

SUJET DE THESE ED 614 & 615 2019

Sujet de thèse

Informations sur l'équipe	
Nom & Prénom du porteur du sujet	Nathalie Faumont
Nom de l'équipe	Mécanismes moléculaires de la lymphomagenèse B ; CRIBL
Adresse de messagerie du porteur du sujet	nathalie.faumont@unilim.fr (contact candidature)
Téléphone	05 55 19 56 42 21
Adresse	CBRS Centre de Biologie et Recherche en Santé/Pôle Biologie Santé; 2 rue du Pr. Bernard Descottes 87025 LIMOGES Cedex; FRANCE
Co-direction envisagée éventuellement	Jean Feuillard
Informations sur le sujet	
Titre du sujet	Rôle de la sous-unité c-Rel de NF-κB dans les GC-DLBCL : établissement d'un modèle murin préclinique
Mots clés	Lymphome B, c-Rel, tumorigenèse
Présentation détaillée du projet doctoral (1 page maximum)	<p>Le facteur de transcription Rel/NF-κB inclue 5 sous unités, p50, p52, RelA(p65), RelB et c-Rel. Ces sous-unités forment des dimères qui régulent de nombreux gènes essentiels pour l'immunité innée et adaptative, la prolifération cellulaire et la survie, l'inflammation, le développement de tumeurs, la chimiorésistance et la radiorésistance. Deux voies d'activation sont décrites : la voie classique pour l'activation des complexes contenant RelA et/ou c-Rel et la voie alterne pour l'activation des complexes impliquant RelB.</p> <p>NF-κB joue un rôle clé dans l'initiation et évolution de plusieurs types de lymphomes B. L'activation de NF-κB peut survenir en raison de <i>i</i>) mutations dans des gènes régulateurs des voies d'activations tels que <i>TNFAIP3</i>, <i>CARD11</i>, <i>MYD88</i>, <i>NFKBIA</i> et <i>CD79a/b</i> ; <i>ii</i>) translocations chromosomiques telles que t(11; 18)(q21; q21) / API-MALT1 ; ou <i>iii</i>) de récepteurs de surface cellulaire, tels que CD40 et la protéine membranaire de latence 1 du virus d'Epstein-Barr ou EBV. Les lymphomes B diffus à grandes cellules incluant le sous-type activé (ABC-DLBCL ; <i>activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma</i>) et les lymphomes B primaires du médiastin (PMBL ; <i>primary mediastinal B-cell lymphoma</i>), ainsi que les lymphomes Hodgkiniens classiques et les lymphomes du MALT, possèdent des signatures de gènes cibles de NF-κB pouvant favoriser la progression et la survie du lymphome.</p> <p>En 2014, nous avons publié un travail qui démontre une inhibition croisée entre RelA et RelB et indique, <i>in fine</i>, que RelB serait subordonnée à RelA dans le processus lymphomatogène des DLBCL associés à l'EBV (Chanut et al, Leukemia 2014). En quelques mots, nous mettons en exergue le rôle majeur de RelA, et donc de la voie classique NF-κB dans ces lymphomes EBV positif. Plus récemment, nous avons créé un modèle de souris double transgénique qui développe spontanément des tumeurs agressives proches des DLBCL chez l'homme (David et al, Haematologica 2017). Ce modèle présente une activation constitutive de NF-κB au travers d'une signalisation CD40 (homologue cellulaire de LMP1) associée à une surexpression de c-Myc.</p> <p>Avec le « Consortium NF-κB et Cancers » (6 équipes CHU/EPST de Limoges et Paris), nous avons caractérisé par EMSA (<i>Electrophoretic</i></p>

Document à compléter en français et/ou en anglais

	<p><i>Mobility Shift Assay</i>) les complexes NF-κB contenant RelA, RelB et c-Rel sur une série de 66 DLBCL repartis en 43 ABC et 23 GC (<i>Germinal center B-cell like</i>). Nos résultats montrent que <i>i</i>) RelA est associée au sous-type ABC, <i>ii</i>) RelB est présent quel que soit le sous-type ABC ou GC, et <i>iii</i>) une activité de fixation à l'ADN de c-Rel est associée aux GC-DLBCL. Pour comprendre la place de l'activité c-Rel dans l'émergence des GC-DLBCL, nous corrélons nos données d'EMSA aux données de transcriptome haut-débit déjà acquises. Nous pouvons ainsi définir une signature transcriptomique spécifiquement associée à c-Rel dans les GC-DLBCL et à RelA dans les ABC-DLBCL. Nous avons ensuite validé cette signature c-Rel des GC-DLBCL sur l'ensemble de la série DLBCL soit 210 tumeurs au total puis sur une série indépendante du groupe de L Staudt.</p> <p>Au total, ces données suggèrent que c-Rel est fonctionnel dans GCB-DLBCL. L'objectif global du projet doctoral est d'étudier la contribution de c-Rel à la tumorigenèse des GCB-DLBCL. Pour ce faire, nous proposons de mettre en place des expériences sur modèles cellulaire de DLBCL afin de montrer l'impact sur la prolifération et la survie d'une surexpression de c-Rel. Nous développerons également des modèles murins conditionnels de surexpression de c-Rel uniquement dans les lymphocytes B : mature (CD19_Cre) ou du centre germinatif (AID_Cre).</p> <p>Ces modèles murins de lymphomagenèse seront suivis dans le temps pour le développement de lymphome B. Egalement, avant l'apparition macroscopique de la tumeur, nous comparerons ces souris aux souris contrôles (sauvages, CD19_Cre, ou AID_Cre selon le cas) pour mettre en évidence des variations :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Histologique : poids de la rate et des ganglions lymphatiques, inclusion en paraffine ou congélation du tissu en vue d'immunomarquages pour leur caractérisation ; • Cellulaire : dissociation des cellules constituant les tissus (moelle osseuse, rate et ganglion lymphatiques) pour <i>i</i>) définir leur phénotype et leur taux par immunomarquage et analyse en cytométrie en flux, <i>ii</i>) étudier la prolifération et l'apoptose, ainsi que la signalisation cellulaire, et également <i>iii</i>) mesurer les taux sériques des différents isotopes d'immunoglobulines ; et • Moléculaire et génétique : sur cellules B isolées étude <i>i</i>) du répertoire antigénique, <i>ii</i>) de la recombinaison VDJ, <i>iii</i>) de la commutation de classe, <i>iv</i>) de l'hypermutation somatique, <i>v</i>) du transcriptome et <i>vi</i>) selon les résultats, séquençage de l'exome entier entre l'état pré-tumoral et tumoral. <p>Pour tester l'influence de facteurs environnementaux de type pathogène sur la survenue de lymphome, nous réaliserons :</p> <ul style="list-style-type: none"> • des stimulations <i>ex vivo</i> des splénocytes ou cellules B triées par activation du BCR, des TLR4 et 9 (par les LPS, et les CpG respectivement), et du CD40 : analyse de la prolifération et survie ; • des stimulations TLR <i>in vivo</i> par injection régulière de LPS et/ou d'ODN CpG : analyse histologique, et cellulaire des sous-populations B ; et • des immunisations antigéniques par injection de 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl haptène conjuguait à l'ovalbumine (NP-OVA) pour une stimulation T-dépendante.
<p>Objectif et contexte (300 mots max)</p>	<p>Dans la littérature, le rôle de c-Rel dans les GC-DLBCL n'est pas bien compris puisque la surexpression d'A20 (inhibiteur de la voie classique NF-κB) dans des lignées de type GC-DLBCL ne modifie pas leur survie (contrairement aux ABC-DLBCL). Nos données montrent (<i>i</i>) qu'il existe une forte activité c-Rel NF-κB dans environ 30% des GC-DLBCL, mise</p>

SUJET DE THESE ED 614 & 615 2019

	<p>en évidence par EMSA et validé grâce aux données de transcriptome et par RT-PCR quantitative sur une nouvelle série de DLBCL, et (ii) que l'on peut mettre en évidence une signature transcriptomique associée à c-Rel. Cette signature c-Rel est étroitement liée à l'amplification de la région du chromosome 2p13 où se trouve le gène REL. Ces résultats suggèrent que c-Rel serait fonctionnel dans les GC-DLBCL.</p> <p>Nous avons également réalisé des expériences de surexpression de c-Rel et son variant d'épissage c-RelΔ9 dans un modèle de cellules B humaines immortalisées par l'EBV (cellule EREB2.5). Dans ces cellules, le programme EBV peut-être éteint ce qui nous a permis d'observer un effet anti-apoptotique de c-Rel et c-RelΔ9 en condition quiescente. Nous avons également inhibé l'expression de c-Rel par siRNA (small hairpin RNA) dans des lignées de type GC-DLBCL (SuDhl-4 et SuDhl-6). Le pourcentage de cellules apoptotiques augmente avec l'inhibition de l'expression de c-Rel. C-rel et c-RelΔ9 favorisent donc la survie <i>in vitro</i> des cellules B tumorales issues de GC-DLBCL.</p> <p>En résumé, plusieurs données acquises sur tumeurs humaines et modèles cellulaires identifient c-Rel comme un oncogène potentiel dans les GC-DLBCL. Notre objectif dans le présent projet est de faire la preuve <i>in vivo</i> du pouvoir transformant de c-Rel en développant pour la première fois des modèles murins le surexprimant uniquement dans les lymphocytes B et ce à différents stades du développement B.</p> <p>La création de ces modèles de souris se fera selon le respect des règles éthiques en vigueur au sein de l'animalerie de notre institut de recherche GEIST (Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques), Fédération de Recherche CNRS 3503.</p>
<p>Résultats attendus (300 mots max)</p>	<p>En termes de régulations de l'activité transcriptionnelle des lymphomes B, NF-κB et c-Myc sont parmi les cibles cellulaires les plus prometteuses pour le traitement des lymphomes B non-hodgkiniens. Sur la base de nos résultats actuels, nous ouvrons un nouveau champ de recherche sur les GC-DLBCL, sous-type de DLBCL mal compris en termes mécanistiques pour lequel la place de NF-κB a été négligée ou ignorée.</p> <p>Les modèles précliniques que nous souhaitons développer aideront à une meilleure compréhension moléculaire des DLBCL, ainsi qu'à la recherche de nouvelles thérapeutiques ciblant la sous-unité c-Rel de NF-κB. Ce projet repose sur l'expertise reconnue du site de limoges dans l'établissement de modèles précliniques de cancers, expertise unique et identifiée comme point fort pour le projet Oncosphère porté par la région Nouvelle Aquitaine.</p>
<p>Références bibliographiques (10 max)</p>	<p>- David A, Arnaud N, Fradet M, Lascaux H, Ouk-Martin C, Gachard N, Zimber-Strobl U, Feuillard J, Faumont N (2017). c-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor-κB activated B cells. <i>Haematologica</i> 102(5):883-94.</p> <p>- Chanut A, Duguet F, Marfak A, David A, Petit B, Parrens M, Durand-Panteix S, Boulouin-Deveza M, Gachard N, Youlyouze-Marfak I, Bordessoule D, Feuillard J and Faumont N (2014). RelA and RelB cross-talk and function in Epstein-Barr virus transformed B cells. <i>Leukemia</i> 28:871-879.</p> <p>-Hunter JE, Leslie J, and Perkins ND. (2016) c-Rel and its many roles in cancer: an old story with new twists. <i>Br J Cancer</i> 114(1):1-6.</p>

Document à compléter en français et/ou en anglais

SUJET DE THESE ED 614 & 615 2019

	<p>-Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, et al. (2009) Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kB in diffuse large B-cell lymphoma. <i>Nature</i> 459(7247):717–721.</p> <p>-Lim KH, Yang Y, Staudt LM (2012) Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF-kB in lymphoid malignancies. <i>Immunol Rev</i> 246(1):359–378.</p> <p>-Lenz G, Wright GW, Emre NC, Kohlhammer H, et al. (2008) Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 105(36):13520–13525.</p> <p>-Li L, Xu-Monette ZY, Ok CY, Tzankov A, et al. (2015) Prognostic impact of c-Rel nuclear expression and REL amplification and crosstalk between c-Rel and the p53 pathway in diffuse large B-cell lymphoma. <i>Oncotarget</i> 6(27):23157–23180.</p>
Financement doctoral	<i>Sous réserve de financement</i>
Informations sur le candidat	
Profil et compétences recherchées	Connaissances théoriques en hématologie, immunologie et sur l'établissement de modèles murins transgéniques. Connaissance pratique de la cytométrie en flux, et des techniques de biologie moléculaire.