

ANNÉE 2014

N° 046

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 13 octobre 2014

Par Aurélie Decaux née le 26.10.1987

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Etude des miARNs dans le lymphome folliculaire

Président : Mme le Professeur Marie-Christine BENE

Membres du jury :
Mme le Docteur Céline PANGAULT
Mr le Professeur Thierry FEST
Mr le Docteur Cédric PASTORET

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Marie-Christine BENE,

Pour avoir accepté, sans hésitation, de participer à cette thèse.

Votre présence représente mes débuts en Hématologie au CHU de Nantes et les personnes qui m'ont initié à cette spécialité.

Recevez mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Thierry FEST,

Pour votre intérêt pour le sujet et pour vos conseils.

Je vous remercie pour la perspective que vous m'offrez après la thèse.

Recevez toute ma gratitude.

A Monsieur le Docteur Cédric PASTORET,

Pour avoir accepté de juger ce travail,

Pour ton implication et tes compétences en Hématologie qui forcent l'admiration.

A Madame le Docteur Céline PANGAULT,

Pour m'avoir proposé ce sujet et fait plonger dans le monde des miARNs,

Pour avoir répondu présente à mes nombreux appels à l'aide,

Et pour toutes tes remarques et suggestions améliorant la qualité de ce travail.

Ce fut un plaisir de partager cette thèse avec toi.

A mes parents,

Pour être un exemple de courage et de persévérance, pour m'avoir inculqué les valeurs du travail,

Pour avoir cru en moi et m'avoir toujours donné le choix,

Mais surtout, pour être là, présents à toutes les étapes de ma vie.

A mes grands-parents,

Pour faire partie de mes modèles dans la vie,

Pour votre soutien indéfectible et vos « Travailles bien surtout ».

A mon grand-père,

Merci pour tous ces beaux souvenirs. Ils sont gravés à jamais.

Aux deux hommes de ma vie,

A mon frère, qui a partagé mon enfance. T'avoir à mes côtés, même si la géographie nous éloigne parfois, est essentiel à mes yeux.

A Matthieu, qui partage mon présent et partagera mon avenir. Merci de me rendre unique. De beaux projets nous attendent maintenant...

Merci également pour l'apport de ta touche graphique à cette thèse !

A Anna, Cécile, Charlène et Fanny,

Vous êtes mes âmes sœurs.

Les moments avec vous sont indispensables à mon bonheur ! En espérant que l'on puisse toujours être là les unes pour les autres !

Votre présence ce week end représente beaucoup !

A Caroline et Juliette,

Le temps passe, mais rien ne change entre nous. C'est la définition d'une belle amitié.

Aux Rennaises qui sont devenues bien plus que de simples co-internes (ou amie de co-interne !),

A Charlotte, Clotilde, Estelle, Laure, Louise et Pauline,

Vous avez rendu ces 4 années d'internat mémorables, en partie grâce aux pauses café-thé du midi, à refaire le monde ou du moins nos mondes, et aux mythiques « soirées filles » !

Une nouvelle étape de ma vie commence, j'espère vous avoir à mes côtés.

Aux Rennais qui eux aussi ont prit de l'importance dans ma vie,

A Antoine C., Antoine E., Fred, Maxime, Nico et Stéphane.

Un merci tout particulier à Maxime pour avoir supporté toutes mes plaintes concernant cette thèse !

A Anna et Mylène, nous sommes les « rolls » ou les « miss » de l'Hématologie, ce fut génial de pouvoir partager ce titre avec vous pendant ces 6 derniers mois ! Que l' « Amaspirit » demeure !

A Clarisse, Eugénie, Sorya, Thibault et à toutes les autres rencontres de l'internat. Vous m'avez enrichi.

A Béatrice et Marthe,

Pour tous les bons moments passés dans la pièce de cytologie, les fous rires et les sages enseignements comme le fameux « Il ne faut pas abuser du vingt ».

Merci pour ces 2 dernières années en cytologie. Les 2 prochaines, seront, j'en suis sûre, aussi bonnes.

Aux Assistantes et Biologistes de Nantes, de Rennes et de Laval,

Merci pour vos enseignements.

Aux membres du laboratoire d'Hématologie mais aussi des autres services,

Merci pour votre accueil, ce fut un plaisir de travailler avec vous.

SOMMAIRE

I. GENERALITES	12
A. LA LYMPHOPOIESE B NORMALE	13
1. <i>Etapas précoces de la lymphopoïèse</i>	13
2. <i>Etape tardive dépendante de l'antigène</i>	15
B. LE LYMPHOME FOLLICULAIRE	17
1. <i>Epidémiologie</i>	17
2. <i>Clinique</i>	18
3. <i>Diagnostic et pronostic</i>	18
4. <i>Traitements actuels et perspectives</i>	21
5. <i>Lymphomagénèse</i>	22
a. <i>Origine des cellules tumorales</i>	22
b. <i>Processus tumoral</i>	23
c. <i>Le microenvironnement</i>	27
C. LES MICRO-ARN	28
1. <i>Petits ARN régulateurs</i>	28
a. <i>Généralités sur les miARNs</i>	28
b. <i>Découverte des miARN</i>	29
c. <i>Conservation au cours de l'évolution</i>	29
2. <i>Biogenèse et modes d'action</i>	30
a. <i>Organisation génomique et transcription</i>	30
b. <i>Exemple du cluster miR-17-92</i>	30
c. <i>Maturation des miARN</i>	32
d. <i>Formation du complexe RISC</i>	34
e. <i>Mode d'action des miARNs</i>	34
f. <i>Conséquences de l'appariement miARN/ARNm</i>	35
3. <i>Fonctions des miARNs</i>	36
4. <i>Régulation des miARNs</i>	36
5. <i>Nomenclature</i>	37
D. MIARN ET ONCOGENESE	39
1. <i>miARN et cancers</i>	39
a. <i>Altérations des miARNs dans les cancers</i>	39
b. <i>Perturbation globale</i>	40
c. <i>Notions de miARNs suppresseurs de tumeurs et oncomirs</i>	42
d. <i>Expression miARN : outils de diagnostic/ pronostic des cancers ?</i>	45
2. <i>miARNs et hématopoïèse</i>	45
a. <i>miARNs et cellules souches hématopoïétiques</i>	46
b. <i>miARNs et érythropoïèse</i>	47
c. <i>miARNs et granulopoïèse</i>	47
d. <i>miARNs et lymphopoïèse</i>	47

3.	<i>miARNs et hémopathies</i>	50
a.	<i>miARNs et leucémie lymphoïde chronique</i>	50
b.	<i>miARNs et LA</i>	50
4.	<i>miARNs et lymphome folliculaire</i>	51
OBJECTIFS		53
II. MATERIELS ET METHODES		54
A.	COHORTE	55
B.	PURIFICATION CELLULAIRE	56
C.	EXTRACTION ET QUALIFICATION	57
1.	<i>Extraction de l'ARN total</i>	57
2.	<i>Extraction des miARNs</i>	57
3.	<i>Qualification des ARN</i>	57
D.	ANALYSE DU MIRNOME	58
1.	<i>Principe du séquençage haut débit</i>	58
2.	<i>Technique d'analyse de nos échantillons</i>	60
3.	<i>Analyse par le logiciel miRanalyser</i>	60
E.	ANALYSE DU TRANSCRIPTOME	62
1.	<i>Principe de la microarray</i>	62
2.	<i>Technique d'analyse de nos échantillons</i>	62
F.	VALIDATION EN Q-RT-PCR	63
G.	BIOINFORMATIQUE	64
1.	<i>Analyse statistique</i>	64
2.	<i>Intégration du miRNome et du transcriptome</i>	64
a.	TargetScan et miRTarBase	64
b.	Ingenuity Pathway Analysis	64
III. RESULTATS		65
A.	RESULTATS GLOBAUX	66
1.	<i>Données globales du miRNome</i>	66
2.	<i>Données globales du transcriptome</i>	67
B.	CHOIX DE LA POPULATION NORMALE CONTROLE	68
1.	<i>Représentation en Analyse par composante principale</i>	68
2.	<i>Analyses statistiques du miRNome et du transcriptome</i>	69
C.	PROFILS DU LYMPHOME FOLLICULAIRE	71
1.	<i>Représentation en ACP de échantillons de lymphome folliculaire avec les centrocytes</i>	71
2.	<i>Analyse statistique</i>	71
a.	Analyse statistique du miRNome	71
b.	miARNs d'intérêt dans le lymphome folliculaire	74
c.	Confirmation en Q-RT-PCR	75
3.	<i>Intégration du profil miRNome avec le transcriptome dans le lymphome folliculaire</i>	76
a.	Profil trancriptomique du lymphome folliculaire	76
b.	Détermination des gènes cibles des miARNs d'intérêt	79

c.	Intégration des miARNs/ ARNm cibles dans les voies physio-pathologiques.....	81
IV.	DISCUSSION	84
A.	VALIDATION TECHNIQUE DE NOS RESULTATS	85
B.	PROFIL DE LA DIFFERENCIATION LYMPHOCYTAIRE B GANGLIONNAIRE	87
C.	MIRNOME DANS LE LYMPHOME FOLLICULAIRE.....	89
1.	<i>Signature miARNs du LF</i>	89
2.	<i>miARNs oncogènes ou suppresseurs de tumeurs ?</i>	90
a.	Famille des miRs-29	90
b.	Familles des miRs-26	90
c.	Cluster 17-92 et paralogues	91
D.	IMPLICATION FONCTIONNELLE DES MIR-26, MIR-29 ET MIR-17-92	92
1.	<i>Intégration aux données du transcriptome</i>	92
2.	<i>Voie PI3K/AKT</i>	92
3.	<i>Rôles des miR-26, miR-29 et miR-17-92 dans la lymphomagénèse du LF</i>	93
V.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	95
VI.	BIBLIOGRAPHIE	97

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure du BCR et réarrangements des gènes des immunoglobulines	14
Figure 2 : Ontogénie des lymphocytes B.	16
Figure 3 : Photo de centrocytes	23
Figure 4 : Photo d'un centroblaste	23
Figure 5 : Modèle de la lymphomagenèse du lymphome folliculaire [32]	25
Figure 6 : Classification des ARNs	28
Figure 7 : Organisation génomique du cluster miR-17-92 et ses paralogues [45].....	31
Figure 8 : Biogénèse des miARNs [49]	33
Figure 9 : Anomalies pouvant modifier quantitativement ou qualitativement l'expression des miARNs dans les cancers [61].....	40
Figure 10 : Fonctionnement des miARNs en tant que suppresseurs de tumeurs et oncogènes [49]...	43
Figure 11 : Représentation de la régulation du cluster 17-92 et de ses cibles [73]	45
Figure 12 : miARNs et hématopoïèse [78]	46
Figure 13 : Profils miARNs des cellules de la différenciation lymphocytaire B selon les données de la littérature [86] [87] [85] [88] [85]	49
Figure 14 : Profils miARNs des cellules du LF et du DLBCL comparés aux ganglions normaux (en vert) et comparaison du LF avec le DLBCL (en gris)	52
Figure 15 : Etapes du séquençage Illumina (issue du site internet Illumina)	59
Figure 16 : Algorithme général de miRanalyser [98].....	61
Figure 17 : Représentations du nombre de miARNs détectés en fonction de la population d'échantillons	67
Figure 18 : Représentation graphique en ACP des cellules de la différenciation cellulaire.....	69
Figure 19 : Représentation graphique en ACP des échantillons de LF et des échantillons de centrocytes	71
Figure 20: Représentation de l'expression relative du miR-26a-5p et du miR-29a-3p en Q-RT-PCR d'échantillons de LF, BGC et CC	75
Figure 21 : Co-régulation des gènes cibles significativement dérégulés dans le LF par les miRs d'intérêt de notre étude.....	81
Figure 22 : Voie PI3K/ AKT	82
Figure 23 : Représentation de l'expression relative du gène PTEN dans les échantillons de LF et de CC par analyse du niveau d'expression de la PS 233314_at.....	83
Tableau 1 : Survie selon les groupes pronostics établis selon le score FLIPI-1	20
Tableau 2 : Survie selon les groupes pronostics établis selon le score FLIPI-2.....	20
Tableau 3 : Anomalies génétiques retrouvées au diagnostic du LF	26
Tableau 4 : Exemples de gènes cibles du cluster miR-17-92 et leurs rôles	44
Tableau 5 : miARNs impliqués spécifiquement dans l'hématopoïèse	46
Tableau 6 : Caractéristiques clinico-biologiques de la cohorte	55
Tableau 7 : Stratégies de purification cellulaire	56
Tableau 8: miARNs significativement sur-exprimés dans le LF	72

Tableau 9: miARNs significativement sous-exprimés dans le LF	73
Tableau 10: Top 30 des gènes les plus sur-exprimés dans le LF.....	77
Tableau 11: Top 30 des gènes les plus sous-exprimés dans le LF.....	78
Tableau 12 : Nombre de cibles et leur expression globale pour les miR-26a, miR-29a et miRs représentatifs du cluster 17-92.....	79

TABLE DES ABREVIATIONS

Ac: Anticorps
ACP: Analyse par composante principale
ADN: Acides désoxyribonucléiques
AGO: Argonaute
AID: Activation-induced cytidine deaminase
ARN: Acides ribonucléiques
ARNm: ARN messenger
ARNt: ARN de transfert
ATRA: Acide tout trans rétinoïque
BCL: B cell LLC/Lymphoma
BCR: B-cell receptor
BGC: Cellules B du centre germinatif
C/EBP α : CCAAT/Enhancer Binding factor Alfa
CDR : complementary determining region
CIT: Carte d'identité tumorale
CSH : cellules souches hématopoïétiques
CSR: Class-switch recombination
Ct: Cycle threshold
DGCR8: Di George Critical Region
DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma
ERK: Extracellular signal-regulated kinase
FC: Fold change
FDC: cellules folliculaires dendritiques
FLIPI: Follicular lymphoma international prognostic index
FLLC: Follicular lymphoma like-B
FRD: Fold discovery rate
GB: Globule blanc
GELF: Groupe d'étude du lymphome folliculaire
HMGA2:High mobility group AT-hook 2
Ig: Immunoglobuline
IPA: Ingenuity pathway analysis
LAL: Leucémie aigue lymphoblastique
LDH : Lactate deshydrogénase
LF: Lymphome folliculaire
LNH: Lymphome non Hodgkinien
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MO: Moelle osseuse
MRE : miRNA response element
NF1A: Facteur nucléaire 1A
OMS: Organisation mondiale de la santé

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PDCD2 : Programmed cell death-2

PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase

PS: Probe set

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

Q-RT PCR: Quantitative-Retrotranscriptase Polymerase chain reaction

RAG: Recombination activating gene

R-B: Rituximab- Bendamustine

R-CHOP: Rituximab- Cyclophosphamide, Hydroxyurée, Oncovin, Prednisone

RIN : RNA Integrity Number

RISC: RNA induced silencing complex

SHM: Hypermutation somatique

siARN: small interference ARN

I. Généralités

A. LA LYMPHOPOIESE B NORMALE

Les lymphocytes B remplissent leur rôle dans l'immunité adaptative par la reconnaissance spécifique des pathogènes. Cette fonction est assurée par leurs récepteurs, les anticorps (Ac) membranaires, et comme ceux-ci ont une très grande diversité, ils peuvent reconnaître d'innombrables antigènes. Afin de générer une telle diversité, il est inconcevable que tout le répertoire des Ac soit codé par des gènes distincts, puisqu'il faudrait plus de gènes pour coder ces récepteurs qu'il en existe dans le génome entier. Lors de la génération des Ac au cours de la lymphopoïèse B normale, des modifications moléculaires ont lieu permettant d'assurer la diversité du répertoire. Le développement des lymphocytes B consiste donc en une succession de stades de différenciation identifiés en partie par le statut des réarrangements de leur récepteur B membranaire (BCR). La lymphopoïèse B s'effectue initialement dans la moelle osseuse (MO), puis dans les organes lymphoïdes secondaires.

1. Etapes précoces de la lymphopoïèse

Les cellules souches de la MO se différencient en progéniteur lymphoïde commun qui s'engagera ensuite dans la lignée B. La figure 2 résume les différentes étapes du développement des lymphocytes B. Dans le MO se produit le réarrangement des gènes codant pour le récepteur B à l'antigène, sous l'action des recombinaisons RAG-1 et RAG-2 (recombination activating gene) à partir du stade pro-B, stade où ces enzymes sont fortement exprimés. Les parties variables des immunoglobulines (Ig) sont formées par la sélection et la jonction des segments V, D (chaînes lourdes uniquement) et J sur le gène codant pour les chaînes d'Ig (figure 1). Les jonctions de segments sont aléatoirement modifiées, il peut aussi bien se produire des délétions que des ajouts de nucléotides en petit nombre. Du fait de la sélection des segments parmi un large choix et de l'imprécision de leur jonction, il existe une grande diversité du site de reconnaissance de l'antigène. Ces réarrangements sont sous l'influence de signaux produits par les cellules de l'environnement [1].

La survie des lymphocytes B naïfs dépend de leur rencontre avec l'antigène. A leur sortie de la moelle, ces cellules circulent dans le sang jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses).

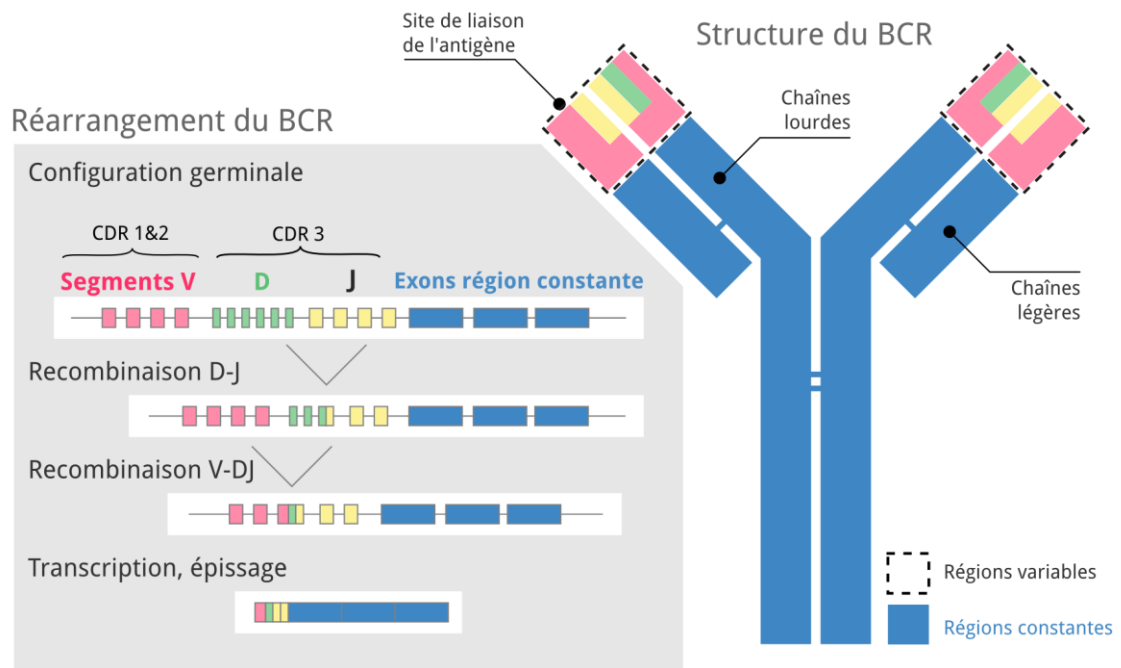


Figure 1 : Structure du BCR et réarrangements des gènes des immunoglobulines (BCR : Récepteur pour l'antigène des lymphocytes B)

2. Etape tardive dépendante de l'antigène

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les antigènes sont présentés aux lymphocytes B par les cellules dites présentatrices de l'antigène comprenant les cellules dendritiques et les macrophages. La poursuite de la réponse cellulaire dépend des signaux produits lors de l'interaction entre les cellules B et les cellules T et l'association de leurs marqueurs de surface, notamment CD40-CD154 (CD40L). A l'issue de cette première rencontre T-B, les cellules B pourront migrer dans la zone folliculaire et élaborer un centre germinatif [2]. A ce niveau, deux modifications majeures surviennent sur les gènes des Ig, visant à modifier la fonction ou l'affinité des Ac produits par les cellules B. L'enzyme responsable spécifiquement des changements moléculaires au sein du centre germinatif porte le nom de AID (activation-induced cytidine deaminase) [3].

Les cellules B entrent en phase de prolifération et sont appelées des centroblastes, formant la zone dite « sombre » du centre germinatif. Il se produit alors les phénomènes d'hypermutations somatiques (SHM) des régions variables des deux chaînes d'Ig, introduisant de nouvelles mutations enrichissant la diversité du répertoire, et modifiant également d'autres gènes comme *BCL6*.

Une fois cette phase achevée, les centroblastes prennent le nom de centrocytes exprimant un nouveau BCR soit d'affinité diminuée soit d'affinité augmentée. Ces centrocytes sont localisés dans la zone dite « claire » du centre germinatif et peuvent entrer en contact avec les cellules présentatrices de l'Ag et les cellules T. Seuls les lymphocytes au BCR de plus forte affinité seront sélectionnés, survivront et pourront éventuellement réaliser de nouveaux cycles de prolifération et de SHM. Les centrocytes non sélectionnés vont entrer en apoptose. Par la suite, les centrocytes sélectionnés vont subir le phénomène de recombinaison de classe (CSR) c'est-à-dire le remplacement d'une partie constante d'Ig par une autre [4].

Une fois le switch isotypique effectué, les cellules B vont soit pouvoir se transformer en cellules B mémoires à longue durée de vie [5], soit devenir des plasmocytes qui rejoindront la moelle osseuse.

Les cellules de ces 3 phases, « pré-centre germinatif », « centre germinatif » et « post centre germinatif », de la réponse immune B T-dépendante présentent des caractéristiques immunophénotypiques et moléculaires spécifiques de chaque stade, rappelées dans la figure 2.

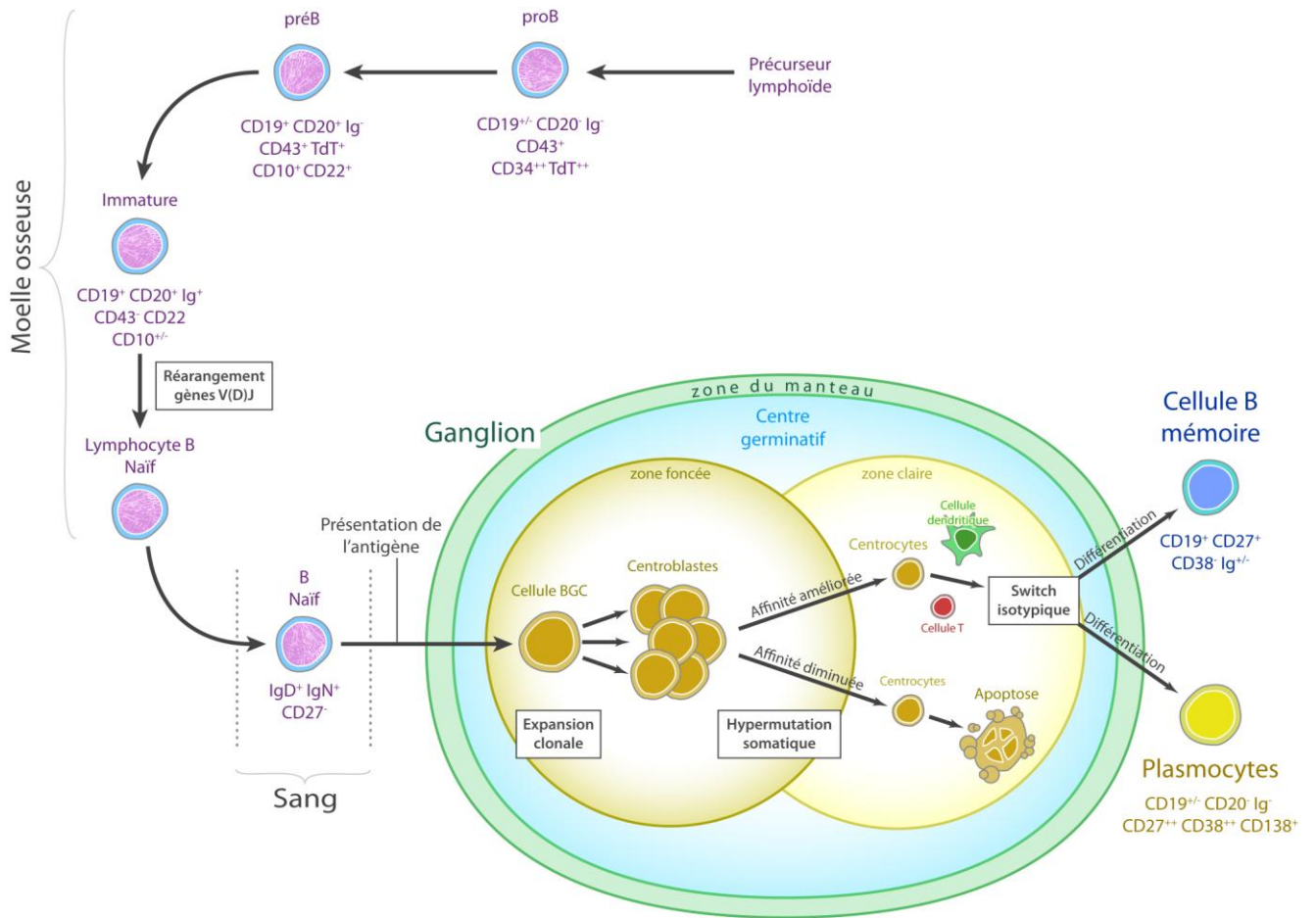


Figure 2 : Ontogénie des lymphocytes B.

Chaque cellule correspondant à un stade du développement est caractérisée par un profil immunophénotypique propre.

B. LE LYMPHOME FOLLICULAIRE

Le lymphome est une prolifération cellulaire maligne se produisant au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Chez l'Homme, nous différencions deux types de proliférations lymphomateuses : le lymphome Hodgkinien, et les lymphomes dits non Hodgkiniens (LNHs). Les LNHs correspondent à une prolifération anormale de lymphocytes le plus souvent issus de la lignée B (85% des cas), plus rarement de la lignée T (15% des cas). Le lymphome folliculaire (LF) appartient aux LNH-B et correspond à une accumulation de lymphocytes B tumoraux, dérivant de la zone centro-germinative de la différenciation lymphocytaire ganglionnaire [6]. Cette prolifération se fait aux dépens des lymphocytes B normaux.

1. Epidémiologie

Le lymphome folliculaire est le lymphome le plus fréquent des LNHs de bas grade, il représente 20 à 30% des hémopathies lymphoïdes B.

L'incidence du lymphome folliculaire augmente avec l'âge et varie selon la géographie. Le LF est le 2ème lymphome le plus fréquent en Europe de l'Ouest et aux Etats-Unis, et représente 70% des lymphomes indolents [7]. En Asie, le LF est moins fréquent en comparaison aux données de l'Europe et de l'Amérique du Nord. Il est toutefois à noter que le nombre de patients atteints de LF au Japon est en constante augmentation.

En France, les données pour 2012 recensent 2530 nouveaux cas, dont 52% concernent les hommes [8]. L'incidence augmente avec l'âge et atteint un pic de 13-14 cas pour 100000 personnes-années chez les [70-79 ans]. Les taux d'incidence standardisés sur la population mondiale sont de 2,5 chez l'homme et de 2,1 chez les femmes soit un ratio homme/femme à 1,2. Les données européennes (Heamacare, 2000-2006) [9] rapportent des taux moins élevés, à l'inverse de celles issues des études américaines qui rapportent des incidences plus importantes selon le National Cancer Institute (disponibles sur le site seer.cancer.gov).

L'évolution de l'incidence est en augmentation en France depuis 1995, de 3% chez l'homme et de 2,2% chez la femme par an et peut être attribuée à l'évolution de la démographie avec le vieillissement de la population. Toutefois, on constate depuis 2005 une nouvelle tendance avec une poursuite de l'augmentation de l'incidence mais à un taux moins élevé. Certaines équipes définissent différents facteurs environnementaux, tels que les pesticides ou encore

certaines solvants, comme étant responsables de la progression régulière de l'incidence du LF au cours des années [10].

Le LF fait partie des LNHS dits « indolents », caractérisés par le fait qu'ils évoluent lentement, souvent sur plusieurs années, avec peu ou pas de symptômes dans un premier temps. Du fait de cette évolution à bas bruit, la maladie est diagnostiquée chez la majorité des patients (plus de 70%) à un stade évolué (III ou IV), avec une atteinte diffuse comme par exemple à la moelle osseuse, dans plus de la moitié des cas [11]. L'âge médian au diagnostic est de 60 ans. Le LF peut survenir à tout âge, mais il reste exceptionnel chez l'enfant. Son évolution suit une succession de réponses aux traitements et de rechutes, la survie médiane étant de 8 à 12 ans.

2. Clinique

Le lymphome folliculaire est une maladie indolente, évoluant à bas bruit. Au début de la maladie, le signe le plus fréquent et le plus caractéristique est la présence d'adénopathie, unique ou multiple, chronique, en général indolore. En fonction de la taille et de la localisation des adénopathies, en particulier si elles sont profondes, des compressions, notamment digestives et urologiques, peuvent compliquer la clinique. D'autres symptômes non spécifiques peuvent accompagner la maladie comme la fièvre, la perte de poids, les sueurs nocturnes ou une fatigue inexplicable. Dans les phases évolutives de la maladie, on observe un envahissement des sites ganglionnaires et/ou extra ganglionnaires notamment avec la possibilité d'une atteinte neuro-méningée.

3. Diagnostic et pronostic

Le bilan initial comporte un examen clinique rigoureux à la recherche d'adénopathies et/ou d'une hépato-splénomégalie. L'imagerie permet de décrire les atteintes ganglionnaires profondes inaccessibles à l'examen clinique.

Le diagnostic de lymphome folliculaire repose essentiellement sur la biopsie ganglionnaire. L'analyse de celle-ci en anatomopathologie doit préciser le grade histologique de la tumeur, élément pronostic important. Dans la classification OMS, les LF sont séparés en 3 grades selon la cytologie : 1) à prédominance de petites cellules, 2) mixte, à petites et grandes cellules, 3) à prédominance de grandes cellules.

Le grade de la tumeur est établi par l'observation de l'architecture ganglionnaire en microscopie au grossissement Gx40. Il faut pour cela compter le nombre de centroblastes sur une dizaine de champs microscopiques [12] :

Grade I dit à petites cellules: 0 à 5 centroblastes par champs

Grade II dit à cellules mixtes: 6 à 15 centroblastes par champs

Grade III dits à grandes cellules: > 15 centroblastes par champs (IIIa: persistance de centrocytes, IIIb: absence de centrocytes)

Les grades I et II sont généralement associés à des maladies peu évolutives. Actuellement, la classification OMS 2008 des lymphomes de bas grade ne retient que les LF grade I, II et IIIa, le grade IIIb étant déjà assimilé à un lymphome de haut grade [13].

Le bilan initial est complété par un hémogramme et un myélogramme et sur l'ensemble des prélèvements peuvent être réalisés des analyses cytologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques, et moléculaires.

Le LF est une maladie incurable caractérisée par une succession de rechutes s'accompagnant d'une diminution de la sensibilité aux chimiothérapies. Sa transformation en lymphome B de haut grade, agressif, marque un tournant dans l'histoire de la maladie. Le plus souvent il s'agit d'une évolution en DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma) ou plus rarement en lymphome B de haut grade inclassable, aux caractéristiques intermédiaires entre le DLBCL et le lymphome de Burkitt [14]. De très rares cas d'évolution en LAL (Leucémie Aigüe lymphoïde) ou en lymphome lymphoblastique ont été rapportés dans la littérature. L'incidence de la transformation en lymphome de haut grade B varie considérablement selon les études, de 10 à 70% [15], et cet événement diminue la survie médiane puisque celle-ci est alors estimée à 1,7 ans [16].

Par l'étude d'une cohorte de près de 5000 patients diagnostiqués entre 1985 et 1992 en Europe et aux Etats-Unis, un groupe d'observation sur le LF a permis de définir des facteurs pronostiques. Les résultats montrent que la réponse au traitement ainsi que la survie globale des patients dépendent de 5 facteurs pronostiques :

- l'âge (< ou > à 60 ans)
- le nombre de sites ganglionnaires atteints (< ou > à 4)
- le stade de la classification Ann Arbor, prenant en compte le nombre d'aires ganglionnaires atteintes et la présence ou non de sites extra-ganglionnaires atteints.
- le taux de LDH (lactate déshydrogénase) (< ou > à la normale)
- le taux d'hémoglobine (< ou > à 12g/dL).

L'ensemble de ces facteurs définissent le score FLIPI-1 (follicular lymphoma international prognostic index) qui permet d'identifier 3 groupes à risque [11]. Le FLIPI-1 est l'index pronostique de référence de la survie globale dans LF dans la majorité des recommandations [17] (Tableau1).

Tableau 1 : Survie selon les groupes pronostics établis selon le score FLIPI-1

Groupe	Nombre de facteurs	Survie globale à 5 ans (%)	Survie globale à 10 ans (%)
Faible	0-1	90,6	70,7
Intermédiaire	2	77,6	50,9
Elevé	> ou = 3	52,5	35,5

L'index FLIPI-2 est une version modifiée du FLIPI-1 tenant compte des évolutions de traitements en particulier avec l'ère des immunochimiothérapies. L'âge et le taux d'hémoglobine sont toujours pris en compte tandis que le stade Ann Arbor est remplacé par la présence ou non d'un envahissement médullaire, le nombre d'aires ganglionnaires atteintes est remplacé par le diamètre du plus gros ganglion (> ou < à 6 cm) et le taux de LDH est remplacé par celui de la β 2-microglobuline (normal ou >) [18]. Ce nouvel index permet également de prédire la survie des patients (Tableau 2).

Tableau 2 : Survie selon les groupes pronostics établis selon le score FLIPI-2

Groupe	Nombre de facteurs	Patients au diagnostic (%)	Survie sans progression à 5 ans (%)
Faible	0	20	79,5
Intermédiaire	1-2	53	51,2
Elevé	> ou = 3	27	18,8

Les anomalies cytogénétiques participent à prédire le risque évolutif du LF. Plus le nombre d'anomalies génétiques augmente et moins bon est le pronostic [19]. La complexité du caryotype est en effet corrélée avec le grade histologique. Certaines anomalies ont une valeur pronostique propre : la trisomie 8, la del6q 23-26 et la del17p (où se situe le gène *P53* codant pour une protéine suppressive de tumeur) sont associées à une diminution de la survie globale et à un risque de transformation élevé.

De la même manière, le profil des anomalies moléculaires est associé à la survie des patients. L'analyse des profils géniques a montré que les LF de mauvais pronostics, associés à une rechute, surexpriment *BCL2*, *SMAD-1*, *PAX-5* et *ID-2* dont les protéines jouent un rôle dans le développement B. Au contraire, ils sous-expriment des gènes impliqués dans les interactions avec le microenvironnement tel que *MRP4* [20]. Les réarrangements de *C-MYC* sont impliqués dans la transformation du LF (6-10% des LF et 30-40% des DLBCL) tout comme les altérations géniques de *CDKN2A* et *CDKN2B* codant pour des protéines inhibitrices de cyclines kinases. Toutefois ces anomalies sont non spécifiques et inconstantes, les profils obtenus sont hétérogènes selon les études.

Les critères d'évaluation de la masse tumorale du GELF (groupe d'étude des lymphomes folliculaires) sont utilisés en pratique clinique dans la décision thérapeutique. Le LF est considéré de forte masse tumorale si au moins 1 des critères suivants est présent :

- Atteinte d'au moins 3 aires ganglionnaires, chacune de diamètre ≥ 3 cm
- Toute localisation ganglionnaire ou extra ganglionnaire de diamètre ≥ 7 cm
- Présence de symptômes B
- Splénomégalie dépassant la ligne ombilicale
- Epanchement pleural ou péritonéal
- Cytopénies (GB < 1G /L, Plaquettes < 100G/L)
- Présence de cellules lymphomateuses sanguines (> 5G/L)

Certains paramètres sont proposés comme facteurs pronostiques de transformation : le taux de $\beta 2$ -microglobuline ou l'albuminémie [21], le grade cytologique et le nombre d'aires ganglionnaires atteintes. D'autres proposent de tenir compte de l'indice FLIPI-1 ainsi que du nombre de lignes thérapeutiques reçues depuis le diagnostic par le patient [22].

4. Traitements actuels et perspectives

Le lymphome folliculaire présente initialement de forts taux de réponse aux chimiothérapies. L'approche thérapeutique varie selon la clinique, le stade de la maladie mais aussi en fonction des scores pronostiques. Elle peut aller de l'abstention thérapeutique à la greffe de cellules souches allogéniques [23].

Lorsque le patient est asymptomatique, avec une faible charge tumorale, et avec une progression lente de la maladie, il est recommandé d'adopter la stratégie du « wait and watch ». Si le patient présente des signes cliniques avec toutefois une maladie localisée, une radiothérapie exclusive peut être envisagée. Un traitement de 1^{ère} ligne par Rituximab seul peut être proposé en cas de faible masse tumorale. Pour la grande majorité des patients (80%) le diagnostic se fait à un stade avancé de la maladie, avec localisations multiples des foyers lymphomateux.

Le traitement d'induction de référence actuel associe un anticorps monoclonal anti-CD20, le Rituximab (MabThera®) à une polychimiothérapie composée de cyclophosphamide, d'hydroxydaunomicine, de vincristine (Oncovin®), et de Prednisone. L'ensemble forme ce que l'on appelle plus communément le traitement R-CHOP. Le bénéfice de l'ajout du Rituximab à la chimiothérapie a été prouvé dans de nombreux essais thérapeutiques. La réponse globale au R-CHOP est de 95% avec une réponse complète obtenue pour 55% des

patients. Depuis l'incorporation des anticorps monoclonaux dans les stratégies thérapeutiques, le délai de réponse au traitement et la médiane de survie se sont significativement prolongés.

Certains patients se montrent réfractaires au R-CHOP et des alternatives se mettent en place. La Bendamustine, agent alkylant, est capable d'inhiber la prolifération des cellules B lymphomateuses résistantes aux alkylants conventionnels, d'où son utilisation potentielle chez les patients réfractaires aux thérapeutiques habituelles. En utilisation avec le Rituximab il a été montré un effet synergique, et cette association R-B serait plus active que le R-CHOP avec une toxicité moindre [24].

Lors des rechutes, de nouvelles options thérapeutiques doivent être proposées. C'est pourquoi de nombreuses molécules sont en cours d'évaluation. Il s'agit de nouveaux anti-CD20 de structure modifiée (glycosylée, radiomarquée etc) ou ciblant d'autres épitopes, mais aussi d'anticorps monoclonaux ciblant d'autres marqueurs tels que les anti-CD22 (Epratuzumab) et les anti-CD80 (Galiximab seul ou radiomarqué). Le couplage d'anticorps monoclonaux avec un isotope radiomarqué pourrait non seulement cibler et tuer les cellules tumorales mais aussi détruire leur microenvironnement. Une autre voie de recherche en cours d'étude combine une immunothérapie type anti CD-20 avec un immunomodulateur tel que le lénalidomide conférant une action combinée sur la cellule B et sur le microenvironnement [25].

5. Lymphomagénèse

a. Origine des cellules tumorales

Les organes lymphoïdes secondaires ont une structure compartimentée en fonction des étapes de la réponse immune B. Les cellules B tumorales dérivent le plus souvent de cellules normales de l'un de ces compartiments. Dans le cas du LF, il s'agit d'un lymphome B mature dérivant des cellules B du centre germinatif ganglionnaire [26]. En effet, son architecture ganglionnaire, organisée en follicules néoplasiques renfermant un mélange de centrocytes (Figure 3) et de centroblastes (Figure 4), reproduit celle des centres germinatifs normaux. Les données immunophénotypiques confirment cette proximité cellulaire. Les cellules lymphomateuses du LF expriment les marqueurs de lignée lymphocytaire B : CD19, CD20, CD22, CD24, CD79a. A ceux-ci sont associés le plus souvent des marqueurs de centre germinatif :

- CD10 : L'expression du CD10 est d'autant moins fréquente que le grade histologique des cellules du LF est haut. Certains auteurs rapportent une corrélation positive entre l'absence de marqueur et l'absence de t(14 ; 18) [27].

- BCL6 (B cell LLC/Lymphoma): Le proto-oncogène *BCL6*, localisé sur le chromosome 3q27, code pour un répresseur transcriptionnel qui joue un rôle crucial dans le développement normal et pathologique des centres germinatifs en régulant la différenciation, la survie et les fonctions lymphocytaires B. BCL6 réprime notamment p53 et protège ainsi le lymphocyte B de l'apoptose p53-dépendante mais également d'autres voies d'apoptose impliquant PDCD2 (programmed cell death-2), ou les cyclines D1 et D2 [28].

Il existe fréquemment une co-expression des marqueurs CD10/CD38/BCL2/BCL6. L'immunoglobuline de surface la plus souvent exprimée est de type IgM puis IgG et enfin IgA et elle présente une restriction isotypique des chaînes légères kappa ou lambda.

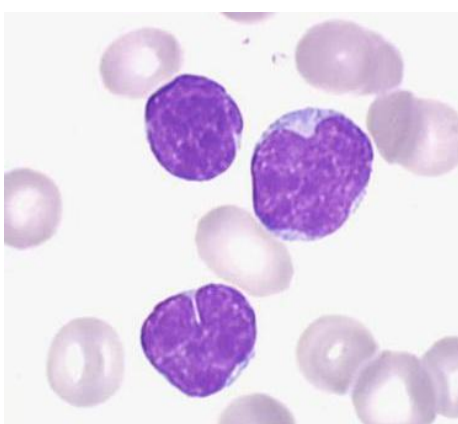


Figure 3 : Photo de centrocytes

Il s'agit de petit lymphocyte, à rapport N/C proche de 1, pas ou peu de cytoplasme visible, au noyau à chromatine dense, mature souvent fendu d'un sillon, dont l'aspect est dit en grain de café.

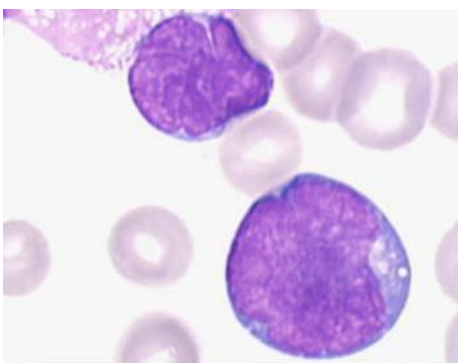


Figure 4 : Photo d'un centroblaste

Il s'agit d'un grand lymphocyte, au noyau à chromatine fine, au contour irrégulier, avec plusieurs nucléoles visibles.

b. Processus tumoral

La lymphomagénèse est initiée dans la MO lors d'une erreur de réarrangement VDJ au cours de l'étape précoce de la différenciation lymphocytaire B [29]. En effet, le LF est

associé à une anomalie chromosomique retrouvée dans 90% des cas : la translocation t(14;18) (q32, q21). Ce 1^{er} point de cassure génétique dans le LF est réciproque et équilibré avec un échange de matériel entre les chromosomes 14 et 18. Elle juxtapose l'oncogène *BCL2* situé en 18q21.3 et la région codant les chaînes lourdes des immunoglobulines en 14q32.33 (*IgH*, segment JH) aboutissant à la surexpression de sa protéine BCL2. On note que dans presque 20% des cas la translocation n'est pas détectable par les techniques conventionnelles de cytogénétique et de biologie moléculaire en raison de points de cassure rares. La translocation t(14;18) est conservée lors de la transformation du LF en lymphome de haut grade. Elle a une valeur diagnostique mais pas pronostique. D'autres translocations, extrêmement rares, impliquent, comme précédemment, la région codant la protéine BCL2 mais aussi les régions codant les chaînes légères des immunoglobulines. Il s'agit des t(2;18) et t(18;22) aboutissant elles aussi à la surexpression de BCL2.

Les protéines de la famille BCL2 ont une importance cruciale dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire par apoptose, et sont donc impliquées dans de nombreuses pathologies, telles que les cancers ou certaines maladies dégénératives. *BCL2* appartient à une famille de gènes qui peuvent être soit pro-apoptotiques – entre autres *BAX*, *BAK*, *BOK*, *BAD*, *BID* et *BIM* – ou anti-apoptotiques dont *BCL2*. Physiologiquement, l'expression de BCL2 est couplée à celle de BIM, qui agit comme son antagoniste.

La translocation t(14 ; 18) est insuffisante à elle seule pour conduire au processus malin. En effet, des cellules t(14 ;18) positives sont détectées dans le sang chez 50 à 70% d'individus sains [30]. La proportion de ces cellules augmente avec l'âge des patients. Le rôle de ces cellules dites « Follicular Lymphoma-like B (FLLC) » dans la lymphomagenèse reste non élucidé mais l'hypothèse que ces cellules puissent constituer une étape initiatrice au LF, avant l'acquisition d'autres altérations génétiques, semble privilégiée [31].

Une fois la translocation acquise, les cellules B naïves vont migrer dans les organes lymphoïdes secondaires. L'hyperexpression de BCL2 confère aux cellules porteuses de la t(14 ;18) un avantage de survie et les mécanismes de régulation négatif (*BAX*, *BAK* et *BAD*) vont être saturés. Normalement, seuls les lymphocytes au BCR de forte affinité sont sélectionnés, mais puisque les cellules présentent un avantage de survie, les lymphocytes au BCR de faible affinité vont eux aussi être conservés. Ces cellules auront une susceptibilité accrue à l'acquisition de nouvelles altérations génétiques.

Ces cellules recirculent alors dans le sang avec des caractéristiques de cellules B mémoires IgM⁺ ou IgD⁺, CD27⁺, se sont les FLLC. De retour dans le GC, elles acquièrent des anomalies génétiques additionnelles aboutissant au phénotype de LF. L'ensemble de ces étapes sont résumées dans la figure 5.

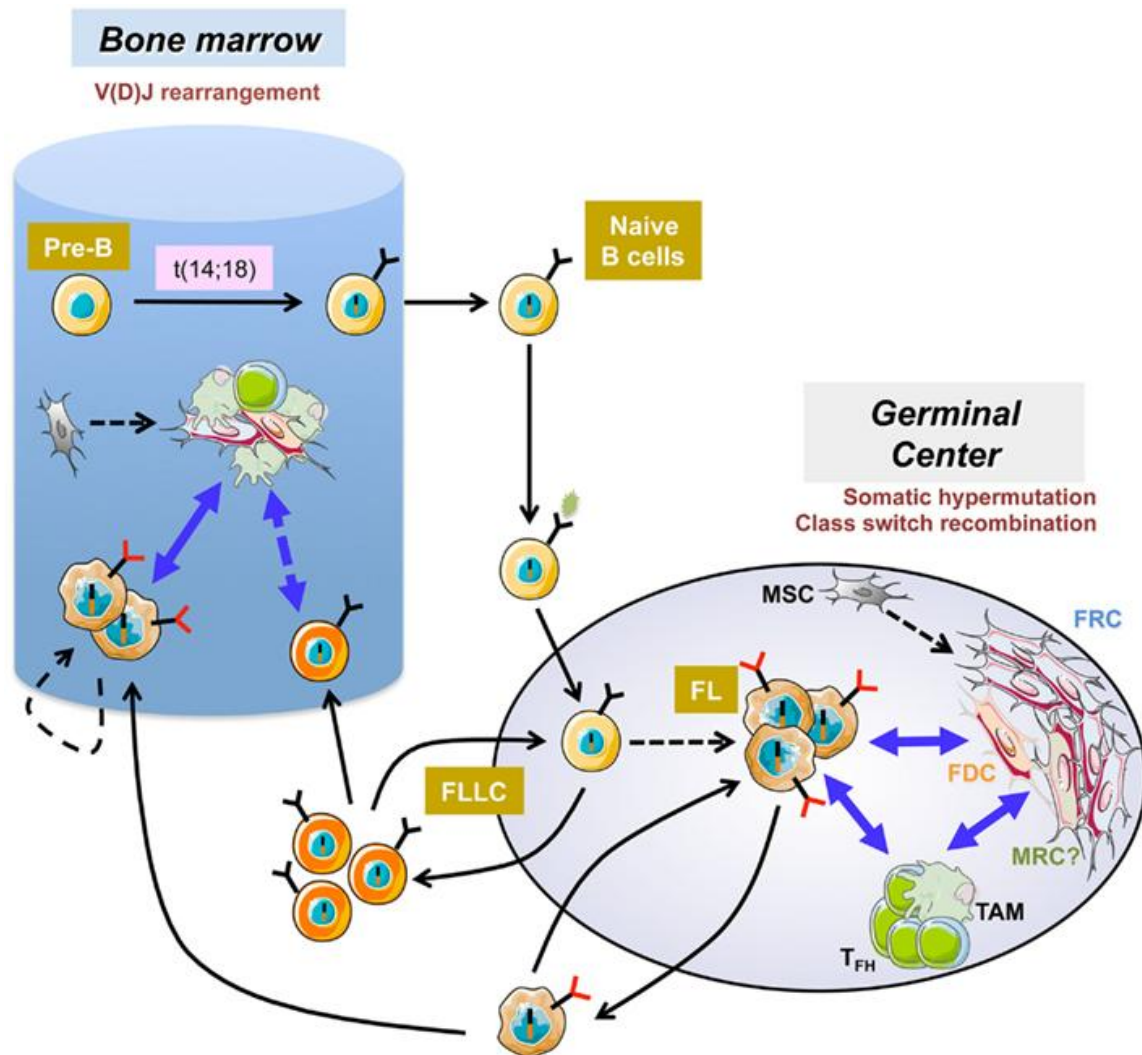


Figure 5 : Modèle de la lymphomagenèse du lymphome folliculaire [32]

La première étape du développement du LF se produit dans le MO avec des anomalies des réarrangements V(D)J conduisant à une hyper-expression de la protéine anti-apoptotique BCL2. Les cellules naïves t(14 ;18) gagnent le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires où elles sont sélectionnées de part leur avantage de survie. Ces cellules recirculent alors dans le sang avec des caractéristiques de cellules B mémoires IgM⁺, elles sont alors appelées FLLC. De retour dans le centre germinatif, elles acquièrent des anomalies génétiques additionnelles aboutissant au phénotype de FL. La survie des cellules du LF leur permet d'acquérir, au cours des remaniements dans le centre germinatif, d'autres anomalies génétiques.

A la t(14;18) sont associées en moyenne 8 anomalies additionnelles, cytogénétiques ou moléculaires [19]. Celles-ci sont nécessaires à l'acquisition du phénotype tumoral et s'acquièrent de façon séquentielle au niveau du centre centro-germinatif en partie sous l'influence de AID [33]. L'importance de AID est soulignée dans une étude qui montre que sa délétion dans un clone murin empêche la formation de lymphome dérivé du centre germinatif [33].

Sur le plan cytogénétique, les anomalies chromosomiques les plus fréquemment retrouvées sont les délétions del(1p36), del(6q) et les gains +7q, +7p, +18q, +Xp.

Sur le plan moléculaire, des mutations précoces dans le processus tumoral du LF concernent les gènes ayant pour fonction la régulation épigénétique. Dans quasiment 90% des cas de LF, le gène *MLL2* codant une histone méthyltransferase est muté. D'autres gènes ayant aussi un rôle dans la modification des histones, par acétylation ou méthylation, tels que *CREBBP*, *EZH2* et *MEF2B* sont respectivement retrouvés mutés dans 64%, 20% et 18% des cas de LF selon l'étude de Okosun *et al.* [34]. Au cours de l'évolution du LF, le nombre de mutations retrouvées est plus important. Toujours d'après Okosun *et al.* les mutations additionnelles acquises tardivement concernent des gènes jouant un rôle dans l'immunité (*TNFRSF14*, *B2M*, *CD58*), et dans les voies de signalisation JAK-STAT (*SOCS1*, *STAT6*) et/ou BCR-NFKB (*BCL10*, *CARD11*, *CD79B*) dont certaines modifient les interactions avec le microenvironnement. Ces données sont retrouvées dans d'autres études, reprises dans la revue de Kridel *et al.* [29] et représentées dans le tableau 3. L'ensemble de ces mutations favorise la survie des cellules lymphomateuses.

Tableau 3 : Anomalies génétiques retrouvées au diagnostic du LF

Gene	Fréquence (%)	Effets
<i>BCL2</i>	85	Surexpression de BCL2 par translocation <i>IGH/BCL2</i>
<i>MLL2</i>	89	Modification des histones
<i>IGHV, IGHL</i>	79-100	N-glycosylation
<i>EPHA7</i>	70	Perte de suppresseurs de tumeurs
<i>BCL6</i>	47	Surexpression de BCL6
<i>TNFRSF14</i>	18-46	Non connu
<i>CREBBP</i>	33	Modification des histones
<i>MEF2B</i>	15	Modification des histones
<i>EZH2</i>	7	Oncogène
<i>TP53</i>	<5	Perte de suppresseur de tumeur

c. Le microenvironnement

Le microenvironnement, constitué de cellules non tumorales et du stroma, produit un ensemble de molécules, dont des cytokines et des molécules d'adhésion facilitant la communication entre les cellules et assurant un équilibre entre la survie et l'apoptose cellulaire. Le microenvironnement joue un rôle majeur et aujourd'hui démontré dans la physiopathologie cancéreuse puisqu'il contribue entre autre à assurer la survie des cellules tumorales. Ce rôle est particulièrement important dans l'évolution du LF et plusieurs éléments le prouvent.

Tout d'abord, les caractéristiques cytologiques, transcriptomiques et génétiques des cellules lymphomateuses ne sont pas similaires selon la localisation du clone tumorale [35]. Les cellules lymphomateuses médullaires ont de plus bas grade cytologique que celles des ganglions. Le profil transcriptomique de ces dernières retrouve une sous expression des gènes associés à la prolifération et à la réparation de l'ADN. Un complément d'explication apparaît à travers la constatation que les cellules du microenvironnement expriment elles aussi des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, dans la synthèse de l'ADN et dans le métabolisme [36].

De la même manière, pour une même tumeur, les caractéristiques structurales, cytologiques et moléculaires du microenvironnement sont différentes selon leur localisation, ganglionnaire ou médullaire [35]. En cas de dissémination tumorale médullaire, il est retrouvé une sous représentation de certaines fractions cellulaires du microenvironnement ganglionnaire tels que les lymphocytes T CD8+ et des macrophages CD68+, en comparaison au microenvironnement de ganglions de LF localisé [35]. Ainsi il est évoqué la possibilité que l'infiltration médullaire soit favorisée par la diminution des lymphocytes T cytotoxiques et des macrophages. Compte tenu de l'importance du microenvironnement dans la pathologie du LF, de nouveaux marqueurs pronostiques reflétant sa composition, notamment en macrophages et en lymphocytes T, voient le jour. Dave et al. [37] ont établie 2 profils pronostics sur la survie. Le 1^{er} profil associé à un bon pronostic retrouve une expression préférentielle de gènes exprimés par les lymphocytes T (*CD7*, *CD8B1*, *ITK*...) tandis que le 2nd profil associé à un pronostic péjoratif est caractérisé par une expression préférentielle de gènes exprimés par les macrophages et les cellules dendritiques (*TLR5*, *FCGR1A*...).

Les interactions entre les cellules du microenvironnement, les cellules folliculaires dendritiques (FDC), les lymphocytes T helpers ou régulateurs, les cellules myéloïdes sont bidirectionnelles avec celles du LF. L'acquisition d'anomalies géniques supplémentaires par les cellules du LF transforme ses relations avec le microenvironnement. Celui-ci par son activité régulatrice directe ou indirecte modifie le devenir des cellules tumorales. Au total, les contacts étroits entre ces populations cellulaires facilitent la survie du lymphome [32].

1. Petits ARN régulateurs

a. Généralités sur les miARNs

Les ARN (acides ribonucléiques) sont des polymères de ribonucléotides liés par des liaisons phosphodiester 5'-3'. Il s'agit d'élément génétique monocaténaire c'est-à-dire simple brin, bien qu'il puisse exister des structures avec repliement en doubles brins. Les ARN peuvent être divisés en 2 catégories suivant leurs fonctions:

- Les ARN codants : représentés par les ARN messagers (ARNm) issus de la transcription de l'ADN. Ils sont le support dans l'expression de l'information génétique. Ils permettent la synthèse protéique et ne représentent que 4% de l'ARN total.
- Les ARN non codants : ils représentent la majorité de l'ARN total et interviennent dans de nombreux processus essentiels à la cellule. Ils incluent les ARN de transfert (ARNt), les ARN ribosomiaux (ARNr) et les petits ARN régulateurs endogènes dits « small RNA ». Ces derniers sont classés selon 3 catégories déterminées par leur nature et leur mode d'action : les siARNs (small interfering RNA), les piARNs (PIWI interacting RNA) et les microARNs.

La figure 6 récapitule la classification des ARNs.

Les microARNs peuvent également être désignés sous l'appellation miARNs. Il s'agit de petits ARN régulateurs non codants, dont la longueur varie de 21 à 25 nucléotides.

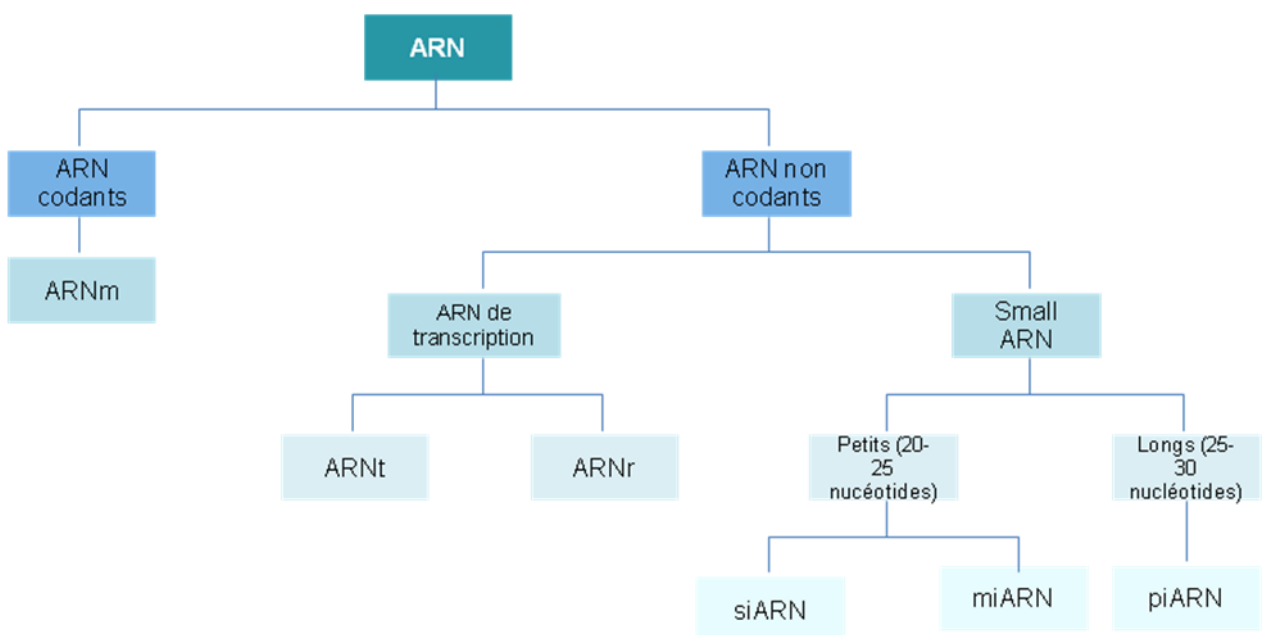


Figure 6 : Classification des ARN

Dans le génome humain, il est aujourd'hui recensé 1872 précurseurs et 2578 matures, catalogués dans une base de données appelée miRBase (anciennement consultable sur <http://microrna.sanger.ac.uk>, et actuellement sur <http://www.mirbase.org>). Cette base de données est en constante évolution du fait de l'utilisation de techniques de plus en plus sensibles permettant la découverte de nouveaux miARNs.

b. Découverte des miARN

Les miARNs ont été découverts mais non identifiés en 1989 par l'équipe d'Ambros *et al.* [38], au cours de l'étude du développement du nématode *Caenorhabditis elegans*. Les résultats ont mis en évidence l'importance du gène *lin-4* dans la coordination temporelle de son développement larvaire. Le produit du gène *lin-4* agit sur la protéine lin-14 et l'ensemble est indispensable à la transition des stades larvaires.

La première caractérisation des miARNs s'est faite en 1993 par l'équipe de Lee *et al.*, toujours à l'occasion de l'étude du nématode *C. elegans* [39]. Il a été montré que le gène *lin-4* code non pas pour une protéine mais pour deux petits ARNs. Le premier, dénommé *lin-4S*, le plus abondant, est composé de 22 nucléotides et le second, *lin-4L*, de 61 nucléotides. Cet article décrit pour la première fois ce que l'on appellera par la suite les précurseurs de miARNs et les miARNs matures. *Lin-4* serait un élément capable de se lier à la région non codante 3'UTR de l'ARNm codant pour la protéine lin-14. L'inhibition de la traduction de lin-14 est une étape nécessaire au développement larvaire. Les hypothèses qui en découlent suggèrent que le petit ARN *lin-4* agit comme un régulateur négatif de l'expression post-transcriptionnelle génique. Le rôle régulateur de ce nouveau modèle d'ARN est confirmé en 2000 par l'équipe de Reinhart *et al.* avec la découverte d'un second miARN de 21 nucléotides, *let-7*, réprimant l'expression de la protéine *lin-41*.

Depuis leur découverte en 1993, et la détermination de leur rôle régulateur dans les années 2000, les miARN font l'objet de nombreux travaux scientifiques visant à élucider leurs structures, leurs biogenèses, leurs modes d'action et surtout leurs implications dans les processus physiologiques et pathologiques.

c. Conservation au cours de l'évolution

Suite à leur découverte chez le nématode, de nombreux laboratoires de recherche ont révélés la présence de miARNs dans diverses espèces animales et végétales. Mise à part les virus, les miARNs sont retrouvés uniquement dans des organismes multicellulaires, ils ne sont en effet retrouvés ni chez les levures, ni chez les champignons (exception faite de *Chlamydomonas reinhardtii* [40]) ni chez les bactéries.

L'existence des miARNs semble remonter à plusieurs centaines de millions d'années. L'analyse de leur séquence montre une certaine conservation génétique entre les espèces appartenant au règne animal. Cette même observation a été faite pour le règne végétal. En revanche, il n'a pas été montré de conservation croisée entre les deux règnes ni sur le plan structurel, ni sur le mode d'action. Pour des espèces phylogénétiques proches, un même miARN va présenter une structure similaire quasi homologue. Le fait que la structure et les mécanismes de synthèse de ces petits ARNs soient aussi stables dans le temps, et le fait qu'ils soient présents dans les différents règnes, suggèrent leur importance dans la survie et l'évolution des espèces.

2. Biogenèse et modes d'action

a. Organisation génomique et transcription

Les miARNs sont codés dans le génome au sein d'unités transcriptionnelles codant (60% des cas) ou non (40% des cas) pour des protéines. Chez l'homme, au sein des unités géniques, 80% des gènes codant les miARNs seraient dans des introns, et 20% dans des exons [41]. La fréquente corrélation entre l'expression des miARNs introniques et celle de leur gène hôte suggère un phénomène de co-transcription. Cependant, environ 30% des miARNs introniques peuvent être transcrits à partir d'un promoteur indépendant du gène hôte [41]. Les miARNs peuvent se regrouper sur certains transcrits primaires en «cluster» de pré-miARN, suggérant pour ces derniers une possible unité transcriptionnelle polycistronique. Ils aboutissent à la formation d'un transcrit primaire unique polycistronique synthétisant un pri-miARN commun, sous la dépendance d'un même promoteur. Il est difficile de déterminer le nombre précis de cluster, certains articles font la projection qu'au moins un tiers des miARNs appartiennent à des clusters [42]. Aujourd'hui, bien que la majorité des miARNs soit identifiée et annotée dans le génome, la conception de leur organisation génomique reste encore à élucider.

b. Exemple du cluster miR-17-92

Le cluster miR-17-92 correspond à un groupe de miARNs associés sur des transcrits polycistroniques primaires générant lors du processus de maturation des miARNs individuels matures. Le haut niveau de conservation des miARNs appartenant à des clusters suggère l'importance de cette organisation dans la coordination de leurs différentes fonctions. De plus, cette conservation s'explique par l'importance de leur rôle dans les fonctions cellulaires, et ce dès le début de la vie. Il est à noter que le miR-92a est le seul qui soit retrouvé à la fois chez les vertébrés et chez les invertébrés.

Le cluster miR-17-92 code pour 6 miARNs groupés en une séquence de 800 paires de base sur le chromosome 13, au niveau du 3^{ème} intron d'un transcrit connu sous le nom de C13orf25 [43]. Il s'agit des miARNs : miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92a-1. Très tôt dans l'évolution, des duplications et délétions géniques ont permis l'émergence de 2 clusters dits paralogues, spécifiques aux mammifères. Le cluster miR-106a-363, localisé au niveau du chromosome X, code pour 6 miARNs matures : miR-363, miR-92a-2, miR-19b-2, miR-18b, miR-106a et miR-20b tandis que le cluster miR-106b-25, localisé au niveau du chromosome 7, code pour 3 miARNs matures : miR-25, miR-106b, miR-93. Il est à noter que le cluster paralogue miR-106a-363 est très peu exprimé dans la plupart des tissus, lui suggérant une activité différente des deux autres [44].

Les 15 miARNs matures présents au sein des 3 clusters, ont été regroupés en 4 familles distinctes, selon l'homologie de leur séquence s'appariant avec leurs cibles, dite « seed », et correspondant aux nucléotides 2 à 7. Ces familles sont schématisées sur la figure 7.

- La famille miR-17 regroupant les miARNs miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-106a, miR-106b, miR-93
- La famille miR-18 regroupant le miR-18a du cluster miR-17-92 et le miR-18b du cluster miR-106a-363
- La famille miR-19 regroupant les miARNs miR-19a, miR-19b-1, miR-19b-2
- La famille miR-25 appelée aussi famille miR-92 regroupant les miARNs miR-92a-1, miR-92a-2, miR-25, miR-363.

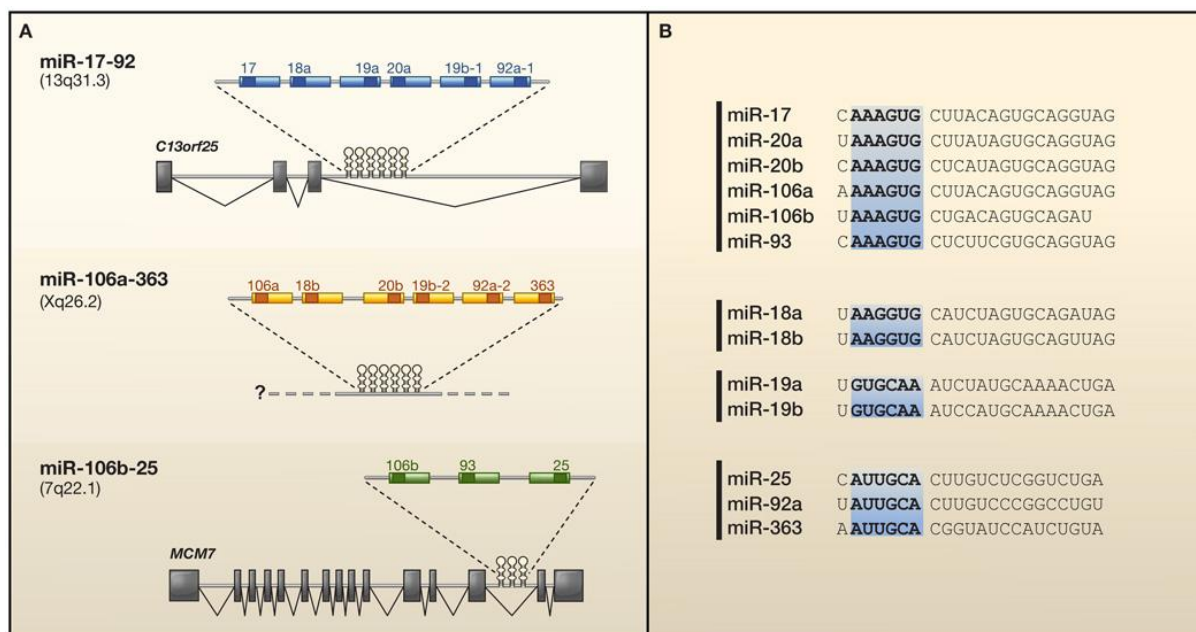


Figure 7 : Organisation génomique du cluster miR-17-92 et ses paralogues [45]

Organisation basée sur l'homologie des séquences dites seed (entre le nucléotide 2 et 7) correspondant à la région d'appariement avec la cible.

c. Maturation des miARN

Dans le noyau, une enzyme synthétise un pri-miARN à partir du gène codant le miARN. Cette enzyme correspond à une ARN polymérase de type II, identique à celle synthétisant les ARNm. Le pri-miARN est un précurseur de grande taille, formant un ARN de structure dit en épingle à cheveux (hairpin) d'environ 1 kb, différant des ARNm par l'absence de queue polyadénylée en 3' et d'une coiffe de type (γ MGppG) en 5'. Ensuite, sous l'action d'un complexe composé d'une RNase de type III appelée DROSHA et de sa protéine de liaison DGCR8 (Di George Critical Region) encore appelé PASHA, le pri-miARN va maturer en un produit intermédiaire. Celui-ci porte le nom de pré-miARN [46]. Le pré-miARN est composé de 60 à 70 nucléotides présentant une extrémité 5' phosphate, une extrémité 3' libre de deux nucléotides et une structure en épingle à cheveux comportant une tige en double chaîne surmontée d'une boucle en simple chaîne. Bien que le mode d'action de DROSHA soit très spécifique elle peut se montrer tolérante envers certains miARNs mutés potentiellement tumoraux. Cette molécule intermédiaire est ensuite exportée du noyau vers le cytoplasme via un transporteur de la famille Ran, l'exportine 5, et son co-facteur, le Ran-GTP. Dans le cytoplasme, le pré-miARN est pris en charge par un second complexe enzymatique. Celui-ci est composé d'une ribonucléase de type III, DICER, associé à son co-facteur, TRBP-PALT. A l'issue du clivage de sa boucle terminale, le pré-miARN donne naissance à un duplex double brin désigné « miR/miR* » ou « miR-3p/miR-5p ». L'ultime étape de maturation se fait par l'incorporation de ce duplex dans le complexe RISC (RNA induced silencing complex) [47] [48]. La figure 8 résume l'ensemble de ces étapes.

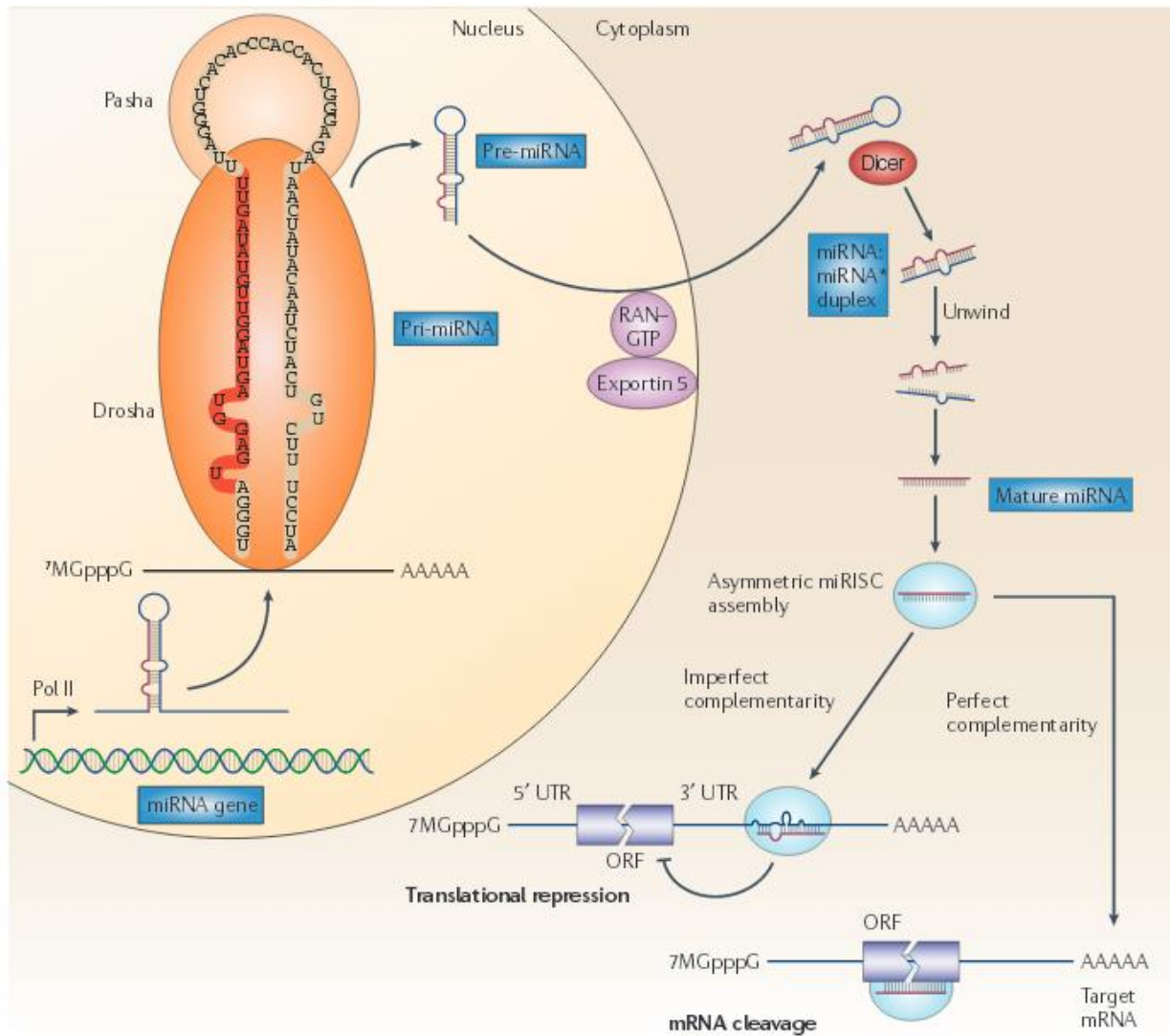


Figure 8 : Biogénèse des miARNs [49]

Dans le noyau, le gène codant un miARN est transcrit par une ARN polymérase II en pri-miARN. Ce dernier est ensuite scindé par un complexe protéique associant une RNase (Drosha), une protéine de fixation des ARNs, la DGCR8. Un pré-miARN est obtenu. Celui-ci migre vers le cytoplasme et est ensuite débarrassé de sa boucle ARN par le complexe Dicer. Un des deux brins est alors sélectionné pour devenir le miARN mature. Celui-ci est incorporé dans le complexe protéique RISC qui va guider le miARN vers sa cible ARNm et réprimer l'expression de ce dernier.

d. Formation du complexe RISC

Le complexe RISC/miRNP (RNA induced silencing complex micro-ribonucleoprotein) est composé de protéines appartenant à la famille Argonaute, AGO et GW82. Au cours de la formation du complexe RISC, le duplex va se scinder en deux miARNs simple brin. L'ARNm cible est incorporé au sein de ce complexe et seul le miARN simple brin complémentaire (réaction thermodynamique) est conservé. Le mode d'action de ce complexe ribonucléoprotéique est dépendant du degré de complémentarité du miARN avec le transcrite cible.

e. Mode d'action des miARNs

La régulation par les miARNs est spécifique grâce à l'appariement du miARN mature présent dans le complexe RISC-miRNP avec une séquence complémentaire située généralement en 3'UTR de l'ARNm cible. Bien que les premières études impliquent cette région 3'UTR, de plus en plus d'études démontrent aussi l'existence de sites en région codante de l'ARNm. L'équipe de Lewis *et al.* en 2003 a décrit une région dite « seed » comprenant les nucléotides 2 à 7 (voir 9) des miARNs ayant un rôle crucial dans l'appariement miARN:ARNm [50].

La portion d'ARNm complémentaire est appelée MRE pour « miRNA response element ». Les modes d'action de RISC-miRNP dépendent du degré d'appariement miARN:ARNm et de la nature des protéines adaptatrices Argonautes qui le composent. Dans le règne végétal, la régulation des ARNm se fait plus fréquemment par complémentarité parfaite tandis que dans le règne animal, elle se fait principalement par complémentarité imparfaite.

La régulation de la traduction protéique par les miARNs se fait donc selon deux mécanismes :

- En cas de complémentarité parfaite miARN:ARNm, la cible est clivée par les ribonucléases du complexe RISC. Cette dégradation de l'ARNm se fait par un processus de déadénylation, puis de décoiffage et enfin par une digestion exonucléolytique 5'-3'. Le clivage a généralement lieu au milieu de l'hybride miARN:ARNm. Dans ce cas, la protéine Argonaute recrutée dans le complexe RISC est Ago2.
- En cas de complémentarité imparfaite miARN:ARNm, la traduction de la protéine est inhibée par la fixation du complexe RISC. Dans ce cas, la protéine Argonaute recrutée dans le complexe est Ago 1. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour comprendre le mécanisme d'inhibition. Soit la stabilité de la cible est affectée par un mécanisme de dégradation lors du clivage exonucléolytique [51], soit il y a répression de la traduction

lors de l'initiation, par blocage de la reconnaissance de la coiffe en 5' par le complexe d'initiation eIF4F, ou bien lors de l'élongation, par inhibition du recrutement de la sous unité ribosomique 60S ou bien par détachement des ribosomes pendant l'élongation produisant une protéine tronquée. D'autres études suggèrent que les polypeptides naissants sont dégradés par recrutement de protéases par le complexe RISC-miRNP [52]. Les mécanismes expliquant le mode d'action des miARNs est à ce jour non élucidé.

De nombreux logiciels ont été développés pour prédire les sites potentiels de fixation des miARNs. Un certain nombre de logiciels sont à notre disposition pour prédire les cibles des miARNs tels que miRanda, Targetscan, miRDeep etc. Les algorithmes de ces logiciels sont basés sur la complémentarité, principalement celle de l'appariement entre la séquence « seed » et la région 3' non codante de l'ARNm, ainsi que sur la conservation des MRE pour favoriser l'identification de sites fonctionnels sélectionnés au cours de l'évolution [50]. Ils prédisent plusieurs dizaines à centaines de cibles pour un miARN donné mais elles n'ont pas toujours une réalité biologique. Des validations expérimentales sont nécessaires dans chaque cas et à ce jour seules une minorité d'entre elles sont validées. On estime que les miARNs ciblent plus de 30% de la totalité des gènes codants [53].

f. Conséquences de l'appariement miARN/ARNm

Du fait de l'homologie de séquence de certains miARNs, ceux-ci possèdent une majorité de cibles en commun et constituent donc des « familles de miARNs ». Cette redondance structurelle et fonctionnelle assure une certaine sécurité phénotypique en cas d'altération d'expression de l'un des membres de cette famille. Un même miARN peut réguler un grand nombre de cibles, en moyenne 300 ARNm différents et plusieurs miARNs peuvent avoir la même cible [42]. Les actions de certains miARNs peuvent s'opposer à l'action d'autres miARNs. Un ARNm cible peut lui aussi réguler un miARN et les miARNs se régulent également entre eux, le tout aboutissant à un vaste réseau de coopération/régulation. La complexité de ces réseaux est encore plus vaste puisque le miRNome est tissu spécifique [54].

3. Fonctions des miARNs

Les miARNs contrôlent la quasi-totalité des processus physiologiques. Il a été démontré que les miARNs sont essentiels à la survie des espèces. En effet, chez les murins, une élimination de la production des miARNs, par une suppression de DICER est létale au 7^{ème} jour après la fécondation [55]. De plus, des délétions conditionnelles de DICER dans différentes lignées cellulaires, notamment la lignée hématopoïétique, ont des effets délétères sur la différenciation et la survie [56] [57]. Dans une expérience de Wang *et al.* [58], une souris déficiente pour le gène DGCR8 et donc déficiente en miARNs matures, maintient l'expression des facteurs de pluripotence empêchant le processus de différenciation.

Le nombre de miARNs exprimés est plus important dans les cellules différenciées que dans les cellules souches ce qui apporte un argument supplémentaire au fait que les miARNs jouent un rôle dans l'induction de la différenciation et dans le maintien de ses états différenciés. La transfection d'un miRNA spécifique d'un tissu dans des cellules HeLa (lignée cellulaire cancéreuse) modifie le profil d'expression des ARNm vers celui du tissu en question [42]. Les miARNs jouent donc un rôle également dans la définition de l'identité tissulaire.

Un miARN possède de nombreuses cibles mais toutes n'ont pas de répercussions phénotypiques. L'impact d'un miARN sur une cellule peut être le résultat de la modulation d'une seule cible. C'est le cas des facteurs de transcription ou de signalisation cellulaire dont la modulation peut avoir des conséquences majeures sur le phénotype tissulaire.

Le couple miARN/ARNm permet le contrôle des profils d'expression génique assurant l'identité tissulaire et le maintien de l'intégrité des profils d'expression au cours du développement.

4. Régulation des miARNs

L'expression des gènes des miARNs est régulée comme celle de gènes plus classiques puisqu'elle est modulée positivement ou négativement, lors de sa transcription. En effet, cette transcription est effectuée sous l'influence de facteurs de transcription. Ceux-ci sont des activateurs ou répresseurs du complexe transcriptionnel incluant l'ARN polymérase qui agissent sur les séquences en amont du gène à transcrire.

La relation entre le miARN et l'ARNm est souvent renforcée par une boucle de régulation mutuellement répressive directe ou indirecte. En effet, certaines cibles agissent elles même sur la régulation des miARNs permettant soit d'amplifier la voie de régulation par les miARNs soit de limiter les effets de celle-ci. Dans le même but, un miARN et sa cible peuvent être

induits par un même facteur de transcription pour ajuster finement le niveau d'expression de la cible, optimisant son rôle.

Les miARNs, indirectement, exercent également un contrôle les uns sur les autres puisque des ARNm peuvent réguler des miARNs dont ils ne sont pas la cible.

Il est aujourd'hui démontré que les miARNs sont également modulés par des mécanismes épigénétiques impliquant les modifications des histones ou la méthylation de l'ADN [59].

5. Nomenclature

Devant l'importance des recherches s'effectuant sur les miARNs, il est devenu nécessaire d'uniformiser des dénominations communes et de répertorier les découvertes de chacun sur une même base de données. Dans le génome humain, il est aujourd'hui recensé 1872 précurseurs et 2578 matures, catalogués dans une base de données appelée miRBase [60] (anciennement consultable sur <http://microrna.sanger.ac.uk>, et actuellement sur <http://www.mirbase.org>). Cette base de données issue des publications scientifiques est en constante évolution du fait de l'utilisation de techniques de plus en plus sensibles permettant la découverte de nouveaux miARNs.

Plusieurs dénominations existent pour les qualifier : miARN, microARN, miR. Leur qualification se fait selon leur origine chromosomique, leurs origines de synthèse et selon leurs cibles.

Le miARN mature est écrit avec un « R » majuscule « miR » tandis que son précurseur est désigné par un « r » minuscule « mir ». Chaque miARN mature se compose d'un préfixe de trois lettres faisant référence à son organisme d'origine et d'un suffixe composé de chiffres.

Chez l'homme, le préfixe utilisé est hsa, pour homo sapiens.

Exemple : hsa-miR-17

Les précurseurs pré-miARN avec leur structure en tige-boucle sont capables de donner deux miARNs matures, l'un issu du bras 5' et l'autre du bras 3' de la tige. Normalement, seul l'un des deux miARNs sera conservé. Dans ce cas, le miARN mature sera nommé « miR-X » X représentant les chiffres. En revanche, si les deux miARNs matures sont conservés, plusieurs nomenclatures s'appliquent :

- miR-X-5p/ miR-X-3p
- miR-X/ miR-X* ou * désigne le miARN mature le moins abondant

En l'état actuel des connaissances, les abondances ne sont pas encore toutes connues ou bien sont soumises à controverse. De plus, les abondances varient en fonction de l'état physiologique (exemple: l'âge) mais aussi en fonction des localisations tissulaires et des

pathologies. Ceci pouvant aboutir à des erreurs de dénominations, il est donc préférable d'utiliser la nomenclature miR-X-5p/ miR-X-3p.

Il existe également des homologies de séquences (différences inférieures à 3 nucléotides) entre miARNs matures différents permettant de les regrouper en familles. Ils seront notés miR-X-a/b comme dans l'exemple qui suit : hsa-miR-181a/ miR-181b. Il est toutefois difficile d'utiliser seulement la définition de l'homologie, à savoir une différence de moins de 3 nucléotides, pour regrouper deux miARNs dans une même famille. En effet, tout dépend de la localisation des différences nucléotidiques dans la structure génique. Si la région 5'UTR du miARN mature concentre ces différences, la complémentarité de cette zone avec la région 3'UTR du ARNm cible n'aura pas lieu pour les deux miARN, pourtant homologues. Ainsi, la notion de famille entre miARN tient plus compte de l'homologie des ARNm cibles que de l'homologie de leur structure.

Un même miARN mature peut provenir de deux loci chromosomiques distincts, on les différenciera à l'aide d'un chiffre souligné comme dans l'exemple qui suit : hsa-miR-181a-1/ hsa-miR-181a-2

A chaque règle ses exceptions, les miARNs n'y échappent donc pas. En effet, il est à noter que certains miRNA sont nommés let, lin ou bantam.

L'attribution du nom lorsqu'il s'avère complexe est laissée à l'appréciation de l'auteur. Ce libre arbitre dans la dénomination des miARNs pose problème dans la lecture et dans la comparaison des études publiées. Celle-ci ne peut alors pas être rigoureuse lorsque deux auteurs distincts ont fait des choix différents dans l'appellation de leurs séquences.

1. miARN et cancers

a. Altérations des miARNs dans les cancers

L'expression des miARNs peut être altérée par différents processus intervenant de leur synthèse à leur mécanisme d'action [61] (figure 9).

Tout d'abord, des réarrangements chromosomiques type délétions, translocations ou des mutations ponctuelles peuvent avoir lieu au sein des gènes codant les miARNs. Une étude de Zhang *et al* [62] a montré que les gènes codant les miARNs ont une forte fréquence d'anomalies génétiques dans différents cancers humains. Par exemple, l'analyse des gènes codant les 283 miARNs repertoriés au moment de l'étude dans 227 cas de mélanomes, de cancers ovariens et de cancers du sein retrouve des altérations du nombre de copies d'ADN dans 86%, 37% et 73% des cas respectivement. Les protéines les plus touchées par ces modifications chromosomiques sont celles ayant une activité connue en relation avec les différentes tumeurs, mais aussi les enzymes DICER et AGO2.

Ces mêmes altérations peuvent survenir dans les régions 3'UTR des ARNm cibles affectant l'hybridation miARN:ARNm cible.

En aval de leur transcription, au niveau de la région promotrice de leur gène, des aberrations dans l'expression des facteurs de transcription peuvent être retrouvées.

A ce même niveau, des mécanismes épigénétiques peuvent modifier la régulation d'expression des miARNs. Leur niveau de méthylation est caractéristique pour chaque cancer. Par comparaison aux gènes codant des protéines, les gènes codant les miARNs montrent une plus forte fréquence et un plus fort niveau de méthylation [63]. Par exemple, dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), le miR-124a est sous exprimé et ce taux d'expression est corrélé avec l'hyperméthylation du promoteur du gène codant. L'importance de la sous-expression de miR-124a est associée à un taux de rechute plus élevé [64]. Il est intéressant de noter que certains miARNs modulent le taux de DNA méthyltransférase ou d'histone deacétylase, ces enzymes ayant des fonctions clés dans la régulation épigénétique [61]. Ils peuvent donc intervenir dans le contrôle d'expression de gènes mais également dans leur propre régulation.

Une anomalie qualitative ou quantitative des enzymes de la biogénèse des miARNs, comme DICER ou DROSHA, peut également altérer la maturation et donc la fonction des miARNs. L'expression globale de l'ensemble des miARNs est diminuée dans la majorité des tumeurs

[65]. Dans les lymphomes B, l'oncoprotéine MYC réprime l'expression de nombreux miARNs. Une diminution d'expression de Dicer et donc une diminution de la maturation des miARNs accélère le développement tumoral. Le profil d'expression de DICER et DROSHA permet également de différencier les sous groupes de tumeurs, comme par exemple le DLBCL. Les 2 enzymes sont en effet moins exprimées dans les DLBCL transformés que dans les DLBCL de novo [66]. De la même manière, dans les cancers pulmonaires à petites cellules, les niveaux d'expression de DICER sont réduits et ces taux ont un impact pronostic significatif dans la survie [67].

Enfin, puisque les miARNs participent à un réseau complexe de régulation, avec soit d'autres miARNs soit des protéines, une modification d'expression d'un seul des intervenants de ce réseau peut avoir des répercussions sur l'ensemble de la boucle. De plus, une modification de la liaison complémentaire miARN:ARNm empêche l'action répressive post-transcriptionnelle.

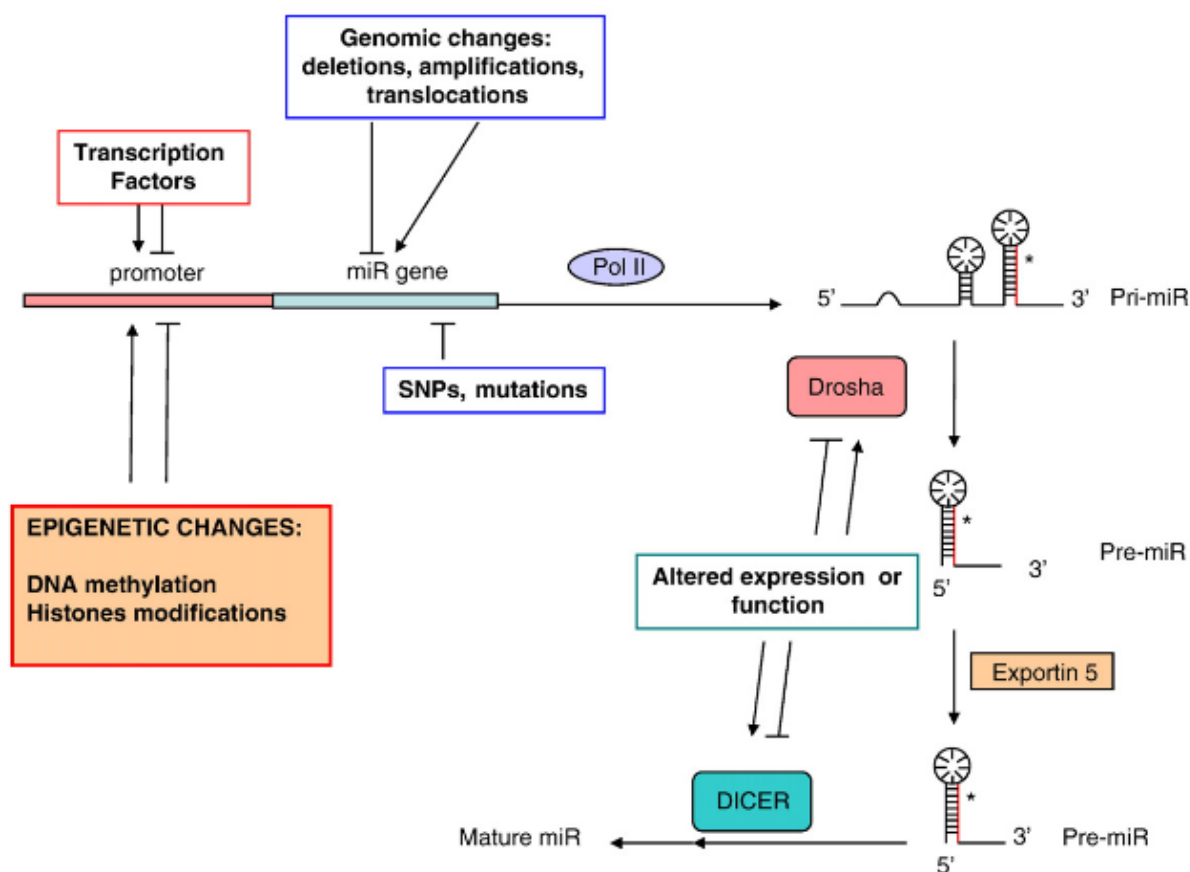


Figure 9 : Anomalies pouvant modifier quantitativement ou qualitativement l'expression des miARNs dans les cancers [61]

b. Perturbation globale

La cancérogénèse consiste en la transformation de cellules saines dites « normales » en cellules tumorales. Cette transformation résulte de l'acquisition d'un certain nombre de

modifications dans la machinerie cellulaire. La caractéristique principale des cellules tumorales est leur capacité à proliférer et à survivre. Ceci est le résultat d'une expression soutenue d'un signal de prolifération et/ou d'un échappement aux signaux inhibiteurs de prolifération et/ou d'une résistance à la mort cellulaire.

La découverte des miARNs et de leurs rôles clés dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire permet une nouvelle approche dans la compréhension des mécanismes tumoraux. En effet, la dérégulation de l'expression des miARNs peut être l'un des facteurs à l'origine de la transformation cellulaire et/ou cette dérégulation peut favoriser la capacité de prolifération et de survie des cellules tumorales ayant nouvellement acquis des erreurs génétiques.

Aujourd'hui, il est prouvé qu'un lien direct existe entre la fonction des miARNs et la cancérogénèse. Calin *et al.* [68] ont démontré que plus de 50% des gènes codants pour les miARNs sont localisés dans des régions dites fragiles, régions connues pour être associées à des cancers. La majorité des miARNs sont donc affectés par des aberrations chromosomiques récurrentes. Lors de la réplication, les mécanismes en charge de la réparation des erreurs géniques peuvent être saturés ce qui aboutit à leur conservation. Tous cancers confondus, la majorité des miARNs matures ont une expression diminuée dans les cellules tumorales en comparaison aux cellules saines [65]. Ceci est en partie dû aux boucles de régulation répressive des gènes cibles sur leurs miARNs. Par exemple, C-MYC, connu pour être surexprimé dans la cancérogénèse, va réguler négativement l'expression des miARNs dont il est la cible et par cette même voie, favoriser son amplification. Les études sur les profils d'expression des miARNs des tumeurs révèlent leur importance dans le processus tumoral. En effet, la comparaison de l'expression des miRNAs dans un type tumoral particulier par rapport au tissu normal correspondant montre que le miRNome dans les tumeurs est significativement différent de celui des cellules normales provenant du même tissu, et permettent généralement de dégager une signature d'expression de quelques miARNs caractérisant le type tumoral.

L'équipe de Lu *et al.* a établi le profil d'expression de 217 miARNs de divers cancers humains, solides et hématopoïétiques. Les miRNomes obtenus permettent de classer les tumeurs, représentant un meilleur marqueur d'identification de la tumeur que le profil d'expression des ARNm [65]. Cette donnée apporte un argument en faveur de l'implication des miARNs dans le diagnostic tumoral. En effet, à un type de tumeur donné correspond un profil spécifique d'expression des miARNs.

c. Notions de miARNs suppresseurs de tumeurs et oncomirs

Des facteurs de régulation prennent en charge la réparation des anomalies géniques acquises. L'altération d'un ou plusieurs de ces facteurs peut conduire à l'initiation d'un processus tumoral, conservant ses erreurs géniques et en acquérant de nouvelles. Les miARNs par leurs fonctions de contrôle de la prolifération, de la différenciation ou de l'apoptose cellulaire jouent la fonction de facteurs de régulation cellulaire. Selon le rôle de leur gène cible, les miARNs agissent soit comme des oncogènes soit comme des suppresseurs de tumeur, comme le résume la figure 10.

Un oncogène peut être défini comme un gène qui, lorsque son expression et/ou ses fonctions sont dérégulées, participe au développement tumoral puisqu'il est capable d'induire la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses [49].

Un suppresseur de tumeur est un gène qui limite la progression tumorale. Quand ce gène est muté et/ou son activité et expression sont diminuées, la cellule peut progresser vers un état cancéreux [49].

Ces notions sont toutefois plus complexes à aborder pour les miARNs puisqu'il faut tenir compte de leurs relations avec le tissu étudié. Un même miARN peut avoir des rôles opposés en fonction du tissu qui l'exprime, comme par exemple, pour le cluster miRNA 17-92, oncogène dans le poumon et suppresseur de tumeur dans les cellules mammaires.

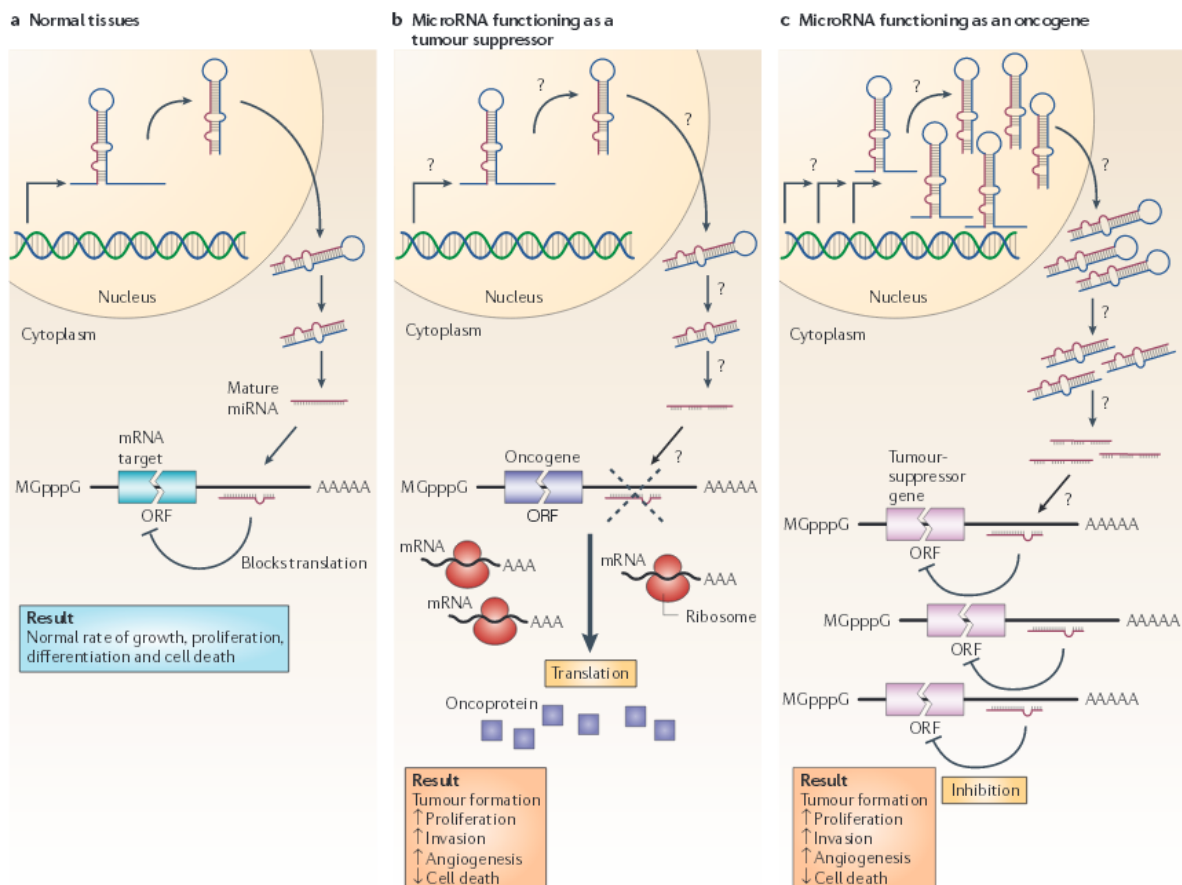


Figure 10 : Fonctionnement des miARNs en tant que supresseurs de tumeurs et oncogènes [49]

a/ Dans le tissu normal, un équilibre entre la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose est assuré.

b/ La sous-expression d'un miARN, pouvant se produire à tous stades de la biogénèse des miARNs (indiqué par les « ? »), dont sa protéine cible est une oncoprotéine conduit à la formation de tumeur. Ce miARN est dit supresseur de tumeur.

c/ La surexpression d'un miARN dont sa protéine cible est suppressive de tumeur conduit à la formation de tumeur. Ce miARN est dit oncogène.

Suppresseurs de tumeurs : L'exemple de let-7

La famille de let-7 comprend 12 miARNs, différenciés par quelques bases et réparti en 8 clusters géniques dont 4 se situent dans des régions chromosomiques fragiles décrites par Calin et al. [68]. Plusieurs miARNs de cette famille ont une expression diminuée dans les tissus tumoraux, comme les tumeurs du sein, en comparaison aux tissus sains. Parmi les cibles validées de let-7 on retrouve des protéines oncogènes telles que RAS ou MYC, mais aussi des facteurs essentiels à la régulation du cycle cellulaire tels que CDK6. L'expression artificielle de let-7 entraîne une diminution de la prolifération cellulaire tumorale. C'est le cas dans les modèles cellulaires de lymphome de Burkitt où une augmentation de let-7 diminue les taux de MYC et réduit la tumeur [69].

OncomiRs: L'exemple du cluster miR-17-92

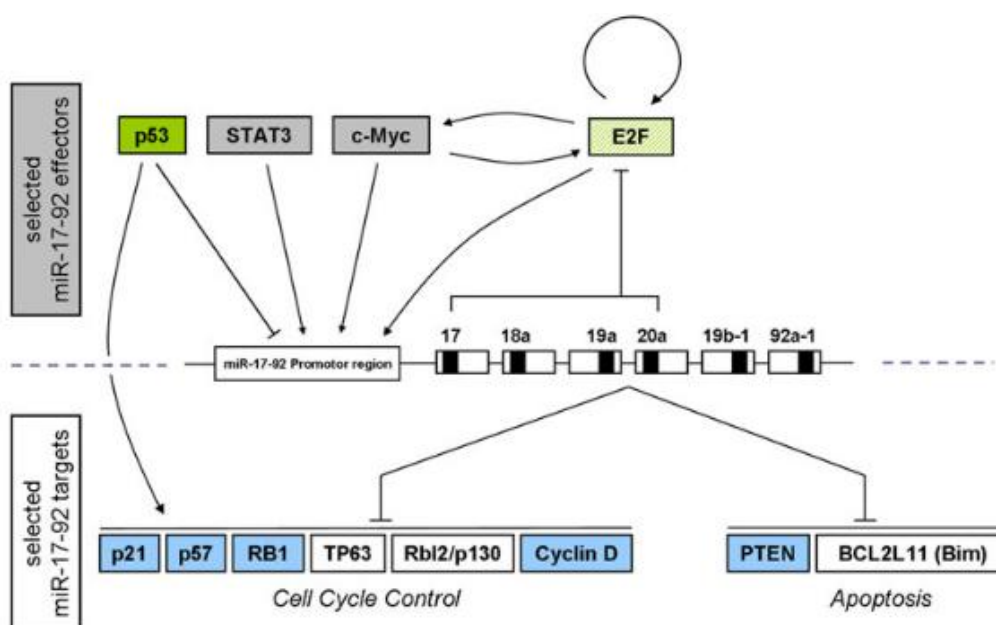
La plupart des oncomiRs sont localisés dans des régions génomiques retrouvées amplifiées dans les cancers. Le cluster miR-17-92 code pour 6 miARNs matures: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92a-1. Le gène polycistronique codant pour ce cluster est localisé sur le chromosome 13 au niveau du locus « chromosome 13 open reading frame 25 » (C13orf25). Les miARNs du cluster 17-92 modulent l'expression d'une grande variété de molécules impliquées dans la régulation des processus cellulaires, dont l'apoptose (BIM), la survie (PTEN, Rb2, E2F1), le cycle cellulaire (p21), la signalisation cytokinique, etc. Ces cibles, considérées comme des supresseurs de tumeurs, sont résumées dans le tableau 4, et les voies régulatrices du cluster 17-92 sont schématisées dans la figure 11. L'amplification de la région C13orf25, fréquemment retrouvée dans les lymphomes B tels que le DLBCL, le LF ou le lymphome du manteau [43], a pour conséquence principale l'augmentation du taux d'expression des miRNAs matures issus du cluster miR-17-92. L'équipe de He *et al.* [70] a montré que les niveaux d'expression du cluster miR-17-92, aussi bien le mir précurseur que les miRs matures, sont plus élevés dans les lymphomes B que dans les lignées cellulaires normales. Dans les lymphomes B, l'une des voies d'actions du facteur de transcription MYC est d'amplifier l'expression des miARNs du cluster 17-92. Cette étroite collaboration entre l'oncoprotéine MYC et le cluster miR-17-92 participe à la lymphomagénèse [70].

Tableau 4 : Exemples de gènes cibles du cluster miR-17-92 et leurs rôles

Cibles	Rôles protéiques	Rôles dans l'oncogénèse
PTEN	Inhibiteur de protéine kinase3	Suppresseur de tumeur
E2F1	Régulateur du cycle cellulaire. Pro-apoptotique	Suppresseur de tumeur
BIM	Antagoniste du facteur anti-apoptotique BCL2	Suppresseur de tumeur
P21	Pro-apoptotique	Suppresseur de tumeur
Rbl2/p130	Régulateur épigénétique. Répresseur d'E2F5	Suppresseur de tumeur

Plusieurs études dont celles de Olive *et al.* [71] [72] prouvent que les miARNs de la famille miR-19 (miR-19a, miR-19b-1, miR-19b-2) sont les éléments clés, nécessaires et suffisants, à l'activité oncogénique du cluster. Cette équipe montre également que le miR-92a antagonise l'effet des miRs-19 durant la différenciation des lymphocytes B en inhibant le gène *Fbw7* codant une protéine de dégradation de C-MYC. En cas de lymphome B, ces interactions antagonistes entre miARNs sont dégradés, soit au niveau du transcrit primaire, soit au niveau des miARNs matures, ne permettant pas de maintenir l'équilibre entre apoptose et prolifération cellulaire. Il est suggéré que le ratio miR-19/ miR-92a est le reflet du potentiel oncogénique du cluster miR-17-92.

Les miRs-19 ont pour cible PTEN, suppresseur de la voie PI3K (phosphatidylinositol-3-OH kinase). Celle-ci est impliquée dans les processus de différenciation cellulaire et dans le développement de cancers. Dans les lymphomes B, la surexpression du cluster 17-92 et du miR-19 inhibe le suppresseur PTEN et augmente l'activité de la voie PI3K.



d. Expression miARN : outils de diagnostic/ pronostic des cancers ?

La comparaison des tissus sains avec des tissus tumoraux a permis de caractériser des profils propres à la tumeur. L'apport des miARNs dans le diagnostic tumoral a été largement étudié. Les profils miARNs exprimés par le tissu tumoral mettent en évidence une signature caractéristique du cancer. Les profils d'expression des miARNs peuvent avoir une valeur pronostique [74] et peuvent prédire la réponse aux traitements [75]. Dans le DLBCL, le profil d'expression de seulement 11 miARNs aide à prédire la survie des patients traités par R-CHOP [76]. Récemment, de nombreuses équipes s'intéressent au profil d'expression des miARNs circulants dans le sang. Ils pourraient s'agir de biomarqueurs de tumeurs, plus facilement accessibles que la tumeur elle-même, jouant également un rôle pronostique sur la survie mais aussi prédictif de la réponse au traitement. Dans l'exemple du DLBCL, les taux d'expression de 5 miARNs circulants (miR-224, miR-455-3p, miR-1236, miR-33a, and miR-520d-3p) sont significativement associés à la réponse à la chimiothérapie par R-CHOP [77]. A l'heure actuelle, la mise en évidence des profils d'expression fait partie de la recherche et n'est pas applicable en routine. On peut toutefois imaginer dans les années à venir que ces profils diagnostiques, pronostiques ou prédictifs des réponses aux chimiothérapies, soient intégrés au bilan biologique des patients.

2. miARNs et hématopoïèse

L'hématopoïèse permet la production des cellules matures sanguines à partir de précurseurs, les cellules souches hématopoïétiques. Ce processus comprend diverses étapes de maturation pour chacune des lignées cellulaires.

Chaque type cellulaire exprime un répertoire de miARNs qui varie selon son stade de maturation et selon sa localisation tissulaire. L'expression d'un miARN et d'un facteur de transcription conduit à l'exécution d'un programme spécifique de lignée (figure 12).

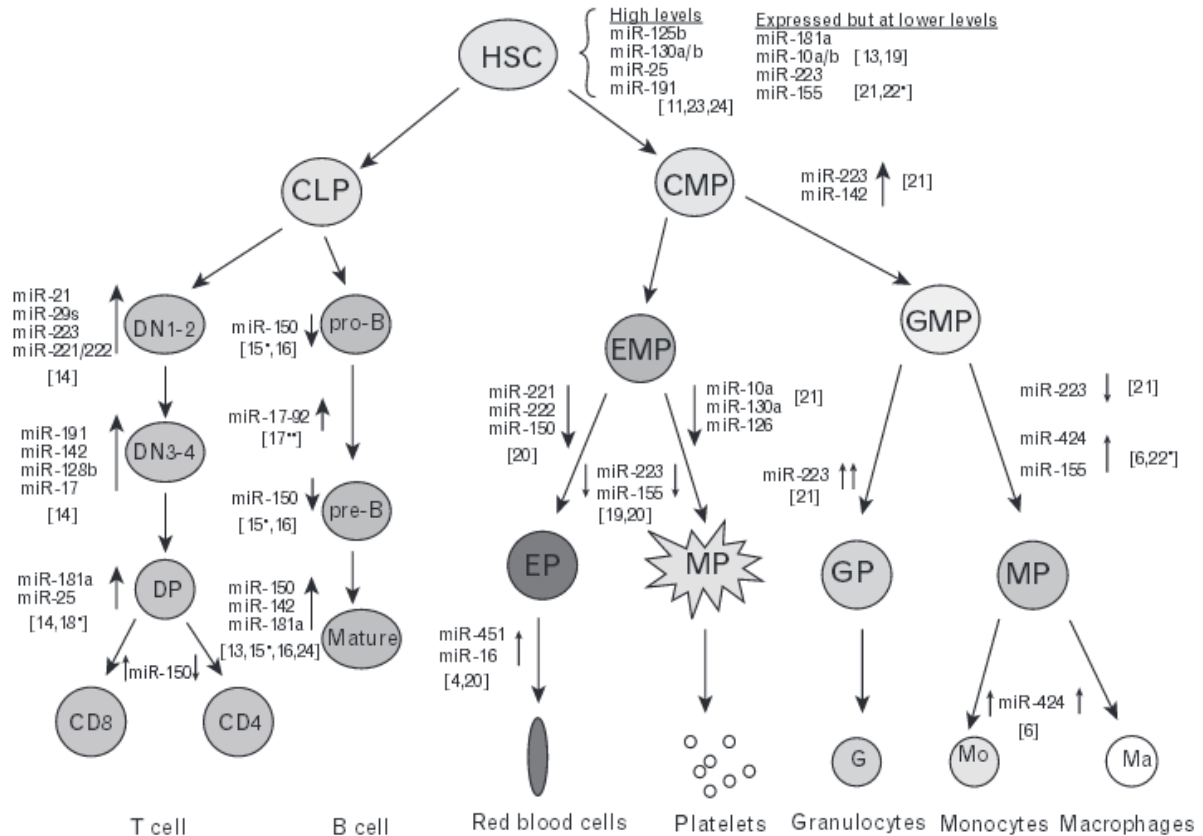


Figure 12 : miARNs et hématopoïèse [78]

HSC : cellules souche hématopoïétique, CLP : précurseur lymphocytaire commun, CMP : précurseur granuleux commun, DP : double positif, DN : double négatif, EMP : précurseur érythroïde-mégacaryocytaire, GMP : précurseur granulocytaire-monocytaire, GP : précurseur granulaire, MP : précurseur mégacaryocytaire.

Les miARNs exprimés lors de l'hématopoïèse sont classés en 3 groupes (tableau 5) :

- Ceux agissant sur les étapes précoces et donc capables d'inhiber la différenciation de toutes les lignées.
- Ceux agissant sur plusieurs lignées déjà engagées.
- Ceux agissant sur une seule lignée.

Tableau 5 : miARNs impliqués spécifiquement dans l'hématopoïèse

Famille	miARNs concernés
Actions sur les étapes précoces	miR-128, miR-181
Actions sur plusieurs lignées	miR-146, miR-155, miR-24, miR-17
Actions lignée-spécifique	miR-221, miR-222, miR-223

a. miARNs et cellules souches hématopoïétiques

L'étude des cellules CD34+ comprenant les progéniteurs et les cellules souches hématopoïétiques (CSH) montre que les étapes initiales de l'hématopoïèse sont sous le contrôle de quelques miARNs et plus particulièrement sous celui des miR-181 et miR-128.

Une prédiction bioinformatique estime que seuls 33 miARNs, incluant le miR-181a, le miR-221, le miR-222, le miR-223 et le miR-155 réguleraient plus de 10% de l'ensemble des ARNm exprimés par les CSH [79]. En revanche, peu de données existent sur l'implication des miARNs dans l'auto-renouvellement des CSH.

b. miARNs et érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus aboutissant à la production des hématies à partir d'une cellule souche hématopoïétique. La différenciation érythroïde implique des changements morphologiques en partie liés à la perte d'expression membranaire du récepteur à activité tyrosine kinase de classe III, C-KIT. Les miR-221 et miR-222, appartenant à la même famille, sont fortement exprimés dans les cellules CD34+ humaines mais diminuent fortement après l'engagement des cellules dans la lignée érythropoïétique. Les analyses bioinformatiques et la corrélation inverse existant entre les taux d'expression de ces miARNs et ceux de l'ARNm du récepteur KIT suggère que celui-ci serait l'une de leurs cibles [80].

De la même manière, le facteur hématopoïétique GATA-1, essentiel à la formation des érythrocytes et des plaquettes, est régulé par les miR-144 et miR-451 [81].

c. miARNs et granulopoïèse

Plusieurs miARNs interviennent dans la granulopoïèse. On peut citer le miR-223 qui est spécifique de la lignée myéloïde, dont l'expression est fortement induite lors de la différenciation granulocytaire. Ainsi, le taux d'expression de miR-223 est significativement augmenté au cours d'une LAM3 (leucémie myéloïde promyélocytaire) traitée par l'ATRA (Acide tout trans rétinoïque, agent de différenciation granulocytaire). L'engagement et la différenciation de la lignée granulaire est équilibrée par l'association au promoteur du miR-223 de son répresseur, le facteur nucléaire 1-A (NF1A), et de son inducteur, le CCAAT/Enhancer Binding factor Alfa (C/EBP α) [82].

L'action coordonnée du miR-424 et du facteur de transcription PU.1 est un exemple de miARN activant la différenciation monocytaire.

d. miARNs et lymphopoïèse

La majorité des études se sont focalisées sur l'implication des miARNs dans le développement précoce de la lymphopoïèse, c'est-à-dire au niveau médullaire. Georgantas *et al.* a montré que seulement 3 miARNs, miR-128a, miR-181a et miR-146, peuvent inhiber la différenciation des progéniteurs multipotents en progéniteurs lymphoïdes. L'expression ectopique de miR-181a dans les progéniteurs hématopoïétiques augmente le pourcentage de lymphocytes B et diminue celui des lymphocytes T. D'autres miARNs interviennent dans

la différenciation B. En effet, l'expression ectopique de miR-150 réduit significativement le nombre de lymphocytes B dans le sang et dans les organes lymphoïdes secondaires, par action sur sa cible, le facteur de transcription C-MYB, qui bloque la transition du stade pro-B au stade pré-B [83]. Le cluster miR-17-92 agit spécifiquement durant la transition pro-B vers pré-B en ciblant spécifiquement la protéine pro-apoptotique BIM. Le gène *BIC* codant pour le miR-155 est fortement exprimé dans les cellules B, T et dans les cellules présentatrices de l'antigène. Ce miR-155 montre que non seulement les miARNs ont un rôle dans le développement des lymphocytes mais également dans leur fonction immune. En effet, une délétion du locus *BIC* a pour conséquence l'immunodéficiência des souris, avec une production accrue de lymphocytes Th2 et une diminution importante des cellules B dans les centres germinatifs ganglionnaires. Après immunisation, les souris miR-155^{-/-} ont des anticorps de moindre affinité en comparaison aux souris contrôles. Ces anomalies de maturation dans le centre germinatif pourraient être dues à une modification de l'environnement aussi bien cytokinique que cellulaire. La dérégulation de miR-155 suffit à entraîner la transformation des cellules B en lymphomes selon Costinean *et al.* [84] et prouve son importance dans la lymphomagénèse.

Peu d'études se sont intéressées aux profils des miARNs lors de la différenciation ganglionnaire. La figure 13 reprend les principaux miARNs de chaque transition lymphocytaire retrouvés dans la littérature. L'étude de Tan *et al.* [85] montre que 16 miARNs distinguent les cellules B du centre germinatif (BGC) des autres stades de développement ganglionnaire, parmi eux on peut citer les miR-93, miR-181b, miR-17-5p, miR-106a surexprimés et les miR-150, miR-29a, miR-223 sous-exprimés dans les cellules BGC. On constate que les miARNs du cluster 17-92 sont sur-exprimés dans les étapes du centre germinatif en comparaison aux stades naïfs et mémoires. Cette même équipe est la seule à avoir comparé les centroblastes avec les centrocytes. Bien que peu détaillée, cette approche révèle que les miR-17-5p, miR-106a et miR-181b, sont sur-exprimés dans les centroblastes par rapport aux centrocytes.

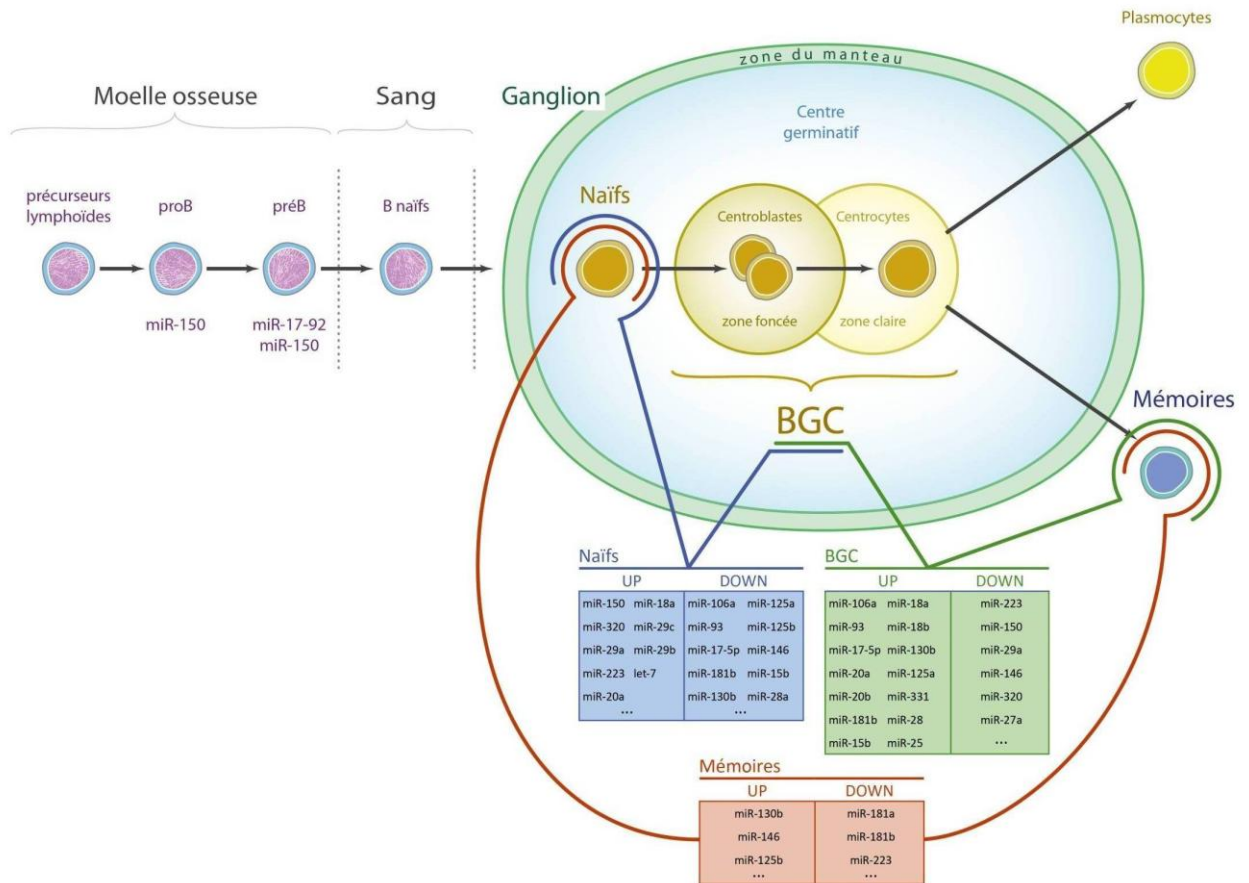


Figure 13 : Profils miARNs des cellules de la différenciation lymphocytaire B selon les données de la littérature [86] [87] [85] [88] [85]

3. miARNs et hémopathies

L'étude des miARNs a été particulièrement prolifique dans certaines maladies hématologiques.

a. miARNs et leucémie lymphoïde chronique

L'hémopathie dont le profil miARNs a été le plus étudiée est la leucémie lymphoïde chronique (LLC). L'anomalie cytogénétique la plus retrouvée dans la LLC est la délétion héli- ou homozygote de la région 13(q14) (>50% des cas de LLC) qui est associée à un bon pronostic. Cette délétion n'est pas spécifique puisqu'elle est présente dans d'autres cancers hématologiques et solides. En partant du constat que la délétion de cette région est liée au processus tumoral, il est probable qu'au moins un gène suppresseur de tumeur y soit localisé. Calin *et al.* ont découvert que la région 13(q14) comprend le gène cluster *LEU2* codant pour les miR-15a et miR-16-1. Dans les lymphocytes B normaux, ces 2 miARNs sont fortement exprimés tandis que dans plus de 70% des LLC, ils sont sous-exprimés [89]. Il est intéressant de remarquer que des mutations germinales du transcrit primaire des 2 miARNs ont été retrouvées dans un cas de LLC familiale [90]. L'une des cibles communes de ces 2 miARNs est la protéine anti-apoptotique BCL2. La perte d'expression de miR-15a et de miR-16-1 pourrait être un évènement précoce et fondateur dans le processus de la LLC. Un profil d'expression caractéristique de la LLC a été trouvé lors de l'étude de 94 échantillons de LLC par une technique de microarray. Cette signature tumorale est composée de 13 miARNs (sur les 190 analysés), 9 sont surexprimés dont les miR-15a, miR-16, miR-221, et miR-155 et 4 sous exprimés dans la LLC, le miR-223 et 3 miARNs de la famille du miR-29. Cette signature a une valeur pronostique puisque le profil est corrélé aux autres facteurs pronostiques tels que l'expression de ZAP70 et le statut mutationnel des régions VH [90].

b. miARNs et LA

De nombreuses études, avec des résultats variables selon les techniques et les échantillons sélectionnés, ont été réalisées pour mieux comprendre la pathogénèse des leucémies aigües (LA). L'équipe de Mi *et al.* a comparé les profils d'expression des miARNs de 54 LAM et de 18 LAL_B et a identifié 27 miARNs (sur les 435 étudiés) dont l'expression est significativement différentes entre les 2 types de LA. Dans la LAL, en comparaison à la LAM, les miRs 128a et 128b sont les plus sur-exprimés et les miR-223 et let-7b sont les plus sous-exprimés [91]. Compte tenu de la grande variabilité des LA, les profils miARNs sont extrêmement liés aux types de LA et à leurs profils cytogénétiques et moléculaires.

4. miARNs et lymphome folliculaire

Comme la plupart des processus tumoraux, le LF doit présenter un profil spécifique d'expression des miARNs. Cette signature permet de le distinguer à la fois des cellules d'origine dont il dérive, les cellules du centre germinatif, et du lymphome de haut grade vers lequel il peut évoluer. Il est toutefois difficile à l'heure actuelle de se faire une idée précise du profil des miARNs dans le LF et de leurs implications dans la tumorigénèse compte tenu du faible nombre de données. En effet, concernant le LF, moins de 5 équipes ont publiées leurs résultats, celles-ci ne se recoupant pas toujours compte tenu de la différence dans les techniques analytiques utilisées.

L'équipe de Wang *et al.* [92] a étudié le profil d'expression des miARNs de 19 échantillons de LF en prenant pour contrôle 7 échantillons d'hyperplasie folliculaire. Par une technique de microarray, 851 miRs ont été analysés. 134 miRs sont exprimés significativement différemment entre les 2 populations (Test de Mann-Whitney, $p < 0.05$, $FC > 2$), 66.5% étant sous-exprimés et 33.5% surexprimés. Cette répartition est classique des cancers puisqu'il a été montré que la majorité des miARNs sont sous-exprimés dans les pathologies tumorales. Pour ce travail, la discrimination du LF avec les hyperplasies folliculaires est possible grâce à la signature spécifique du LF qui regroupe 44 miARNs. Ceux-ci permettent également de classifier les échantillons de FL en 2 groupes, dont l'un est associé à une meilleure réponse à la chimiothérapie. Une analyse du profil d'expression de 199 gènes impliqués dans les processus de différenciation et de tumorigénèse a également été réalisé retrouvant 33 gènes significativement différents (Test de Mann-Whitney, $p < 0.05$, $FC > 2$) entre les 2 populations. Les ARNm cibles des miARNs sur-exprimés miR-20a, miR-20b, appartenants au cluster 17-92, et le miR-194 sont CDKN1A et SOCS2. Ceux-ci sont retrouvés sous-exprimés dans les échantillons de LF et ont donc une fonction amoindrie dans les mécanismes de réparation d'ADN ou de régulation du cycle cellulaire. Il s'agit de la 1^{ère} étude établissant un lien entre le LF, les miARNs et la lymphomagenèse.

D'autres études telles que celles de Roehl *et al.* [93] et de Lawie *et al.* [94] ont étudiés le LF dans le cadre d'une comparaison avec le DLBCL ou avec des cellules normales. Ces équipes utilisent comme techniques d'analyse la Q-Rt-PCR ou la microarray. Elles apportent quelques informations sur le profil miARN du LF et établissent des algorithmes décisionnels d'aide au diagnostic. Ainsi, selon Roehle, seulement 4 miARNs suffisent à distinguer le LF du DLBCL (miR-330, 17-5p, 106a, 210). Sur l'ensemble des miARNs analysés par les 2 équipes, seuls 2 miARNs sont retrouvés en commun : miR-135a et miR-150, tout les 2 sous-exprimés dans le LF par rapport au DLBCL.

Une revue de la littérature sur le LF m'a permis de résumer les connaissances sur les miARNs en un schéma représenté sur la figure 14. Plusieurs inconvénients dans cette revue des données sont à noter. Premièrement, les techniques d'analyse utilisées ne sont pas exhaustives (PCR, microarray) réduisant le nombre total de miARNs étudiés. Deuxièmement, les cellules contrôle tout comme les échantillons patients sont des cellules issues de ganglions ou d'amygdales saines non triées. Les résultats représentent donc l'ensemble des cellules de la lymphopoïèse B normale et celles du microenvironnement, dont l'importance a été largement prouvée ces dernières années. Aucune étude à ce jour n'a comparé les profils d'expression des cellules, hautement purifiées, tumorales avec leur contrepartie normale.

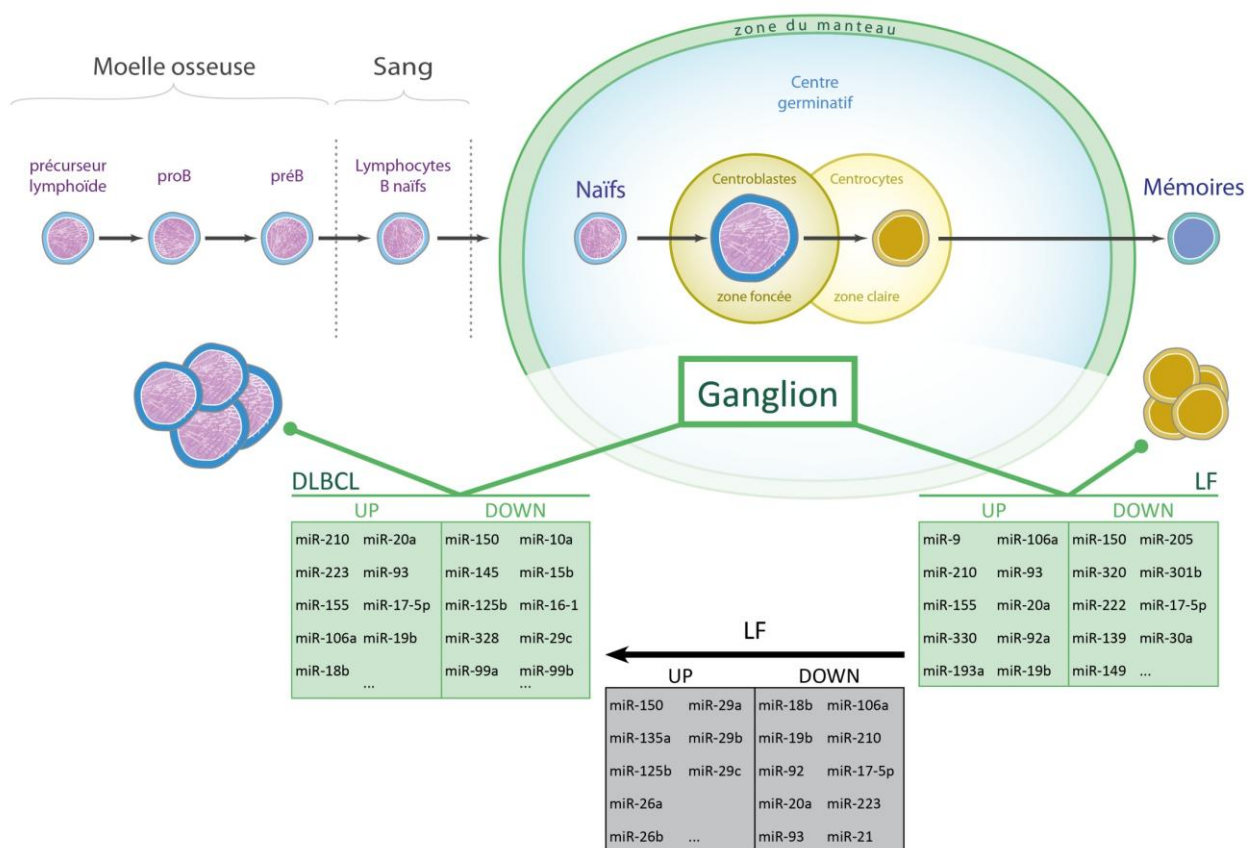


Figure 14 : Profils miARNs des cellules du LF et du DLBCL comparés aux ganglions normaux (en vert) et comparaison du LF avec le DLBCL (en gris)

OBJECTIFS

La transformation d'une cellule normale vers une cellule de LF est plurifactorielle et repose notamment sur l'accumulation d'anomalies génétiques. La lymphomagénèse du LF est complexe et certains points restent encore à élucider.

L'implication des miARNs aussi bien dans les cancers solides que dans les cancers hématopoïétiques est prouvée et ouvre une nouvelle voie d'étude dans la caractérisation des processus tumoraux. A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées aux dérégulations des miARNs dans le LF, et elles sont le plus souvent non exhaustives.

Ce travail s'inscrit dans la caractérisation de la signature des cellules du LF de façon à apporter un nouvel élément de compréhension de la physiopathologie de cette maladie.

Dans un 1^{er} temps, par une technique de séquençage, le miRNome des cellules de FL purifiées est obtenu. Ces résultats sont comparés aux cellules ganglionnaires dont dérivent les cellules du LF, c'est-à-dire les cellules du centre germinatif. Ceci implique d'obtenir et d'exploiter également les miRNomes des différents stades du développement lymphocytaire B ganglionnaire. Le but de cette confrontation est de mettre en évidence les miARNs les plus dérégulés dans le LF et donc les plus impliqués dans la transformation tumorale.

Puisque les miARNs sont des régulateurs de l'expression génique, une dérégulation de leur expression entraîne une modification du transcriptome. Dans un 2nd temps, les données du transcriptome, obtenues sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour le miRNome, sont intégrées aux profils d'expression génique. Compte tenu de l'importance des données que ces 2 techniques engendrent, notre attention sera focalisée sur les miARNs, associés à leurs cibles, les plus pertinents c'est-à-dire les plus dérégulés.

Au total, l'objectif de ce travail est de prouver l'implication des miARNs dans le LF, d'établir un profil signature et de mettre en évidence la relation entre le miRNome et le transcriptome. Cette étude entre dans le cadre d'un projet de recherche mené avec la ligue contre le cancer (http://cit2.ligue-cancer.net/CIT_Public/) grâce au programme de « carte d'identité de la tumeur » (CIT).

II. Matériels et méthodes

A. Cohorte

Notre série comporte 6 échantillons de LF. Le diagnostic a été fait suivant les critères cytologiques, immunophénotypiques et moléculaires définis par l'OMS. Les ganglions de LF obtenus après exérèse chirurgicale, proviennent de patients n'ayant jamais reçus de traitement, les grades IIIb et les patients en rechute ont été exclus de l'étude. L'ensemble des patients inclus ont signés une feuille de consentement. Les principales caractéristiques biocliniques de cette cohorte sont reprises dans le tableau 6. Celle ci est représentative de la pathologie étudiée puisqu'elle comprend à la fois des hommes et des femmes, dont la moyenne d'âge est de 64 ans. Le prélèvement correspond à un stade avancé de la maladie, comme c'est souvent le cas au diagnostic.

La cohorte inclut également 6 échantillons d'amygdales saines considérés comme nos populations normales.

Tableau 6 : Caractéristiques clinico-biologiques de la cohorte

Echantillons	Date de prélèvement	Sexe	Age au diagnostic (ans)	Stade Ann Harbor
Ganglion LF 1	25/11/2004	M	54	IV
Ganglion LF 2	06/06/2007	M	68	NA
Ganglion LF 3	15/09/2010	M	76	III A
Ganglion LF 4	03/03/2009	F	76	III A
Ganglion LF 5	01/06/2010	M	52	IV
Ganglion LF 6	22/02/2011	F	58	IV A

B. Purification cellulaire

Au cours d'un précédent travail, l'ensemble de nos échantillons ont été mécaniquement dissocié et les suspensions cellulaires obtenues ont été purifiées par le trieur FACSAria (Becton Dickinson). La stratégie de purification est résumée dans le tableau 7. Au total, 28 échantillons cellulaires triés ont été préparés : 6 échantillons de LF, 6 échantillons de cellules BGC, 4 échantillons de cellules B naïves, centroblastiques, centrocytiques et B mémoires.

2 stratégies différentes ont été utilisées pour définir les cellules du centre germinatif :

- L'utilisation des marqueurs CD20, CD44, IgD, CD38 et CD138 pour définir la population globale des cellules du centre germinatif.
- L'utilisation du marqueur CXCR4 pour différencier les centroblastes exprimant positivement ce marqueur des centrocytes caractérisés par son absence [95].

Tableau 7 : Stratégies de purification cellulaire

Cellules	Phénotypes
B naïve	CD19 ^{pos} IgD ^{pos} CD38 ^{low} CD27 ^{neg} CD10 ^{neg}
Centroblaste	CD19 ^{pos} IgD ^{neg} CD38 ^{high} CD10 ^{pos} CXCR4 ^{pos}
Centrocyte	CD19 ^{pos} IgD ^{neg} CD38 ^{high} CD10 ^{pos} CXCR4 ^{neg}
BGC	CD20 ^{high} CD44 ^{low} IgD ^{neg} CD38 ^{pos} CD138 ^{neg}
B mémoire	CD19 ^{pos} IgD ^{neg} CD38 ^{low} CD27 ^{pos} CD10 ^{neg}
LF	CD20 ^{high} CD44 ^{low} IgD ^{neg} CD38 ^{pos} CD138 ^{neg}

1. **Extraction de l'ARN total**

Les ARN totaux comprenant les miARNs de nos échantillons ont été extraits par une technique Qiazol avec traitement par une DNase selon les recommandations du fournisseur. Pour chaque échantillon cellulaire, une partie de l'ARN total extrait a été conservé pour l'analyse du profil génique et une autre partie a été mise de côté pour l'analyse des miARNs.

2. **Extraction des miARNs**

Les miARNs ont été extraits à partir d'une partie de l'ARN total à l'aide du kit miRNeasy Mini du fournisseur Qiagen par la plateforme Integragen d'Evry dans le cadre du projet avec le CIT. Le protocole d'extraction s'est fait selon les recommandations du fournisseur.

3. **Qualification des ARNs**

Avant l'analyse des échantillons, ceux-ci ont été qualifiés par la plateforme du CIT. La pureté de l'ARN a été évaluée par spectrophotométrie par la mesure du ratio des absorbances 260/280 nm et 260/230 nm. Pour que l'ARN soit considéré pur, il faut que le rapport 260/280 soit supérieur ou égal à 1,8 et que le rapport 260/230 soit supérieur ou égal à 1,6. Nos échantillons ont tous été qualifiés.

L'analyse de l'intégrité de l'ARN a été réalisée grâce à l'automate Bioanalyzer 2100 d'Agilent. Cette technique permet pour chaque échantillon de déterminer le ratio 28S/18S et de lui attribuer un RIN (RNA Integrity Number). Ce RIN est obtenu lors de la séparation des échantillons par électrophorèse capillaire sur puce. La fluorescence émise lors de la séparation est traduite en un électrophorégramme sous forme de pics. Ces pics identifient la taille des fragments contenus dans l'échantillon grâce à une comparaison avec un marqueur de taille. Pour que les conditions pré-analytiques soient remplies, il faut que le ratio 28S/18S soit >1,5 et que le RIN soit >7. Nos échantillons ont tous été qualifiés, la moyenne du ratio 28S/18S est de 1,8 et la médiane de 1,725 et la moyenne du RIN est de 9,55 et la médiane de 9,46.

1. Principe du séquençage haut débit

Il s'agit d'une technologie très sensible particulièrement adaptée aux miARNs puisqu'elle permet la détection de séquence même en faible abondance.

Le séquençage haut débit, quelque soit la technologie utilisée, comportent 4 étapes principales :

- La préparation des librairies et amplification des ADNs d'intérêt
- Les cycles de réactions de séquençage
- La prise d'image à la fin de chaque cycle
- L'analyse de données

L'une des technologies la plus répandue pour le séquençage haut débit est la méthode Illumina commercialisée par Solexa. La particularité de ce procédé est l'amplification en pont des fragments à séquencer. La préparation de la librairie consiste à sélectionner des fragments d'ADN de taille différente. L'ADN est chargé dans un puits de gel d'agarose type PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) avec un tampon de charge. A la fin de la migration, on récupère la bande de gel de la taille d'intérêt. L'ADN est ensuite extrait de chaque bande selon les recommandations du fournisseur.

S'en suit une étape d'amplification des fragments sélectionnés par PCR qui seront ensuite purifiés sur colonne.

Sur les extrémités 3' et 5' des fragments de la librairie à séquencer ont été fixés des adaptateurs. Ceux-ci vont permettre aux séquences de se fixer aux amorces déjà présentes sur la plaque dite « flow cell ». Sous l'action d'une polymérase, un nouveau brin est synthétisé. Le brin d'origine est éliminé par dénaturation et l'extrémité libre du nouveau brin va s'hybrider avec une amorce adjacente formant un pont. La polymérase va une nouvelle fois synthétiser un nouveau brin complémentaire pour former un pont d'ADN double brin qui sera ensuite libéré par dénaturation. L'ensemble forme un cycle d'amplification en pont. Le séquençage s'effectue sur des millions de séquences simultanément. Les nucléotides ajoutés sont marqués par fluorescence et lorsque l'un d'entre eux est incorporé à la séquence complémentaire en formation, la fluorescence émise est relevée et le fluorophore clivé, permettant l'ajout d'un nouveau nucléotide. Les 4 nucléotides incorporés ont une couleur différente. Ainsi, une base peut être déterminée à chaque cycle d'incorporation [96]. La figure 15 récapitule l'ensemble des étapes du séquençage Illumina HiSeq2000 et détaille les étapes de la génération des clusters et de l'amplification en pont.

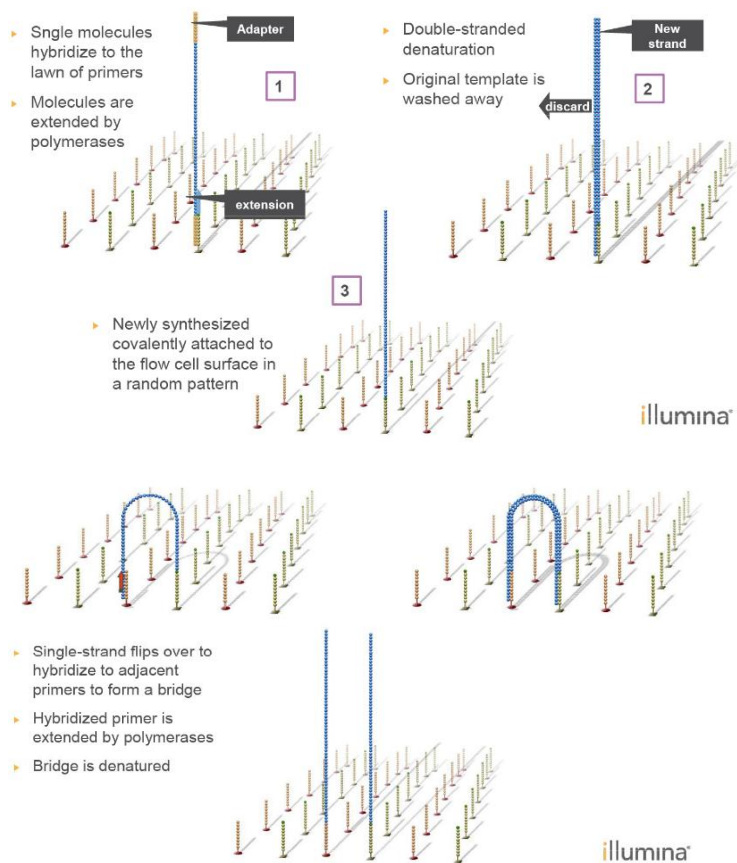
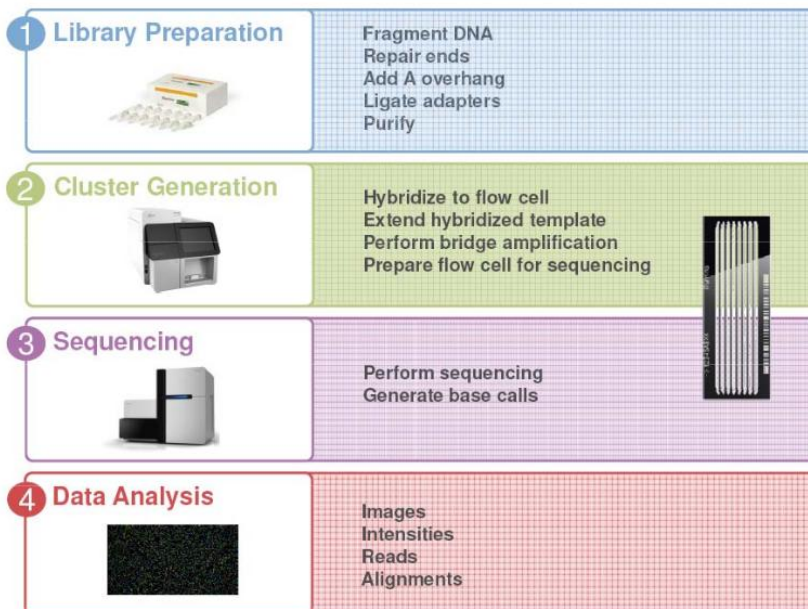


Figure 15 : Etapes du séquençage Illumina (issue du site internet Illumina)

Etape 1 : Préparation de la banque d'ADN (dite librairie). Sélection des fragments d'ADN puis ligation d'adaptateurs. Amplification de la librairie par PCR.

Etape 2 : Transfert de la librairie sur la plaque. Génération des clusters (synthèse du brin complémentaire puis dénaturation). Formation d'un pont et synthèse du brin complémentaire.

Etape 3 : Incorporation des bases complémentaires (4 nucléotides fluorescents). Génération des signaux.

Etape 4 : Détection des signaux et conversion en séquences.

2. Technique d'analyse de nos échantillons

Le miRNome, terme définissant l'expression globale des miARNs, de chacun de nos échantillons a été séquencé par la technologie Illumina HiSeq 2000 sur la plateforme Integragen, à Evry.

3. Analyse par le logiciel miRanalyser

Les données issues du séquençage représentent un challenge bioinformatique dans leur analyse compte tenu de la taille des informations récoltées. Le logiciel miRanalyser est un serveur internet dédié à l'analyse du séquençage haut débit des « small RNAs » [97]. Après conversion du format des données brutes issues du séquençage Illumina, celles-ci sont filtrées et seules les séquences de 17 à 26 bases sont conservées. Les séquences sélectionnées vont ensuite subir 3 étapes successives. Tout d'abord, toutes les séquences vont être alignées sur les séquences des miARNs connus répertoriées sur le site miRBase. Au moment de l'étude, nos échantillons ont été analysés grâce à miRBase version 18. Les séquences qui ont été sélectionnées et mises de côté à cette étape vont constituer le miRNome. En cas de non alignement, les séquences restantes vont être alignées sur celles de différentes databases pour éliminer les contaminations par des « small RNAs » non miARNs. Puis, les dernières séquences sont des ARN candidats pour la prédiction de nouveaux miARNs. La dernière étape correspond à la quantification des miARNs. Le nombre de fois où une séquence unique filtrée est lue va déterminer son taux d'expression dans l'échantillon. Celui-ci est normalisé non pas sur les séquences totales de 17 à 26 bases mais seulement sur les séquences alignées sur miRBase.

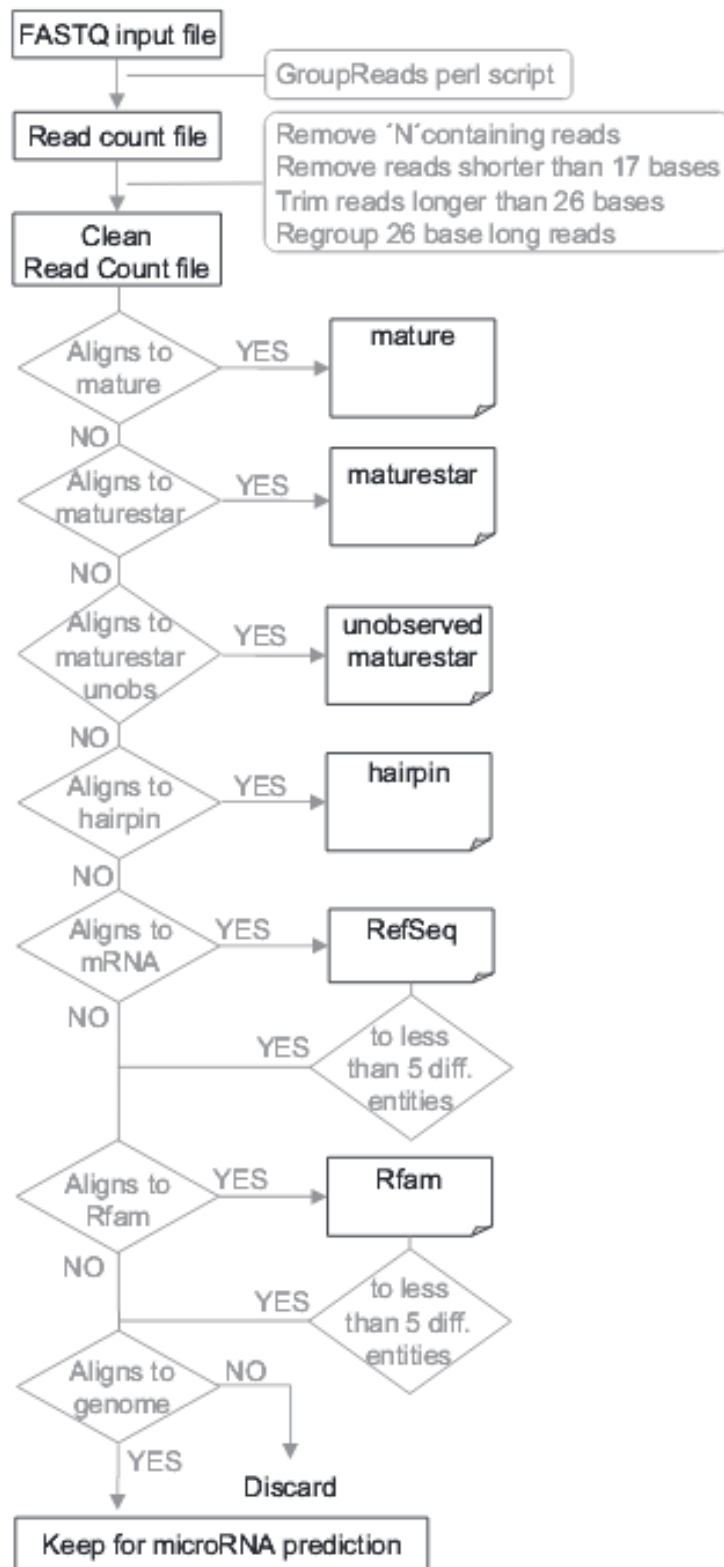


Figure 16 : Algorithme général de miRanalyser [98]

Les fichiers bruts fastq sont transformés en un fichier regroupant le nombre de séquences uniques lues qui est ensuite filtrés pour ne conserver que les séquences de 17 à 26 bases. Puis, ces séquences sont alignées sur différentes databases identifiant en premier les miARNs connus, puis éliminant les ARN contaminants, et enfin, sélectionnant les éventuels nouveaux miARNs.

1. Principe de la microarray

La technique des puces à ADN dite « microarray » permet de comparer le niveau d'expression des gènes d'un échantillon par rapport à un autre échantillon dit contrôle. Dans notre étude, nous avons comparé le transcriptome des cellules tumorales du LF les cellules issues d'amygdales saines.

Le principe de fabrication des puces à ADN Affymetrix est la synthèse in situ de centaines de milliers de séquences distinctes d'oligonucléotides sur une matrice de verre, fixées par photolithographie et chimie combinatoire. Chaque oligonucléotide de 25 bases est reproduit à des millions d'exemplaires dans une région circonscrite à 1 cm². Chaque séquence de transcription est couverte par 11 à 20 paires de sondes d'oligonucléotides espacées aléatoirement sur la matrice.

Les ARN cibles sont transcrits en ADNc par transcriptase inverse, puis une transcription in vitro est menée pour créer de l'ARNc marqué à la biotine pour hybridation. L'ARNc cible hybridé est coloré à la streptavidine-phycoérythrine, puis les biopuces sont analysées grâce à un scanner dédié à une longueur d'onde de 488 nm. L'émission de lumière à une longueur d'onde de 570 nm est proportionnelle à la quantité de cibles liées à chaque position des oligonucléotides sur la puce.

2. Technique d'analyse de nos échantillons

L'analyse du transcriptome de notre cohorte a été réalisé sur la plateforme « Biopuces et séquençage » à Illkirch. Pour notre étude, nous avons utilisé la puce Genechip human genome U133 Plus 2.0 array, commercialisée par Affymetrix, qui permet l'analyse simultanée de plus de 54000 probe sets correspondant à plus de 38000 gènes. L'image est enregistrée par GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) et analysée par le logiciel GCOS 1.4 (Affymetrix). Les données issues de cette analyse, sous le format CEL, sont normalisées par rapport au bruit de fond selon la méthode GCRMA à l'aide du logiciel Partek® Genomics Suite™ 6.6 (<http://www.partek.com/>).

F. Validation en Q-RT-PCR

Les échantillons utilisés pour la validation en Q-RT-PCR sont les mêmes que ceux de la cohorte de séquençage. La 1^{ère} étape de la validation en PCR consiste en une Reverse Transcription (RT) de l'ARN total de nos échantillons. La solution de réaction pour la RT a été préparée à partir des RT primers contenus dans les TaqMan® MicroRNA assays (hsa-miR-26a et hsa-miR-29a, RNU6B) et des réactifs contenus dans le TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit (deoxynucléotides, MultScribe RT, inhibiteurs d'ARNase, tampon). 12µl de ce mix sont ajoutés à 3µL de l'ARN total de nos échantillons, correspondant à 350ng. La réaction de transcription inverse est réalisée dans un bloc chauffant selon le programme suivant: 30 min à 16°C, 30 min à 42°C et 5 min à 85°C.

Une fois la réaction de RT effectuée, la solution de réaction de RT est incorporée à celle pour la PCR quantitative contenant le réactif TaqMan® Universal Master mix. 19 µL de cette solution est incorporée dans chaque puit de la plaque de PCR auquel sont ajoutés 1µL de réactifs TaqMan® MicroRNA assays. La réaction de Q-PCR est réalisée sur un appareil StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems®). L'activation de l'enzyme se fait à 95°C pendant 10 min puis sont réalisés 40 cycles de dénaturation (15sec, 95°C)/ hybridation-élongation (1 min, 60°C).

Ce protocole est appliqué non seulement aux miARNs dont on veut confirmer les résultats obtenus en séquençage, mais aussi sur un contrôle endogène, le RNU6B. Les Q-RT-PCR ont été réalisées en duplicate pour chaque échantillon. Après acquisition des données, le Ct moyen (Cycle Threshold) correspondant au seuil à partir duquel le signal est supérieur au bruit de fond, a été calculé pour un miARN dans un échantillon. Un Ct>40 est considéré indétectable. Le signal est normalisé par l'expression de RNU6B pour les miARNs. La comparaison des niveaux d'expressions des miARNs entre échantillons utilise la méthode 2^{-ddCt} .

1. Analyse statistique

L'ensemble des données du miRNome et du transcriptome ont été analysées statistiquement à l'aide du logiciel Partek Genomics Suite 6.6 (<http://www.partek.com/>). L'ensemble des données de nos échantillons suivent une loi normale vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnoff. Le test paramétrique de Student (t-test) a donc pu être appliqué à l'ensemble de nos échantillons. Celui-ci a été corrigé par la loi de correction des grands nombres selon la méthode de Benjamini-Hochberg (FDR: False discovery rate). Pour les données ne pouvant être normalisées, un test de Mann Whitney a été réalisé.

2. Intégration du miRNome et du transcriptome

a. TargetScan et miRTarBase

TargetScanHuman version 6.2 est un outil bioinformatique de prédiction des cibles de miARNs accessible en ligne (<http://www.targetscan.org>). Ce logiciel prédit les cibles des miARNs en comparant la complémentarité des structures des miARNs étudiés avec celles des régions 3'UTR des ARNm présents dans sa base de données (18393 gènes uniques). Les critères permettant de déterminer les cibles des miARNs se basent sur la stringence de l'appariement dans la région « seed » du miARN, sur la conservation des sites cibles des miARNs entre espèces, et sur l'accessibilité au site cible [99].

miRTarBase, contrairement à TargetScan, est une base de données comprenant les cibles des miARNs validées expérimentalement dans la littérature. Elle répertorie à ce jour 1232 miARNs et 17520 gènes cibles et totalise 51460 interactions miR-gène [100].

b. Ingenuity Pathway Analysis

Ingenuity pathway Analysis est un logiciel qui permet de modéliser, analyser et comprendre les voies biologiques. Ce logiciel est disponible sur internet (<http://www.ingenuity.com/>). Les données issues de nos analyses sont intégrées et traitées par IPA qui propose un aperçu des interactions moléculaires directes et indirectes entre les miARNs et les gènes. Il en ressort une ou plusieurs voies impliquant nos miARNs et gènes les plus dérégulés sur lesquelles peuvent être générées des hypothèses de dysfonctionnement dans le processus pathologique du LF.

III. Résultats

1. Données globales du miRNome

Les données issues du séquençage du miRNome sont classées en plusieurs groupes comprenant entre autres :

- Les données sur les miARNs matures (miRs)
- Les données sur les miARNs dits « hairpin » correspondant aux précurseurs miARNs (mirs).

Tout d'abord, en considérant l'ensemble des échantillons, aussi bien normaux que tumoraux, 1469 séquences uniques de miARNs matures (miRs) et 1411 séquences uniques de miARNs hairpin (mirs) ont été détectées. Ce travail s'est intéressé uniquement aux données sur les miARNs matures.

Lors de l'analyse de ces données par le logiciel miRanalyser, les séquences lues ont été alignées sur la version 18 de miRBase qui recensait alors 1921 miARNs matures. Compte tenu de l'intérêt porté aux miARNs et de la mise à disposition de nouvelles technologies et de nouveaux logiciels d'exploitation, la communauté scientifique découvre chaque jour de nouveaux miARNs. Ainsi, à l'heure actuelle, la version 20 de miRBase recense 2578 miARNs matures.

En moyenne, les cellules tumorales du LF expriment 650 miARNs matures différents tandis que les cellules BGC et les centrocytes expriment respectivement 740 et 706 miARNs matures différents.

Le nombre total de miARNs exprimés par les cellules de la différenciation lymphocytaire B, n'est pas significativement différent entre les cellules B naïves, les cellules BGC, les centroblastes, les centrocytes et les cellules B mémoires (Mann-Whitney, $p < 0.05$) (figure 17). De la même manière, le nombre total de miARNs exprimés par les cellules tumorales du LF en comparaison avec les cellules BGC ou les centrocytes, n'est pas significativement différent (Mann-Whitney, $p < 0.05$) (figure 17). Ces observations sont applicables aux miARNs « hairpin ».

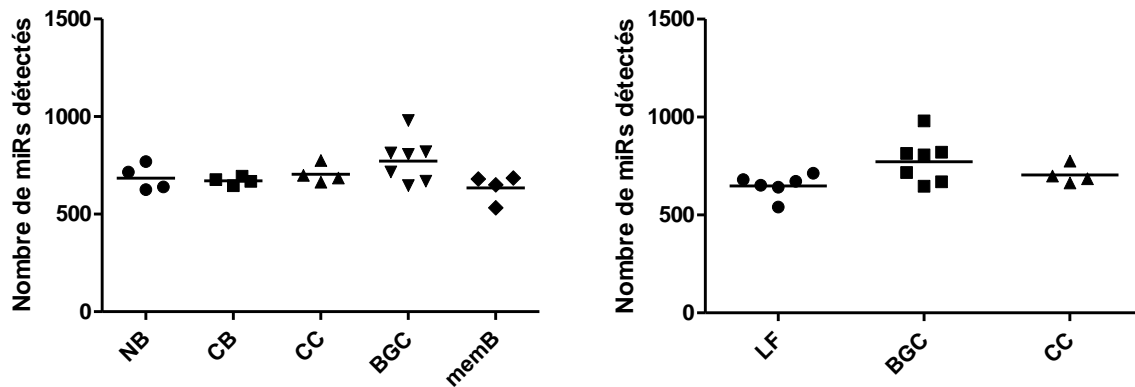


Figure 17 : Représentations du nombre de miARNs détectés en fonction de la population d'échantillons

A gauche, les cellules de la lymphopoïèse B normale (NB : cellules B naïves, CB : centroblastes, CC : centrocytes, BGC : cellules B du centre germinatif, memB : cellules B mémoires). A droite, les cellules du LF et leur contrepartie normale.

2. Données globales du transcriptome

Au total, 54675 probe set (PS) ont été étudiées par microarray. Seules 42440 PS sont annotées ce qui correspond à 21049 gènes. Pour la comparaison des populations cellulaires entre elles, seules les PS annotées et dont la valeur d'intensité logarithmique est supérieure à 4,32, éliminant les sondes présentes dans le bruit de fond, sont conservées.

B. Choix de la population normale contrôle

Le LF dérive des cellules du centre germinatif ganglionnaire, représentées par les centroblastes et les centrocytes. Les cellules du LF présentent des similarités, notamment cytologiques, avec les centrocytes. La population contrôle utilisée pour notre étude doit correspondre à la contrepartie normale du LF. Les cellules BGC et les centrocytes ont été hautement purifiées par 2 stratégies différentes :

- Centroblastes : CD19^{pos} IgD^{neg} CD38^{high} CD10^{pos} CXCR4^{pos}
- Centrocytes : CD19^{pos} IgD^{neg} CD38^{high} CD10^{pos} CXCR4^{neg}

Nous pouvons donc faire le choix d'utiliser soit les cellules B du centre germinatif soit les centrocytes.

1. Représentation en Analyse par composante principale

La représentation en analyse par composante principale (ACP) permet de décrire graphiquement les liens, sans à priori, entre les échantillons étudiés. Celle-ci est réalisée à partir de toutes les variables quantitatives issues de l'analyse. Cette représentation non supervisée donne une tendance sur les liens entre les échantillons, avant toute analyse statistique.

La représentation en ACP des échantillons de cellules B naïves, des centroblastes, des centrocytes, des cellules BGC et des cellules B mémoires, constituant les étapes de la différenciation B tardive, permet de les différencier visuellement. Cette distinction est possible aussi bien sur les données du transcriptome composées des PS annotées et sortant du bruit de fond que sur celles du miRNome (figure 18). La répartition cellulaire basée sur le miRNome est superposable à celle basée sur le transcriptome.

Tout d'abord, aussi bien à partir des données du miRNome que du transcriptome, on constate la répartition sur un même plan des cellules BGC, des centroblastes et des centrocytes. La totalité des échantillons de cellules du centre germinatif, bien que purifiées selon 2 stratégies différentes se distinguent parfaitement de ceux des cellules B naïves et des cellules B mémoires. Cette représentation valide donc nos purifications cellulaires. On constate également une distinction entre les cellules BGC et les centrocytes sur les données d'expression génique et de miARNs.

Il est également à noter que les échantillons de cellules B naïves ont une projection proche de celles des cellules B mémoires. Cette proximité a déjà été décrite par des études

d'expression génique, elle est confirmée ici par les données du transcriptome de notre cohorte. Cette observation est soutenue par les données du miRNome.

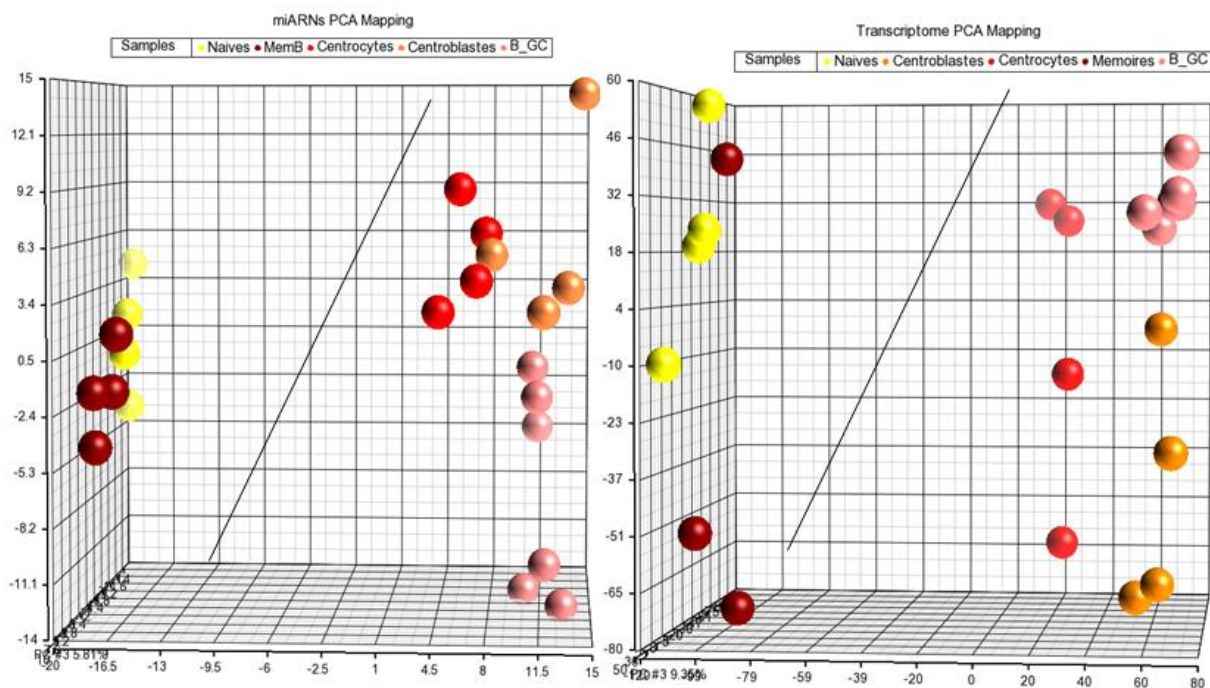


Figure 18 : Représentation graphique en ACP des cellules de la différenciation cellulaire

A gauche, selon les données du miRNome, à droite, selon les données du transcriptome.

En jaune, les lymphocytes B naïfs, en marron, les cellules B mémoires, en rouge les centrocytes, en orange les centroblastes et en rose les B du GC.

2. Analyses statistiques du miRNome et du transcriptome

Les données du miRNome et du transcriptome obtenues pour les échantillons de cellules B naïves (n=4), de centroblastes (n=4), de centrocytes (n=4), de BGC (n=6) et de cellules B mémoires (n=4) ont été analysées par un test de Student corrigé par le FDR à l'aide du logiciel Partek Genomics Suite 6.6.

Toutes les populations cellulaires ont été comparées 2 à 2 sur l'ensemble des miARNs ou gènes exprimés par les échantillons.

La comparaison du miRNome des centroblastes avec les centrocytes montre que 140 miARNs soit 9,5% de l'ensemble des miARNs exprimés sont significativement différents (FDR, t-test, $p < 0,05$). De la même manière, la comparaison du transcriptome entre ces 2 populations montre que l'expression de 2052 gènes soit 21,6% de la totalité des gènes exprimés sont significativement différents. Il existe donc bien 2 profils distincts entre les centroblastes et les centrocytes. L'utilisation de cellules BGC comme population contrôle ne constituerait pas l'analyse la plus fine puisque celle-ci est un mélange des 2 sous

compartiments, les centroblastes et les centrocytes. La population des centrocytes semble donc la plus appropriée pour être la contrepartie normale à nos échantillons de LF.

Il est à noter, comme pour la représentation en ACP, que les cellules B naïves et les cellules B mémoires ont des profils très proches. L'analyse du miRNome montre que seulement 13 miARNs soit 0,9% des miARNs totaux exprimés sont significativement différents. En augmentant la stringence du test (FDR, t-test, $p < 0,001$), seul le miR-138-5p signe la différence entre ces 2 population, celui-ci étant sous exprimé dans les cellules B naïves. De la même manière, seulement 8,5% des gènes exprimés par les 2 populations sont exprimés différemment (FDR, t-test, $p < 0,05$). Ces 2 populations ont beaucoup de proximité en termes d'expression génique, potentiellement lié à leur état peu proliférant en comparaison à la dynamique des cellules B en voie de différenciation dans le CG.

1. Représentation en ACP de échantillons de lymphome folliculaire avec les centrocytes

L'ensemble des données obtenues pour les échantillons de LF sont confrontées sur une représentation en ACP avec celles des échantillons de centrocytes. Il en résulte une distinction franche des 2 populations aussi bien par les données du transcriptome que par celles du miRNome (figure 19). Ainsi, avant même l'utilisation d'outil statistique, le LF peut être discriminé de sa contrepartie normale.

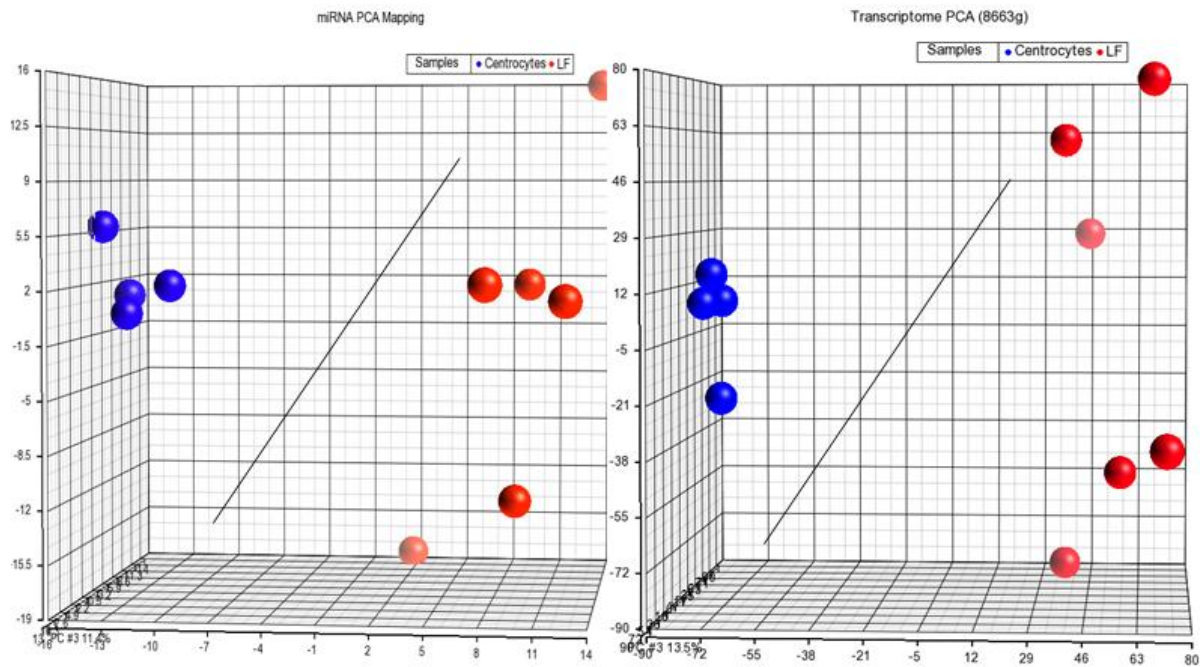


Figure 19 : Représentation graphique en ACP des échantillons de LF et des échantillons de centrocytes

A gauche, selon les données du miRNome, à droite, selon les données du transcriptome.

En bleu les centrocytes, en rouge les cellules du LF.

2. Analyse statistique

a. Analyse statistique du miRNome

Sur les 1150 miARNs exprimés par les 6 échantillons du LF et les 4 échantillons de centrocytes, seuls 49 miRs soit 4,3% sont exprimés différemment (FDR, $p < 0.05$, t-test).

Parmi ces 49 miRs, 7 miRs soit 14% sont sur-exprimés dans le LF (Tableau 8). Plus de 70% des 7 miRs significativement sur-exprimés dans le LF appartiennent aux familles des miRs

26 et 29. La famille des miRs 29 est particulièrement représentée puisque 4 de ces membres appartiennent aux miRs significativement dérégulés dans le LF. Les gènes codant les précurseurs des membres de cette famille sont localisés sur le chromosome 7 pour les miRs 29a et 29b-1 et sur le chromosome 1 pour les miRs 29b-2 et 29c.

Tableau 8: miARNs significativement sur-exprimés dans le LF
Classement selon la p-value (FDR, $p < 0,05$, t-test)

miR surexprimés dans le LF	p-value
hsa-miR-26a-5p	0.000626232
hsa-miR-29b-3p	0.000626232
hsa-miR-29a-3p	0.00212481
hsa-miR-29c-3p	0.0107916
hsa-let-7i-5p	0.00855847
hsa-miR-4485	0.0487179
hsa-miR-29c-5p	0.0182578

Parmi les 49 miRs dérégulés dans le LF, 42 miRs soit 86% sont sous-exprimés dans le LF (tableau 9). Le miR le plus sous-exprimé est le miR-30a. Plus de 20% des miRs significativement sous-exprimés dans le LF appartiennent au cluster 17-92, ou à l'un de ses 2 paralogues, réputés pour avoir un rôle oncogène. Il s'agit des miR-17-5p et 20a appartenant au cluster 17-92, des miR-363, 20b et 18b appartenant au cluster 106a-363, et des miR-106b et 93 appartenant au cluster 106b-25.

Tableau 9: miARNs significativement sous-exprimés dans le LF
 Classement selon la p-value (FDR, $p < 0,05$, t-test)

miR sous exprimés dans le LF	p-value
hsa-miR-30a-5p	7.07355e-005
hsa-miR-30a-3p	0.000541134
hsa-miR-331-5p	0.00150099
hsa-miR-20b-5p	0.00212481
hsa-miR-363-3p	0.00352994
hsa-miR-744-5p	0.00352994
hsa-miR-942	0.00474904
hsa-miR-93-5p	0.00568432
hsa-miR-1296	0.00600489
hsa-miR-184	0.00704081
hsa-miR-4298	0.00855847
hsa-miR-17-5p	0.00943342
hsa-miR-130b-3p	0.0107916
hsa-miR-449a	0.0107916
hsa-miR-1249	0.0107916
hsa-miR-20b-3p	0.0107916
hsa-miR-18b-5p	0.0107916
hsa-miR-5100	0.0107916
hsa-miR-93-3p	0.0107916
hsa-miR-15b-3p	0.0107916
hsa-miR-301a-3p	0.0107916
hsa-miR-4448	0.0116442
hsa-miR-339-5p	0.0116691
hsa-miR-940	0.013827
hsa-miR-1304-3p	0.0155012
hsa-miR-3143	0.0178344
hsa-miR-425-5p	0.0182578
hsa-miR-106b-3p	0.0224754
hsa-miR-7-5p	0.0277798

hsa-miR-191-3p	0.0277798
hsa-miR-331-3p	0.030029
hsa-miR-4726-5p	0.030029
hsa-miR-1307-3p	0.0325882
hsa-miR-425-3p	0.0342136
hsa-miR-20a-5p	0.039199
hsa-miR-339-3p	0.0419318
hsa-miR-107	0.0419318
hsa-miR-30c-1-3p	0.0419318
hsa-miR-148a-5p	0.0419318
hsa-miR-28-3p	0.0448006
hsa-miR-363-5p	0.0448006
hsa-miR-744-3p	0.0448006

Au total, on constate qu'une faible proportion des miARNs exprimés par les LF et les centrocytes ont une expression dérégulée dans la pathologie tumorale. Cette notion est appuyée par les données du séquençage des séquences dites « hairpin », puisque seule l'expression du mir-1295a est significativement dérégulée dans le LF en comparaison aux centrocytes (FDR, $p < 0,05$, t-test). On ne retrouve d'ailleurs pas son miR mature dans la liste des miARNs matures statistiquement dérégulés dans le LF.

Ainsi, la dérégulation des miARNs interviendrait soit à un stade tardif de leur biogénèse soit au niveau de la boucle de régulation exercée par leurs protéines cibles.

La dérégulation va majoritairement dans le sens d'une sous-expression des miARNs, et donc d'une potentielle sur-expression de leurs cibles.

b. miARNs d'intérêt dans le lymphome folliculaire

Pour la suite de l'analyse du miRNome du LF, nous avons choisi de focaliser notre attention sur 3 groupes de miARNs :

- Les miRs de la famille 29
- Les miRs de la famille 26
- Le cluster 17-92 et ses paralogues

Les miRs-26 et les miRs-29 représentent majoritairement les miARNs significativement sur-exprimés dans le LF. Compte tenu du fait que peu de représentants des miARNs sont sur-exprimés dans le LF, il semble important d'analyser leur impact sur l'expression génique.

Du fait de leur proximité structurale, les miARNs d'une même famille ont la plupart de leurs gènes cibles en commun. Compte tenu du fait que 4 des représentants de la famille du miR-29 font partie des miRs sur-exprimés dans le LF, nous avons choisi de déterminer les gènes cibles d'un seul de ces miARNs. Notre choix s'est porté arbitrairement sur le miR-29a.

Une part importante des miARNs appartenant au cluster 17-92 ou à l'un de ses paralogues a une expression plus faible dans le LF. Ainsi, sur les 6 représentants que compte le cluster 17-92, 2 miARNs sont dérégulés dans le LF. Il s'agit du miR-17 et du miR-20a. La moitié des représentants du cluster paralogue 106a-363 sont eux aussi dérégulés, il s'agit du miR-363, miR-18b et miR-20b. Enfin, le 2^{ème} cluster paralogue, 106b-25, présente 2 de ses 3 membres sous-exprimés, le miR-106b et le miR-93.

c. Confirmation en Q-RT-PCR

Les résultats obtenus par séquençage pour les miRs d'intérêt, miR26a et miR-29 ont été confirmés par une approche PCR quantitative. Les résultats pour le miR-26a sont représentés sur la figure 20. Pour la famille du miR-29, seul le miR-29a-5p a été testé. De la même manière, pour la famille du miR-26, seul le miR-26a-5p a été vérifié.

Les échantillons testés pour le LF sont ceux préalablement utilisés pour le séquençage auquel un nouvel échantillon de LF issu d'un ganglion a été ajouté. Les populations correspondant à sa contrepartie normale, aussi bien les BGC que les centrocytes, sont celles utilisées pour le séquençage. Les résultats sont significativement différents entre les échantillons de LF et ceux de BGC ainsi qu'avec les centrocytes confirmant une augmentation significative de l'expression des miARNs d'intérêt testés dans le LF.

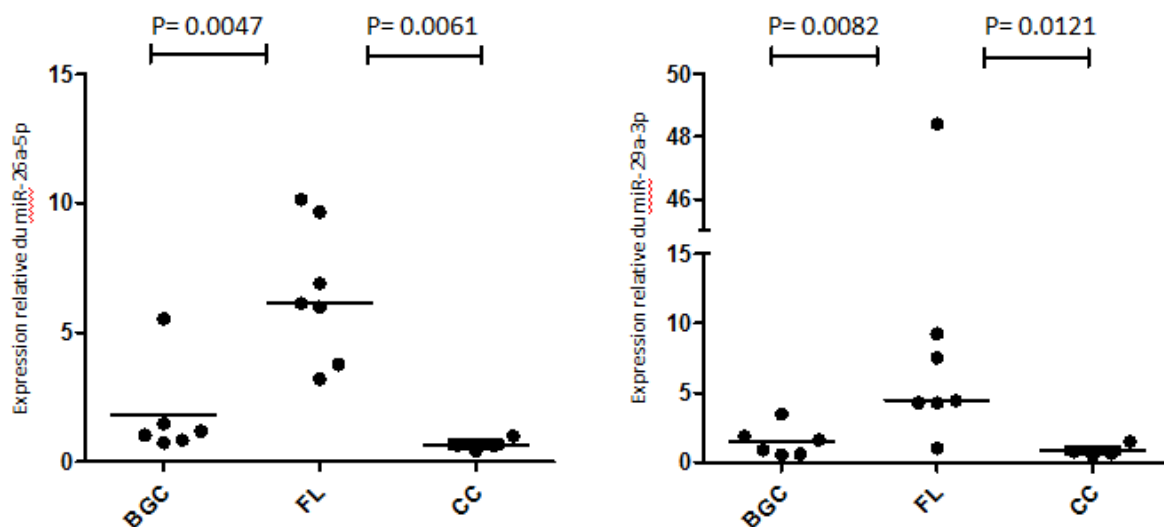


Figure 20: Représentation de l'expression relative du miR-26a-5p et du miR-29a-3p en Q-RT-PCR d'échantillons de LF, BGC et CC

La référence utilisée pour les calculs par la méthode des 2^{-ddCt} est le RNU6B.

Test de Mann-Whitney.

3. Intégration du profil miRNome avec le transcriptome dans le lymphome folliculaire

a. Profil transcriptomique du lymphome folliculaire

Lors de l'analyse des échantillons de LF avec les centrocytes, 14701 PS annotées soit 8663 gènes différents ont une expression supérieure au bruit de fond. Sur ces 8663 gènes, 2344 sont significativement dérégulés dans le LF par rapport aux échantillons contrôles (FDR, $p < 0,05$, t-test) soit 27% de l'expression génique totale. Le tableau 10 représente les 30 gènes les plus fortement sur-exprimés et le tableau 11 indique les 30 gènes les plus fortement sous-exprimés. Parmi ces 2344 gènes, 60% ont un niveau d'expression plus important dans le LF et 40% d'entre eux sont au contraire sous-exprimés. Le fait que les gènes significativement dérégulés soient globalement plus exprimés dans le LF coïncide avec le profil de dérégulation du miRNome. En effet, les miARNs significativement dérégulés sont majoritairement sous-exprimés et présentent donc une diminution de leur fonction régulatrice négative sur les ARNm aboutissant à une augmentation de l'expression génique. Les gènes les plus dérégulés, aussi bien sous que sur-exprimés dans le LF, sont le plus souvent des facteurs de transcription ou des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Parmi les gènes les plus sur-exprimés dans le LF, on retrouve les protéines JUN et JUND qui sont des oncogènes reconnus. L'une des protéines régulatrices de l'action de JUN est CDCA4 appartenant à la famille E2F. Il est intéressant de noter que dans notre cohorte, CDCA4 est sous-exprimée par les échantillons de LF.

Un travail dédié à l'analyse spécifique du transcriptome complet des cellules tumorales du LF est par ailleurs mené au sein de l'équipe INSERM U917. L'analyse effectuée pour ce travail ne focalisera que sur les gènes cibles de nos miARNs d'intérêt.

Tableau 10: Top 30 des gènes les plus sur-exprimés dans le LF
 Classement selon la p-value (FDR, $p < 0,05$, t-test)

Symbole	Appellation gène	FDR p-value
UBE2B	ubiquitin-conjugating enzyme	4.78767e-005
UBB	ubiquitin B	4.78767e-005
CBX7	chromobox homolog 7	8.77315e-005
LMBR1L	limb development membrane protein 1-like	0.000347047
TIPARP	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	0.000347047
DEDD2	death effector domain containing 2	0.000347047
HSP90AA1	heat shock protein	0.000347047
NUFIP2	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 2	0.000347047
HERPUD2	HERPUD family member 2	0.000347047
JUN	jun proto-oncogene	0.000452439
TRIM33	tripartite motif containing 33	0.000452439
NR4A1	nuclear receptor	0.000463092
CHD2	chromodomain helicase DNA binding protein	0.0004928
HEXIM1	hexamethylene bis-acetamide inducible 1	0.000531207
JUND	jun D proto-oncogene	0.000531207
ARID5B	AT rich interactive domain 5B	0.000551958
TMEM66	transmembrane protein 66	0.000620516
JMJD6	jumonji domain containing 6	0.000620516
HSP90AA1	heat shock protein	0.000620516
C1orf55	chromosome 3 open reading frame	0.000620516
CHMP1B	charged multivesicular body protein 1B	0.000620516
AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13	0.000620516
ZNF295	zinc finger protein	0.000620516
KLHL15	kelch-like family member 15	0.000699772
CHD7	chromodomain helicase DNA binding protein 7	0.000699772
CALM1	calmodulin 1	0.000699772
DYNLL1	dynein, light chain, LC8-type 1	0.000699772
LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1	0.000758313
LOC144438		0.000792719
SERTAD2	SERTA domain containing 2	0.000821057

Tableau 11: Top 30 des gènes les plus sous-exprimés dans le LF
 Classement selon la p-value (FDR, $p < 0,05$, t-test)

Symbole	Appellation gène	FDR p-value
PRKACA	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	4.78767e-005
SMARCC1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin	0.000103704
TMEM161A	transmembrane protein	0.00019211
MCM7	minichromosome maintenance complex component	0.000347047
NCAPG2	non-SMC condensin II complex, subunit G2	0.000347047
PAQR4	progesterin and adipoQ receptor family member IV	0.000347047
CCDC21		0.000347047
MRPL16	mitochondrial ribosomal protein L16	0.000347047
SSRP1	structure specific recognition protein 1	0.000347047
MCM3	minichromosome maintenance complex component	0.000384669
SLCO3A1	solute carrier organic anion transporter family, member 3A1	0.000415622
FAM105B		0.000452439
TMEM48	transmembrane protein 48	0.0004928
SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin	0.0004928
KIF22	kinesin family member 22	0.000531207
PRELID1	PRELI domain containing 1	0.000531207
AIMP2	aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 2	0.000555428
RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family	0.000620516
SOS1	son of sevenless homolog 1	0.000620516
PDS5A	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog A	0.000620516
EYA3	EYA transcriptional coactivator and phosphatase 3	0.000620516
MCAT	malonyl CoA:ACP acyltransferase	0.000620516
SOS1	son of sevenless homolog 1	0.000684534
ZNF70	zinc finger protein 70	0.000713107
L3MBTL2	l(3)mbt-like 2	0.000758313
HSBP1	heat shock factor binding protein 1	0.000758313
SYVN1	synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin	0.000793833
TUBB	tubulin, beta class I	0.000821057
CDCA4	cell division cycle associated 4	0.000821057
ADH5	alcohol dehydrogenase 5	0.000821057

b. Détermination des gènes cibles des miARNs d'intérêt

De façon à mettre en relation les miARNs jugés d'intérêt dans notre étude et les données du transcriptome, nous avons déterminé les gènes cibles des miR-26a et miR-29a. Le logiciel TargetScan permet d'obtenir une liste des potentiels gènes cibles pour chaque miARN. Le nombre de ces gènes cibles est de 185 et de 917, respectivement pour le miR-26a et le miR-29a.

L'ensemble des gènes cibles de nos 2 miARNs est croisé avec l'ensemble des 8663 gènes exprimés dans nos échantillons cellulaires de LF et de centrocytes. Pour le miR-26a, seulement 107 miRs sont exprimés hors du bruit de fond dans les échantillons soit 58% de la totalité de ses gènes cibles. En ce qui concerne le miR-29a, sur les 917 miRs cibles, 52% soit 481 gènes cibles sont exprimés hors du bruit de fond dans notre cohorte.

Parmi ces gènes cibles exprimés dans nos échantillons, on détermine par la suite le pourcentage de ceux qui sont dérégulés dans le LF en comparaison aux centrocytes. Pour cela, les listes des 107 gènes cibles exprimés du miR-26a et celle des 481 gènes cibles exprimés du miR-29a sont croisées avec la liste des 2344 gènes significativement dérégulés dans le LF (FDR, $p < 0,05$, t-test) grâce à un diagramme de Venn. Concernant le miR-26a, 28 soit 26% de ses gènes cibles exprimés sont dérégulés dans le LF. Concernant le miR-29a, 158 soit 33% de ses gènes cibles exprimés sont dérégulés dans le LF.

Tableau 12 : Nombre de cibles et leur expression globale pour les miR-26a, miR-29a et miRs représentatifs du cluster 17-92

miARN	Nombre de cibles (TargetScan6.2)	Nombre de cibles exprimées dans les échantillons	Nombre de cibles statistiquement dérégulées dans le LF (FRD, $p < 0.05$ t-test)
miR-26a	185	107 (58%)	28 / 107 (26%)
miR-29a	917	481 (55%)	158 / 481 (33%)
Représentants du cluster 17-92	1220	694 (57%)	187 / 694 (27%)

Dans notre cohorte, 7 des 15 miARNs que comprennent le cluster 17-92 et paralogues sont sous exprimés. Pour réduire le nombre de données à analyser, nous avons traité dans TargetScan un seul représentant pour chacun des clusters. Le miR choisi pour chacun correspond à celui ayant la plus forte dérégulation d'expression dans notre étude. Il s'agit du miR-17 pour le cluster 17-92, du miR-20b pour le cluster 106a-363 et du miR-93 pour le

cluster 106b-25. Ces 3 miRs ciblent 1220 gènes différents et parmi ceux-ci, seulement 187 gènes sont dérégulés dans le LF soit 27% de gènes cibles exprimés dans les échantillons de notre cohorte. L'ensemble de ces données est résumée dans le tableau 12.

Au total, on remarque que pour les 3 miARNs étudiés, le pourcentage de gènes cibles dérégulés dans le LF est similaire, environ 30%. Ainsi, environ 70% de gènes cibles sont non significativement dérégulés dans le LF, ceci pouvant être expliqué par les mécanismes complexes de régulation génique, ne dépendant pas d'un seul miARN.

En effet, un même gène peut être régulé par plusieurs miARNs différents. Un diagramme de Venn a été réalisé à partir de nos 3 listes d'ARNm cibles significativement dérégulés dans le LF totalisant 373 gènes. Cette représentation permet de mettre en évidence les gènes appartenant à plusieurs listes : Les miR-26a et miR-29a co-régulent 7 de ces gènes, les miR-26a et miRs représentants du cluster 17-92 en co-régulent 4, les miR-29a et miRs représentants du cluster 17-92 en co-régulent 38 (figure 21).

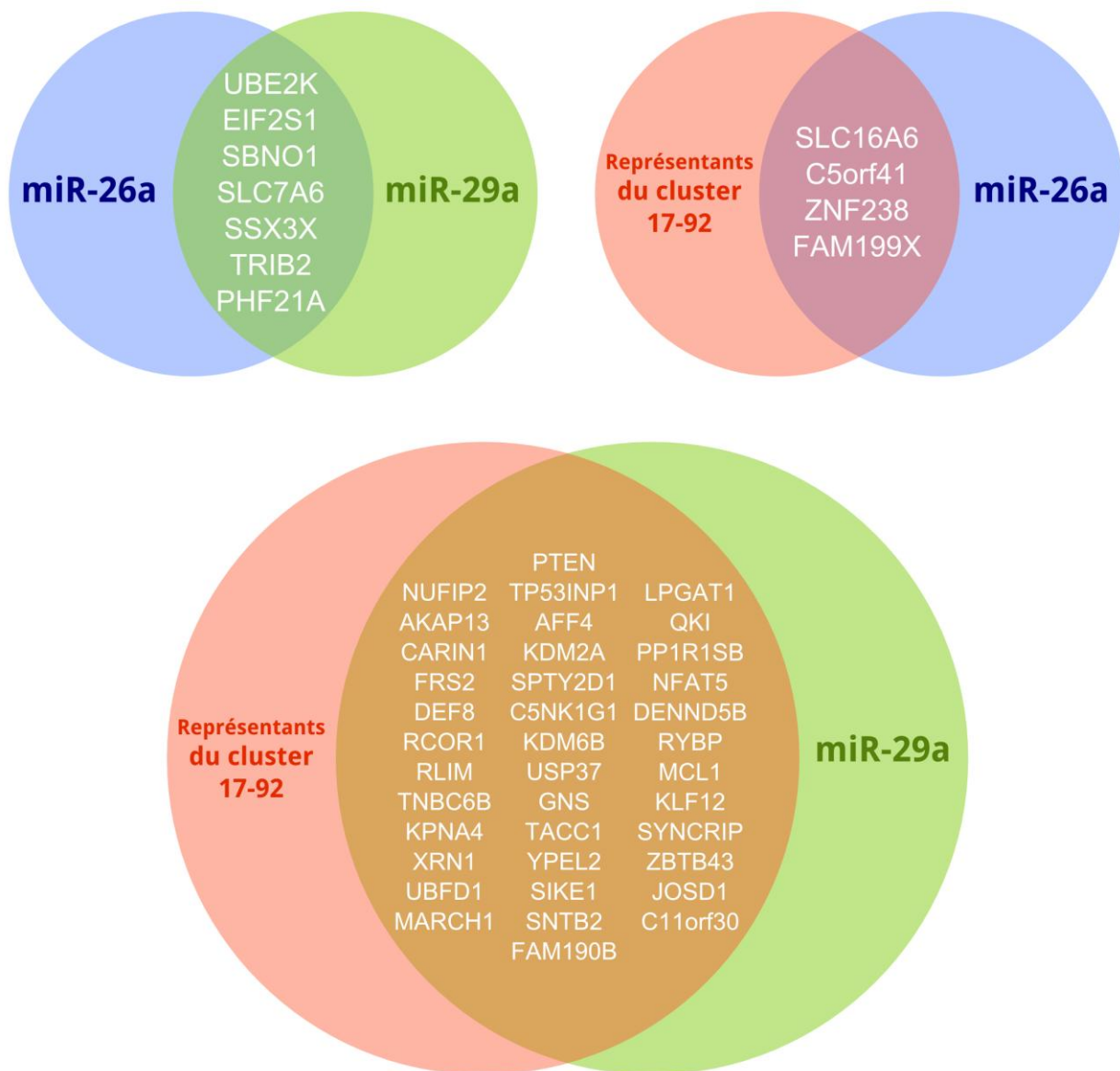


Figure 21 : Co-régulation des gènes cibles significativement dérégulés dans le LF par les miRs d'intérêt de notre étude

c. Intégration des miARNs/ ARNm cibles dans les voies physiopathologiques

Après identification des gènes cibles significativement dérégulés dans le LF pour nos miARNs d'intérêt, ceux-ci ont été analysés par le logiciel IPA. Le but de cette démarche est de mettre en évidence une ou plusieurs voies physiologiques représentées au sein de réseaux, impliquant plusieurs de ces gènes cibles, donc potentiellement dérégulée dans le LF. Ainsi, la liste des 373 gènes cibles dérégulés dans le LF a été traitée par le logiciel IPA. Les voies physiologiques intégrant les gènes cibles dérégulés de nos miARNs d'intérêt sont pour la majorité connue pour leurs rôles dans la survie et l'apoptose cellulaire. En effet, on

retrouve par exemple la voie NFκB ou encore la voie ERK/ MAPK (Extracellular signal-regulated kinase/ Mitogen activated protein kinase). En mettant les réseaux cellulaires proposés par le logiciel en parallèle, on constate qu'une voie cellulaire revient fréquemment : il s'agit de la voie PI3K/ AKT. C'est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaires. Cette voie, grâce à la PI3K, aboutit à l'activation par phosphorylation de la protéine AKT. La régulation de cette voie s'effectue à l'aide de PTEN, protéine intracytoplasmique à activité phosphatase. L'activation finale de la protéine kinase AKT est à l'origine de la phosphorylation de multiples effecteurs, ceux-ci ayant un effet positif sur la survie et la prolifération cellulaire. Parmi les voies cellulaires impactées par la voie PI3K/ AKT, on peut citer la voie NFκB, la voie mTOR, la voie p53 ou encore la voie d'activation des protéines C-JUN. La figure 22 schématise succinctement les acteurs de la voie PI3K/ AKT.

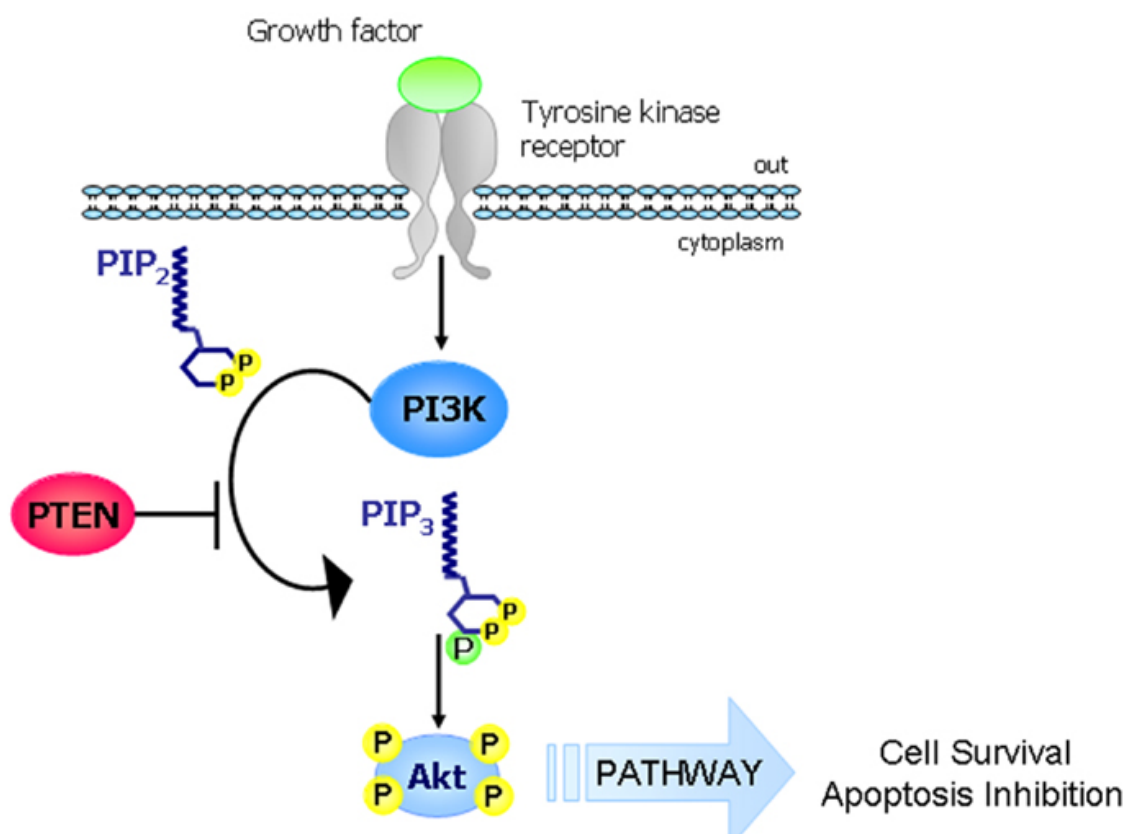


Figure 22 : Voie PI3K/ AKT

PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

La PI3K est activée lors de la reconnaissance d'une phosphotyrosine d'un récepteur à activité tyrosine kinase. La PI3 kinase convertit le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃). La présence d'un groupement phosphate en 3 sur l'inositide permet le recrutement et l'activation de la protéine kinase AKT. La phosphorylation en 3 de l'inositide par la PI3K est contrebalancée par une déphosphorylation assurée par une phosphatase, PTEN. Cette phosphatase assure la régulation négative de cette voie de signalisation.

Les données du transcriptome de notre cohorte montre que PTEN est significativement sous-exprimée dans le LF en comparaison aux centrocytes (Test Mann-Whitney, $p=0.0075$). D'après le diagramme de Venn qui croise les gènes cibles dérégulés dans le LF de nos 3 miARNs d'intérêt, PTEN est commun au cluster 17-92 et au miR-29a. Cette liste de gènes cibles est issue des prédictions du logiciel TargetScan. En utilisant un autre logiciel, miRTarBase, se basant cette fois-ci sur des données expérimentales et non prédictives, PTEN est une cible commune aux miR-26a, miR-29a et aux miRs du cluster 17-92. Il s'agirait donc d'une protéine cible commune à nos 3 miARNs d'intérêt, donc l'expression est significativement dérégulée dans le LF.

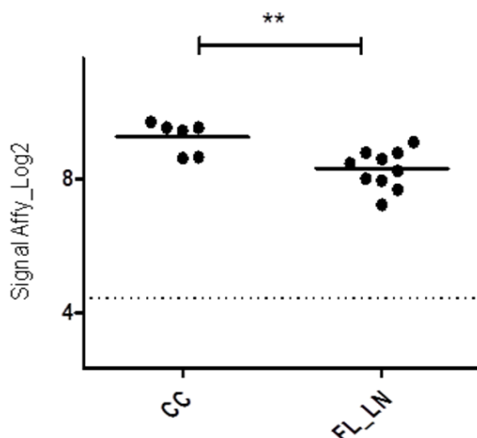


Figure 23 : Représentation de l'expression relative du gène PTEN dans les échantillons de LF et de CC par analyse du niveau d'expression de la PS 233314_at. (Mann-Whitney, $p=0.0075$).

PTEN semble une protéine clé dans notre étude :

- PTEN est significativement sous-exprimée dans le LF
- PTEN est une cible commune aux 3 miARNs les plus dérégulés de notre cohorte
- PTEN joue un rôle majeur dans le voie PI3K/ AKT réputée oncogène.

L'analyse spécifique de la régulation de cette voie par les miR-26, miR-29 et le cluster 17-92 dans le LF est une piste d'étude des mécanismes épigénétiques impliqués dans cette pathologie. Ces éléments devront être validés dans de futures approches fonctionnelles.

IV. **DISCUSSION**

A. *Validation technique de nos résultats*

Dans la pathogénicité du LF, le microenvironnement joue un rôle majeur. Les interactions des cellules tumorales avec celles du microenvironnement participent à la survie cellulaire. Les données actuelles sur le miRNome du LF reposent sur des analyses effectuées sur des cellules non triées. Les résultats font donc intervenir les données propres à la cellule tumorale mais aussi celles des cellules de l'environnement ganglionnaire. Nous avons choisi dans notre étude d'affiner les connaissances du miRNome de la cellule tumorale, indépendamment de l'influence du microenvironnement. Pour cela, les 6 échantillons de LF de notre cohorte ainsi que ceux de la population contrôle ont été hautement purifiés sur trieur cellulaire avec extraction des acides nucléiques et analyse.

Par ailleurs, les résultats des études publiées du miRNome dans le LF sont issus d'analyses non exhaustives des miARNs puisqu'ils ont été obtenus par des techniques de qRT-PCR ou de microarray dédiés représentant au maximum l'analyse d'environ 850 miARNs. Nous avons fait le choix d'analyser l'ensemble de nos échantillons par une technique de séquençage haut débit. Celle-ci présente l'avantage d'être très sensible et de fournir des données, en particulier quantitative, sur l'ensemble des miARNs exprimés par les cellules.

Enfin, les populations contrôles habituellement utilisées dans les études de la littérature sont des cellules totales de ganglions sains ou d'hyperplasies folliculaires. Dans notre étude, les cellules de la différenciation lymphocytaire B de ganglions sains ont été hautement purifiées à partir d'amygdales saines, permettant d'isoler spécifiquement les lymphocytes B naïfs, B mémoires, et les centroblastes, centrocytes, séparés sur le marqueur CXCR4. Par ailleurs, à partir des amygdales saines, nous avons accès à des cellules B du CG. Celles-ci ont été isolées grâce à des marqueurs phénotypiques communément décrits et également mis en œuvre pour isoler les populations tumorales B de LF. Deux populations servant de contrepartie normale pouvaient donc être utilisées dans notre cohorte : les cellules BGC ou plus précisément les centrocytes. Lors du passage dans le centre germinatif, le centroblaste devient un centrocyte, modifiant à la fois son profil miRNome et son transcriptome. Dans cette cohorte, 10% de la totalité des miARNs exprimés à la fois par les centroblastes et les centrocytes sont significativement différents entre les 2 populations. De la même manière, l'analyse statistique du transcriptome des centroblastes et centrocytes, montre que ces 2 entités sont bien différentes puisque 22% des gènes exprimés le sont différemment entre ces 2 populations. Ce travail apporte donc une information non publiée à ce jour sur le profil exhaustif du miRNome différenciant les centroblastes des centrocytes, cellules constituant le centre germinatif ganglionnaire.

La comparaison des données, tout d'abord du miRNome, mais aussi du transcriptome, entre les différentes populations B issues du CG d'amygdales saines nous montre que parmi la population BGC contenant des proportions variables de centroblastes et de centrocytes, ces 2 dernières entités présentent des signatures spécifiques clairement identifiées. Du fait de la proximité histologique, cytologique et phénotypique des cellules B tumorales du LF avec les centrocytes, et que ces dernières présentent bien un profil moléculaire spécifique, nous avons considéré qu'elles constituaient la meilleure contrepartie normale dans notre étude.

Notre étude, de part la technique d'analyse, le choix de la population contrôle, et la purification cellulaire de nos échantillons, présente une originalité et un intérêt majeur dans l'étude du profil miRNome du LF.

B. Profil de la différenciation lymphocytaire B ganglionnaire

Ce travail a permis en outre de caractériser le miRNome de chaque transition cellulaire lors de la lymphopoïèse tardive, du stade B naïf au stade B mémoire. Peu de données sont retrouvées dans la littérature, la majorité s'intéressant aux stades médullaires du développement lymphocytaire. Nos résultats permettent d'agrémenter les études sur le sujet. Nous avons donc confrontés nos profils avec ceux déjà décrits.

Tout d'abord, les miRNomes des cellules B naïves et mémoires sont très proches dans notre cohorte puisque seul le miR-138 est significativement différemment exprimé entre les 2 populations ($p < 0.01$). En diminuant la stringence du test de Student, avec $p < 0.05$, 13 miARNs sont retrouvés sur ou sous-exprimés. Les études de Malumbres *et al.*[87] et de Tan *et al.*[85] obtiennent par une technique de microarray pour l'un (FDR, t-test, $p < 0.05$) et par analyse de qRT-PCR pour l'autre des résultats montrant que les miR-146a et miR-24 sont sur-exprimés dans les cellules B mémoires, et les miR-181a et miR-181b, sous-exprimés, comme démontré dans notre travail, et validant ainsi notre approche. En revanche, le miR-138 de notre cohorte n'est retrouvé dans aucune autre, ceci peut être expliqué par le fait que les techniques d'analyse des études publiées n'intègrent pas ce miR dans leur analyse. Les cellules B naïves et les cellules B mémoires présentent une proximité de signature, probablement liée à leur état de quiescence, contrastant avec les lymphocytes B du CG soumis à des cycles de dynamiques de survie/ prolifération.

De plus, dans la comparaison des cellules B naïves avec les cellules BGC, les études de Tan *et al.*[85] Malumbres *et al.*[87] et la notre retrouvent certaines données similaires. Ainsi, sur les 6 miARNs décrits sous-exprimés, dans les BGC en comparaison aux B naïves, en PCR par Tan *et al.* 3 miARNs (miR-29, miR-150 et miR-223) sont retrouvés par l'équipe de Malumbres *et al.* et la notre tandis que les 3 autres miARNs (miR-320, miR-331, let-7a) sont soit non retrouvés dans notre travail (miR-320) soit leur sens de variation est contraire à celui décrit par Tan *et al.* à la fois dans notre étude et dans celle de Malumbres. De la même manière, sur les 10 miARNs décrits sur-exprimés dans les cellules BGC par rapport aux cellules B naïves par l'équipe de Tan, 8 miARNs sont retrouvés similaires dans notre travail et dans celui de Malumbres (miR-15b, miR-93, miR-25, miR-17-5p, miR-106a, miR-28, miR-130b, miR-146). Seuls les miR-181b et miR-145 ne sont pas retrouvés significativement exprimés différemment dans notre étude.

Ainsi, notre analyse est confortée par les données publiées, et apporte de nouvelles informations sur le miRNome des différentes populations cellulaires de la lymphopoïèse B ganglionnaire.

Cette étude confirme l'expression de la plupart des miARNs déjà décrits dans la littérature mais apporte également de plus amples données du fait de la technique d'analyse par séquençage que nous avons retenu. Ces profils seront à analyser plus précisément dans un futur travail puisqu'ils ne font pas l'objet du cœur de notre étude.

1. Signature miARNs du LF

Dans ce travail, nous avons donc caractérisé le profil d'expression des miARNs différenciant le LF des centrocytes. Celui-ci comprend 49 miARNs soit 4,3% de la totalité des miARNs exprimés par ces cellules. Plus de 80% de ces 49 miARNs sont sous-exprimés dans le LF, en rapport avec ce qui est décrit dans la littérature dans les cancers ou les hémopathies où la majorité des miARNs sont sous exprimés, à l'origine ou en conséquence d'une sur-expression de gènes d'intérêt dans la cellule tumorale. Ceci suggère que la diminution d'expression des miARNs correspond à un état pré-tumoral contribuant à l'acquisition d'un phénotype malin.

Compte tenu du nombre de miARNs constituant ce profil et de la difficulté de leur étude, nous avons focalisé l'analyse sur les miARNs les plus sur-exprimés et les plus sous-exprimés dans le LF. Parmi les 49 miARNs significativement dérégulés dans le LF, les membres de la famille des miR-26, miR-29 et les membres du cluster 17-92 ou de l'un de ses paralogues sont les plus différentiellement exprimés dans la tumeur. En effet, plus de 70% des miARNs significativement sur-exprimés dans le LF appartiennent aux familles des miR-26 et 29 et plus de 20% des miARNs significativement sous-exprimés dans le LF appartiennent au cluster 17-92.

En réalisant une revue de la littérature, nous avons cherché à savoir si notre profil coïncidait avec ceux déjà publiés. Cependant, la comparaison de nos résultats avec ceux d'autres études doit prendre en compte les différences de méthodologie. L'étude Wang *et al.* [92] retrouve 134 miARNs significativement dérégulés dans le LF en comparaison aux hyperplasies folliculaires sur les 851 miARNs analysés (soit 16%), la plupart étant sous-exprimés dans la tumeur (66%). Malgré un nombre de miARNs analysés plus important dans notre cohorte, nous retrouvons un pourcentage plus faible (4,3%) de miARNs dérégulés, ceux-ci étant également très majoritairement sous-exprimés dans les cellules de LF (86%). Nos données et celles de Wang *et al.* ont seulement 9 miARNs en commun dont le miR-26a et les membres du cluster 17-92 : miR-17-5p, miR-18b, miR-106, miR-20a, miR-20b, miR-363. Cependant, contrairement à nos résultats, le miR-26a est sous-exprimé dans les LF de la cohorte de Wang *et al.* Il est toutefois intéressant de remarquer que le miR-26b de la même famille est lui très sur-exprimé dans les LF de cette cohorte publiée. De la même manière, nos résultats divergent sur 2 miARNs du cluster 17-92 : les miR-20a et miR-20b. En effet, ceux-ci sont sur-exprimés dans les échantillons de LF de la cohorte de Wang, les autres membres du cluster variant dans le même sens que les notres. La comparaison de

nos résultats avec d'autres équipes tel que celles de Roehle *et al.* [93] et celles de Lawrie *et al.* [94] est plus difficile puisque celles-ci comparent à la fois les LF, les DLBCL et les ganglions normaux, les résultats tumoraux correspondant à la fois à ceux du LF mais aussi à ceux de sa transformation en lymphome de haut grade.

On constate donc des différences dans les profils mis en évidence par les équipes, mais celles-ci ne peuvent être interprétées compte tenu des variations dans la méthodologie, du très faible nombre d'études sur le miRNome du LF, ou encore du nombre restreint d'échantillons dans notre étude limitant peut être l'analyse de l'hétérogénéité potentielle dans cette pathologie.

2. miARNs oncogènes ou suppresseurs de tumeurs ?

a. Famille des miRs-29

Les 3 membres de cette famille, miR-29a, miR-29b et miR-29c, ont souvent une expression altérée dans divers types de cancers, aussi bien solides qu'hématopoïétiques. Ils sont décrits à la fois comme oncogènes ou suppresseurs de tumeurs selon les processus pathologiques. Ainsi, miR-29 prend part à la régulation du cycle cellulaire, en partie sur le versant prolifératif, et au processus de différenciation cellulaire, notamment myéloïde. Les miRs-29 sont sous-exprimés dans de nombreux cancers solides comme le cancer du sein [101] ou de la prostate [102]. La majorité des publications décrit donc les miRs-29 comme des suppresseurs de tumeurs. Leurs rôles dans les maladies hématologiques est en revanche peu connu [103] mais il a été montré que les miRs-29 sont sous-exprimés dans les LAM [104] ainsi que dans les LLC en particulier dans les LLC agressives [98]. Nos résultats font partie des premiers à retrouver les miR-29 sur-exprimés dans une pathologie cancéreuse. Il a toutefois déjà été publié que les miARNs peuvent avoir une fonction différente en fonction du tissu qui l'exprime et avoir ainsi un rôle contraire selon les cancers concernés. Nos résultats sont les premiers à décrire les miR-29 dans un LNH de type LF, il s'agit là d'une signature originale du LF.

b. Familles des miRs-26

Les 3 membres de cette famille, miR-26a-1, miR-26a-2 et miR-26b ont également une expression perturbée dans les cancers. Les miRs-26 sont peu étudiés à ce jour, et leur rôle est controversé selon les cancers étudiés. Ils sont qualifiés d'oncogènes dans les gliomes et les LAL-T, et de suppresseurs de tumeurs dans les cancers hépatiques, du sein ou dans le lymphome de Burkitt [105] [106]. Une étude du précurseur mir-26 dans le cancer pulmonaire retrouve son expression inversement corrélée avec celle de PTEN associée à une augmentation d'activité des voies PI3K/AKT et NFκB potentialisant la survenue de

métastases [107]. Comme précédemment, nos résultats décrivent pour la première fois l'implication des miRs-26 dans la lymphomagenèse du LF lui conférant un rôle oncogène.

c. Cluster 17-92 et paralogues

Le cluster 17-92 est l'un des miARNs les plus étudiés et son rôle oncogène est largement démontré notamment dans les pathologies hématologiques. En effet, les miARNs appartenant au cluster sont retrouvés sur-exprimés dans les lymphomes non hodgkiniens tels que le lymphome du manteau, mais également dans le DLBCL, les LAL et la LMC [108]. Il est étonnant de décrire dans notre étude une sous-expression de l'ensemble des membres de ce cluster. L'équipe de Olive *et al.* a montré que l'activité du miR-19 est nécessaire et suffisante à elle seule au développement des lymphomes B par activation de la voie PI3K via l'inhibition de sa cible PTEN. Selon cet auteur, le potentiel oncogénique du cluster peut être caractérisé par le ratio du miR-19/ miR-92. Plus le miR-19 est exprimé, plus ce ratio est fort, et plus le potentiel oncogène est important. Dans notre étude, les miR-19 et miR-92 ne sont pas significativement déregulés dans le LF par rapport aux centrocytes. Nous avons tout de même établi le ratio d'expression de ces 2 miARNs qui est en faveur du miR-92 c'est-à-dire que celui-ci a une expression plus forte dans le LF. L'analyse de ce ratio dans notre petite cohorte de LF ne confirme pas cette hypothèse comme un mécanisme général dans les lymphopathies B.

1. Intégration aux données du transcriptome

Pour comprendre le rôle de ces 3 familles de miARNs sur le plan fonctionnel, nous avons établi sur les mêmes échantillons de la cohorte du miRNome le profil transcriptomique. Celui-ci a été comparé entre les échantillons de LF et ceux de centrocytes et 27% des gènes sont exprimés significativement différemment entre les 2 populations. Parmi ces gènes dérégulés, la majorité va dans le sens d'une sur-expression dans le LF. Pour établir le lien entre les 3 miARNs d'intérêt et les données du transcriptome, nous avons comparé les listes de gènes cibles des miARNs avec celle des gènes significativement dérégulés dans le LF. On retrouve environ 30% des gènes cibles des 3 miARNs dérégulés dans le LF. Pour affiner notre étude, nous avons croisés ces gènes cibles dérégulés entre eux pour mettre en évidence un gène cible commun aux 3 miARNs. La protéine PTEN est une cible commune aux miR-26, miR-29 et au cluster 17-92.

De plus, après intégration des 3 miARNs ainsi que l'ensemble de leurs gènes cibles dérégulés dans le LF dans le logiciel IPA, celui-ci propose des voies physiologiques pouvant être altérées dans la maladie. Parmi les voies proposées, l'une d'entre elle semble pertinente, il s'agit de la voie PI3K/AKT.

2. Voie PI3K/AKT

La voie physiologique PI3K/ AKT régule la prolifération cellulaire, la survie et donc la croissance tumorale. A ce jour, il est clair que la voie PI3K/ AKT est impliquée dans la pathogénèse du LF. En effet, l'action de molécules inhibitrices de cette voie induit l'apoptose des cellules tumorales et la régression de la masse tumorale [109]. De nombreuses molécules altérant cette voie sont en cours d'étude comme traitement des pathologies lymphoïdes [110]. L'activation de la voie commence par celle de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) par les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase qui induit l'augmentation d'expression de la phosphatidyl 3,4,5-triphosphate (PIP3) à partir de la phosphatidyl 4,5-biphosphate (PIP2). La PIP3 va recruter et participer à la phosphorylation des protéines de la voie AKT notamment la 3-phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK1) et les protéines des complexes mTor 1 et 2. La protéine kinase PI3K est régulée négativement par l'activité phosphatase de la protéine PTEN. Celle-ci inhibe donc la survie cellulaire et est donc considérée comme un suppresseur de tumeur. Il a été décrit dans de nombreux cancers une activation anormale de la voie PI3K/AKT. Cette dérégulation peut résulter de mutations ou d'amplifications survenant sur le gène PI3K aboutissant à son

activation constitutive. Elle peut également être due à une perte d'expression de PTEN. Des modifications géniques type mutations ou délétions de *PTEN* sont les plus souvent étudiées dans les cancers. Cependant ces anomalies ne sont pas toujours retrouvées et n'expliquent donc pas tous les mécanismes responsables de la dérégulation de cette voie. Les altérations d'expression de PTEN peuvent en effet survenir à d'autres niveaux : par une régulation transcriptionnelle épigénétique avec hyperméthylation de son promoteur, par une régulation post-transcriptionnelle sous l'influence des miARNs ou enfin par modification de sa conformation ou de sa stabilité lors des interactions protéiques. Dans le cas du LF, Yahiaoui *et al.* [111] montre l'absence de mutation du gène PI3K dans les 38 échantillons de LF étudiés malgré une augmentation d'expression des protéines actives de la voie AKT. La littérature rapporte une faible fréquence des altérations géniques de PTEN dans les LNHS (5 à 10%) dont les LF [112], apportant une preuve que sa dérégulation survient à une autre étape.

Dans notre cohorte, PTEN est bien retrouvé sous-exprimée dans le LF tandis que 2 de ses miARNs régulateurs sont les plus sur-exprimés de notre cohorte. Ce travail pose l'hypothèse que le miR-26 et le miR-29 participent à l'activation de la voie PI3K/ AKT par répression de PTEN, favorisant ainsi la survie cellulaire. Ainsi, puisque PTEN joue un rôle de suppresseur de tumeur, les miR-26 et miR-29 auraient donc une fonction oncogène dans le LF. A l'inverse, dans le LF, le cluster 17-92 tend à favoriser l'action de PTEN par diminution de sa régulation négative sur son ARNm, et joue donc un rôle suppresseur de tumeur. Il est intéressant de noter que l'évolution du miRNome lors de la transformation du LF en lymphome de haut grade est caractérisée par une augmentation d'expression de l'ensemble du cluster 17-92, devenant alors oncogène [113].

3. Rôles des miR-26, miR-29 et miR-17-92 dans la lymphomagénèse du LF

Dans la pathogénèse du LF, la translocation t(14;18) est considérée comme un évènement initial mais non suffisant au développement de la maladie. Une succession d'altérations supplémentaires sont nécessaires à la tumorigénèse. L'équipe d'Okosun *et al.* [34] a mise en évidence des anomalies géniques acquises précocement dans le développement tumoral et d'autres plus tardivement. Les altérations précoces interviennent principalement sur les processus régulateurs de la condensation de la chromatine comme les gènes *CREBBP*, *EZH2* ou *STAT6*. En revanche, lors de la progression de la maladie, les altérations surviennent principalement sur les gènes impliqués dans la voie NFκB tels qu'*EBF1*, *TNFAIP3*, *CARD11*. Ainsi, la dérégulation des voies physiologiques impliquées dans la prolifération cellulaire ou l'apoptose semble faire partie des anomalies acquises tardivement. Les gènes appartenant à la voie PI3K/ AKT ne faisaient pas partie de l'étude d'Okosun *et al.* Cependant, il est à noter que la voie NFκB est en relation avec la voie PI3K/

AKT puisque l'activation d'AKT favorise l'activation de protéines de la voie NFκB. On peut donc faire l'hypothèse que les anomalies induites par les miARNs ne surviennent pas lors des étapes précoces du processus tumoral mais qu'elles pourraient être acquises lors de l'évolution de la maladie.

v. Conclusion et perspectives

Le lymphome folliculaire est caractérisé dans la très grande majorité des cas par la translocation t(14;18), considérée comme l'évènement initiateur de la pathogénèse du lymphome. Cette anomalie n'est cependant pas suffisante au développement tumoral qui résulte de l'acquisition d'une succession d'autres altérations géniques et moléculaires, favorisant la survie du clone tumoral. Les voies physiologiques régulant la prolifération et l'apoptose cellulaire sont souvent impliquées dans la lymphomagénèse par des mécanismes pas toujours élucidés.

La découverte des miARNs, régulateurs post transcriptionnel de l'expression génique, et leurs rôles démontrés dans les cancers, a ouvert une nouvelle voie d'étude.

Ce travail a porté sur l'analyse de l'expression des miARNs sur des échantillons de LF en comparaison à leur contrepartie normale, les centrocytes. Il s'agit de la toute 1^{ère} caractérisation du miRNome du LF par une technique de séquençage, à partir d'échantillons hautement purifiés.

Trois familles de miARNs se distinguent du profil du LF, par l'importance de leur dérégulation et par leur originalité. Il s'agit des miR-26, miR-29, sur-exprimés par les échantillons de LF et des membres du cluster 17-92, sous-exprimés.

L'intégration de ces 3 miARNs au transcriptome, obtenu sur les même échantillons de la cohorte, montre qu'environ 30% de leurs gènes cibles sont significativement dérégulés dans le LF. La protéine PTEN est une cible commune aux miR-26, miR-29 et miR-17-92, décrite comme suppressive de tumeur dans de nombreux cancers. La sur-expression des miR-26 et miR-29 augmente la répression de leurs cibles d'où la sous-expression de PTEN observée dans les échantillons de LF. Le cluster 17-92, sous-exprimé dans le LF, joue donc un rôle contraire sur PTEN, mais ne semble pas suffisant pour maintenir son niveau d'expression physiologique. La protéine PTEN est un antagoniste de la voie PI3K/ AKT, sa sous-expression dans le LF entrainerait une diminution de la répression de cette voie, favorisant la survie des cellules tumorales.

La dérégulation des miARNs pourrait faire partie des anomalies acquises tardivement lors de la lymphomagénèse du LF. Les miR-26 et miR-29 stimulent la voie PI3K/ AKT par l'inhibition de PTEN, favorisant l'action de cette voie sur la survie de la tumeur et entraînant l'activation d'autres voies telles que la voie NFκB, elles mêmes essentiels à la prolifération et à la survie cellulaire.

A court terme, des analyses fonctionnelles sur des lignées cellulaires représentatives du LF sont prévues. Cette perspective a pour but d'analyser l'impact des miARNs d'intérêt sur la fonctionnalité de PTEN. Par exemple, l'utilisation d'antagonistes de miARNs, appelés antagomiRs, permettra d'apprécier les conséquences d'une diminution d'expression des miR-26 et miR-29 sur la survie des lignées cellulaires.

Une validation de ces résultats sur une cohorte indépendante de LF doit également être envisagée.

VI. **Bibliographie**

- [1] T. Kurosaki, « B-lymphocyte biology », *Immunol. Rev.*, vol. 237, n° 1, p. 5-9, sept. 2010.
- [2] T. W. LeBien et T. F. Tedder, « B lymphocytes: how they develop and function », *Blood*, vol. 112, n° 5, p. 1570-1580, sept. 2008.
- [3] M. Muramatsu, K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, et T. Honjo, « Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme », *Cell*, vol. 102, n° 5, p. 553-563, sept. 2000.
- [4] C. D. C. Allen, T. Okada, et J. G. Cyster, « Germinal-center organization and cellular dynamics », *Immunity*, vol. 27, n° 2, p. 190-202, août 2007.
- [5] S. G. Tangye et D. M. Tarlinton, « Memory B cells: effectors of long-lived immune responses », *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, n° 8, p. 2065-2075, août 2009.
- [6] S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffre, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, et J. W. Vardiman, *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. .
- [7] « A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project », *Blood*, vol. 89, n° 11, p. 3909-3918, juin 1997.
- [8] A. Monnereau, X. Troussard, A. Belot, A.-V. Guizard, A.-S. Woronoff, S. Bara, B. Lapôtre-Ledoux, J. Iwaz, B. Tretarre, M. Maynadié, et French Network of Cancer Registries (FRANCIM), « Unbiased estimates of long-term net survival of hematological malignancy patients detailed by major subtypes in France », *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, vol. 132, n° 10, p. 2378-2387, mai 2013.
- [9] M. Sant, C. Allemani, C. Tereanu, R. De Angelis, R. Capocaccia, O. Visser, R. Marcos-Gragera, M. Maynadié, A. Simonetti, J.-M. Lutz, F. Berrino, et HAEMACARE Working Group, « Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project », *Blood*, vol. 116, n° 19, p. 3724-3734, nov. 2010.
- [10] D. D. Alexander, P. J. Mink, H.-O. Adami, E. T. Chang, P. Cole, J. S. Mandel, et D. Trichopoulos, « The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature », *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, vol. 120 Suppl 12, p. 1-39, 2007.
- [11] P. Solal-Céligny, P. Roy, P. Colombat, J. White, J. O. Armitage, R. Arranz-Saez, W. Y. Au, M. Bellei, P. Brice, D. Caballero, B. Coiffier, E. Conde-Garcia, C. Doyen, M. Federico, R. I. Fisher, J. F. Garcia-Conde, C. Guglielmi, A. Hagenbeek, C. Haioun, M. LeBlanc, A. T. Lister, A. Lopez-Guillermo, P. McLaughlin, N. Milpied, P. Morel, N. Mounier, S. J. Proctor, A. Rohatiner, P. Smith, P. Soubeyran, H. Tilly, U. Vitolo, P.-L. Zinzani, E. Zucca, et E. Montserrat, « Follicular lymphoma international prognostic index », *Blood*, vol. 104, n° 5, p. 1258-1265, sept. 2004.
- [12] « National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project », *Cancer*, vol. 49, n° 10, p. 2112-2135, mai 1982.
- [13] H. Horn, C. Schmelter, E. Leich, I. Salaverria, T. Katzenberger, M. M. Ott, J. Kalla, M. Romero, R. Siebert, A. Rosenwald, et G. Ott, « Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles », *Haematologica*, vol. 96, n° 9, p. 1327-1334, sept. 2011.
- [14] I. S. Lossos et R. D. Gascoyne, « Transformation of follicular lymphoma », *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 24, n° 2, p. 147-163, juin 2011.
- [15] S. Montoto et J. Fitzgibbon, « Transformation of indolent B-cell lymphomas », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 29, n° 14, p. 1827-1834, mai 2011.
- [16] A. J. Al-Tourah, K. K. Gill, M. Chhanabhai, P. J. Hoskins, R. J. Klasa, K. J. Savage, L. H. Sehn, T. N. Shenkier, R. D. Gascoyne, et J. M. Connors, « Population-based analysis

- of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 26, n° 32, p. 5165-5169, nov. 2008.
- [17] P. Solal-Celigny, « Prognosis of follicular lymphomas », *Clin. Lymphoma*, vol. 6, n° 1, p. 21-25, juin 2005.
- [18] M. Federico, M. Bellei, L. Marcheselli, S. Luminari, A. Lopez-Guillermo, U. Vitolo, B. Pro, S. Pileri, A. Pulsoni, P. Soubeyran, S. Cortelazzo, G. Martinelli, M. Martelli, L. Rigacci, L. Arcaini, F. Di Raimondo, F. Merli, E. Sabattini, P. McLaughlin, et P. Solal-Céligny, « Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 27, n° 27, p. 4555-4562, sept. 2009.
- [19] D. E. Horsman, J. M. Connors, T. Pantzar, et R. D. Gascoyne, « Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18) », *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 30, n° 4, p. 375-382, avr. 2001.
- [20] H. Husson, E. G. Carideo, D. Neuberg, J. Schultze, O. Munoz, P. W. Marks, J. W. Donovan, A. C. Chillemi, P. O'Connell, et A. S. Freedman, « Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays », *Blood*, vol. 99, n° 1, p. 282-289, janv. 2002.
- [21] Y. Bastion, C. Sebban, F. Berger, P. Felman, G. Salles, C. Dumontet, P. A. Bryon, et B. Coiffier, « Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 15, n° 4, p. 1587-1594, avr. 1997.
- [22] E. Giné, S. Montoto, F. Bosch, L. Arenillas, S. Mercadal, N. Villamor, A. Martínez, L. Colomo, E. Campo, E. Montserrat, et A. López-Guillermo, « The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) and the histological subtype are the most important factors to predict histological transformation in follicular lymphoma », *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO*, vol. 17, n° 10, p. 1539-1545, oct. 2006.
- [23] M. Ghilmini, U. Vitolo, E. Kimby, S. Montoto, J. Walewski, M. Pfreundschuh, M. Federico, P. Hoskin, C. McNamara, F. Caligaris-Cappio, S. Stilgenbauer, R. Marcus, M. Trneny, P. Dreger, E. Montserrat, M. Dreyling, et Panel Members of the 1st ESMO Consensus Conference on Malignant Lymphoma, « ESMO Guidelines consensus conference on malignant lymphoma 2011 part 1: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) », *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO*, vol. 24, n° 3, p. 561-576, mars 2013.
- [24] L. M. Leoni, B. Bailey, C. C. Niemeyer, J. Reifert, H. Bendall, L. Dauffenbach, et C. Kerfoot, « In vitro and ex vivo activity of SDX-105 (bendamustine) in drug-resistant lymphoma cells », *AACR Meet. Abstr.*, vol. 2004, n° 1, p. 278-b, mars 2004.
- [25] B. D. Cheson, « New agents in follicular lymphoma », *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 24, n° 2, p. 305-312, juin 2011.
- [26] R. J. Bende, L. A. Smit, et C. J. M. van Noesel, « Molecular pathways in follicular lymphoma », *Leukemia*, vol. 21, n° 1, p. 18-29, janv. 2007.
- [27] F. Jardin, P. Gaulard, G. Buchonnet, N. Contentin, S. Leprêtre, P. Lenain, A. Stamatoullas, J. M. Picquenot, C. Duval, F. Parmentier, H. Tilly, et C. Bastard, « Follicular lymphoma without t(14;18) and with BCL-6 rearrangement: a lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics », *Leukemia*, vol. 16, n° 11, p. 2309-2317, nov. 2002.
- [28] F. Jardin, P. Ruminy, C. Bastard, et H. Tilly, « The BCL6 proto-oncogene: a leading role during germinal center development and lymphomagenesis », *Pathol. Biol. (Paris)*, vol. 55, n° 1, p. 73-83, févr. 2007.
- [29] R. Kridel, L. H. Sehn, et R. D. Gascoyne, « Pathogenesis of follicular lymphoma », *J. Clin. Invest.*, vol. 122, n° 10, p. 3424-3431, oct. 2012.

- [30] J. Limpens, D. de Jong, J. H. van Krieken, C. G. Price, B. D. Young, G. J. van Ommen, et P. M. Kluin, « Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia », *Oncogene*, vol. 6, n° 12, p. 2271-2276, déc. 1991.
- [31] S. Roulland, J.-M. Navarro, P. Grenot, M. Milili, J. Agopian, B. Montpellier, P. Gauduchon, P. Lebailly, C. Schiff, et B. Nadel, « Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis », *J. Exp. Med.*, vol. 203, n° 11, p. 2425-2431, oct. 2006.
- [32] F. Mourcin, C. Pangault, R. Amin-Ali, P. Amé-Thomas, et K. Tarte, « Stromal cell contribution to human follicular lymphoma pathogenesis », *Front. Immunol.*, vol. 3, p. 280, 2012.
- [33] L. Pasqualucci, G. Bhagat, M. Jankovic, M. Compagno, P. Smith, M. Muramatsu, T. Honjo, H. C. Morse 3rd, M. C. Nussenzweig, et R. Dalla-Favera, « AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis », *Nat. Genet.*, vol. 40, n° 1, p. 108-112, janv. 2008.
- [34] J. Okosun, C. Bödör, J. Wang, S. Araf, C.-Y. Yang, C. Pan, S. Boller, D. Cittaro, M. Bozek, S. Iqbal, J. Matthews, D. Wrench, J. Marzec, K. Tawana, N. Popov, C. O’Riain, D. O’Shea, E. Carlotti, A. Davies, C. H. Lawrie, A. Matolcsy, M. Calaminici, A. Norton, R. J. Byers, C. Mein, E. Stupka, T. A. Lister, G. Lenz, S. Montoto, J. G. Gribben, Y. Fan, R. Grosschedl, C. Chelala, et J. Fitzgibbon, « Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma », *Nat. Genet.*, vol. 46, n° 2, p. 176-181, févr. 2014.
- [35] H. Rajnai, C. Bödör, Z. Balogh, E. Gagyai, J. Csomor, T. Krenács, E. Tóth, et A. Matolcsy, « Impact of the reactive microenvironment on the bone marrow involvement of follicular lymphoma », *Histopathology*, vol. 60, n° 6B, p. E66-75, mai 2012.
- [36] A. M. Glas, M. J. Kersten, L. J. M. J. Delahaye, A. T. Witteveen, R. E. Kibbelaar, A. Velds, L. F. A. Wessels, P. Joosten, R. M. Kerkhoven, R. Bernards, J. H. J. M. van Krieken, P. M. Kluin, L. J. van’t Veer, et D. de Jong, « Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment », *Blood*, vol. 105, n° 1, p. 301-307, janv. 2005.
- [37] S. S. Dave, G. Wright, B. Tan, A. Rosenwald, R. D. Gascoyne, W. C. Chan, R. I. Fisher, R. M. Braziel, L. M. Rimsza, T. M. Grogan, T. P. Miller, M. LeBlanc, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. C. Lynch, J. Vose, J. O. Armitage, E. B. Smeland, S. Kvaloy, H. Holte, J. Delabie, J. M. Connors, P. M. Lansdorp, Q. Ouyang, T. A. Lister, A. J. Davies, A. J. Norton, H. K. Muller-Hermelink, G. Ott, E. Campo, E. Montserrat, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, R. Simon, L. Yang, J. Powell, H. Zhao, N. Goldschmidt, M. Chiorazzi, et L. M. Staudt, « Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells », *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, n° 21, p. 2159-2169, nov. 2004.
- [38] V. Ambros, « A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans* », *Cell*, vol. 57, n° 1, p. 49-57, avr. 1989.
- [39] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, et V. Ambros, « The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* », *Cell*, vol. 75, n° 5, p. 843-854, déc. 1993.
- [40] T. Zhao, G. Li, S. Mi, S. Li, G. J. Hannon, X.-J. Wang, et Y. Qi, « A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* », *Genes Dev.*, vol. 21, n° 10, p. 1190-1203, mai 2007.
- [41] A. M. Monteys, R. M. Spengler, J. Wan, L. Tecedor, K. A. Lennox, Y. Xing, et B. L. Davidson, « Structure and activity of putative intronic miRNA promoters », *RNA*, vol. 16, n° 3, p. 495-505, mars 2010.
- [42] L. P. Lim, N. C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J. M. Schelter, J. Castle, D. P. Bartel, P. S. Linsley, et J. M. Johnson, « Microarray analysis shows that some

- microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs », *Nature*, vol. 433, n° 7027, p. 769-773, févr. 2005.
- [43] A. Ota, H. Tagawa, S. Karnan, S. Tsuzuki, A. Karpas, S. Kira, Y. Yoshida, et M. Seto, « Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma », *Cancer Res.*, vol. 64, n° 9, p. 3087-3095, mai 2004.
- [44] A. Ventura, A. G. Young, M. M. Winslow, L. Lintault, A. Meissner, S. J. Erkeland, J. Newman, R. T. Bronson, D. Crowley, J. R. Stone, R. Jaenisch, P. A. Sharp, et T. Jacks, « Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters », *Cell*, vol. 132, n° 5, p. 875-886, mars 2008.
- [45] J. T. Mendell, « miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease », *Cell*, vol. 133, n° 2, p. 217-222, avr. 2008.
- [46] Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Rådmark, S. Kim, et V. N. Kim, « The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing », *Nature*, vol. 425, n° 6956, p. 415-419, sept. 2003.
- [47] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, et S. Diederichs, « Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation », *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, n° 3, p. 228-234, mars 2009.
- [48] D. P. Bartel, « MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function », *Cell*, vol. 116, n° 2, p. 281-297, janv. 2004.
- [49] A. Esquela-Kerscher et F. J. Slack, « Oncomirs - microRNAs with a role in cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, n° 4, p. 259-269, avr. 2006.
- [50] B. P. Lewis, I. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, et C. B. Burge, « Prediction of mammalian microRNA targets », *Cell*, vol. 115, n° 7, p. 787-798, déc. 2003.
- [51] A. Eulalio, E. Huntzinger, et E. Izaurralde, « Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing », *Cell*, vol. 132, n° 1, p. 9-14, janv. 2008.
- [52] A. Aravin et T. Tuschl, « Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing », *FEBS Lett.*, vol. 579, n° 26, p. 5830-5840, oct. 2005.
- [53] J. M. Friedman et P. A. Jones, « MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease », *Swiss Med. Wkly.*, vol. 139, n° 33-34, p. 466-472, août 2009.
- [54] P. Landgraf, M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A. O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N. D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foà, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R.-U. Müller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D. B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H.-I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C. E. Rogler, J. W. Nagle, J. Ju, F. N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M. J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J. J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, et T. Tuschl, « A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing », *Cell*, vol. 129, n° 7, p. 1401-1414, juin 2007.
- [55] E. Bernstein, S. Y. Kim, M. A. Carmell, E. P. Murchison, H. Alcorn, M. Z. Li, A. A. Mills, S. J. Elledge, K. V. Anderson, et G. J. Hannon, « Dicer is essential for mouse development », *Nat. Genet.*, vol. 35, n° 3, p. 215-217, nov. 2003.
- [56] B. S. Cobb, A. Hertweck, J. Smith, E. O'Connor, D. Graf, T. Cook, S. T. Smale, S. Sakaguchi, F. J. Livesey, A. G. Fisher, et M. Merkenschlager, « A role for Dicer in immune regulation », *J. Exp. Med.*, vol. 203, n° 11, p. 2519-2527, oct. 2006.
- [57] S. B. Koralov, S. A. Muljo, G. R. Galler, A. Krek, T. Chakraborty, C. Kanellopoulou, K. Jensen, B. S. Cobb, M. Merkenschlager, N. Rajewsky, et K. Rajewsky, « Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage », *Cell*, vol. 132, n° 5, p. 860-874, mars 2008.

- [58] Y. Wang, R. Medvid, C. Melton, R. Jaenisch, et R. Blelloch, « DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal », *Nat. Genet.*, vol. 39, n° 3, p. 380-385, mars 2007.
- [59] M. Malumbres, « miRNAs and cancer: an epigenetics view », *Mol. Aspects Med.*, vol. 34, n° 4, p. 863-874, août 2013.
- [60] S. Griffiths-Jones, « miRBase: the microRNA sequence database », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 342, p. 129-138, 2006.
- [61] M. V. Iorio, C. Piovano, et C. M. Croce, « Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1799, n° 10-12, p. 694-701, déc. 2010.
- [62] L. Zhang, J. Huang, N. Yang, J. Greshock, M. S. Megraw, A. Giannakakis, S. Liang, T. L. Naylor, A. Barchetti, M. R. Ward, G. Yao, A. Medina, A. O'Brien-Jenkins, D. Katsaros, A. Hatzigeorgiou, P. A. Gimotty, B. L. Weber, et G. Coukos, « microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, n° 24, p. 9136-9141, juin 2006.
- [63] T. Kunej, I. Godnic, J. Ferdin, S. Horvat, P. Dovc, et G. A. Calin, « Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature », *Mutat. Res.*, vol. 717, n° 1-2, p. 77-84, déc. 2011.
- [64] X. Agirre, A. Vilas-Zornoza, A. Jiménez-Velasco, J. I. Martín-Subero, L. Cordeu, L. Gárate, E. San José-Eneriz, G. Abizanda, P. Rodríguez-Otero, P. Fortes, J. Rifón, E. Bandrés, M. J. Calasanz, V. Martín, A. Heiniger, A. Torres, R. Siebert, J. Román-Gomez, et F. Prósper, « Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 10, p. 4443-4453, mai 2009.
- [65] J. Lu, G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, et T. R. Golub, « MicroRNA expression profiles classify human cancers », *Nature*, vol. 435, n° 7043, p. 834-838, juin 2005.
- [66] S. Caramuta, L. Lee, D. M. Ozata, P. Akçakaya, P. Georgii-Hemming, H. Xie, R.-M. Amini, C. H. Lawrie, G. Enblad, C. Larsson, M. Berglund, et W.-O. Lui, « Role of microRNAs and microRNA machinery in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma », *Blood Cancer J.*, vol. 3, p. e152, 2013.
- [67] Y. Karube, H. Tanaka, H. Osada, S. Tomida, Y. Tatematsu, K. Yanagisawa, Y. Yatabe, J. Takamizawa, S. Miyoshi, T. Mitsudomi, et T. Takahashi, « Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients », *Cancer Sci.*, vol. 96, n° 2, p. 111-115, févr. 2005.
- [68] G. A. Calin, C. Sevignani, C. D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini, et C. M. Croce, « Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, n° 9, p. 2999-3004, mars 2004.
- [69] V. B. Sampson, N. H. Rong, J. Han, Q. Yang, V. Aris, P. Soteropoulos, N. J. Petrelli, S. P. Dunn, et L. J. Krueger, « MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 20, p. 9762-9770, oct. 2007.
- [70] L. He, J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon, et S. M. Hammond, « A microRNA polycistron as a potential human oncogene », *Nature*, vol. 435, n° 7043, p. 828-833, juin 2005.
- [71] V. Olive, M. J. Bennett, J. C. Walker, C. Ma, I. Jiang, C. Cordon-Cardo, Q.-J. Li, S. W. Lowe, G. J. Hannon, et L. He, « miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92 », *Genes Dev.*, vol. 23, n° 24, p. 2839-2849, déc. 2009.

- [72] V. Olive, Q. Li, et L. He, « mir-17-92: a polycistronic oncomir with pleiotropic functions », *Immunol. Rev.*, vol. 253, n° 1, p. 158-166, mai 2013.
- [73] J. Grillari, M. Hackl, et R. Grillari-Voglauer, « miR-17-92 cluster: ups and downs in cancer and aging », *Biogerontology*, vol. 11, n° 4, p. 501-506, août 2010.
- [74] G. A. Calin et C. M. Croce, « MicroRNA signatures in human cancers », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, n° 11, p. 857-866, nov. 2006.
- [75] R. Garzon, G. A. Calin, et C. M. Croce, « MicroRNAs in Cancer », *Annu. Rev. Med.*, vol. 60, p. 167-179, 2009.
- [76] A. J. Alencar, R. Malumbres, G. A. Kozloski, R. Advani, N. Talreja, S. Chinichian, J. Briones, Y. Natkunam, L. H. Sehn, R. D. Gascoyne, R. Tibshirani, et I. S. Lossos, « MicroRNAs are independent predictors of outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 17, n° 12, p. 4125-4135, juin 2011.
- [77] G. Song, L. Gu, J. Li, Z. Tang, H. Liu, B. Chen, X. Sun, B. He, Y. Pan, S. Wang, et W. C. Cho, « Serum microRNA expression profiling predict response to R-CHOP treatment in diffuse large B cell lymphoma patients », *Ann. Hematol.*, mai 2014.
- [78] R. Garzon et C. M. Croce, « MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis », *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 15, n° 4, p. 352-358, juill. 2008.
- [79] R. W. Georgantas 3rd, R. Hildreth, S. Morisot, J. Alder, C. Liu, S. Heimfeld, G. A. Calin, C. M. Croce, et C. I. Civin, « CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, n° 8, p. 2750-2755, févr. 2007.
- [80] N. Felli, L. Fontana, E. Pelosi, R. Botta, D. Bonci, F. Facchiano, F. Liuzzi, V. Lulli, O. Morsilli, S. Santoro, M. Valtieri, G. A. Calin, C.-G. Liu, A. Sorrentino, C. M. Croce, et C. Peschle, « MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 50, p. 18081-18086, déc. 2005.
- [81] L. C. Dore, J. D. Amigo, C. O. Dos Santos, Z. Zhang, X. Gai, J. W. Tobias, D. Yu, A. M. Klein, C. Dorman, W. Wu, R. C. Hardison, B. H. Paw, et M. J. Weiss, « A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, n° 9, p. 3333-3338, mars 2008.
- [82] F. Fazi, A. Rosa, A. Fatica, V. Gelmetti, M. L. De Marchis, C. Nervi, et I. Bozzoni, « A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis », *Cell*, vol. 123, n° 5, p. 819-831, déc. 2005.
- [83] C. Xiao, D. P. Calado, G. Galler, T.-H. Thai, H. C. Patterson, J. Wang, N. Rajewsky, T. P. Bender, et K. Rajewsky, « MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb », *Cell*, vol. 131, n° 1, p. 146-159, oct. 2007.
- [84] S. Costinean, N. Zanasi, Y. Pekarsky, E. Tili, S. Volinia, N. Heerema, et C. M. Croce, « Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, n° 18, p. 7024-7029, mai 2006.
- [85] L. P. Tan, M. Wang, J.-L. Robertus, R. N. Schakel, J. H. Gibcus, A. Diepstra, G. Harms, S.-C. Peh, R. M. Reijmers, S. T. Pals, B.-J. Kroesen, P. M. Kluin, S. Poppema, et A. van den Berg, « miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes », *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 89, n° 6, p. 708-716, juin 2009.
- [86] D. D. Jima, J. Zhang, C. Jacobs, K. L. Richards, C. H. Dunphy, W. W. L. Choi, W. Y. Au, G. Srivastava, M. B. Czader, D. A. Rizzieri, A. S. Lagoo, P. L. Lugar, K. P. Mann, C. R. Flowers, L. Bernal-Mizrachi, K. N. Naresh, A. M. Evens, L. I. Gordon, M. Luftig, D. R. Friedman, J. B. Weinberg, M. A. Thompson, J. I. Gill, Q. Liu, T. How, V. Grubor,

- Y. Gao, A. Patel, H. Wu, J. Zhu, G. C. Blobe, P. E. Lipsky, A. Chadburn, S. S. Dave, et Hematologic Malignancies Research Consortium, « Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs », *Blood*, vol. 116, n° 23, p. e118-127, déc. 2010.
- [87] R. Malumbres, K. A. Sarosiek, E. Cubedo, J. W. Ruiz, X. Jiang, R. D. Gascoyne, R. Tibshirani, et I. S. Lossos, « Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas », *Blood*, vol. 113, n° 16, p. 3754-3764, avr. 2009.
- [88] K. Basso, P. Sumazin, P. Morozov, C. Schneider, R. L. Maute, Y. Kitagawa, J. Mandelbaum, J. Haddad Jr, C.-Z. Chen, A. Califano, et R. Dalla-Favera, « Identification of the human mature B cell miRNome », *Immunity*, vol. 30, n° 5, p. 744-752, mai 2009.
- [89] G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, et C. M. Croce, « Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, n° 24, p. 15524-15529, nov. 2002.
- [90] G. A. Calin, M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, et C. M. Croce, « A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, n° 17, p. 1793-1801, oct. 2005.
- [91] S. Mi, J. Lu, M. Sun, Z. Li, H. Zhang, M. B. Neilly, Y. Wang, Z. Qian, J. Jin, Y. Zhang, S. K. Bohlander, M. M. Le Beau, R. A. Larson, T. R. Golub, J. D. Rowley, et J. Chen, « MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, n° 50, p. 19971-19976, déc. 2007.
- [92] W. Wang, M. Corrigan-Cummins, J. Hudson, I. Maric, O. Simakova, S. S. Neelapu, L. W. Kwak, J. E. Janik, B. Gause, E. S. Jaffe, et K. R. Calvo, « MicroRNA profiling of follicular lymphoma identifies microRNAs related to cell proliferation and tumor response », *Haematologica*, vol. 97, n° 4, p. 586-594, avr. 2012.
- [93] A. Roehle, K. P. Hoefig, D. Reptsilber, C. Thorns, M. Ziepert, K. O. Wesche, M. Thiere, M. Loeffler, W. Klapper, M. Pfreundschuh, A. Matolcsy, H.-W. Bernd, L. Reiniger, H. Merz, et A. C. Feller, « MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas », *Br. J. Haematol.*, vol. 142, n° 5, p. 732-744, sept. 2008.
- [94] C. H. Lawrie, J. Chi, S. Taylor, D. Tramonti, E. Ballabio, S. Palazzo, N. J. Saunders, F. Pezzella, J. Boulwood, J. S. Wainscoat, et C. S. R. Hatton, « Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, n° 7, p. 1248-1260, juill. 2009.
- [95] G. Caron, S. Le Gallou, T. Lamy, K. Tarte, et T. Fest, « CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 182, n° 12, p. 7595-7602, juin 2009.
- [96] M. Metzker, « Sequencing technologies - the next generation. [Nat Rev Genet. 2010] - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997069>. [Consulté le: 27-févr-2013].
- [97] M. Hackenberg, M. Sturm, D. Langenberger, J. M. Falcón-Pérez, et A. M. Aransay, « miRanalyzer: a microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments », *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, n° Web Server issue, p. W68-76, juill. 2009.

- [98] M. Hackenberg, N. Rodríguez-Ezpeleta, et A. M. Aransay, « miRanalyzer: an update on the detection and analysis of microRNAs in high-throughput sequencing experiments », *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, n° Web Server issue, p. W132-138, juill. 2011.
- [99] B. P. Lewis, C. B. Burge, et D. P. Bartel, « Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets », *Cell*, vol. 120, n° 1, p. 15-20, janv. 2005.
- [100] S.-D. Hsu, Y.-T. Tseng, S. Shrestha, Y.-L. Lin, A. Khaleel, C.-H. Chou, C.-F. Chu, H.-Y. Huang, C.-M. Lin, S.-Y. Ho, T.-Y. Jian, F.-M. Lin, T.-H. Chang, S.-L. Weng, K.-W. Liao, I.-E. Liao, C.-C. Liu, et H.-D. Huang, « miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions », *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, n° Database issue, p. D78-85, janv. 2014.
- [101] Z. Wu, X. Huang, X. Huang, Q. Zou, et Y. Guo, « The inhibitory role of Mir-29 in growth of breast cancer cells », *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, vol. 32, p. 98, 2013.
- [102] R. Nishikawa, Y. Goto, S. Kojima, H. Enokida, T. Chiyomaru, T. Kinoshita, S. Sakamoto, M. Fuse, M. Nakagawa, Y. Naya, T. Ichikawa, et N. Seki, « Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion via targeting LAMC1 in prostate cancer », *Int. J. Oncol.*, vol. 45, n° 1, p. 401-410, juill. 2014.
- [103] B. Fiserova, L. Kubiczkova, L. Sedlarikova, R. Hajek, et S. Sevcikova, « The miR-29 family in hematological malignancies », *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.*, juill. 2014.
- [104] F. Wang, X.-S. Wang, G.-H. Yang, P.-F. Zhai, Z. Xiao, L.-Y. Xia, L.-R. Chen, Y. Wang, X.-Z. Wang, L.-X. Bi, N. Liu, Y. Yu, D. Gao, B.-T. Huang, J. Wang, D.-B. Zhou, J.-N. Gong, H.-L. Zhao, X.-H. Bi, J. Yu, et J.-W. Zhang, « miR-29a and miR-142-3p downregulation and diagnostic implication in human acute myeloid leukemia », *Mol. Biol. Rep.*, vol. 39, n° 3, p. 2713-2722, mars 2012.
- [105] S. Sander, L. Bullinger, et T. Wirth, « Repressing the repressor: a new mode of MYC action in lymphomagenesis », *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 8, n° 4, p. 556-559, févr. 2009.
- [106] J. Gao et Q.-G. Liu, « The role of miR-26 in tumors and normal tissues (Review) », *Oncol. Lett.*, vol. 2, n° 6, p. 1019-1023, nov. 2011.
- [107] B. Liu, X. Wu, B. Liu, C. Wang, Y. Liu, Q. Zhou, et K. Xu, « MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1822, n° 11, p. 1692-1704, nov. 2012.
- [108] C. P. Concepcion, C. Bonetti, et A. Ventura, « The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease », *Cancer J. Sudbury Mass*, vol. 18, n° 3, p. 262-267, juin 2012.
- [109] B. J. Lannutti, S. A. Meadows, S. E. M. Herman, A. Kashishian, B. Steiner, A. J. Johnson, J. C. Byrd, J. W. Tyner, M. M. Loriaux, M. Deininger, B. J. Druker, K. D. Puri, R. G. Ulrich, et N. A. Giese, « CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability », *Blood*, vol. 117, n° 2, p. 591-594, janv. 2011.
- [110] E. Curran et S. M. Smith, « Phosphoinositide 3-kinase inhibitors in lymphoma », *Curr. Opin. Oncol.*, vol. 26, n° 5, p. 469-475, sept. 2014.
- [111] O. I. Yahiaoui, J. A. Nunès, C. Castanier, R. Devillier, F. Broussais, A. J. Fabre, D. Naimi, R. Bouabdallah, D. Olive, et L. Xerri, « Constitutive AKT activation in follicular lymphoma », *BMC Cancer*, vol. 14, p. 565, 2014.
- [112] J. R. Westin, « Status of PI3K/Akt/mTOR Pathway Inhibitors in Lymphoma », *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, févr. 2014.
- [113] A. Fassina, F. Marino, M. Siri, R. Zambello, L. Ventura, M. Fassan, F. Simonato, et R. Cappellesso, « The miR-17-92 microRNA cluster: a novel diagnostic tool in large B-cell

malignancies », *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 92, n° 11, p. 1574-1582, nov. 2012.

Nom - Prénom : DECAUX Aurélie

Titre de la thèse : Etude des miARNs dans le lymphome folliculaire

Résumé de la thèse :

Les miARNs sont de petits ARNs non-codants régulant la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire, suggérant leur étroite implication avec les processus cancéreux. Le lymphome folliculaire (LF), le plus fréquent des lymphomes indolents, dérive de cellules B du centre germinatif. L'objectif de cette étude est d'établir et de corrélérer le profil d'expression des miARNs (miRNome) à celui des ARNm (transcriptome) des cellules tumorales du LF, afin de mieux comprendre les processus de la tumorigénèse. 6 échantillons de LF, issus de ganglions, et 4 échantillons de centrocytes, issus d'amygdales saines, ont été triés par FACS. Le miRNome a été obtenu par séquençage (Illumina HiSeq2000, Integragen, Evry) et le transcriptome par hybridation sur puces Affymetrix HGU133plus2.0. Les données ont été analysées par le logiciel miRanalyzer et Partek GS. Dans nos populations de LF, 49 miARNs soit 4.3% de l'ensemble des miARNs exprimés, sont significativement dérégulés en comparaison aux centrocytes (t-test, FDR, $p < 0.05$). La majorité de ces miARNs sont sous-exprimés (86%) dans le LF, parmi ceux-ci, on retrouve les membres du cluster 17-92, réputé oncogène dans d'autres types de cancers. Parmi les miARNs sur-exprimés dans le LF, les plus dérégulés sont le miR-26 et le miR-29. Pour cela, notre attention s'est focalisée sur les miR-26, miR-29 et sur le cluster 17-92. L'une des cibles communes à ces 3 familles de miARNs, d'après le logiciel TargetScan, est PTEN. Cette protéine, retrouvée sous-exprimée dans notre cohorte de LF, est impliquée dans la régulation de la voie PI3K/ AKT, voie favorisant la survie et la prolifération cellulaire. La dérégulation des miARNs pourrait faire partie des mécanismes épigénétiques impliqués dans la tumorigénèse du LF

MOTS CLÉS : miRNome, transcriptome, lymphome folliculaire, PI3K/AKT, PTEN

JURY

PRÉSIDENT : Mme Marie-Christine BENE, Professeur en Hématologie,
Faculté de Médecine de Nantes

ASSESEURS :

Mme Céline PANGAULT, Maître de Conférences en
Hématologie, Faculté de Médecine de Rennes

Mr Thierry FEST, Professeur en Hématologie, Faculté de
Médecine de Rennes

Mr Cédric PASTORET, Assistant Hospitalo-Universitaire
en Hématologie, Faculté de Médecine de Rennes

**Adresse de l'auteur : Laboratoire d'Hématologie. 2 rue Henri Le Guilloux.
35000 RENNES**