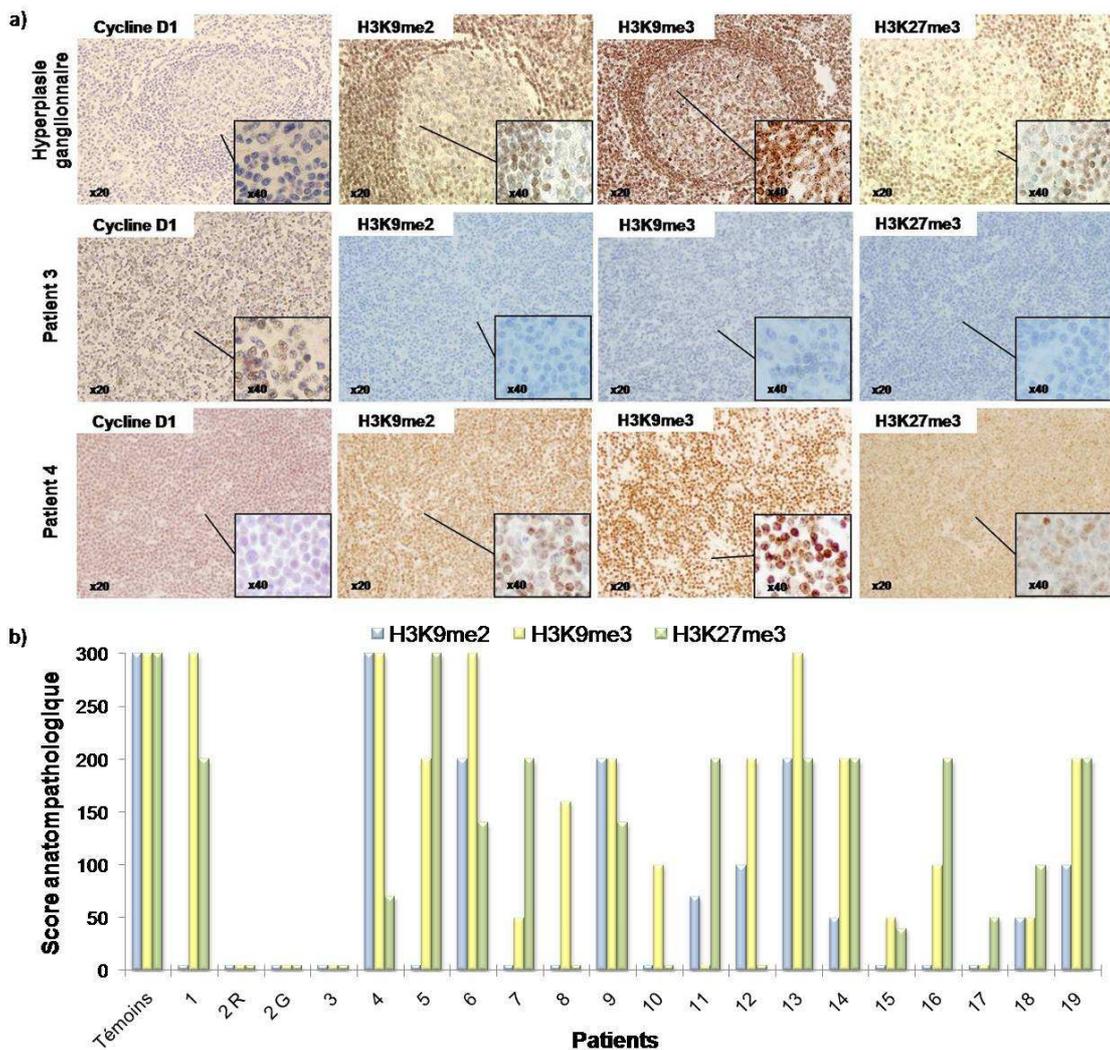


Figure III.5 : Profil de modifications post-traductionnelles de lysines N-terminales de l'histone H3 dans les lymphomes du manteau. a) Profil immunohistochimique de deux patients représentatifs des deux motifs observés pour les marques H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3. b) Histogramme récapitulatif des scores anatomopathologiques (pourcentage de cellules et intensité du marquage) des prélèvements de 19 patients MCL.

Enfin, on note une dissociation entre les deux principales marques d'hétérochromatine constitutive H3K9me3 et H4K20me3 chez 8 patients sur 19 (42%).

Ces profils se sont également confirmés sur les TMA.

d. Patrons des isoformes d'HP1 dans les lymphomes du manteau

En immunohistochimie, 42% (8/19) et 26% (5/19) des patients présentent respectivement une perte partielle ou totale des isoformes α et γ au niveau des échantillons tumoraux étudiés. Un marquage intense est noté chez 5 patients sur 19 (26%). L'absence ou la perte d'expression nucléaire d'HP1 β est observée chez 9 patients sur 19 (47,4%). La présence d'HP1 β au niveau du cytoplasme des cellules tumorales est observée dans 9 cas (fig. III.6).

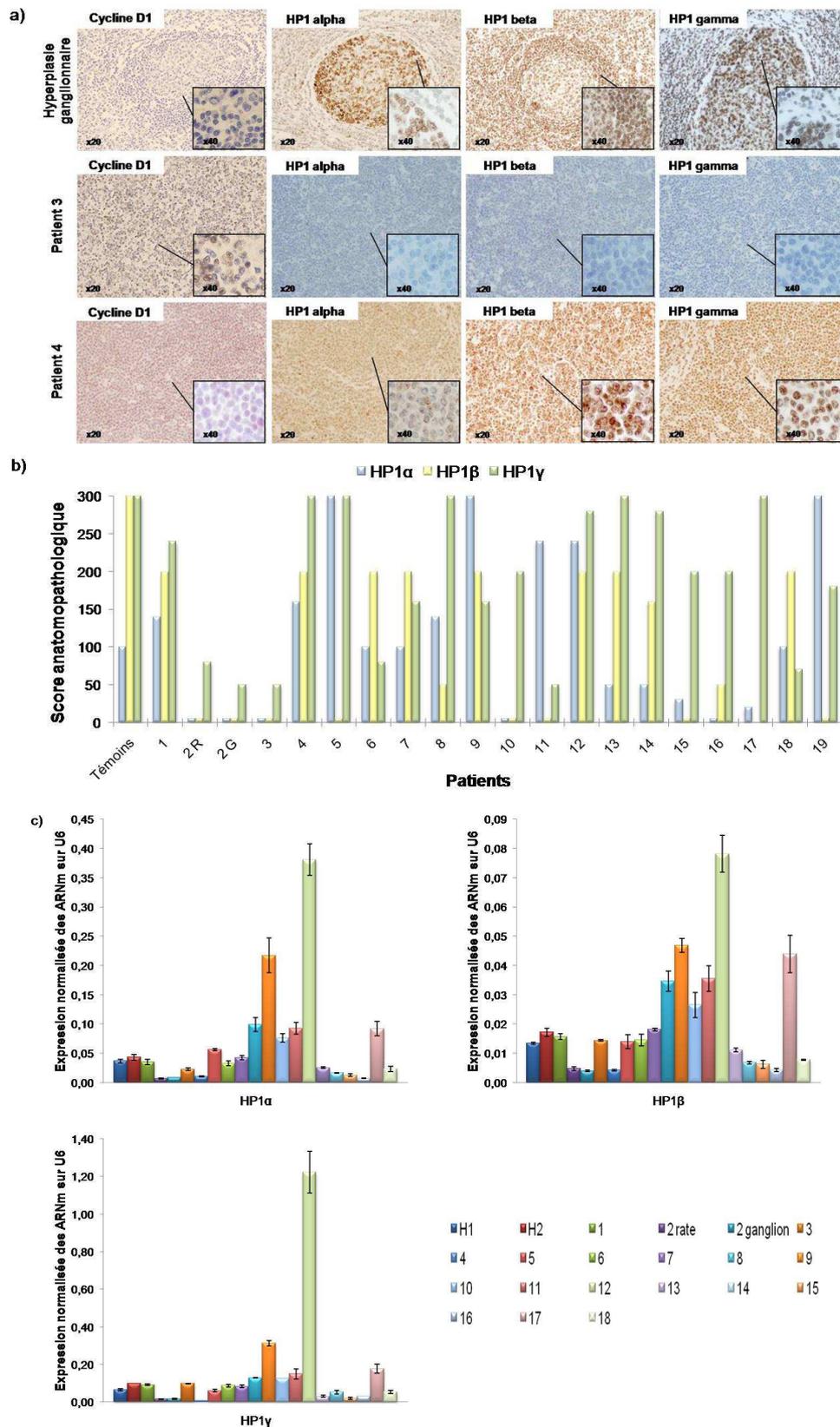


Figure III.6 : Expression des trois isoformes d'HP1 dans les lymphomes du manteau. a) Profil immunohistochimique de deux patients représentatifs des motifs observés pour HP1 α , HP1 β et HP1 γ . b) Histogramme récapitulatif des scores anatomopathologiques (pourcentage de cellules et intensité du marquage) des prélèvements de 19 patients MCL comparés aux scores observés au niveau des zones du manteau de prélèvements ganglionnaires réactionnels. c) Etude de l'expression des ARNm des trois isoformes d'HP1 en PCR quantitative chez 2 cas d'hyperplasies ganglionnaires (H1 et H2) et 18 cas de lymphome du manteau.

L'expression des ARNm des trois isoformes d'HP1 étudiée en PCR quantitative est dans la majorité des cas corrélée à l'expression protéique observée en immunohistochimie. Cependant, dans certains cas (patients 3, 10 et 17 notamment) on note une expression des ARNm normale ou augmentée en comparaison des hyperplasies ganglionnaires associée à une perte de la marque en immunohistochimie (fig. III.6). On peut supposer une perturbation de la traduction ou une dégradation anormale de ces protéines chez ces patients. De plus, chez 6 patients (4, 6, 7, 13, 15 et 16) une diminution de l'expression de l'ARNm de l'isoforme γ est associée à un marquage des cellules tumorales en immunohistochimie (fig. III.6). Pour ces cas, il semble y avoir une accumulation de l'isoforme γ dans les cellules tumorales avec de potentielles conséquences sur l'état de la chromatine et la régulation transcriptionnelle.

Par ailleurs, on remarque que la perte d'HP1 β semble associée à celle de H3K9me3. Ceci peut laisser supposer une interaction importante entre HP1 β et les Suv39h qui triméthylent H3K9 dans les cellules MCL.

e. Un ou des profils épigénétiques dans le lymphome du manteau ?

De façon tout à fait remarquable, deux grands profils épigénétiques d'hétérochromatine constitutive sont observés au sein de l'entité lymphome du manteau. Environ 1/3 des cas étudiés présentent une perturbation partielle ou totale de l'hétérochromatine constitutive (H3K9me3, H4K20me3 et HP1) en immunohistochimie (fig. III.7a, patients 1 à 3). De la même façon, deux profils pour l'hétérochromatine facultative sont mis en évidence. Environ la moitié des patients étudiés présentent une perturbation partielle ou totale des marques H3K9me2 et H3K27me3 (fig. III.7a, patients 1 à 3).

Les lysats protéiques de cinq patients (correspondant à 6 échantillons), pour lesquels du matériel était disponible, ont été étudiés en western-blot et comparés aux données obtenues en immunohistochimie (fig. III.7b). Pour l'ensemble des marques étudiées on retrouve deux profils : des cas avec un marquage fort et des cas avec un marquage faible. Toutefois, les résultats en western-blot sont corrélés pour seulement 3 échantillons sur 6 à ceux obtenus en immunohistochimie et seraient à confirmer car réalisés qu'une seule fois.

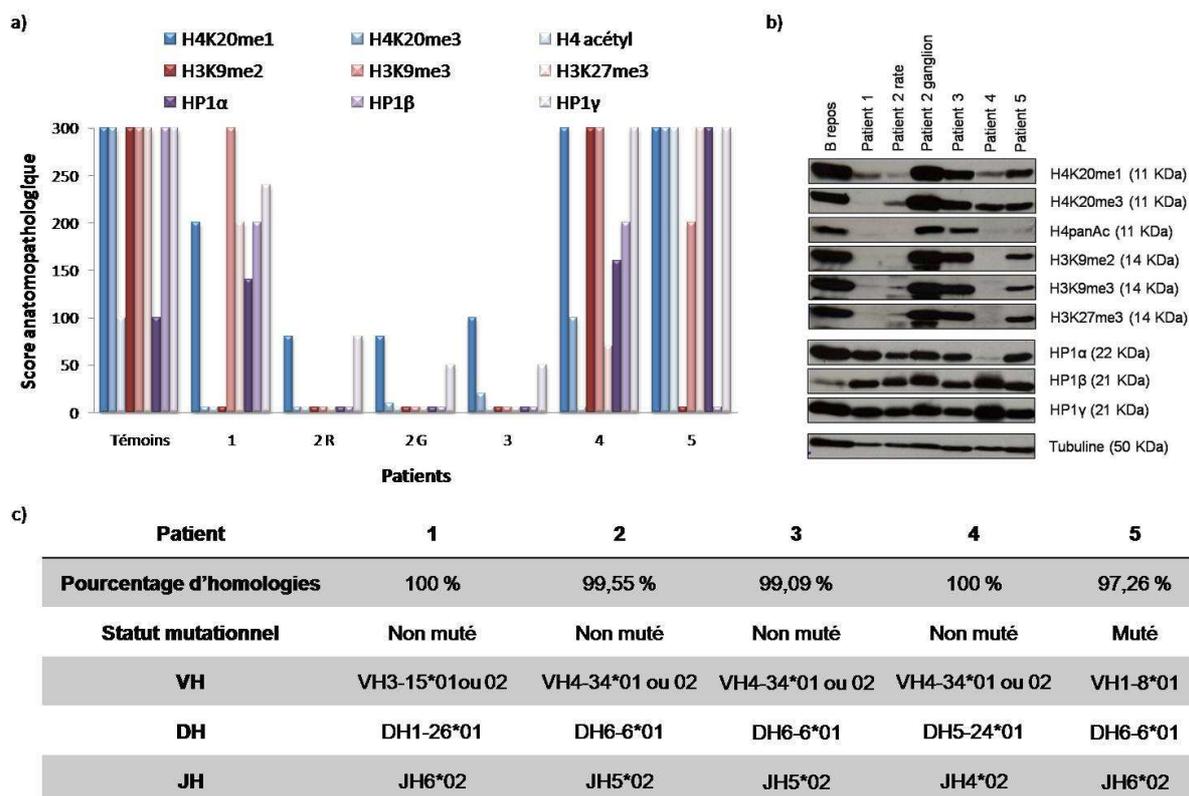


Figure III.7 : Profils épigénétiques observés dans le lymphome du manteau. a) Histogrammes représentant les profils immunohistochimiques de modifications post-traductionnelles des histones H3 et H4 ainsi que des trois isoformes d'HP1 observés chez les cas d'hyperplasies ganglionnaires (témoins) et 5 cas de lymphomes du manteau. b) Résultats obtenus en western-blot pour des lysats protéiques totaux de lymphocytes B repos triés et de prélèvements spléniques ou ganglionnaires de 5 patients atteints d'un lymphome du manteau. L'étude de la tubuline est utilisée comme contrôle de dépôt. c) Tableau récapitulatif du statut mutationnel des 5 patients MCL, ainsi que les gènes V, D et J codant pour les chaînes lourdes d'immunoglobulines dans les cellules tumorales.

De façon tout à fait surprenante et inattendue, les western-blots pour H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3 révèlent pour le patient 2 ce qui semble être un variant de l'histone 3 non mis en évidence chez les autres patients. Étant donné que cette observation est faite avec trois anticorps différents et que le poids moléculaire est un peu plus faible, on peut penser qu'il s'agit d'un variant de l'histone H3 tronqué au niveau de la partie C-terminale de la protéine.

Aux vues des données présentées, nous émettons deux hypothèses pour expliquer les profils épigénétiques observés dans les lymphomes du manteau. La première hypothèse correspond à la dérégulation acquise des modifications d'histones et de l'expression des HP1 au cours du processus de lymphomagenèse du MCL. Cette hypothèse est celle couramment décrite dans la littérature dans les tumeurs solides. Toutefois, il reste à déterminer les mécanismes qui en sont à l'origine et l'implication physiopathologique de ces anomalies dans le MCL. La deuxième hypothèse se base sur les données publiées par l'équipe de Matsuda *et al.* Elle suppose que les profils observés sont en fait le reflet de l'origine cellulaire des cellules MCL¹⁴⁷. Dans ce cas, les marques épigénétiques ne seraient pas perdues mais conservées au cours du processus de lymphomagenèse et pourraient ainsi être une aide au diagnostic.

Pour étayer une de ces deux hypothèses, nous avons étudié par séquençage le statut mutationnel des chaînes lourdes d'immunoglobulines. En effet, l'engagement du récepteur à l'antigène du lymphocyte B induit l'expression de l'enzyme AID responsable du processus d'hypermutations somatiques et de commutation de classe. Ainsi, l'étude du statut mutationnel des gènes VH permet de distinguer les cellules B naïves des cellules B activées par l'antigène (d'origine centro-folliculaire ou post-centre germinatif). Les cellules présentant un pourcentage d'identités $\leq 98\%$ avec la séquence sauvage des chaînes lourdes d'immunoglobulines sont considérées comme mutées et ne sont plus naïves de toutes interactions antigéniques. Les résultats obtenus montrent que seuls 4 patients présentent un génotype muté qui n'est pas associé à un phénotype épigénétique particulier (fig. III.7c) (annexe 7). Par conséquent, l'hypothèse de la dérégulation acquise de l'hétérochromatine au cours de la lymphomagenèse est celle qui semble la plus plausible d'après ces données.

Enfin, on observe une restriction de l'utilisation des segments VH des gènes d'immunoglobulines dans la série de patients étudiés. En effet, 7 patients sur 19 présentent un segment VH3-21 et 4 sur 19 un segment VH4-34. Cette observation est également décrite dans la littérature. Dans notre cohorte, les segments VH4-34 sont associés dans les 4 cas à la perte partielle ou totale de H3K9me2 et d'HP1 β en immunohistochimie. Pour les patients VH3-21, il n'y a pas de profil épigénétique associé à l'utilisation de ce segment. Par ailleurs, il ne semble pas que l'utilisation des segments VH ait une incidence sur la survie globale dans notre cohorte. Ceci reste bien évidemment à confirmer par des analyses statistiques sur une cohorte homogène plus importante.

3. Expression de gènes modificateurs de la méthylation de lysines des histones H3 et H4

Compte-tenu des résultats obtenus en western-blot et en immunofluorescence dans les lignées lymphomateuses couplés aux perturbations épigénétiques observées au cours des études immunohistochimiques chez les patients atteints de MCL, il a été décidé d'étudier, par RT-Q-PCR, les profils d'expression des ARNm encodant les histones méthyltransférases (tableau II.3). Au total, 19 prélèvements tissulaires de 18 patients MCL, 2 hyperplasies ganglionnaires, 4 lignées de lymphomes, des lymphocytes B triés au repos et activés par du CD40L ont été étudiés.

a. Variations physiologiques

De façon tout à fait intéressante, on remarque une différence d'expression entre les lymphocytes B repos et ceux activés par le CD40L pour Suv4-20h2, Suv39h1/2 et EZH2 dans les trois compartiments étudiés, sous-tendant leur rôles lors de l'activation antigène-

dépendante des lymphocytes B. Concernant Pr-Set7 et Suv4-20h1 la variation entre B repos et B activés diffère selon les compartiments dont sont issus les cellules. On peut ainsi supposer l'intervention du microenvironnement.

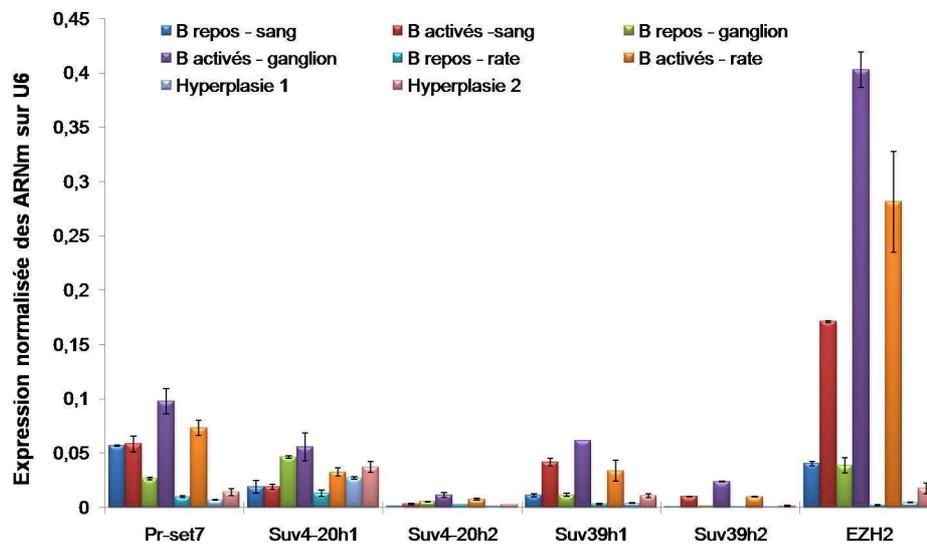


Figure III.8 : Histogramme récapitulatif du taux d'expression des transcrits de six histones méthyltransférases dans des lymphocytes B au repos et activés par du CD40L *in vitro* triés à partir de sang périphérique, d'amygdales et de rate. Deux cas d'hyperplasies ganglionnaires étudiées en immunohistochimie ont également été analysés en PCR quantitative. Pr-set7 est responsable de la monométhylation de H4K20. Les Suv4-20h sont responsables de la di- et triméthylation de H4K20. Les Suv39h triméthylent H3K9. La protéine du groupe Polycomb EZH2 triméthyle H3K27. L'expression des ARNm étudiés est normalisée par rapport à celle du gène contrôle U6.

On note également des différences d'expression (de facteurs 2 à 4) entre les deux cas d'hyperplasies ganglionnaires étudiés pour Pr-set7, Suv39h1/2 et EZH2, laissant présager des variations physiologiques interindividuelles (fig. III.8).

b. Dérégulation de l'expression des histones méthyltransférases dans les MCL

Concernant les patients MCL, on observe des différences d'expression de 2 log pour Suv4-20h2, Suv39h1/2 et EZH2 entre les patients. Les profils d'expression de ces enzymes sont variables selon les cas ce qui peut s'expliquer, d'une part, par des variations physiologiques interindividuelles et, d'autre part, par une dérégulation de l'expression de ces enzymes en lien avec la lymphomagenèse (fig. III.9). Pour s'affranchir de la différence physiologique, il faudrait idéalement étudier en parallèle leur expression dans les lymphocytes B normaux de chaque patient. Ceci n'a pas pu être réalisé par manque de matériel. De plus, la réalisation paraît difficile étant donné la circulation fréquente de cellules tumorales dans le MCL.

La perte des marques épigénétiques en immunohistochimie ne semble pas corrélée à une diminution de l'expression des histones méthyltransférases les mettant en place en PCR quantitative. Toutefois, dans quelques cas on note une corrélation. Une diminution de

l'expression des Suv4-20h1 et Suv4-20h2 associée à l'absence de marquage H4K20me3 en immunohistochimie est observée pour le patient 2 (fig. III.9a). Ce cas est particulièrement intéressant puisqu'il y a une différence d'expression de Suv4-20h1 entre la rate (absence totale de marquage H4K20me3) et le ganglion (très faible marquage d'environ 10% des cellules présentent dans l'échantillon). Ainsi, on peut supposer que dans le ganglion l'expression en plus grande quantité de l'ARNm de Suv4-20h1 permet en partie de compenser la perte d'expression de Suv4-20h2, normalement responsable de la triméthylation de H4K20 en première ligne. Autre exemple, on observe pour le patient 15 une baisse franche d'expression des Suv39h1 et Suv39h2 associée à un score anatomopathologique d'H3K9me3 faible (fig. III.9c).

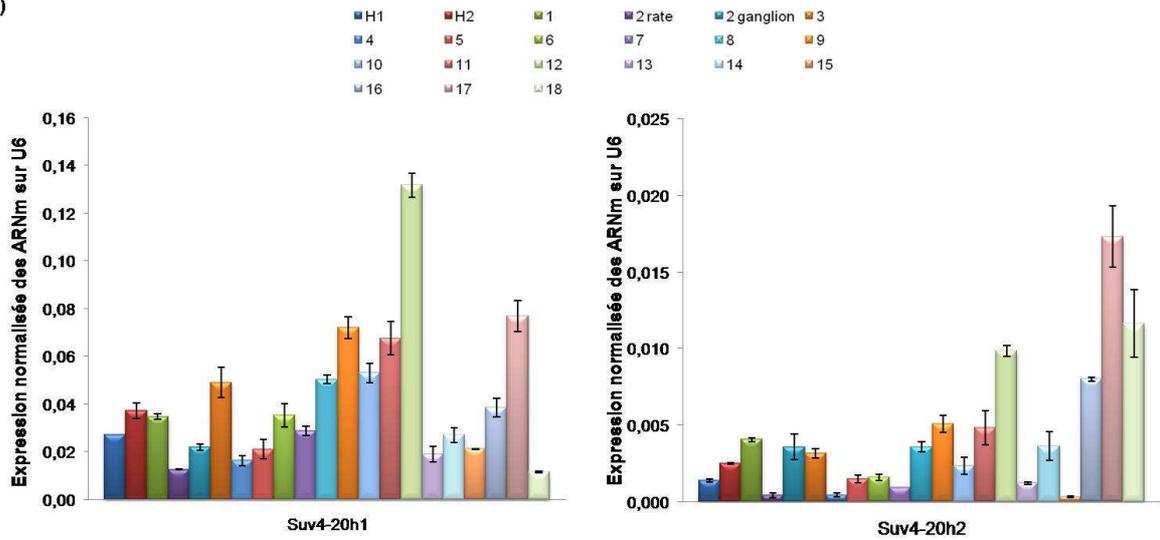
En comparant les profils d'expression des trois isoformes d'HP1 et des Suv39h, il semble que ceux de l'isoforme β soient proches de ceux de Suv39h1 et que ceux de l'isoforme γ le soient de ceux de Suv39h2. Ceci peut laisser supposer des interactions fortes préférentielles entre ces protéines dans les lymphocytes du MCL (fig. III. 6b et 9c).

L'expression de ces enzymes n'est pas systématiquement corrélée à une anomalie chromosomique détectée au caryotype. Cependant, il serait intéressant de confirmer les données caryotypiques par une étude en hybridation fluorescente *in situ* (FISH) au niveau des loci spécifiques des enzymes (fig. III.9).

L'ensemble des données d'expression de certaines histones méthyltransférases et des profils immunohistochimiques laissent sous-entendre des mécanismes de dérégulation autres que la diminution/augmentation de l'expression ou la délétion/le gain des gènes les codant.

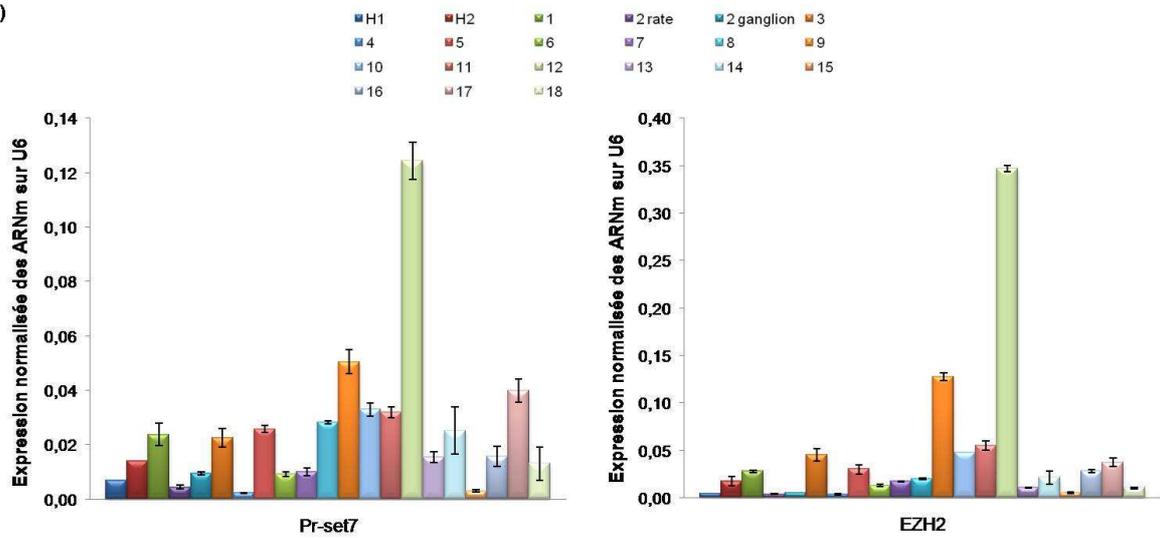
Dans le contexte de la recherche de marqueurs épigénétiques pronostiques dans les cancers solides, nous avons commencé à évaluer l'intérêt pronostique de l'expression des histones méthyltransférases étudiées par comparaison avec les facteurs pronostiques Ki67 et MIP1 (fig. III.9). Cette première approche ne révèle pas de lien dans le groupe de 18 patients étudiés. Cette évaluation devra être menée sur une population plus importante et plus homogène pour pouvoir réaliser une étude statistique convenable.

a)



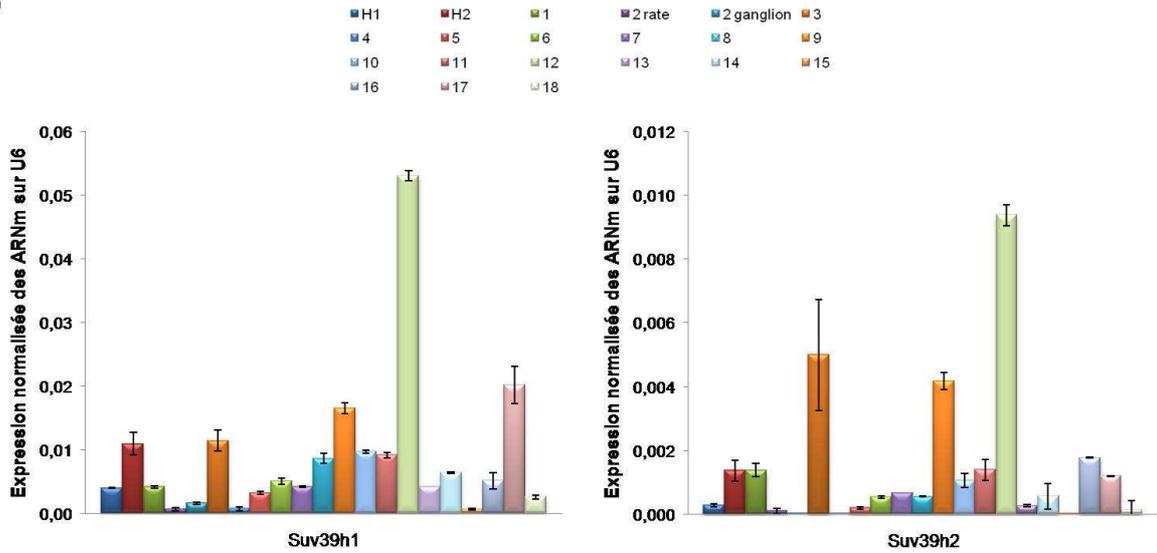
Patients	H1	H2	1	2R	2G	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Score H4K20me3	300	300	0	0	10	20	100	300	200	0	100	50	0	100	100	0	150	210	50	50	300	
Ki67	CG	CG	50	10	10	10	15	10	20	5	5	10	13	10	8	8	10	20	10	10	10	
MIPI	/	/	8,2	5,7	5,7	6,5	5,7	5,1	6,1	6,2			5,7	5,4	4,7		7,5	6	5,3	6	6,3	5,1
Anomalie en 11q13	non	non	t	t	t	t	t	t	t	non	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
Anomalie en 19q13	non	non	non	add	add	non	non	nm	non													

b)



Patients	H1	H2	1	2R	2G	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Score H4K20me1	300	200	200	80	80	100	300	300	200	160	200	200	0	0	300	300	200	140	100	200	300	
Score H3K27me3	300	200	200	0	0	0	70	300	140	200	0	140	0	200	0	200	200	40	200	50	100	
Ki67	CG	CG	50	10	10	10	15	10	20	5	5	10	13	10	8	8	10	20	10	10	10	
MIPI	/	/	8,2	5,7	5,7	6,5	5,7	5,1	6,1	6,2			5,7	5,4	4,7		7,5	6	5,3	6	6,3	5,1
Anomalie en 12q24	non	del	non																			
Anomalie en 7q35-36	non	non	non	del	del	non	del	??	non	non												

c)



Patients	H1	H2	1	2R	2G	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Score H3K9me3	300	200	300	0	0	0	300	200	300	50	160	200	100	0	200	300	200	50	100	0	50
Ki67	CG	CG	50	10	10	10	15	10	20	5	5	10	13	10	8	8	10	20	10	10	10
MIPI	/	/	8,2	5,7	5,7	6,5	5,7	5,1	6,1	6,2		5,7	5,4	4,7		7,5	6	5,3	6	6,3	5,1
Anomalie en Xp11	non	add	non	del	t																
Anomalie en 10p13	non	del	non	non	non	non	del	non	non	non											

Figure III.9 : Expression des histones méthyltransférases responsables de la méthylation de H4K20, H3K27 et H3K9. Histogrammes récapitulatifs des taux normalisés de transcrits des différentes histones méthyltransférases dans deux cas d’hyperplasies ganglionnaires et 18 cas de lymphomes du manteau : a) Suv4-20h1 et Suv4-20h2 responsables de la triméthylation de H4K20 ; b) Pr-Set7 qui monométhyle H4K20, EZH2 triméthylant H3K27 ; c) Suv39h1 et Suv39h2 responsables de la triméthylation de H3K9. Les tableaux récapitulent les scores immunohistochimiques des modifications post-traductionnelles mises en place par les histones méthyltransférases des patients. Le score du Ki67, le MIPI ainsi que les anomalies cytotypiques éventuellement observées au niveau des loci des gènes codant pour les enzymes étudiées sont également indiqués. Un MIPI < 5,7 correspond au groupe de risque faible, entre 5,7 et 6,2 au groupe de risque intermédiaire et ≥ 6,2 au groupe à fort risque. Pour les patients 8 et 12, le MIPI n’a pas pu être calculé car certaines données n’étaient pas disponibles puisque non réalisées au diagnostic. H : hyperplasie ganglionnaire, add : addition, del : délétion, t : translocation.

c. Corrélation de l’expression de Suv4-20h1 avec le statut MTC

Dans le contexte d’une dérégulation de l’expression de certaines histones méthyltransférases non associée à des anomalies chromosomiques, il est tout à fait intéressant que le gène codant pour Suv4-20h1 soit localisé à environ 1,5 mégabases (Mb) du gène de la cycline D1 en 11q13 (fig. III.10). On peut ainsi supposer une perturbation d’origine épigénétique de l’expression de cette enzyme au niveau du dérivé du chromosome 11 dans le cadre de la t(11;14)(q13;q32) caractérisant les lymphomes du manteau.

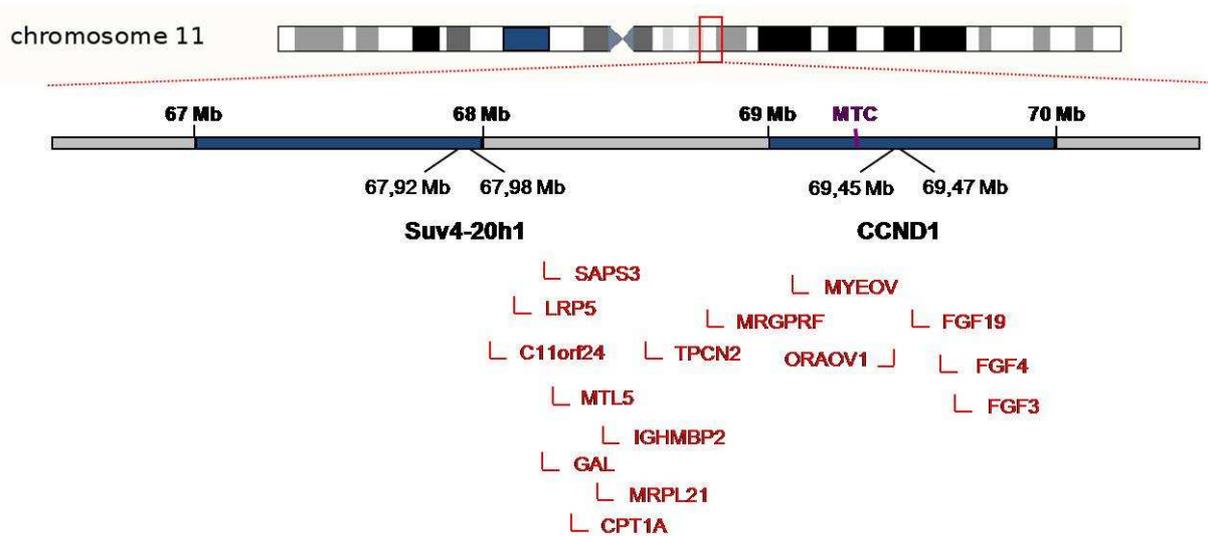


Figure III.10 : Carte génomique de la région 11q13. Le gène CCND1 codant pour la cycline D1 est localisé à environ 1,5 Mb télomérique du gène codant pour l'histone méthyltransférase Suv4-20h1. Le Major Translocation Cluster (MTC) de la t(11;14)(q13;q32) est indiqué. L'ensemble des gènes présents entre CCND1 et Suv4-20h1 sont placés et marqués en rouge.

En effet, la juxtaposition d'un fragment d'un des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines en 11q13 pourrait entraîner une modification de l'état de la chromatine au niveau des loci en amont, puisque constitutivement exprimé dans les lymphocytes B. Ainsi, nous avons souhaité savoir si l'expression de Suv4-20h1 pouvait être influencée par le type de point de cassure de la t(11;14)(q13;q32) au niveau du chromosome 11. Pour cela, nous avons recherché la présence du point de cassure MTC (Major Translocation Cluster) par PCR. Sur notre série de 19 patients, il ne semble pas y avoir de différence statistiquement significative entre le groupe MTC+ et le groupe MTC- (fig. III.11). Toutefois, il s'agit d'une petite série de patients. Sur le graphique présenté ci-dessous, on note quand même une légère tendance à une expression augmentée de Suv4-20h1 dans le groupe MTC+. Cette tendance a pu également être observée sur des prélèvements sanguins de patients étudiés dans les tissu-macroarrays en immunohistochimie.

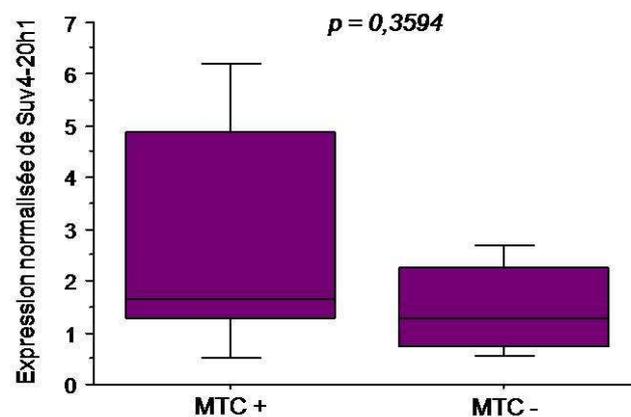


Figure III.11 : Graphe en boîtes représentant l'expression de l'histone méthyltransférase Suv4-20h1 en fonction du type de point de cassure de la t(11;14)(q13;q32) au niveau du chromosome 11. La p value est indiquée en italique.

Il sera par conséquent intéressant de contrôler ces données sur une plus grande population de patients, d'analyser l'expression de l'ensemble des gènes en 11q13 (fig. III.10) et de les compléter avec des études de la chromatine par immunoprécipitation de la chromatine analysée en PCR quantitative au niveau de ces loci.

DISCUSSION

Il est maintenant bien établi qu'un surcroît d'hétérochromatine a pour conséquence la répression excessive de gènes suppresseurs de tumeurs ou de groupes de gènes un peu partout dans le génome, par effet de position notamment. En contrepartie, la perte d'hétérochromatine peut aboutir à la dérégulation d'oncogènes. Par conséquent, il est aisé de comprendre que la présence d'anomalies de l'hétérochromatine peut favoriser les processus de cancérogénèse par instabilité du génome. En se basant sur la mise en évidence de l'implication des réarrangements de l'hétérochromatine constitutive 1q12 sur la dérégulation de l'expression de gènes pertinents et sur la corrélation des profils épigénétiques à des profils transcriptomiques particuliers dans les lymphomes B diffus à grandes cellules, nous nous sommes intéressés à ces notions dans une pathologie encore incurable, le lymphome du manteau⁵⁹.

Cette étude pilote de « profiling » épigénétique au sein des lymphomes du manteau apporte un éclairage nouveau sur le rôle potentiel de la dynamique du remodelage de la chromatine au cours de la lymphopoïèse B normale et tumorale. Nos données montrent pour la première fois une organisation micro-anatomique hiérarchisée des modifications d'histones au sein des ganglions lymphatiques normaux et dévoilent des perturbations de cette organisation au sein des MCL. Plus précisément, les zones du manteau et marginale des ganglions lymphatiques normaux présentent des modifications d'histones corrélées à l'hétérochromatine constitutive et facultative tandis que les cellules du centre germinatif les perdent au profit d'une acétylation corrélée à l'euchromatine (fig. IV.1). De plus, ces observations bouleversent la notion de remarquable stabilité de l'hétérochromatine constitutive qui la définit¹⁰⁰.

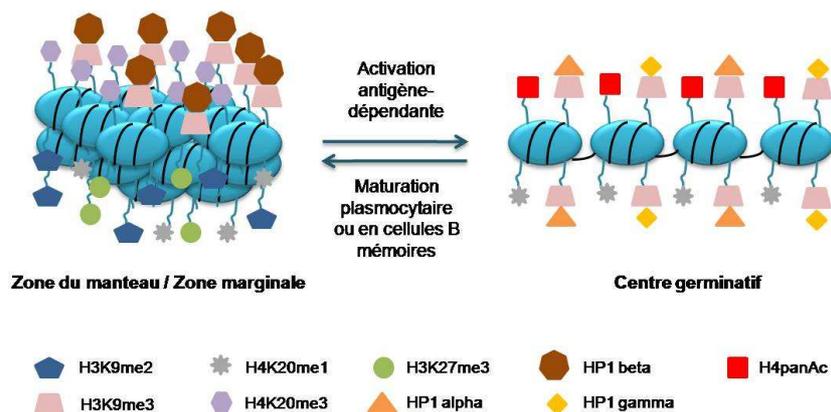


Figure IV.1 : Schéma récapitulatif des marques épigénétiques associées aux zones du manteau/marginales et au centre germinatif. Les cellules des zones du manteau/marginales (cellules physiologiquement quiescentes) sont associées à un état hétérochromatinien transcriptionnellement peu actif. Les cellules des centres germinatifs (cellules en prolifération, subissant les mécanismes d'hypermutations somatiques et de commutations de classe) sont plutôt associées à un état euchromatinien transcriptionnellement très actif.

De manière intéressante, des profils épigénétiques aberrants, avec notamment la perte de H4K20me3 – marque d'hétérochromatine constitutive –, ont été observés au sein des

lymphomes du manteau. En effet pour cette marque, il semble coexister deux profils épigénétiques distincts : des cas négatifs et des cas fortement positifs, ce qui laisse envisager l'existence de sous-types épigénétiques au sein de cette entité. De plus, d'autres données immunohistochimiques / transcriptomiques (puces Affymetrix) obtenues au laboratoire viennent conforter cette hypothèse en montrant qu'il existe des profils transcriptionnels spécifiques associés à ces patrons de modifications d'histones au sein des lymphomes. Toutefois, ces données semblent contredites par une étude menée en immunohistochimie sur 7 cas de MCL et 8 cas de lymphomes folliculaires. Elles montrent que les cellules lymphomateuses présentent des motifs spécifiques de modification globale d'histones (H4K20me3, H3K18Ac, H3R17me2) correspondant à leur contrepartie normale. Ces marques épigénétiques constituant dans cette étude une « carte d'identité » pourraient ainsi être utilisés à des fins diagnostiques¹⁴⁷. Or, l'étude du statut mutationnel des chaînes lourdes d'immunoglobulines dans notre série de patients est en faveur d'une perte des modifications d'histones associées au processus de lymphomagenèse du MCL plutôt que d'une « carte d'identité » en lien avec l'origine cellulaire des lymphocytes tumoraux.

La perturbation des compartiments chromatiniens enrichis en H4K20me3 (régions (péri)centromériques et télomériques) peut provoquer à la fois une instabilité génomique et une dérégulation de l'expression des gènes, notamment la dérégulation de l'expression de gènes tissu-spécifiques ou soumis à l'empreinte (perte du « silencing » génique), contribuant par conséquent au processus de lymphomagenèse.

Les compartiments d'hétérochromatine facultative semblent également subir des réorganisations très dynamiques au cours de la différenciation lymphocytaire B normale antigène-dépendante (données immunohistochimiques et western-blot). Ceci avait déjà été évoqué chez la souris mais n'est pas clairement décrit chez l'homme¹⁷⁵. Cette organisation semble largement perturbée dans les cellules de lymphomes du manteau. A titre d'exemple, l'étude des modifications H3K9me2 et H3K27me3 chez des patients atteints de MCL, révèle deux profils différents : des cas négatifs et des cas positifs. De telles perturbations pourraient provoquer la dérégulation de programmes transcriptionnels particuliers, notamment celles des voies Polycomb.

Dans les cancers du sein, il est décrit que les altérations épigénétiques globales sont retrouvées dans les cellules tumorales, les cellules stromales et les cellules du myoépithélium. Ceci suggère que l'ensemble du microenvironnement tumoral, incluant les cellules apparemment normales, est la cible de perturbations épigénétiques⁵³. Dans la majorité des cas de lymphomes du manteau étudiés, nous avons observés une dissociation du marquage en immunohistochimie entre les cellules d'un même échantillon pour l'ensemble des modifications d'histones et les trois isoformes d'HP1 étudiés. En effet, une perte ou un gain sont parfois observés dans 20 à 90% des cellules de l'échantillon. Pour ces cas, un double marquage cycline D1/modification d'histone ou isoforme d'HP1 serait particulièrement intéressant pour savoir s'il s'agit d'une dissociation des perturbations

épigénétiques entre les cellules tumorales et le microenvironnement ou uniquement entre les cellules tumorales. Ces patterns pourraient être le reflet du début d'une perturbation globale de la chromatine ou bien d'une tentative de régulation/correction des anomalies via les cellules du microenvironnement.

Ce travail s'est également attaché à étudier les profils épigénétiques de lignées de lymphomes B dans le but d'identifier des lignées modèles nous permettant, *in fine*, d'aborder les mécanismes moléculaires précis sous-tendant la perte de H4K20me3 observée chez nos patients atteints de lymphome du manteau. A cet égard, un résultat intéressant concerne la perte dramatique des taux de H4K20me3 dans la lignée MCL Granta, phénomène associé à une désorganisation nette de la distribution nucléaire des HP1, sans accumulation / perturbation aberrante d'autres modifications d'histones ou de l'accumulation de la forme monométhylée de H4K20. La désorganisation de la répartition nucléaire des isoformes d'HP1 est particulièrement intéressante puisqu'il est actuellement démontré que ces isoformes sont enrichies non seulement au niveau des régions d'hétérochromatine constitutive (via la liaison du chromodomaine d'HP1 à H3K9me3) mais sont également retrouvées au niveau de gènes actifs^{42,138}. Il serait donc intéressant de voir si le profil HP1 diffus, observé dans les cellules MCL Granta, reflète une redistribution de ces isoformes au niveau des séquences géniques qui pourraient subir par la suite des dérégulations transcriptionnelles. Ainsi, il est intéressant de noter que l'isoforme HP1 γ , qui a la particularité d'avoir des sites de liaisons spécifiques à la fois dans les domaines d'hétérochromatine et d'euchromatine contrairement à HP1 α et à HP1 β , participe à la répression et à l'activation transcriptionnelle via E2F notamment^{82,138}. Par ailleurs, la dynamique des isoformes d'HP1 dans le noyau lors de changements de microenvironnements semble en faire des outils intéressants pour le typage de populations cellulaires possédant des potentiels développementaux différents⁴². Ceci renforce l'intérêt d'avoir comme modèle d'étude des phénomènes observés chez les patients.

En tenant compte du rôle clé de l'hétérochromatine constitutive dans la régulation tissu- et allèle-spécifique de l'expression des gènes, il est tout à fait raisonnable de proposer l'hypothèse de la dérégulation de ces mécanismes fondamentaux dans les cellules lymphomateuses. Les données obtenues laissent supposer le rôle important de certaines histones méthyltransférases (Suv4-20h2, Suv39h1/2, EZH2) lors de l'activation / prolifération des lymphocytes B antigène-dépendante. Physiologiquement, les taux d'expression de ces enzymes sont relativement faibles dans les lymphocytes B et semblent présenter des variations interindividuelles. Malgré cela chez les patients MCL, on observe des profils d'expression *a priori* différents pour les différentes enzymes étudiées ce qui serait en accord avec notre hypothèse. De plus, il semble y avoir une corrélation entre la perte de H3K9me3 et de H4K20me3 observée en immunohistochimie chez quelques patients et une diminution de l'expression des Suv39h (triméthylation de H3K9) et des Suv4-20h (triméthylation de H4K20me3) responsables de leurs mises en place. Actuellement, il existe peu de données concernant la voie H4K20me3 lors de l'activation antigène-dépendante. Dans un modèle de

souris, les cellules B Suv4-20h^{-/-} sont défectueuses pour la recombinaison et la commutation de classe des immunoglobulines et on observe une diminution du pool de progéniteurs B¹⁹². L'expression dérégulée de certaines histones méthyltransférases pourrait donc favoriser l'émergence d'un clone malin / pré-malin au niveau du compartiment des précurseurs B et/ou contribuer à l'instabilité génétique. A cet égard, il est tout à fait remarquable qu'une enzyme clé, Suv4-20h1, qui contrôle la mise en place de la di/triméthylation de H4K20, soit localisée à seulement 1,5 Mb en amont du gène codant la cycline D1 en 11q13. Ce gène pourrait donc être une cible de dérégulation transcriptionnelle au cours de la t(11;14), évènement potentiellement initiateur du processus de lymphomagenèse dans les MCL. Une première approche, comparant l'expression de l'ARNm de Suv4-20h1 et le type de point de cassure de la t(11;14), n'apporte pas de réponse statistiquement significative mais une tendance à approfondir sur une population plus importante. L'étude de l'expression des gènes présents au niveau du locus 11q13 associée à une analyse fine de l'état chromatinien permettrait de compléter cette problématique.

Par ailleurs, il semble que la perte d'expression de ces enzymes ne soit pas le seul mécanisme à l'origine de perturbation des marques épigénétiques étudiées. Très récemment, il a été montré des mutations somatiques récurrentes dans le gène codant pour EZH2 dans 21 % des cas de lymphomes diffus à grandes cellules (sous-type B du centre germinatif), dans 7 % des lymphomes folliculaires et non détectées dans les lymphomes du manteau. Ces mutations aboutissent à la substitution d'une seule tyrosine (Tyr641) dans le domaine SET de la protéine EZH2 qui présente une activité enzymatique réduite *in vitro*¹⁵³. Cette étude est particulièrement intéressante et entrouvre l'hypothèse de dérégulation de l'activité enzymatique des histones méthyltransférases par mutation. Ainsi, nous souhaitons par la suite rechercher d'éventuelles mutations dans les domaines SET des Suv4-20h1 et 2 mettant en place la triméthylation de H4K20, par séquençage direct.

PERSPECTIVES

L'exploration épigénétique des lymphomes du manteau représente un potentiel considérable pour la caractérisation de nouveaux mécanismes oncogéniques, le développement de nouveaux marqueurs diagnostiques / pronostiques et de cibles thérapeutiques. En effet, la thérapie épigénétique est en plein essor avec le début d'applications anti-cancéreuses, notamment l'inhibiteur des histones déacétylases, le SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid, Vorinostat[®]) dans le traitement des lymphomes T cutanés ou encore des lymphomes B diffus à grandes cellules¹⁴². De plus, des inhibiteurs des histones méthyltransférases (dithiodichetopiperazine, dérivé de la chaetocine, qui inhibe Suv39h) et des histones déméthylases (pargyline, par exemple, qui bloque les déméthylases de type LSD1) sont en développement et constituent de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les lymphomes¹⁴¹.

Dans le contexte de ce travail, il est également très intéressant de noter que des études récentes, chez la Drosophile, soulignent le rôle de la voie JAK/STAT dans le remodelage et la stabilité de l'hétérochromatine, en régulant le statut épigénétique des cellules via HP1 et la méthylation de H3K9 par Suv39h. L'hyperactivation de JAK par mutation notamment et/ou une augmentation de la phosphorylation de STAT ont pour conséquences la perturbation globale de la suppression tumorale médiée par l'hétérochromatine qui est essentielle à l'hyperprolifération et à la tumorigenèse^{196,197}. Ces voies ne sont pas encore explorées dans les tumeurs humaines mais présentes clairement un intérêt thérapeutique. Il semble par conséquent intéressant d'étudier la voie JAK/STAT dans nos cas de MCL et de la corréler aux données immunohistochimiques de H3K9 et HP1.

Les développements spectaculaires récents dans le domaine du « profiling » épigénétique à haut débit couplés aux coûts décroissants des analyses transcriptomiques ouvrent également de nombreuses perspectives. Ces techniques reposent sur des nouvelles stratégies de séquençage (« deep-sequencing ») sur fractions chromatiniennes (ChIP-seq) ou ADN méthylés et permettent d'établir la carte de méthylation de l'ADN (« méthylome ») ou de modifications d'histones / protéines particulières. De plus, dans le cadre du projet de l'INCA-DHOS, nous allons réaliser une étude transcriptomique des cas de notre série pilote afin d'essayer de corréler les profils épigénétiques observés à des profils transcriptomiques. Une étude très récente reporte des profils génomiques et transcriptomiques de 77 tumeurs primaires de MCL. Nous souhaitons utiliser ces données pour poursuivre l'étude de l'expression des histones méthyltransférases dans le MCL⁸¹. L'exploitation judicieuse de ces nouvelles approches, dans des lignées modèles de MCL par exemple, devrait permettre d'avancer rapidement vers l'identification de nouvelles voies de signalisation onco-épigénétique dans les lymphomes du manteau.

Les outils mis en place au cours de ce travail ont commencé à faire l'objet d'une évaluation / validation dans le cadre de protocoles thérapeutiques multicentriques nationaux,

notamment du GOELAMS (Dr Rémy Gressin / Dr Steven Le Gouil), et au sein du réseau Français sur le lymphome du manteau (coordonné par le Pr Olivier Hermine). Trente neuf patients MCL issus de protocoles du GOELAMS ont été étudiés en immunohistochimie sur tissu-macroarrays. Une lecture commune par trois anatomopathologistes (Dr Antoine Martin, Dr Sylvie Caulet-Maugendre et Dr Blandine Fabre-Bocquentin) a confirmé les profils épigénétiques observés sur notre série pilote. Cette nouvelle série de patients devraient permettre de valider les résultats obtenus et présentés dans ce document.

Ces données pourraient permettre de dégager des nouveaux marqueurs pronostiques et à terme, de disposer d'une classification intégrée, génétique et épigénétique des sous-types de lymphomes de manteau, dans la perspective du développement de nouvelles thérapeutiques ciblées.

CONCLUSION

Les lymphomes du manteau (MCL) sont des lymphomes B diffus à petites cellules (prolifération clonale de lymphocytes B matures) représentant 5 à 10 % des lymphomes non Hodgkiniens. Ils sont particuliers de par leur pronostic sombre et leur évolution rapide (médiane de survie de 3-4 ans). Les objectifs clés autour de cette maladie sont : l'identification de marqueurs moléculaires prédictifs de l'évolution et le développement de thérapies innovantes.

Si l'étude des causes génétiques du cancer (mutations, gains/amplifications/délétions, translocations) occupe depuis longtemps le devant de la scène biologique, l'explosion récente des connaissances sur les mécanismes de régulation épigénétique (méthylation de l'ADN, modifications post-traductionnelles des histones) a révélé le rôle prépondérant de leurs modifications dans le déclenchement et la progression des cancers. Dans les lymphomes, les études portent essentiellement sur la méthylation de l'ADN mais celles portant sur la méthylation des histones restent rares. Etant donné la réversibilité des anomalies épigénétiques et leurs implications physiopathologiques, il n'est pas étonnant que des inhibiteurs des histones déacétylases et des DNA méthyltransférases commencent à être utilisés dans les protocoles de chimiothérapies des hémopathies malignes.

L'intérêt de ce projet est d'établir le profil épigénétique du lymphome du manteau (en immunohistochimie, western-blot et immunofluorescence), de le corrélérer à des données clinico-biologiques (facteurs pronostiques, statut mutationnel des gènes d'immunoglobulines établi par séquençage, caryotype), d'identifier les localisations des anomalies observées (par immunoprécipitation de la chromatine) et d'étudier les gènes modificateurs de la méthylation des histones (en PCR quantitative).

De façon tout à fait remarquable, les observations faites en immunohistochimie sur ganglions lymphatiques réactionnels pointent le rôle important de la dynamique du remodelage de la chromatine, en particulier pour la lysine 20 de l'histone H4 triméthylée (H4K20me3), au cours de la prolifération / différenciation lymphoïde B antigène-dépendante. Nous avons identifié des cas de MCL pour lesquels le patron observé dans les hyperplasies ganglionnaires est largement perturbé. En effet, sur une série pilote de 19 patients, il coexiste deux profils épigénétiques distincts pour l'ensemble des marques et protéines étudiées, en particulier pour H4K20me3, des cas négatifs et des cas fortement positifs. L'étude du statut mutationnel des chaînes lourdes d'immunoglobulines est en faveur d'une perte de ces marques épigénétiques au cours de la lymphomagenèse plutôt que de profils épigénétiques liés à l'origine cellulaire des lymphocytes tumoraux dans le lymphome du manteau.

Dans la majorité des cas, ces patrons ne semblent pas refléter un profil d'expression particulier des histones méthyltransférases les mettant en place. Si dans un cas la perte de

H4K20me3 est associée à une diminution importante du taux d'expression des deux enzymes la mettant en place (Suv4-20h1 et Suv4-20h2), dans les autres cas ce n'est pas ce qui est observé. De plus, la perte ou l'augmentation d'expression des enzymes étudiées ne paraît pas corrélée aux anomalies cytogénétiques mises en évidence sur les caryotypes des cellules tumorales. Par conséquent, ces données sous-entendent l'existence de mécanismes autres tels que la dérégulation d'histones déméthylases, la présence de mutations inactivant le domaine catalytique des histones méthyltransférases.

Les altérations de l'hétérochromatine, état chromatinien fermé associé à la répression transcriptionnelle, apparaissent désormais comme une perturbation épigénétique précoce et récurrente dans les cellules cancéreuses, et en particulier dans le lymphome du manteau. Toutefois, les mécanismes ne sont pas entièrement élucidés.

Les outils mis en place devraient permettre de dégager des marqueurs pronostiques pertinents et à terme, de disposer d'une classification intégrée, génétique et épigénétique des sous-types de lymphomes de manteau, dans la perspective du développement de nouvelles thérapeutiques ciblées épigénétiques. Pour cela, ils seront à évaluer sur une série homogène plus importante de patients atteints de lymphome du manteau.

Vu et permis d'imprimer

Grenoble, le 20 Mai 2010

Le Doyen

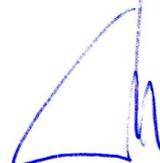


Professeur Renée Grillot



Le Président de la thèse

Professeur Emmanuel Drouet



BIBLIOGRAPHIE

1. Abboudi Z, Patel K, Naresh KN. Cyclin D1 expression in typical chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 2009;83:203-207.
2. Allman D, Srivastava B, Lindsley RC. Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells. *Immunol Rev.* 2004;197:147-160.
3. Andersen NS, Pedersen LB, Laurell A, et al. Pre-emptive treatment with rituximab of molecular relapse after autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009;27:4365-4370.
4. Au WY, Horsman DE, Viswanatha DS, Connors JM, Klasa RJ, Gascoyne RD. 8q24 translocations in blastic transformation of mantle cell lymphoma. *Haematologica.* 2000;85:1225-1227.
5. Avet-Loiseau H, Garand R, Gaillard F, et al. Detection of t(11;14) using interphase molecular cytogenetics in mantle cell lymphoma and atypical chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998;23:175-182.
6. Banks PM, Chan J, Cleary ML, et al. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol.* 1992;16:637-640.
7. Barista I, Romaguera JE, Cabanillas F. Mantle-cell lymphoma. *Lancet Oncol.* 2001;2:141-148.
8. Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007;129:823-837.
9. Bartova E, Krejci J, Harnicarova A, Galiova G, Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem.* 2008;56:711-721.
10. Bea S, Salaverria I, Armengol L, et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole genome profiling. *Blood.* 2008.
11. Bentz M, Plesch A, Bullinger L, et al. t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;27:285-294.
12. Bernstein E, Allis CD. RNA meets chromatin. *Genes Dev.* 2005;19:1635-1655.
13. Bertoni F, Ponzoni M. The cellular origin of mantle cell lymphoma. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:1747-1753.
14. Bertoni F, Rinaldi A, Zucca E, Cavalli F. Update on the molecular biology of mantle cell lymphoma. *Hematol Oncol.* 2006;24:22-27.
15. Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:1008-1016.
16. Bijwaard KE, Aguilera NS, Monczak Y, Trudel M, Taubenberger JK, Lichy JH. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for cyclin D1 expression: utility in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Clin Chem.* 2001;47:195-201.
17. Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet.* 2007;8:299-309.
18. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:287-320.
19. Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, Lindeman GJ, Harris AW, Adams JM. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J.* 1994;13:2124-2130.
20. Bradley SP, Kaminski DA, Peters AH, Jenuwein T, Stavnezer J. The histone methyltransferase Suv39h1 increases class switch recombination specifically to IgA. *J Immunol.* 2006;177:1179-1188.
21. Brenner C, Fuks F. A methylation rendezvous: reader meets writers. *Dev Cell.* 2007;12:843-844.

22. Brito JL, Walker B, Jenner M, et al. MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica*. 2009;94:78-86.
23. Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. Quantitative monitoring of cyclin D1 expression: a molecular marker for minimal residual disease monitoring and a predictor of the disease outcome in patients with mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2008;123:2865-2870.
24. Bruggemann M, Droese J, Bolz I, et al. Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2000;14:1419-1425.
25. Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:55-79.
26. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol*. 1999;36:115-127.
27. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev*. 2004;197:179-191.
28. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*. 2009;10:295-304.
29. Chaudhuri J, Khuong C, Alt FW. Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature*. 2004;430:992-998.
30. Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2000;95:619-626.
31. Chim CS, Wong KY, Loong F, Srivastava G. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Leukemia*. 2004;18:356-358.
32. Chowdhury M, Forouhi O, Dayal S, et al. Analysis of intergenic transcription and histone modification across the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15872-15877.
33. Chu G. Double strand break repair. *J Biol Chem*. 1997;272:24097-24100.
34. Chuang SS, Huang WT, Hsieh PP, et al. Mantle cell lymphoma in Taiwan: clinicopathological and molecular study of 21 cases including one cyclin D1-negative tumor expressing cyclin D2. *Pathol Int*. 2006;56:440-448.
35. Cloos PA, Christensen J, Agger K, Helin K. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev*. 2008;22:1115-1140.
36. Coiffier B. Rituximab in the treatment of diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Oncol*. 2002;29:30-35.
37. Cremer M, von Hase J, Volm T, et al. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res*. 2001;9:541-567.
38. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al. Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: correlation with clinicobiologic features. *Blood*. 1999;93:1372-1380.
39. Davila M, Foster S, Kelsoe G, Yang K. A role for secondary V(D)J recombination in oncogenic chromosomal translocations? *Adv Cancer Res*. 2001;81:61-92.
40. de Boer CJ, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM, Schuurin E. Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Oncogene*. 1995;10:1833-1840.
41. de Guibert S, Jaccard A, Bernard M, Turlure P, Bordessoule D, Lamy T. Rituximab and DHAP followed by intensive therapy with autologous stem-cell transplantation as first-line therapy for mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2006;91:425-426.
42. Dialynas GK, Terjung S, Brown JP, et al. Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells. *J Cell Sci*. 2007;120:3415-3424.

43. Dreyling M, Lenz G, Hoster E, et al. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood*. 2005;105:2677-2684.
44. Du MQ, Diss TC, Xu CF, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Pan LX. Ongoing immunoglobulin gene mutations in mantle cell lymphomas. *Br J Haematol*. 1997;96:124-131.
45. Dunnick WA, Collins JT, Shi J, et al. Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J Exp Med*. 2009;206:2613-2623.
46. Dyer MJ, Akasaka T, Capasso M, et al. Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? *Blood*;115:1490-1499.
47. Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:9923-9927.
48. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther*. 2009;8:1409-1420.
49. Espada J, Esteller M. Epigenetic control of nuclear architecture. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64:449-457.
50. Espinet B, Salaverria I, Bea S, et al. Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*;49:439-451.
51. Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol*. 2003;109:80-88.
52. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*. 2001;61:3225-3229.
53. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*. 2007;447:433-440.
54. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature*. 2003;421:448-453.
55. Fernandez-Capetillo O, Allis CD, Nussenzweig A. Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J Exp Med*. 2004;199:1671-1677.
56. Fernandez V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol*. 2005;23:6364-6369.
57. Fisher RI. Mantle cell lymphoma: at last, some hope for successful innovative treatment strategies. *J Clin Oncol*. 2005;23:657-658.
58. Forstpointner R, Dreyling M, Repp R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2004;104:3064-3071.
59. Fournier A, McLeer-Florin A, Lefebvre C, et al. 1q12 chromosome translocations form aberrant heterochromatic foci associated with changes in nuclear architecture and gene expression in B cell lymphoma. *EMBO Mol Med*.
60. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*. 2005;37:391-400.

61. Francastel C, Walters MC, Groudine M, Martin DI. A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin. *Cell*. 1999;99:259-269.
62. Frater JL, Hsi ED. Properties of the mantle cell and mantle cell lymphoma. *Curr Opin Hematol*. 2002;9:56-62.
63. Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 2005;106:4315-4321.
64. Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15:490-495.
65. Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J*. 2001;20:2536-2544.
66. Ganti AK, Bierman PJ, Lynch JC, Bociek RG, Vose JM, Armitage JO. Hematopoietic stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2005;16:618-624.
67. Gao H, Lukin K, Ramirez J, Fields S, Lopez D, Hagman J. Opposing effects of SWI/SNF and Mi-2/NuRD chromatin remodeling complexes on epigenetic reprogramming by EBF and Pax5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:11258-11263.
68. Garcia-Munoz R, Panizo C, Bendandi M, Llorente L. Autoimmunity and lymphoma: is mantle cell lymphoma a mistake of the receptor editing mechanism? *Leuk Res*. 2009;33:1437-1439.
69. Gazzo S, Felman P, Berger F, Salles G, Magaud JP, Callet-Bauchu E. Atypical cytogenetic presentation of t(11;14) in mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2005;90:1708-1709.
70. Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI, et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood*. 2006;108:1109-1110.
71. Ghia P, ten Boekel E, Sanz E, de la Hera A, Rolink A, Melchers F. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp Med*. 1996;184:2217-2229.
72. Gianni AM, Magni M, Martelli M, et al. Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (R-HDS regimen). *Blood*. 2003;102:749-755.
73. Gilbert N, Gilchrist S, Bickmore WA. Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int Rev Cytol*. 2005;242:283-336.
74. Gonda H, Sugai M, Nambu Y, et al. The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J Exp Med*. 2003;198:1427-1437.
75. Gressin R, Caulet-Maugendre S, Deconinck E, et al. Evaluation of the (R)VAD+C regimen for the treatment of newly diagnosed Mantle Cell Lymphoma. Combined results of two prospective phase II trials from the French GOELAMS group. *Haematologica*.
76. Grewal SI, Jia S. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*. 2007;8:35-46.
77. Grewal SI, Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*. 2003;301:798-802.
78. Guo J, Burger M, Nimmrich I, et al. Differential DNA methylation of gene promoters in small B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2005;124:430-439.
79. Han S, Zheng B, Schatz DG, Spanopoulou E, Kelsoe G. Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science*. 1996;274:2094-2097.
80. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:595-621.
81. Hartmann EM, Campo E, Wright G, et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high resolution gene expression and copy number profiling. *Blood*.

82. Hediger F, Gasser SM. Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover! *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16:143-150.
83. Herens C, Lambert F, Quintanilla-Martinez L, Bisig B, Deusings C, de Leval L. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma with cryptic t(12;14)(p13;q32) and cyclin D2 overexpression. *Blood.* 2008;111:1745-1746.
84. Hikida M, Mori M, Takai T, Tomochika K, Hamatani K, Ohmori H. Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells. *Science.* 1996;274:2092-2094.
85. Hillion S, Rochas C, Youinou P, Jamin C. Signaling pathways regulating RAG expression in B lymphocytes. *Autoimmun Rev.* 2009;8:599-604.
86. Hirt C, Schuler F, Dolken L, Schmidt CA, Dolken G. Low prevalence of circulating t(11;14)(q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR. *Blood.* 2004;104:904-905.
87. Hofmann WK, de Vos S, Tsukasaki K, et al. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood.* 2001;98:787-794.
88. Horn PJ, Peterson CL. Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science.* 2002;297:1824-1827.
89. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood.* 2008;111:558-565.
90. Howard OM, Gribben JG, Neuberg DS, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol.* 2002;20:1288-1294.
91. Hui P, Howe JG, Crouch J, et al. Real-time quantitative RT-PCR of cyclin D1 mRNA in mantle cell lymphoma: comparison with FISH and immunohistochemistry. *Leuk Lymphoma.* 2003;44:1385-1394.
92. Hummel M, Tamaru J, Kalvelage B, Stein H. Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. *Blood.* 1994;84:403-407.
93. Hutter G, Scheubner M, Zimmermann Y, et al. Differential effect of epigenetic alterations and genomic deletions of CDK inhibitors [p16(INK4a), p15(INK4b), p14(ARF)] in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45:203-210.
94. Iacobuzio-Donahue CA. Epigenetic Changes in Cancer. *Annu Rev Pathol.* 2008.
95. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:245-254.
96. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood.* 2008;112:4384-4399.
97. Jaffe ES, Raffeld M, Medeiros LJ, Stetler-Stevenson M. An overview of the classification of non-Hodgkin's lymphomas: an integration of morphological and phenotypical concepts. *Cancer Res.* 1992;52:5447s-5452s.
98. Jares P, Campo E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008.
99. Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:750-762.
100. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001;293:1074-1080.
101. Jiang YH, Bressler J, Beaudet AL. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004;5:479-510.

102. Johnson K, Angelin-Duclos C, Park S, Calame KL. Changes in histone acetylation are associated with differences in accessibility of V(H) gene segments to V-DJ recombination during B-cell ontogeny and development. *Mol Cell Biol.* 2003;23:2438-2450.
103. Johnson K, Pflugh DL, Yu D, et al. B cell-specific loss of histone 3 lysine 9 methylation in the V(H) locus depends on Pax5. *Nat Immunol.* 2004;5:853-861.
104. Kawamata N, Chen J, Koeffler HP. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; vorinostat) suppresses translation of cyclin D1 in mantle cell lymphoma cells. *Blood.* 2007;110:2667-2673.
105. Kawamata N, Ogawa S, Gueller S, et al. Identified hidden genomic changes in mantle cell lymphoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic array. *Exp Hematol.* 2009;37:937-946.
106. Kelsoe G. The germinal center: a crucible for lymphocyte selection. *Semin Immunol.* 1996;8:179-184.
107. Kelsoe G. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity.* 1996;4:107-111.
108. Khouri IF, Lee MS, Saliba RM, et al. Nonablative allogeneic stem-cell transplantation for advanced/recurrent mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2003;21:4407-4412.
109. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene.* 2006;25:1620-1628.
110. Kodet R, Mrhalova M, Krskova L, et al. Mantle cell lymphoma: improved diagnostics using a combined approach of immunohistochemistry and identification of t(11;14)(q13;q32) by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch.* 2003;442:538-547.
111. Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, et al. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood.* 2004;104:795-801.
112. Kolar GR, Mehta D, Pelayo R, Capra JD. A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID. *Blood.* 2007;109:2545-2552.
113. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997;91:661-672.
114. Kremmidiotis G, Zola H. Changes in CD44 expression during B cell differentiation in the human tonsil. *Cell Immunol.* 1995;161:147-157.
115. Krieger S, Grunau C, Sabbah M, Sola B. Cyclin D1 gene activation in human myeloma cells is independent of DNA hypomethylation or histone hyperacetylation. *Exp Hematol.* 2005;33:652-659.
116. Krivtsov AV, Feng Z, Lemieux ME, et al. H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell.* 2008;14:355-368.
117. Kuang FL, Luo Z, Scharff MD. H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:5288-5293.
118. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:251-262.
119. Kuppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene.* 2001;20:5580-5594.
120. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 1999;341:1520-1529.
121. Kuppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J.* 1993;12:4955-4967.
122. Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14:286-298.

123. Lai R, Lefresne SV, Franko B, et al. Immunoglobulin VH somatic hypermutation in mantle cell lymphoma: mutated genotype correlates with better clinical outcome. *Mod Pathol.* 2006;19:1498-1505.
124. Lardelli P, Bookman MA, Sundeen J, Longo DL, Jaffe ES. Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation. Morphologic and immunophenotypic spectrum and clinical correlations. *Am J Surg Pathol.* 1990;14:752-763.
125. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008;112:1570-1580.
126. Lefrere F, Delmer A, Levy V, Delarue R, Varet B, Hermine O. Sequential chemotherapy regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: an update of a prospective study. *Haematologica.* 2004;89:1275-1276.
127. Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, et al. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol.* 2003;13:1192-1200.
128. Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790:863-868.
129. Lenz G, Dreyling M, Hiddemann W. Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions. *Ann Hematol.* 2004;83:71-77.
130. Lenz G, Dreyling M, Hoster E, et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol.* 2005;23:1984-1992.
131. Leroux D, Le Marc'Hadour F, Gressin R, et al. Non-Hodgkin's lymphomas with t(11;14)(q13;q32): a subset of mantle zone/intermediate lymphocytic lymphoma? *Br J Haematol.* 1991;77:346-353.
132. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol.* 2002;3:822-829.
133. Liu H, Huang J, Wang J, et al. Transvection mediated by the translocated cyclin D1 locus in mantle cell lymphoma. *J Exp Med.* 2008;205:1843-1858.
134. Liu H, Wang J, Epner EM. Cyclin D1 activation in B-cell malignancy: association with changes in histone acetylation, DNA methylation, and RNA polymerase II binding to both promoter and distal sequences. *Blood.* 2004;104:2505-2513.
135. Liu Y, Subrahmanyam R, Chakraborty T, Sen R, Desiderio S. A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. *Immunity.* 2007;27:561-571.
136. Liu YJ, Arpin C. Germinal center development. *Immunol Rev.* 1997;156:111-126.
137. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, et al. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med.* 1999;190:75-89.
138. Lomberk G, Wallrath L, Urrutia R. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol.* 2006;7:228.
139. Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, Moroy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* 1994;13:3487-3495.
140. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997;389:251-260.

141. Mai A, Altucci L. Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:199-213.
142. Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem.* 2009.
143. Martensson IL, Keenan RA, Licence S. The pre-B-cell receptor. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:137-142.
144. Martin-Subero JI, Ammerpohl O, Bibikova M, et al. A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS One.* 2009;4:e6986.
145. Martin P, Coleman M, Leonard JP. Progress in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009;27:481-483.
146. Martinez-Garcia E, Licht JD. Deregulation of H3K27 methylation in cancer. *Nat Genet;*42:100-101.
147. Matsuda I, Imai Y, Hirota S. Global Histone Modification Profiles are Well Conserved Between Normal B Lymphocytes and Neoplastic Counterparts. *Pathol Oncol Res.* 2009.
148. Matthews AG, Kuo AJ, Ramon-Maiques S, et al. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature.* 2007;450:1106-1110.
149. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.* 1994;8:1640-1645.
150. Meusers P, Engelhard M, Bartels H, et al. Multicentre randomized therapeutic trial for advanced centrocytic lymphoma: anthracycline does not improve the prognosis. *Hematol Oncol.* 1989;7:365-380.
151. Moller MB, Pedersen NT, Christensen BE. Mantle cell lymphoma: prognostic capacity of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Br J Haematol.* 2006;133:43-49.
152. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol.* 2006;27:428-433.
153. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet;*42:181-185.
154. Mozos A, Royo C, Hartmann E, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica.* 2009;94:1555-1562.
155. Muegge K. Modifications of histone cores and tails in V(D)J recombination. *Genome Biol.* 2003;4:211.
156. Ng SS, Yue WW, Oppermann U, Klose RJ. Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:407-422.
157. Niller HH, Wolf H, Minarovits J. Epigenetic dysregulation of the host cell genome in Epstein-Barr virus-associated neoplasia. *Semin Cancer Biol.* 2009;19:158-164.
158. O'Connor OA. Mantle Cell Lymphoma : identifying novel molecular targets in growth and survival pathways. *American Society of Hematology.* 2007:270-276.
159. Obrador-Hevia A, Fernandez de Mattos S, Villalonga P, Rodriguez J. Molecular biology of mantle cell lymphoma: from profiling studies to new therapeutic strategies. *Blood Rev.* 2009;23:205-216.
160. Odegard VH, Kim ST, Anderson SM, Shlomchik MJ, Schatz DG. Histone modifications associated with somatic hypermutation. *Immunity.* 2005;23:101-110.
161. Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:573-583.
162. Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, et al. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet.* 2007;39:237-242.

163. Okada Y, Feng Q, Lin Y, et al. hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell*. 2005;121:167-178.
164. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5:649-655.
165. Orchard J, Garand R, Davis Z, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*. 2003;101:4975-4981.
166. Pal S, Baiocchi RA, Byrd JC, Grever MR, Jacob ST, Sif S. Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma. *EMBO J*. 2007;26:3558-3569.
167. Pannetier M, Julien E, Schotta G, et al. PR-SET7 and SUV4-20H regulate H4 lysine-20 methylation at imprinting control regions in the mouse. *EMBO Rep*. 2008;9:998-1005.
168. Paoluzzi L, Scotto L, Marchi E, Seshan VE, O'Connor OA. The anti-histaminic cyproheptadine synergizes the antineoplastic activity of bortezomib in mantle cell lymphoma through its effects as a histone deacetylase inhibitor. *Br J Haematol*. 2009.
169. Parry-Jones N, Matutes E, Morilla R, et al. Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH. *Br J Haematol*. 2007;137:117-124.
170. Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, et al. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*. 2001;107:323-337.
171. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ. Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol*. 2003;171:88-95.
172. Pirrotta V. Transvection and chromosomal trans-interaction effects. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1424:M1-8.
173. Pott C, Schrader C, Gesk S, et al. Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2006;107:2271-2278.
174. Quintanilla-Martinez L, Slotta-Huspenina J, Koch I, et al. Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR. *Haematologica*. 2009;94:1595-1598.
175. Raaphorst FM, van Kemenade FJ, Fieret E, et al. Cutting edge: polycomb gene expression patterns reflect distinct B cell differentiation stages in human germinal centers. *J Immunol*. 2000;164:1-4.
176. Raffeld M, Sander CA, Yano T, Jaffe ES. Mantle cell lymphoma: an update. *Leuk Lymphoma*. 1992;8:161-166.
177. Rajasekhar VK, Begemann M. Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells*. 2007;25:2498-2510.
178. Rice KL, Hormaeche I, Licht JD. Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*. 2007;26:6697-6714.
179. Rimokh R, Berger F, Bastard C, et al. Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias. *Blood*. 1994;83:3689-3696.
180. Rimokh R, Berger F, Delsol G, et al. Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood*. 1994;83:1871-1875.
181. Ripperger T, von Neuhoff N, Kamphues K, et al. Promoter methylation of PARG1, a novel candidate tumor suppressor gene in mantle-cell lymphomas. *Haematologica*. 2007;92:460-468.

182. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2003;3:185-197.
183. Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood*. 2005;105:4445-4454.
184. Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, Campo E. Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica*. 2006;91:11-16.
185. Salaverria I, Zettl A, Bea S, et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol*. 2007;25:1216-1222.
186. Sandell LL, Zakian VA. Telomeric position effect in yeast. *Trends Cell Biol*. 1992;2:10-14.
187. Sander S, Bullinger L, Leupolt E, et al. Genomic aberrations in mantle cell lymphoma detected by interphase fluorescence in situ hybridization. Incidence and clinicopathological correlations. *Haematologica*. 2008;93:680-687.
188. Sayegh CE, Quong MW, Agata Y, Murre C. E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat Immunol*. 2003;4:586-593.
189. Schelonka RL, Zemlin M, Kobayashi R, et al. Preferential use of DH reading frame 2 alters B cell development and antigen-specific antibody production. *J Immunol*. 2008;181:8409-8415.
190. Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, et al. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*. 2007;39:232-236.
191. Schotta G, Lachner M, Sarma K, et al. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*. 2004;18:1251-1262.
192. Schotta G, Sengupta R, Kubicek S, et al. A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev*. 2008;22:2048-2061.
193. Schraders M, Oeschger S, Kluijn PM, et al. Hypermutation in mantle cell lymphoma does not indicate a clinical or biological subentity. *Mod Pathol*. 2009;22:416-425.
194. Seligson DB, Horvath S, Shi T, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature*. 2005;435:1262-1266.
195. Shen Y, Iqbal J, Xiao L, et al. Distinct gene expression profiles in different B-cell compartments in human peripheral lymphoid organs. *BMC Immunol*. 2004;5:20.
196. Shi S, Calhoun HC, Xia F, Li J, Le L, Li WX. JAK signaling globally counteracts heterochromatic gene silencing. *Nat Genet*. 2006;38:1071-1076.
197. Shi S, Larson K, Guo D, et al. Drosophila STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. *Nat Cell Biol*. 2008;10:489-496.
198. Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:243-269.
199. Shirato H, Ogawa S, Nakajima K, et al. A jumonji (Jarid2) protein complex represses cyclin D1 expression by methylation of histone H3-K9. *J Biol Chem*. 2009;284:733-739.
200. Smith E, Shilatifard A. The A, B, Gs of silencing. *Genes Dev*. 2007;21:1141-1144.
201. Sola B, Salaun V, Ballet JJ, Troussard X. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms induce cyclin-D1 over-expression in B-chronic lymphoproliferative disorders. *Int J Cancer*. 1999;83:230-234.
202. Solomon DA, Wang Y, Fox SR, et al. Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem*. 2003;278:30339-30347.

203. Souza PP, Volkel P, Trinel D, et al. The histone methyltransferase SUV420H2 and Heterochromatin Proteins HP1 interact but show different dynamic behaviours. *BMC Cell Biol.* 2009;10:41.
204. Specht K, Haralambieva E, Bink K, et al. Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood.* 2004;104:1120-1126.
205. Stamatopoulos K, Kosmas C, Belessi C, et al. Molecular analysis of bcl-1/IgH junctional sequences in mantle cell lymphoma: potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation. *Br J Haematol.* 1999;105:190-197.
206. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000;403:41-45.
207. Su IH, Tarakhovsky A. Lysine methylation and 'signaling memory'. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:152-157.
208. Swerdlow SH. Genetic and molecular genetic studies in the diagnosis of atypical lymphoid hyperplasias versus lymphoma. *Hum Pathol.* 2003;34:346-351.
209. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009;324:930-935.
210. Tarlinton D. Germinal centers: form and function. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:245-251.
211. Thieblemont C, Antal D, Lacotte-Thierry L, et al. Chemotherapy with rituximab followed by high-dose therapy and autologous stem cell transplantation in patients with mantle cell lymphoma. *Cancer.* 2005;104:1434-1441.
212. Thomas MD, Srivastava B, Allman D. Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell Immunol.* 2006;239:92-102.
213. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol.* 2005;131:29-38.
214. Vaishampayan UN, Mohamed AN, Dugan MC, Bloom RE, Palutke M. Blastic mantle cell lymphoma associated with Burkitt-type translocation and hypodiploidy. *Br J Haematol.* 2001;115:66-68.
215. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17:2257-2317.
216. Vire E, Brenner C, Deplus R, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 2006;439:871-874.
217. Walters MC, Magis W, Fiering S, et al. Transcriptional enhancers act in cis to suppress position-effect variegation. *Genes Dev.* 1996;10:185-195.
218. Wang Y, Reddy B, Thompson J, et al. Regulation of Set9-mediated H4K20 methylation by a PWWP domain protein. *Mol Cell.* 2009;33:428-437.
219. Weiler KS, Wakimoto BT. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet.* 1995;29:577-605.
220. Widschwendter M, Fiegler H, Egle D, et al. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet.* 2007;39:157-158.
221. Wiestner A, Tehrani M, Chiorazzi M, et al. Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood.* 2007;109:4599-4606.

222. Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V, et al. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood*. 2008;111:5683-5690.
223. Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeijer A, De Wolf-Peeters C, Van Den Berghe H. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 1999;84:594-599.
224. Xu CR, Feeney AJ. The epigenetic profile of Ig genes is dynamically regulated during B cell differentiation and is modulated by pre-B cell receptor signaling. *J Immunol*. 2009;182:1362-1369.
225. Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*. 2007;26:5310-5318.
226. Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, et al. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*. 2000;95:2253-2261.
227. Yu J, Rhodes DR, Tomlins SA, et al. A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res*. 2007;67:10657-10663.

ANNEXES

Annexe 1 : Les principales molécules définissant l'appartenance à la lignée B

Annexe 2 : Récapitulatif des pathologies malignes des tissus lymphoïdes périphériques

Annexe 3 : Classification d'Ann Harbor

Annexe 4 : Récapitulatif des cas cycline D1 négatifs décrits dans la littérature

Annexe 5 : État général selon l'échelle de l'ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group)

Annexe 6 : Caryotype de la lignée Granta

Annexe 7 : Récapitulatif des patients étudiés

Annexe 1 : Les principales molécules définissant l'appartenance à la lignée B

La technologie des anticorps monoclonaux a permis l'identification de molécules de surface spécifique des lymphocytes B. Une nomenclature commune de ces molécules de surface reconnues par au moins deux anticorps monoclonaux indépendants a été établie par l'OMS et les désigne comme des clusters de différenciation (CD) ¹²⁵.

Molécules	Type	Stade de différenciation	Fonction
CD79a et CD79b ou Igα et Igβ	Phosphoprotéines	Antigènes très précoces qui persistent à tous les stades de la différenciation B sauf sur les plasmocytes	Transduction du signal ARH (Antigen Receptor Homolgy) via la partie intracytoplasmique
CD19	Superfamille des Ig Phosphoprotéine formant des complexes avec CD21 et TATA	Tous les stades y compris les plasmocytes	Régule la transduction du signal intracellulaire par amplification de l'activité kinase de la famille Src
CD22	Superfamille des Ig	Cellules B matures	Régule la survie des cellules B folliculaires et régule négativement la signalisation
CD21	Famille de récepteurs du complément	Cellules B matures et cellules dendritiques folliculaires	Régule les réponses prolifératives B en interagissant avec le CD19, récepteur d'une fraction du complément et de l'EBV
CD20	Famille MS4A	Cellules B matures	Molécule du canal calcique reconnue par le Rituximab
CD23 ou Fc Epsilon R2	Lectine de type C	Cellules B activées, cellules dendritiques folliculaires	Récepteur de faible affinité pour les IgE exprimée sur les lymphocytes activés et influence leur production
CD10	CALLA (common acute lymphoid leukemia antigen)	Exprimée dans les stades immatures de la moelle osseuse et dans le centre germinatif	Endopeptidase neutre
CD40	Récepteur du TNF	Cellules B, cellules épithéliales, cellules dendritiques folliculaires	Facteur de survie critique pour les cellules B du centre germinatif. Ligand du CD154 exprimé par les lymphocytes T

Tableau : Caractéristiques des principaux marqueurs membranaires des lymphocytes B.

Annexe 2 : Récapitulatif des pathologies malignes des tissus lymphoïdes périphériques

Lymphomes B	Définition	Fréquence parmi les lymphomes	Cellule d'origine proposée
Leucémie lymphoïde chronique B (LLC)	Leucémie de petits lymphocytes qui expriment le CD5 retrouvés dans le sang périphérique et la moelle osseuse. Commun chez les personnes âgées. Appelé « Small lymphocytique Lymphoma (SLL) lorsqu'il ya une atteinte ganglionnaire prédominante.	7%	Cellule B mémoire ? Cellule B naïve ? Cellule B de la zone marginale ?
Lymphome du manteau (MCL)	Lymphome provient de cellules localisées au niveau de la zone du manteau des follicules lymphoïdes exprimant le CD5 et présentant une expression aberrante de la cycline D1. Presque tous les cas sont associés à une translocation des gènes IgH/CCND1	5%	Cellules de la zone du manteau CD5 ⁺
Leucémie prolymphocytaire B	Plus de 50% des cellules tumorales sont des prolymphocytes (grand lymphocyte avec une chromatine mottée et un nucléole proéminent	< 1%	Cellules B mémoires
Lymphome folliculaire	Lymphome ganglionnaire avec un motif de croissance folliculaire. Les cellules lymphomateuses ressemblent morphologiquement et phénotypiquement aux cellules B du centre germinatif	20	Cellules B du centre germinatif
Leucémie à tricholeucocytes	Pathologie B maligne chronique avec atteinte de la rate et de la moelle osseuse. Très peu de cellules circulantes. Les cellules tumorales ont des projections cytoplasmiques chevelues	< 1%	Cellules B mémoires
Lymphome de MALT	Lymphome B de la zone marginale extra-ganglionnaire. De développe la plupart du temps dans les structures lymphoïdes acquises	7	Cellules B de la zone marginale
Lymphome ganglionnaire de la zone marginale	Présentation primaire dans les ganglions lymphoïdes. Les cellules lymphomateuses ressemblent aux cellules B de la zone marginale ou aux cellules B monocytoïdes et sont souvent morphologiquement hétérogènes.	2	Cellules B de la zone marginale ? cellules B monocytoïdes ?
Lymphome splénique de la zone marginale	Infiltration lymphoïde micronodulaire dans la pulpe blanche de la rate ? la plupart des petites cellules IgD ⁺ lymphomateuses remplacent les follicules normaux et la région de la zone marginale. Atteinte fréquente de la moelle osseuse et circulation périphérique	1	Sous-ensemble de cellules B naïves qui sont partiellement différenciées en cellules B de la zone marginale ?
Lymphome de Burkitt	Croissance rapide. La plupart du temps extra-ganglionnaire. Caractérisé par une translocation myc-Ig. Les patients avec une forme endémique sont EBV+. Les patients avec la forme sporadique sont EBV+ dans environ 30% des cas	2	Cellules B du centre germinatif
Lymphome diffus à grandes cellules B	Groupe hétérogène de lymphomes caractérisés par des grandes cellules B. On distingue différents sous-types : B du centre germinatif, B activés.	30-40	Cellules B du centre germinatif ou post-centre germinatif

Lymphome B primaire médiastinal	Lymphome B à grandes cellules localisé au niveau du médiastin. Les cellules présentent des caractéristiques similaires aux cellules de Reed-Sternberg. Fréquent chez les jeunes femmes.	2	Cellules B thymiques
Lymphome post-transplantation	La plupart sont des lymphomes diffus à grandes cellules. Lymphomes qui surviennent après une transplantation d'organe. Les traitements immunosuppresseurs favorisent les réactivations non contrôlées de l'EBV	<1	Cellules B du centre germinatif
Lymphome primaire avec effusion	Fréquent chez les patients atteints du SIDA ou les patients transplantés. Les cellules lymphomateuses sont retrouvées comme des effusions dans les cavités séreuses telles que la plèvre, la péricarde, le péritoine.	< 0,5	Cellules B (post)-centre germinatif
Lymphome lymphoplasmocytaire	Atteint les ganglions, la moëlle osseuse et la rate. La population tumorale est composée de petites cellules B, de lymphoplasmocytes et de plasmocytes. La plupart des patients présentent une immunoglobuline monoclonale sérique, généralement de type IgM.	1	Cellules B (post)-centre germinatif
Myélome multiple	Prolifération néoplasique de plasmocytes dans la moëlle osseuse.	10	Plasmocytes
Lymphome de Hodgkin classique	Grandes cellules tumorales, cellules de Reed-Sternberg rares (< 1%) associées à des cellules non tumorales réactionnelles.	10	Cellules B du centre germinatif défectueuses

Tableau : Description des principales pathologies lymphomateuses décrites dans la classification de l'OMS. D'après ¹¹⁸.

Annexe 3 : Classification d'Ann Arbor

La classification d'Ann Arbor est utilisée en médecine pour faire le bilan d'extension des lymphomes malins. Elle a été initialement développée pour les maladies d'Hodgkin. Elle a globalement les mêmes fonctions que le score TNM dans les tumeurs solides.

Le stade dépend à la fois de la localisation du lymphome (mise en évidence par biopsie, scanner et TEP -tomographie par émission de positrons-) et des symptômes systémiques dus au lymphome ("symptômes B" : sueurs nocturnes, perte de poids >10% ou fièvres).

Stade I

- atteinte d'une seule aire ganglionnaire.
- IE: atteinte localisée d'un seul territoire Extra ganglionnaire.

Stade II

- atteinte de deux ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme.
- IIE: atteinte Extra ganglionnaire unique avec une ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme.

Stade III

- atteinte ganglionnaire des deux côtés du diaphragme.
- IIIS: avec atteinte Splénique.
- IIIE: avec atteinte Extra ganglionnaire localisée.

Stade IV

- atteinte diffuse d'une ou de plusieurs aires extra ganglionnaires (foie, poumon, moelle, os) avec ou sans atteinte ganglionnaire.

Annexe 4 : Récapitulatif des MCL cycline D1 négatifs décrits dans la littérature

Bibliographie	Nombre de cas	Anomalie chromosomique	Cycline impliquée
91	2		
174	2	t(2;12)(p12;p13) t(12p13)-Igλ	Cycline D2
70,83	2	t(2;12)(p12;p13)	Cycline D2
83	1	t(2;14)(p12;q32)	Cycline D2
154	5		Cycline D2 (4 cas) Cycline D3 (1 cas)
34	1		Cycline D2
63	6		Cycline D2 (2 cas) Cycline D3 (4 cas)
222	6	t(2;12)(p12;p13) t(6;14)(p21;q32)	Cycline D2 (2 cas) Cycline D3 (3 cas) Cycline D- (1 cas)
National Cancer Institute, Mitelman database of chromosome aberration in cancer	1	t(2;12)(p12;p13)	Cycline D2
226	23 en IHC	3 cas sans t(11;14) au caryotype	

Tableau : Récapitulatif des cas de lymphomes du manteau cycline D1 négatifs décrits dans la littérature.

Annexe 5 : État général selon l'échelle de l'ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group)¹⁶⁴

En médecine, les scores comme l'ECOG status performance permettent de quantifier l'état général des patients atteints d'un cancer. Le score ECOG publié en 1982 par Oken et al est également appelé le score WHO ou score Zubrod et va de 0 à 5.

Définition	Grade
Patient asymptomatique, pas de fatigue, activités sans restrictions.	0
Patient symptomatique mais complètement ambulatoire, il est restreint pour des activités physiques fortes mais capable d'un travail « léger ».	1
Patient symptomatique, obligé de se reposer pendant la journée, moins de 50% de son temps diurne. Il est ambulatoire et capable des gestes de la vie courante mais il est incapable de travailler.	2
Patient symptomatique, obligé de se reposer pendant la journée, plus de 50% de son temps diurne. Il limite ses activités à quelques gestes de la vie courante.	3
Patient alité, complètement confiné dans son lit ou son fauteuil. Il ne peut plus prendre soin de lui.	4
Décès.	5

Tableau : Définition des scores de l'état général des patients selon l'ECOG.

Annexe 6 : Caryotype de la lignée Granta

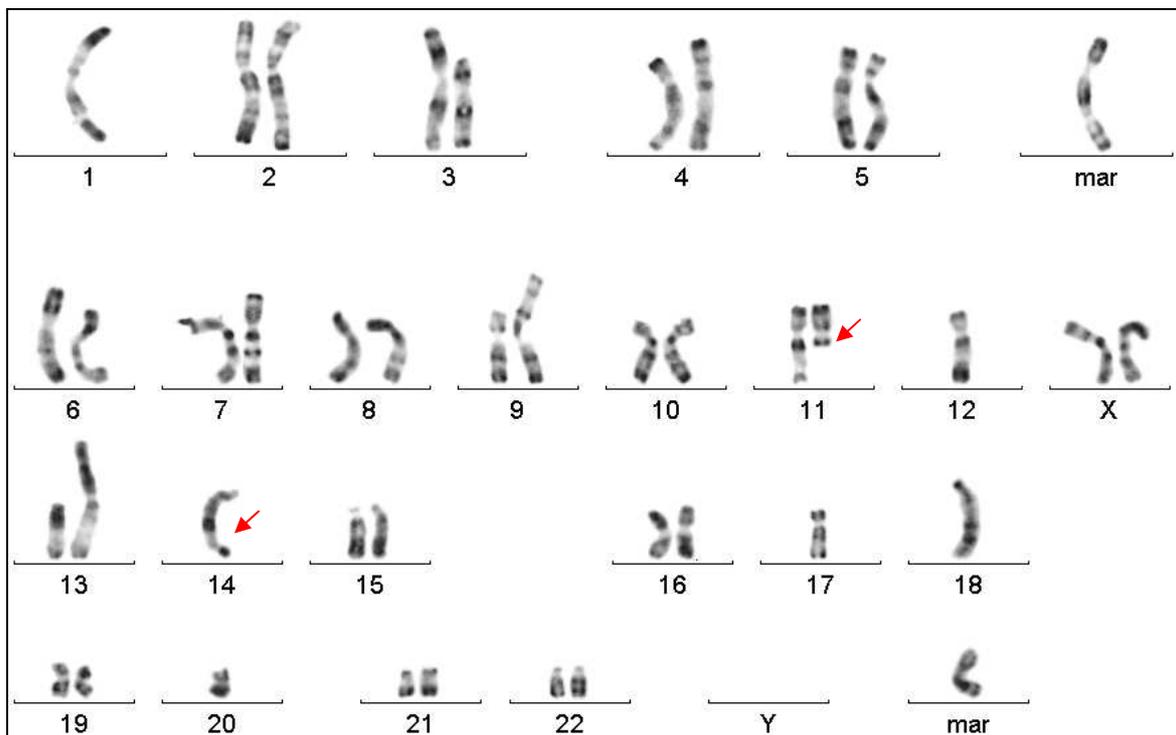
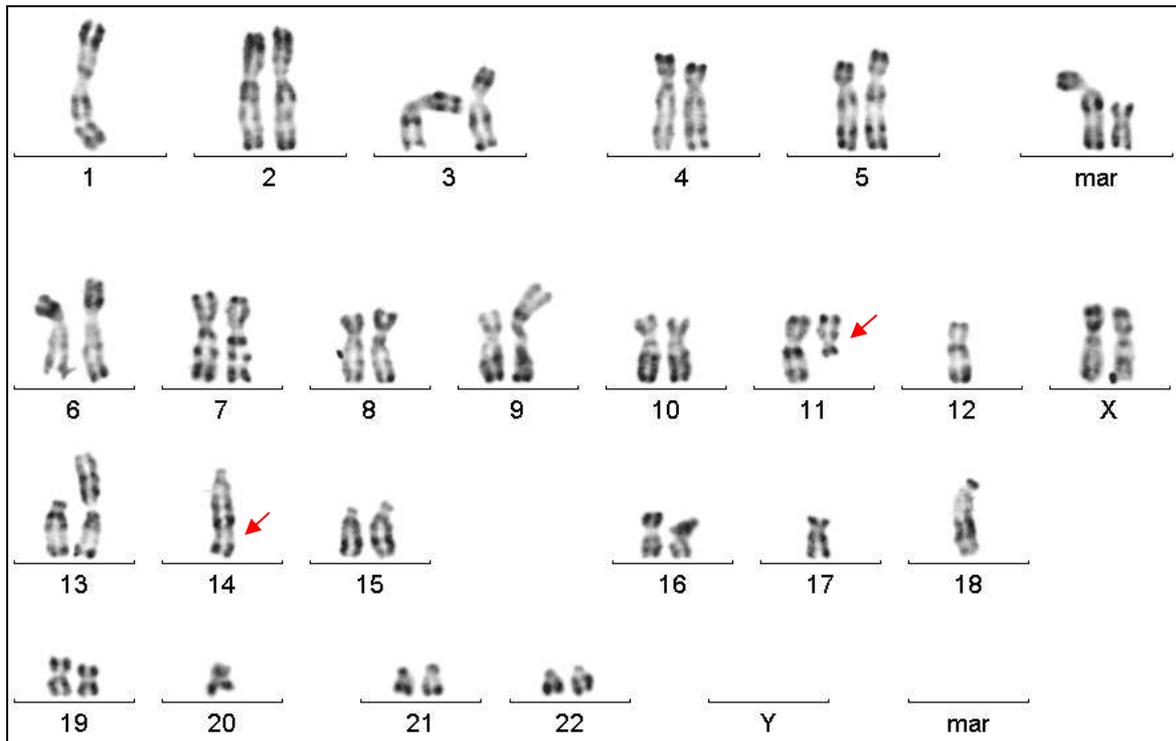


Figure : Deux caryotypes de la lignée Granta établis au laboratoire d'onco-génétique du C.H.U. de Grenoble par le Dr Christine Lefebvre. 42~44,XX, -1[19],del(3)(p21p25)[10],+7[7],add(9)(p13)[19],+add(9)(p13)[5],t(11;14)(q13;q32)[19], -12[19],add(13)(p12)[19],-14[19],add(16)(p13)[9],-17[19],-18[19],add(18)(q2?1)[19],-20[19],+M1[19],+M2[19][cp19]/84, idem x2[2]. La t(11;14) est indiquée par les flèches rouges.

Annexe 7 : Récapitulatif des données concernant les patients étudiés

Tableau 1 : Présentation des données clinico-biologiques des patients atteints d'un lymphome du manteau étudiés. * : en années ; ♣ : en UI/L ; ♥ : déterminé par le pourcentage de cellules exprimant l'immunoglobuline monoclonale en cytométrie de flux.

Tableau 2 : Récapitulatif des données obtenues au cours de ce travail pour les patients présentant un lymphome du manteau étudiés.

Patient	Sexe	Age*	Survie globale*	Diagnostic	Stade	ECOG	MIPI	LDH*	Ki67	Caryotype	% cellules tumorales*
1	F	70	0,66	MCL blastique	4	1	8,2	1528	50	46,XX,del(1)(p21p31),del(9)(p21p23),t(11;14)(q13;q32)<5>/46,idem,add(11)(q12)<2>	80
2	M	52	6,38	MCL classique	4	0	5,7	319	10	46,XY,del(1)(q41),add(4)(q32),del(7)(q31,add(8)(q24),del(9)(q22q31),t(11;14)(q13;q32),add(16)(q2?2)add(17)(p11),add(19)(q1?3)<6>	80
3	M	79	1,70	MCL classique	4	0	6,5	340	10	nm, ish t(11;14)	90
4	M	62	5,84	MCL classique	4	0	5,7	352	15	46,XY,t(11;14)(q13;q32),-13,+mar<2>/46,XY<2>	80
5	M	52	10,58	MCL classique	4	0	5,1	383	10	nm, ish t(11;14)	100
6	F	72	3,58	MCL classique	4	1	6,1	229	20	45,Xdel(X)(q21;q25),der(1),add(4)(p15),add(4)(q2?5),?9,t(11;14)(q13;q32)add(11)(q22),-12,-21,+mar<7>/45,idem,add(3)(p2?1),?6,add(9)(p12),mars,var<4>/46,XX<3>	80
7	M	65	5,33	MCL classique	4	1	6,2	357	5	44,XY?,-2,add(3)(q2?1),del(3)(q2?7),add(4)(p16),add(9)(q2?2),-11,-12,-13,-14,+3mar,inc<7>/46,XY<4>	90
8	M	51	2,09	MCL classique	4	2		NF	5	46,XY,add(1)(q23),t(11;14)(q13;q32),-13,-15,-22,+3mars <4>/47,idem,+X<2>/46,XY <1>	90
9	M	58	12,27	MCL classique	2	0	5,7	321	10	46, XY,del(1)(p21p13),der(3), -9, t(11;14)(q13;q32),-11,del(13q),+2 mar <9>	
10	M	54	7,17	MCL classique	3	1	5,4	207	13	45,XY,del(1)(q31),add(4)(p16),-8,-10,der(?),t(11;14)(q13;q32),-13x2,-15,inc<5>/46,XY<2>	95
11	M	44	1,63	MCL classique	3	1	4,7	465	11	46,XY,del(1)(p13q21),(t(1;?)(q21;?),t(11;14)(q13;q32)<3>/90,XXYY,idem,del(17)(p10)	
12	M	81	3,29	MCL classique	4	1			8	46,XY,t(11;14)(q13;q32) <12>/46,XY <6>	95
13	M	69	4,11	MCL blastique	2	3	7,5	741	8	45,X,-(Y),t(11;14)(q13;q32)<5>,45,idem,add(4)(p16)<7>/46,XY<6>	
14	F	63	8,65	MCL classique	4	0	6	349	10	46,X,t(1;X)(p1?3;q2?1),add(3)(q21),t(11;14)(q13;q32) <3> / 46,idem,del(15q),inc <15>	90
15	M	48	8,07	MCL classique	4	0	5,3	299	20	46,XY,del(1)(p22p32),-10,t(11;14)(q13;q32),?13,-17,add(19)(p13),mars,var<9>/46,XY<3>	
16	M	71	3,63	MCL classique	4			NF	10	45,XY,del(1)(p13q31),der(6),-7,t(11;14)(q13;q32),-13,-15,-22,+mar<6>/45,idem,add(4)(q3?5),inc<2>	
17	F	66	0,69	MCL classique	4	0	6	404	10	45,X,-X,del(1)(p?21p?22),?+3,?7,-8,-11,-11,-13,-13,?der(14)t(11;14)(q13;q32),-15,+6mar<2>	87
18	M	67	5,90	MCL classique	4	0	6,3	631	10	47,t(X;14)(p12;q32)t(14;18)t(32;q21,Y,+18<4>/46,XY<10>	
19	M	52	13,75	MCL classique	4	0		200	5		78
20	F	72		MCL classique						?80,XXX,t(11;14)(q13;q32),inc<3>/46,XX<17>	65

Tableau 1 : Présentation des données clinico-biologiques des patients atteints d'un lymphome du manteau étudiés.

Patient	H4K20me1	H4K20me3	H4panAc	H3K9me2	H3K9me3	H3K27me3	HP1 α	HP1 β	HP1 γ	Pr-Set7	Suv4-20h1	Suv4-20h2	Suv39 h1	Suv39 h2	EZH2	MTC	Statut Ig	VH
1	200	0	0	0	300	200	140	200	240	2,4E-02	3,5E-02	4,1E-03	4,1E-03	1,4E-03	2,8E-02	-	Non muté	VH3-15
2 R	80	0	0	0	0	0	0	0	80	4,4E-03	1,3E-02	4,1E-04	6,9E-04	1,0E-04	3,8E-03	-	Non muté	VH4-34
2 G	80	10	0	0	0	0	0	0	50	9,4E-03	2,2E-02	3,6E-03	1,6E-03	3,1E-05	5,2E-03	-	Non muté	VH4-34
3	200	20	0	0	0	0	0	0	50	2,2E-02	4,9E-02	3,2E-03	1,1E-02	5,0E-03	4,5E-02	+	Non muté	VH4-34
4	300	100	0	300	300	70	160	200	300	2,3E-03	1,6E-02	4,5E-04	7,3E-04	1,7E-05	3,5E-03	+	Non muté	VH4-34
5	300	300	300	0	200	300	300	0	300	2,3E-03	6,3E-02	3,0E-04	8,8E-04	4,7E-05	2,4E-02	-	Muté	VH1-8
6	200	200	100	200	300	140	100	200	80	9,1E-03	3,5E-02	1,6E-03	5,0E-03	5,4E-04	1,3E-02	-	Non muté	VH3-21
7	160	0	0	0	50	200	100	200	160	1,0E-02	2,9E-02	9,5E-04	4,2E-03	6,6E-04	1,7E-02	-	Non muté	VH3-21
8	200	100	0	0	160	0	140	50	300	2,8E-02	5,0E-02	3,6E-03	8,6E-03	5,6E-04	2,0E-02	-	Non muté	VH3-09
9	200	50	100	200	200	140	300	200	160	5,1E-02	7,2E-02	5,1E-03	1,6E-02	4,2E-03	1,3E-01	+	Non muté	VH1-69
10	0	0	0	0	100	0	0	0	200	3,3E-02	5,3E-02	2,4E-03	9,6E-03	1,1E-03	4,7E-02	-	Muté	VH3-33
11	0	100	300	70	0	200	240	0	50	3,2E-02	6,8E-02	4,8E-03	9,1E-03	1,4E-03	5,5E-02	-	Non muté	VH1-18
12	300	100	0	100	200	0	240	200	280	1,2E-01	1,3E-01	9,8E-03	5,3E-02	9,4E-03	3,5E-01	+	Non muté	VH4-34
13	300	0	10	200	300	200	0	200	300	1,5E-02	1,9E-02	1,2E-03	4,2E-03	2,7E-04	1,1E-02	-	Non muté	VH3-21
14	200	150	200	50	200	200	50	160	280	2,5E-02	2,7E-02	3,6E-03	6,3E-03	5,6E-04	2,1E-02	-	Non muté	VH3-21
15	140	210	50	0	50	40	30	0	200	2,9E-03	2,1E-02	3,3E-04	6,6E-04	3,7E-05	5,3E-03	-	Non muté	VH3-21
16	100	50	20	0	100	200	0	50	200	1,6E-02	3,8E-02	8,0E-03	5,1E-03	1,8E-03	2,8E-02	-	Non muté	VH4-34
17	200	50	0	0	0	50	20	100	300	1,3E-02	1,2E-02	1,2E-02	2,6E-03	1,3E-04	1,0E-02	-	Muté	VH3-21
18	300	300	100	50	50	100	100	200	70	2,6E-02	2,1E-02	1,5E-03	3,2E-03	1,9E-04	3,0E-02	-	Muté	VH1-8
19	250	300	300	100	200	200	300	0	180	/	/	/	/	/	/	-	Non muté	VH3-21
20	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4,0E-02	7,7E-02	1,7E-02	2,0E-02	1,2E-03	3,7E-02	+	Non muté	VH1-18

Tableau 2 : Récapitulatif des données obtenues au cours de ce travail pour les patients présentant un lymphome du manteau étudiés.



Serment des Apothicaires

De jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

