

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 26/D3C/2014

N° de série : 03/BA/2014

Thèse en co-tutelle entre l'Université Constantine 1 et Aix Marseille Université
En vue d'obtenir le grade de Docteur troisième cycle LMD d'Université Constantine
1 et Aix Marseille Université

Discipline : Sciences Biologiques /option : Immuno-Oncologie (UC1, Algérie)
Pathologie humaine / option : oncologie (AMU, France)

**ANALYSE DE L'ACTIVATION DE LA VOIE PI3K/AKT DANS LE
LYMPHOME FOLLICULAIRE**

Présentée par
Yahiaoui-Bentounsi Ouardia Imene
Le 11/12/2014

Membres du Jury :

Présidente de jury : SATTI Dalila. Professeur à l'Université Constantine 1, Algérie.

Directeur de thèse : XERRI Luc. Professeur à Aix Marseille Université, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France.

Co-directrice de thèse : NAIMI Dalila. Directrice de recherche à l'Université Constantine 1, Algérie.
Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie - Université Constantine 3, Algérie.

Examineurs :

MOLINA Thierry. Professeur à l'Hôpital Universitaire Necker Enfants Malades, Paris, France.

DJIDJIK Réda. Professeur à l'Université d'Alger 1, service d'immunologie, CHU Beni-Messous, Algérie.

DUBREUIL Patrice. Directeur de recherche, INSERM, CRCM, France.

FILALI Taha. Professeur Service d'oncologie - CHU Benbadis / Université Constantine 3, Algérie.

Année universitaire 2014/2015

Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est très agréable d'exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu et supporté.

A M. le Professeur Daniel Olive, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de recherche «Immunité et cancer» qu'il dirige, ainsi que pour son support avant et durant la thèse. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements et mon profond respect.

A M. le Professeur Xerri Luc, mon co-directeur de thèse, de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche « Microenvironnement des lymphoproliférations et système immunitaire », d'avoir assuré l'encadrement scientifique de la thèse, et de m'avoir permis de mener à terme mes travaux. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements et profond respect.

A Madame le Professeur Satta Dalila, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ma thèse de doctorat, et d'avoir accepté l'évaluation de ce travail. Veuillez trouver l'expression de ma profonde gratitude.

A Madame le Professeur Naimi Dalila, ma co-directrice de thèse, pour l'intérêt qu'elle a porté pour ce travail. A Messieurs le Professeur Molina Thierry et le Docteur Dubreuil Patrice d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant que examinateurs, et d'avoir consacré du temps pour examiner mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et profond respect.

A M. le Docteur Nunès Jacques, pour sa disponibilité, son aide, et ses conseils scientifiques pour l'aboutissement de ce travail. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements et profond respect.

J'adresse mes vifs remerciements à Barbarat Bernadette, pour son aide, sa gentillesse, et sympathie. Je voudrais également remercier Philippe et Sylvaine pour leurs conseils techniques, gentillesse et sympathie. Merci à tous les membres de l'équipe Cyril, Eloïse, Florence, Françoise Mallet, Françoise.Gondois-Rey et Ivan pour leur sympathie et la bonne ambiance au sein du laboratoire.

Bien évidemment, je tiens à remercier l'ensemble des collègues du laboratoire et mes amis Anne Sophie, Aude, Audrey, Besma, Céline, Christine, Hassnae, Javier, Kahina, Manel, Mignane, Ruzena, Suong et Ying pour leur sympathie et bonne humeur.

J'exprime mes plus sincères remerciements à mes amies et collègues de l'UC1 Wissem et Meriem pour leur aide, soutien, et sympathie tout au long de cette aventure.

Je tiens également à remercier tous les membres de la plate-forme Génétique Somatique, en particulier Aurélie, et Arnaud, ainsi que toutes les techniciennes du laboratoire de biopathologie Christine, Francine et Jeannine.

Mes remerciements vont également au programme Averroès Erasmus Mundus, pour l'octroi de la bourse qui m'a permis de poursuivre mes études supérieures en France. J'aimerais aussi remercier tous les responsables du bureau Téthys : Michel Autric, Chrystelle Roux, Merina Ait Abbas, Sandrine Kilman et Lauriane Gros pour leur aide et soutien.

Je dédie cette thèse :

A mes parents, mes deux sœurs, mes beaux-parents, mon beau-frère et ma belle-sœur, que j'aime beaucoup. Merci de m'avoir supporté et soutenu tout au long de ma thèse.

Et finalement, à mon mari Mehdi, pour son soutien, son écoute, ses encouragements. Merci de m'avoir accompagné dans cette aventure et supporté mes humeurs, ça n'a pas été facile pour moi autant que pour toi.

Résumé

La voie PI3K/AKT est impliquée dans la croissance et la progression de divers cancers humains, et semble jouer un rôle majeur dans le développement de tumeurs lymphoïdes. Elle pourrait être impliquée dans la pathogénie du lymphome folliculaire (LF) par certains mécanismes non identifiés.

Les travaux de thèse portent sur l'étude des anomalies de la voie PI3K/AKT dans le lymphome folliculaire, dans le but d'apporter une nouvelle cible thérapeutique.

38 biopsies tissulaires de LF humain ont été étudiées pour une analyse mutationnelle du gène *PIK3CA* dans les exons 9 et 20 par le séquençage selon la méthode de Sanger. Les mêmes échantillons ont été analysés par western blot et immunohistochimie pour détecter l'expression des protéines AKT, AKT phosphorylée (pAKT), et PTEN. Deux cas de lymphadénite ont été utilisés comme témoins.

Les résultats obtenus montrent que l'expression d'AKT était présente dans tous les cas de LF et lymphadénite, et 14/38 (37%) échantillons de LF et 2/2 cas de lymphadénite exprimaient phospho-AKT. 9/38 (24%) échantillons de LF ont montré un niveau élevé d'expression de phospho-AKT, alors que 5/38 (13%) cas de LF, et 2/2 échantillons de lymphadénite montraient un faible niveau d'expression de phospho-AKT. L'expression de PTEN a été observée dans 30/38 (79%) cas de LF et 2/2 cas de lymphadénite, tandis que 8/38 (21%) cas ont montré une perte d'expression de PTEN. En outre, 3 cas qui expriment phospho-AKT montrent une perte d'expression de PTEN. Aucune mutation du gène *PIK3CA* n'a été détectée dans les échantillons étudiés.

Ces données suggèrent que la voie PI3K/AKT peut être activée dans certains cas de LF, soit en raison de la phosphorylation d'AKT, soit en raison d'une perte d'expression de PTEN, en absence de mutations de *PIK3CA*.

Mots-clés: lymphome folliculaire, mutations *PIK3CA*, phospho-AKT, PTEN.

Abstract

The phosphoinositide 3- kinase (PI3K) pathway is involved in the growth of various human cancers, including lymphoid malignancies. However its role in the pathogenesis of follicular lymphoma (FL) has not been yet described.

The PhD work focuses on the study of alterations in the PI3K/AKT pathway in follicular lymphoma, in order to provide a new therapeutic target.

To clarify this point, biopsy tissue samples from 38 human FL cases were investigated for *PIK3CA* somatic mutations in exons 9 and 20 using Sanger sequencing. The same samples were analyzed using western blotting and immunohistochemistry to detect expression of AKT, phosphorylated AKT (pAKT), and PTEN proteins. Two cases of benign lymphadenitis were used as controls.

AKT expression was present in all FL and lymphadenitis cases. 14/38 (37%) FL and 2/2 lymphadenitis cases expressed pAKT. 9/38 (24%) FL samples showed high level of pAKT, whereas 5/38 (13%) FL cases and 2/2 benign lymphadenitis samples expressed pAKT at low level. PTEN expression was observed in 30/38 (79%) FL and 2/2 benign lymphadenitis cases, whereas 8/38 (21%) of FL cases showed loss of PTEN expression. In addition, 3 cases with positive pAKT did not express PTEN. *PIK3CA* mutations were not detected in any sample.

These data suggest that the PI3K/AKT signaling pathway could be activated in a subset of FL cases, due to either AKT phosphorylation or PTEN downregulation, in the absence of *PIK3CA* mutations.

Keywords: Follicular Lymphoma, *PIK3CA* mutations, pAKT, PTEN

شاس كائيس اس PI3K/AKT في بي بي شطا اعيش ح ت ا فويل الأور ألي شش بي ف ا و ح .
 ين . دوس ف ايس ثة في شطا اي غذي لي ف ا و ح اج ش ر ت . ال هتعض اي ا ح ا ر ي ر و ف ه ل ح ذ ا .
 و س ر ل و ح د م ي س د ش م ز ع ي س ل ر ح ا ح ال ل ا ت ا ي س ل ل PI3K /AKT في ف ي ف ا و ح اج ش ت ، ا ج و ي ف ش ه ذ ف
 ال ج ج ذ ذ .

ي عرض ح م ز ا ي ق ط ح ، ل م ي ق ق ف ع ا خ ي ز ع ا ح الأ س ج و ا ي ر ف ي د ه 33 ل م ي س ش طا ا ي غ ذ ي ل ي ف ا و ح اج ش ت
 ل ش ش ت ، و ر ي ل ا ج ش ا ف ي و ط ف ش ا خ ي ي س ن ح PIK3CA في ال م س ر ي ا خ 9 و 20 م س ر خ ذ ك ن ي س و س ا ج ش . و ق ذ د ف ي و
 ف ت ر ا ي ع ا ق ا س ر خ ذ ا Western blot و Immunohistochemie ا ي ش ف ع ن ع ش ل ش و ذ ا خ AKT ، AKT ف ي ف ش
 (pAKT) و PTEN . و ق ذ ا س ر خ ذ د ل م ي . ح ال ا ت ا ي ه ا ب ا ي ع ق ي ل ي ف ا و ح ا ح ذ ج م ش ه ي .

ت د ا ي ر ل ا ج ا ن ع ش ل ش و ذ ا AKT م ا ح ل ش ا ف ج ع ح ال ا ت س ش طا ا ي غ ذ ي ل ي ف ا و ح اج ش ت و ا ي ه ا ب ا ي ع ق ذ
 ي ل ي ف ا و ح ا ح ذ ج ، م ا ع ش ت د (33/14) 33% . ع ا خ ش طا ا ي غ ذ ي ل ي ف ا و ح اج ش ت و 2/2 . ح ال ا ت ا ي ه ا ب ا ي ع ق ذ
 ي ل ي ف ا و ح ا ح ذ ج ع ن ع ش ا ي ش و ذ ا ا ي ف ش pAKT ، ح ت ا ط م ش خ (33/9) 24% . ع ا خ ش طا ا ي غ ذ ي ل ي ف ا و ح
 ا ج ش ت س ي ي ع ا ه . ن ع ش ل ش و ذ ا ا ي ف ش pAKT . ف ح ا ط م ش خ (33/5) 13% . ع ا خ ش طا ا ي غ ذ
 ي ل ي ف ا و ح اج ش ت و 2/2 . ح ال ا ت ا ي ه ا ب ا ي ع ق ي ل ي ف ا و ح ا ح ذ ج س ي ي ح ف ض . ن ع ش ل ش و ذ aAKT .

ي ح ع ن ع ش ل ش و ذ a PTEN ف (33/30) 39% . ع ا خ ش طا ا ي غ ذ ي ل ي ف ا و ح اج ش ت و 2/2 . ح ال ا ت ا ي ه ا ب
 ا ي ع ق ي ل ي ف ا و ح ا ح ذ ج ت ا (33/3) 21% . ط ا ح ال ا ي س ش طا ا ط م ش خ ق ذ ا ن ع ش ل ش و ذ a PTEN ب ا ل ل ا ف ح ا ي
 ر ي ل ف ا 3 ح ال ا ت س ش طا ا ح ا ي ر ع ش ع ش و ذ a pAKT ن ط م ش ف ق ذ ا ا ي ع ش و ي ش و ذ a PTEN . ي ر ا ي ش ف ع
 ط ف ش ا ح ال م و ثة PIK3CA ف ا ا ي ع ا خ ي د س ر و س ح .

ش ش م ز ا ي ث ا خ ا ي ا ا ي س ل ل PI3K /AKT . ا ن ي ش ط ف ج ي ع ش ع ح . ح ال ا ت س ش طا ا ي غ ذ
 ي ل ي ف ا و ح اج ش ت ، ا ي ل س ن ف ف ش و ذ ا ا ي ش و ذ a AKT ا و ت س ت ف ق ذ ا ن ع ش ل ش و ذ a PTEN ، ف ا ب ط ش ا خ ا ي س ن ح
 .PIK3CA

ك ل م ا ت ل ب ح ت : الأور ط ل ي ف ا و ح ط ف ش ا خ PIK3CA ، pAKT ، PTEN

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Développement des lymphocytes B et lymphomagenèse	3
1. Développement des lymphocytes B	3
1.1. Maturation des cellules B	3
1.1.1. Phase indépendante de l'antigène	4
a) Le stade pro B	5
b) Le stade pré B	6
c) Le stade B immature	7
1.1.2. Phase dépendante de l'antigène.....	9
a) Les lymphocytes B de la zone marginale.....	10
b) Les lymphocytes B de la zone folliculaire.....	11
c) Les lymphocytes B anergiques.....	12
d) Les cellules B-B1	13
2. Recombinaison V(D)J des gènes du BCR et mécanisme de translocation chromosomique	
15	
2.1. Organisation des gènes des immunoglobulines et recombinaison V(D)J	16
2.2. Hypermutation somatique.....	20
2.3. Commutation de classe.....	23
3. Lymphomagenèse	25
4. Origine cellulaire des lymphomes B.....	27
Chapitre II : Lymphome folliculaire	30
1. Généralité sur le lymphome folliculaire.....	30
2. Phénotype des cellules folliculaires lymphomateuses	31
3. Pathogenèse et mécanisme de la translocation t(14,18).....	32
4. Traitement	37
4.1. Traitement des lymphomes folliculaires localisés.....	37
4.2. Traitement des lymphomes folliculaires disséminés	37
Chapitre III : Voie PI3K/AKT et cancer	39
1. Les membres de la famille des enzymes PI3Ks	39
1.1. PI3K de classe I.....	39
1.1.1. PI3K de classe IA	39

1.1.2. PI3K classe IB	40
1.2. PI3K de classe II.....	40
1.3. PI3K de classe III	40
2. Mécanisme d'activation de la PI3K de classe I	42
3. Phosphatase PTEN.....	44
4. PKB/AKT	46
5. Mécanisme d'activation de la voie PI3K/AKT.....	48
6. Conséquences de l'activation de la voie PI3K/AKT	50
6.1. Prolifération cellulaire	50
6.2. La survie cellulaire	50
6.3. Le métabolisme cellulaire.....	51
6.4. La croissance cellulaire	51
6.5. L'angiogenèse.....	52
7. Altérations de la voie PI3K/AKT dans les cancers humains	54
7.1. AKT	55
7.2. PTEN	59
7.3. PI3K.....	60
8. Activation de la voie PI3K/AKT dans les tumeurs malignes lymphoïdes.....	62
Chapitre IV : Objectif du projet.....	64
Chapitre V : Méthodologies expérimentales.....	65
1. Patients et échantillons tissulaires tumoraux	65
2. Extraction d'ADN, d'ARN, et de protéine	65
3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse mutationnelle des hot spots du gène <i>PIK3CA</i> (exon 9 et 20)	69
3.1. PCR.....	69
3.2. Réaction de séquence et analyse des mutations du gène <i>PIK3CA</i>	70
4. Western blot.....	72
5. Immunohistochimie	74
6. Analyse statistique	75
Chapitre VI : Résultats	76
Article : Constitutive AKT activation in follicular lymphoma.....	76
1. Absence de mutations activatrices du gène <i>PIK3CA</i> dans le LF	77
2. Expression d'AKT, pAKT et PTEN dans le lymphome folliculaire.....	77
3. Corrélation avec les caractéristiques cliniques des patients	80

Chapitre VII : Discussion et Conclusion	90
Références bibliographiques	93

Liste des illustrations

Figure 1. Stades de différenciation des cellules B.....	4
Figure 2. Interaction des cellules stromales de la moelle osseuse avec les progéniteurs des cellules B.....	5
Figure 3. Genèse de l'expression de l'immunoglobuline membranaire et la chaîne légère de substitution au stade pré-B.....	7
Figure 4. Processus de receptor editing.....	8
Figure 5. Modèle de l'extravasation des leucocytes.....	10
Figure 6. Développement des cellules B et sous-population des cellules B.....	14
Figure 7. Organisation germinales des locus des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines dans le génome humain.....	16
Figure 8. Les séquences signal de recombinaison.....	17
Figure 9. Mécanisme de recombinaison V(D)J et réparation des cassures double brins de l'ADN.....	19
Figure 10. Mécanisme de la désamination de l'ADN lors de l'hypermutation somatique.....	22
Figure 11. Commutation isotypique de l'IgE.....	24
Figure 12. Les mécanismes moléculaires de réarrangements des gènes de la chaîne lourde des immunoglobulines responsables des cassures d'ADN et les translocations du locus IgH.....	26
Figure 13. Origine cellulaire des lymphomes B.....	29
Figure 14. Illustration de la translocation t(14, 18).....	32
Figure 15. Accumulation des lésions lors de la transformation en lymphome folliculaire.....	35
Figure 16. Classification des membres de la famille des PI3K.....	41
Figure 17. Model de l'activation de PI3K de classe I.....	43
Figure 18. Représentation schématique de la protéine PTEN.....	44
Figure 19. Caractéristiques cellulaires associées à la présence ou l'absence nucléaire de PTEN.....	45
Figure 20. Structure des domaines des isoformes de la protéine AKT et modèles des sites de liaison de l'ATP.....	48
Figure 21. La voie de signalisation PI3K/AKT.....	53
Figure 22. Distribution de mutation somatique du gène <i>PIK3CA</i> dans les cancers humains.....	61
Figure 23. Schéma récapitulatif de l'extraction d'ADN, d'ARN et des protéines par utilisation du kit AllPrep DNA/RNA/Protein (Qiagen).....	68
Figure 24. Les étapes de la réaction de séquence.....	72

Liste des tableaux

Tableau 1. Les lymphomes B humains matures.....	28
Tableau 2. Altérations génétiques dans le lymphome folliculaire	36
Tableau 3. Activation d'AKT dans les cancers humains	55
Tableau 4. Séquences des amorces de PCR	70
Tableau 5. Anticorps primaires utilisés en western blot	73

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyrébonucléique
AGC	c-AMP dependent protein kinase A/ protein kinase G/ protein kinase C
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
Bad	Bcl2-antagonist of cell death
Bcl2	B cell lymphoma 2
Bcl6	B cell lymphoma 6
BCR	B Cell Recepteur
BER	short-patch Base Excision Repair
CaMKK	calcium/calmodulin dependent kinase kinase
CD	Cluster de Différenciation
CDR	Complementary Determining Regions
CHOP	Cyclophosphamide Hydroxydaunomycin Oncovin Prednisonel
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
c-Myb	Myeloblastosis
c-Myc	Cellular Myelocytomatosis viral oncogene homolog
CREB	Cyclic AMP Response Element Binding protein
CSR	Class Switch Recombination
D	Diversité
ddNTP	Didésoxyribonucléotides
DNA-PK	DNA- dependent Protein Kinase
dNTP	Désoxyribonucléotides
DO	Densité Optique
EBV	Epstein Barr Virus
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF4E	Eukaryotic Initiation Factor 4 E
ESAM	Endothelial Cell Selective Adhesion Molecule
FAK	Focal Adhesion Kinase
FLIPI	Follicular Lymphoma International Prognostic Index
Gab1	GRB2 associated binding protein 1
GELA	Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte
GLUT	Glucose Transporter
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 β

H	Heavy
HEV	High Endothelial Venules
HIF α	Hypoxia Inducible Factor α
HSM	Hypermutation Somatique
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN γ	Interféron γ
Ig	Immunoglobuline
IHC	Immunohistochimie
IL	Interleukine
ILK	Integrin Linked Kinase
IRS	Insulin Receptor Substrate
J	Jonction
Jak	Janus kinase
JAM	Junctional Adhesion Molecule
kDa	Kilo Dalton
L	Light
LDH	Lactate déshydrogénase
LF	Lymphome Folliculaire
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen 1
LNH	Lymphome Non Hodgkinien
LPS	Lipopolysaccharide
MAC1	Macrophage Antigen 1
MADCAM1	Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1
MAPK APK2	Mitogen Activated Protein Kinase Activated Kinase 2
MBR	Major Breakpoint Region
MCR	Minor Cluster Region
Mdm2	Murine double minute 2
MMAC	Mutated in Multiple Advanced Cancer
MMR	Mismatch Repair
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC 1	mTOR/rictor complex 1
mTORC 2	mTOR/rictor complex 2
NFkβ	Nuclear Factor kappa β
NHED	Non Homologus End Joing
OLS	Organes Lymphoides Secondaires
p70S6K	p70 ribosomal protein S6 kinase
pAKT	phospho-AKT
PALS	Periarteriolar Lymphoid Sheaths
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell

PCR	Polymerase Chain Reaction
pdb	paires de bases
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK1	3'-Phosphoinositide Dependent Kinase 1
PDK2	3'-Phosphoinositide Dependent Kinase 2
PECAM1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PH	Plekstrin Homology
PI3K	Phosphoinositide-3 Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PKCbII	Protein Kinase C bII
PSGL1	P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns(3,4)P2	Phosphatidylinositol-3,4-diphosphate
PtdIns(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PtdIns(4,5)P2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PtdIns4P	Phosphatidylinositol-4-phosphate
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue deleted chromosome 10
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
RAC	Related to protein kinase A and C
RAG	Recombination Activating Genes
Ras	Rat sarcoma
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RSS	Recombination Signal Sequence
RTK	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
S	Switch
SCF	Stem Cell Factor
SH	Src Homology
SHC	Src homology 2 domain containing protein
SHM	Somatic Hypermutation
Src	Sarcoma
TCR	T Cell Receptor
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TGF- β	Transforming Growth Factor β
Th	T helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRADD	TNF Receptor type 1 Associated Death Domain
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
TSC1	Tuberous Sclerosis Complex 1
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
UNG	Uracil DNA Glycosylase

V	Variable
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VLA-4	Very Late Antigen 4
Vps34	Vacuolar protein sorting defective 34
WB	Western blot
XLF	XRCC4 Like Factor
XRCC4	X ray Repair Cross Complementing protein 4
ZM	Zone Marginale

Introduction

Le lymphome folliculaire (LF) est le second type le plus fréquemment rencontré des lymphomes non hodgkiniens à faible degré de malignité. Il dérive des néoplasies développées à partir des lymphocytes B du centre germinatif.

Sur le plan moléculaire, le LF est caractérisé par la translocation t(14, 18) (q32; q21), ce qui se traduit par la juxtaposition du gène BCL2 situé sur le chromosome 18 aux gènes promoteurs des chaînes lourdes d'immunoglobuline situés sur le chromosome 14. Cela conduit à la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ce qui fournit un signal de survie constitutive dans les cellules du LF.

L'évolution clinique du LF est généralement indolente. Bien qu'il soit sensible à certains agents chimiothérapeutiques, il est caractérisé par de multiples rechutes qui peuvent se produire après le traitement. La plupart des cas peuvent résister aux traitements habituels ou se transformer en lymphomes diffus agressifs à grandes cellules B. Il y a donc un besoin de thérapies plus efficaces, et la recherche d'autres cibles impliquées dans la pathogenèse du LF pourrait offrir de nouvelles opportunités dans l'amélioration des thérapeutiques actuelles, et de là une amélioration de la prise en charge des patients.

La voie PI3K/AKT joue un rôle crucial dans la survie et la prolifération cellulaire, et elle est souvent activée dans de nombreux cancers humains. Cette voie semble être impliquée dans le phénomène de résistance aux thérapies anti-tumorales, à savoir le Trastuzumab (anticorps anti-HER2) dans le cancer du sein, l'Erlotinib ou le Gefitinib (inhibiteur de la tyrosine kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique humain EGFR) dans le cancer du poumon, et le Temozolomide (agent alkylant cytotoxique) dans le glioblastome [1].

L'origine de l'activation aberrante de cette voie dans les cancers humains provient de mutation des oncogènes PTEN, AKT ou de l'enzyme PI3K.

La caractérisation des anomalies affectant la voie PI3K/AKT dans le LF constitue l'objectif principal de la problématique que je propose de développer dans la présente thèse afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cette voie et essentiellement leurs dysfonctionnements dans la pathogenèse du LF. Ceci pourrait aboutir à une nouvelle piste de recherche de molécules thérapeutiques d'efficacité potentielle contre les cellules cancéreuses du LF.

Introduction

Pour introduire ce travail, le développement normal des lymphocytes B sera décrit dans le premier chapitre du manuscrit, dans le but de dévoiler les altérations des remaniements géniques intervenant au cours de la maturation des cellules B, qui induisent un développement pathologique des lymphocytes B, et l'émergence de lymphome.

Dans le deuxième chapitre, seront évoqués les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse du LF. En troisième chapitre, seront décrits la voie PI3K/AKT ainsi que les molécules membres de cette voie, leurs mécanismes d'activation, la cascade de signalisation de la voie, et essentiellement les dysfonctionnements de cette voie conduisant au développement de cancers, notamment les tumeurs lymphoïdes. Pour finir, le travail réalisé et les résultats obtenus seront présentés et discutés.

Chapitre I : Développement des lymphocytes B et lymphomagenèse

I. Développement des lymphocytes B et lymphomagenèse

1. Développement des lymphocytes B

Les lymphocytes B font partie du système immunitaire adaptatif et constituent des éléments centraux de la réponse immune humorale. Ils sont responsables de la production des anticorps spécifiques contre une variété d'antigènes, qui se lient par l'intermédiaire du récepteur de lymphocytes B (BCR). Des anomalies survenant lors du développement, sélection, et activation des cellules B conduisent à l'auto-immunité, à la malignité, à l'immunodéficience, ou à l'allergie.

Le processus de développement qui aboutit à la production de plasmocytes et cellules B mémoires se produit en plusieurs étapes:

- Développement des cellules B matures immunocompétentes.
- Activation des cellules B lorsqu'elles entrent en contact avec l'antigène.
- Différenciation en plasmocytes sécrétant des anticorps ou en cellules B mémoires, et chaque étape comprend des réarrangements génétiques aux loci d'anticorps.

1.1. Maturation des cellules B

Au cours de la vie embryonnaire, le sac vitellin, le foie fœtal, et la moelle fœtale sont les principaux sites de maturation des cellules B [2]. Chez les mammifères, le développement des cellules B s'effectue dans la moelle osseuse à partir de précurseurs hématopoïétiques. Les étapes de différenciation se divisent en deux phases principales; indépendante ou dépendante de l'antigène. La phase indépendante de l'antigène qui a lieu dans la moelle osseuse implique la différenciation de cellules souches hématopoïétiques en cellules B immatures exprimant une immunoglobuline de surface capable de reconnaître un antigène. Elle comprend des étapes successives de réarrangements des gènes d'immunoglobulines, appelées recombinaison V(D)J. Ce processus permet la synthèse des chaînes lourdes et légères du récepteur spécifique de la cellule B mature, le BCR. Ces réarrangements séquentiels se produisent au cours de divers stades de maturation : les progéniteurs pro-B, les précurseurs pré-B, les cellules B immatures (Figure 1).

La seconde phase est dépendante de l'antigène, se produit dans les organes lymphoïdes secondaires, où la cellule entreprend une expansion clonale et une différenciation, lesquelles aboutissent à une population de plasmocytes et de cellules B mémoires.

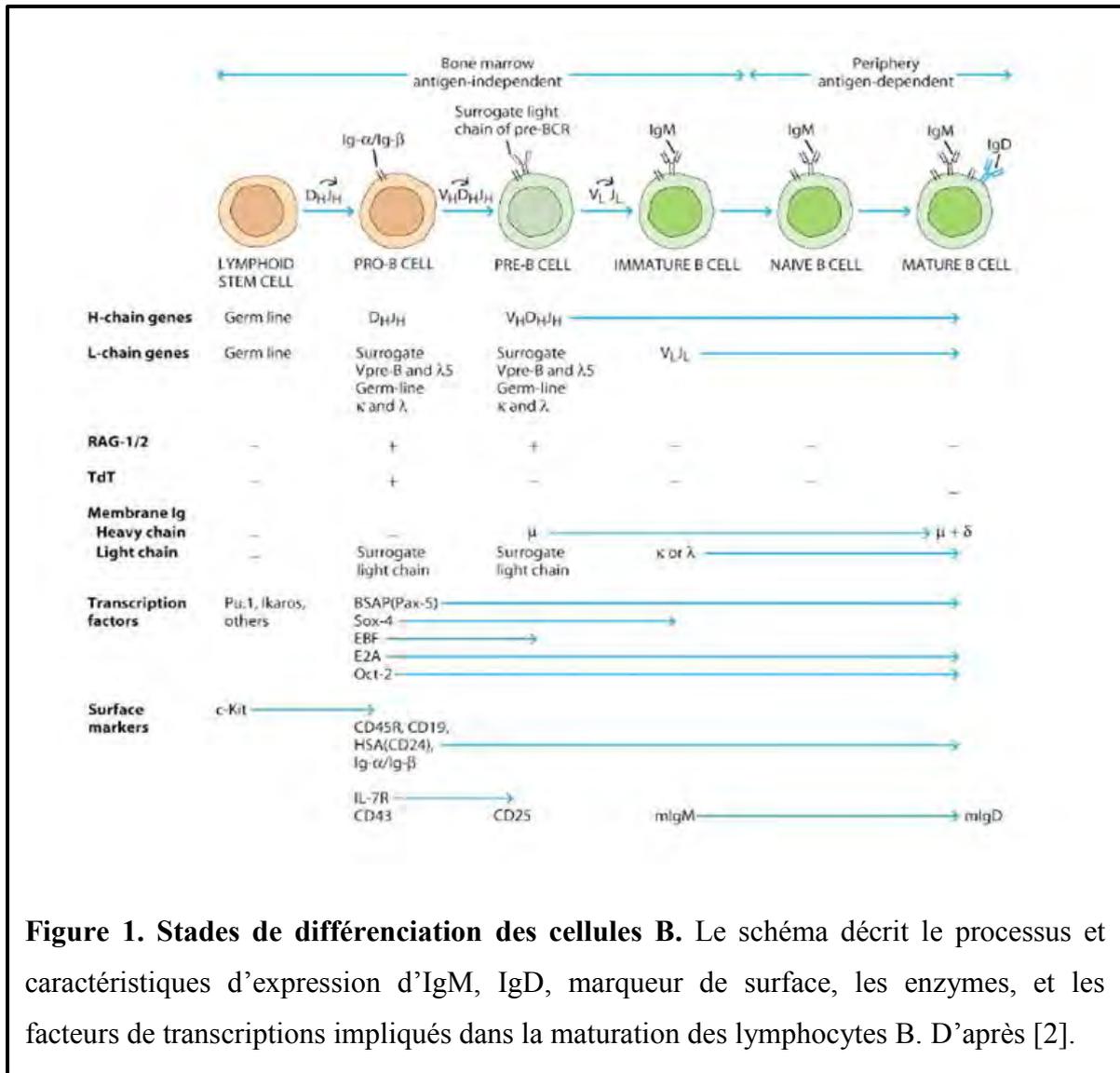


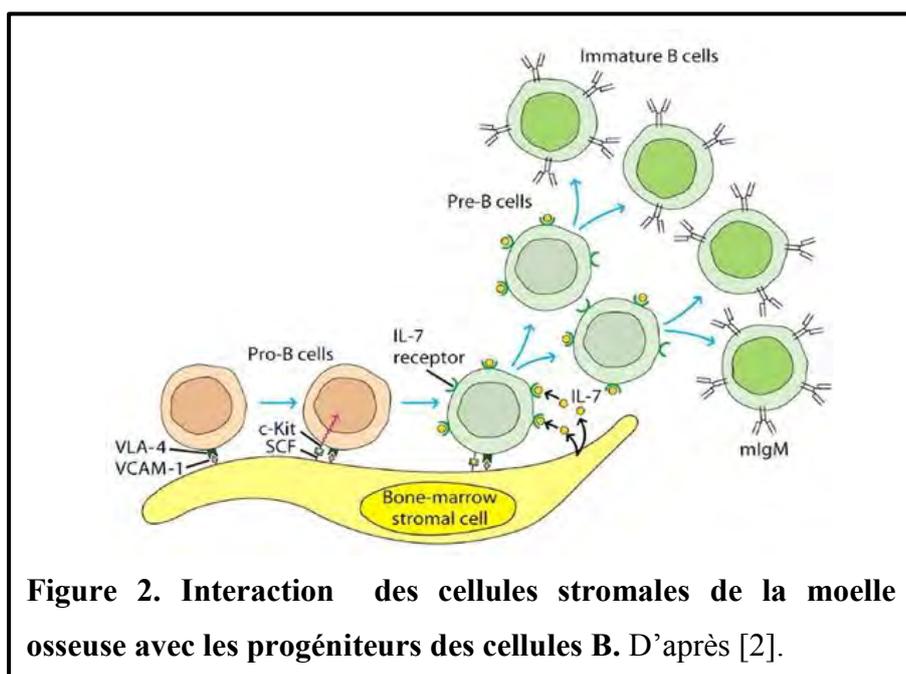
Figure 1. Stades de différenciation des cellules B. Le schéma décrit le processus et caractéristiques d'expression d'IgM, IgD, marqueur de surface, les enzymes, et les facteurs de transcriptions impliqués dans la maturation des lymphocytes B. D'après [2].

1.1.1. Phase indépendante de l'antigène

Le développement des cellules B commence lorsque les cellules souches hématopoïétiques s'engagent dans le lignage B. Cela se passe par une multitude de stades de différenciation et de points de contrôle qui garantissent le bon fonctionnement de l'un des acteurs principaux de l'immunité qui est le lymphocyte B.

a) Le stade pro B

Les cellules pro-B sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes et possèdent une capacité d'autorenouvellement. Les cellules pro-B prolifèrent à l'intérieur de la moelle osseuse et remplissent les espaces extravasculaires entre les sinusoides. Elles expriment une tyrosine phosphatase transmembranaire appelée CD45R. La différenciation des cellules pro-B en cellules pré-B nécessite un microenvironnement fourni par les cellules stromales de la moelle osseuse. Ces dernières jouent un rôle important en interagissant directement avec les cellules pro-B et pré-B, et en sécrétant diverses cytokines, en particulier l'IL-7 qui favorise le processus développemental. Les cellules pro-B se lient aux cellules stromales par l'intermédiaire des molécules d'adhésion cellulaire, y compris le VLA-4 exprimé sur la cellule pro-B, et son ligand le VCAM-1 exprimé à la surface de la cellule stromale (Figure 2). Cette interaction favorise la liaison de la protéine c-Kit des cellules pro-B au facteur de croissance des cellules souches (SCF) de la cellule stromale. Cette interaction déclenche un signal médié par l'activité tyrosine kinase du récepteur c-Kit, qui stimule l'expression du récepteur de l'IL-7 par la cellule pro-B. L'IL-7 libérée par les cellules stromales se lie ensuite aux récepteurs de l'IL-7 ce qui induit la maturation de la cellule pro-B en cellule pré-B, et conduit à une diminution de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules pré-B, de telle façon que les cellules proliférantes puissent se détacher des cellules stromales, et continuer leur différenciation sous la stimulation de l'IL-7 [2].



A ce stade, le réarrangement du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines commence à se mettre en place : la jonction D_H à J_H au stade précoce de la cellule pro-B. Ces premiers réarrangements sont suivis dans les cellules pro-B au stade tardif par l'assemblage de la jonction V_H à DJ_H . Seuls les segments $V_H D_H J_H$ en phase de lecture correcte et sans codon stop codent pour une région variable fonctionnelle et permettent la synthèse d'une chaîne lourde μ intracytoplasmique [3].

Les cellules pro-B sont caractérisées par l'expression membranaire des antigènes CD19 et CD10. La molécule CD19 qui apparaît à partir de ce stade est un marqueur Pan-B. En revanche, l'expression du CD10 est transitoire et s'éteint après cette étape. Les protéines de transduction du signal intracellulaire, $Ig\alpha$ (CD79a) et $Ig\beta$ (CD79b), sont exprimées faiblement à la surface des cellules pro-B en association avec la calnexine [4].

Les cellules pro-B expriment à leurs surfaces une pseudo chaîne légère composée des polypeptides $V_{pré-B}$ et $\lambda 5$ [5]. Elles expriment également une enzyme nucléaire TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) qui catalyse l'insertion des nucléotides au niveau des jonctions codantes des segments réarrangés, augmentant ainsi la diversité des immunoglobulines. Les complexes enzymatiques de la recombinaison, RAG1 et RAG2 (Recombinaison Activating Genes) intervenant lors du réarrangement des gènes des immunoglobulines, sont exprimés au cours des stades cellulaires pro-B et pré-B.

b) Le stade pré B

A ce stade la cellule pré-B exprime à sa surface la chaîne lourde qui a été précédemment réarrangée, en combinaison avec la pseudo chaîne légère qui est constituée de deux polypeptide $V_{pré-B}$ et $\lambda 5$ liés de façon non covalente. Ce complexe s'associe à l'hétérodimère CD79a ($Ig\alpha$) et CD79b ($Ig\beta$), pour former le récepteur de la cellule pré-B (pré-BCR). Le pré-BCR permet à la cellule de passer au stade ultérieur de la différenciation et conduit ainsi à l'exclusion allélique en induisant une diminution transitoire de l'expression des gènes RAG, pour empêcher un réarrangement ultérieur des gènes $V_H D_H J_H$ de l'autre allèle de la chaîne lourde, et entreprendre le réarrangement des gènes $V_L J_L$ pour synthétiser une seule chaîne légère κ ou λ (Figure 3).

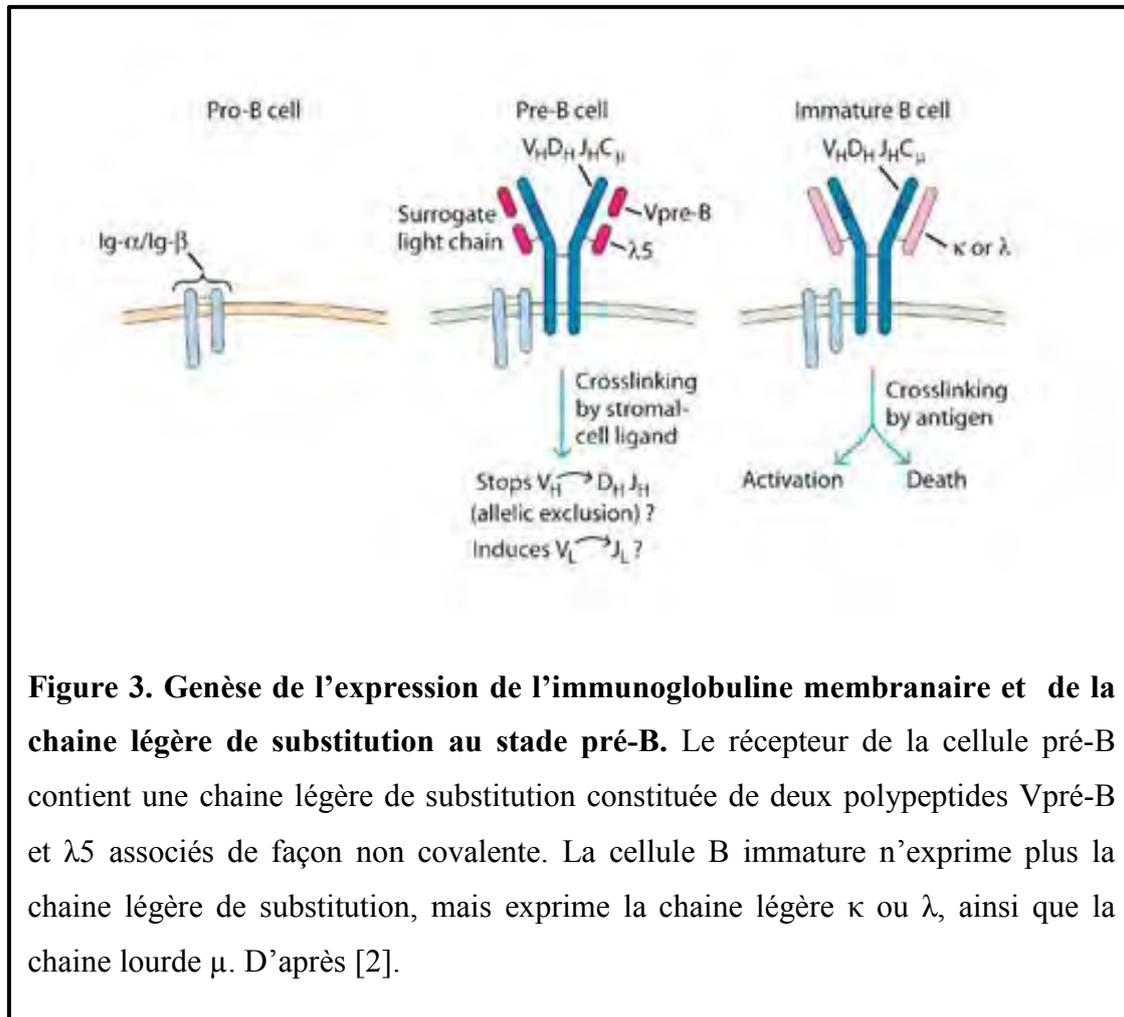
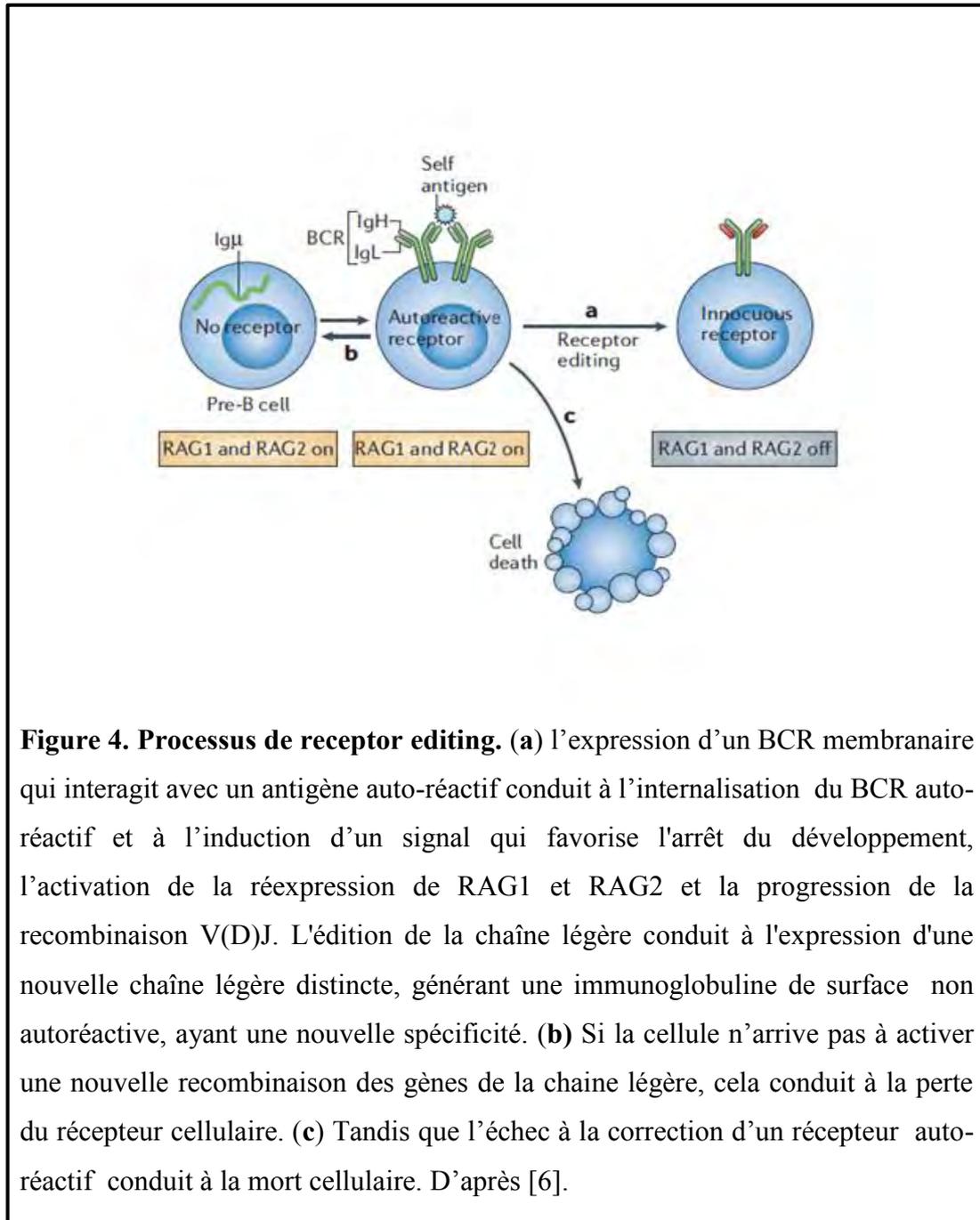


Figure 3. Genèse de l'expression de l'immunoglobuline membranaire et de la chaîne légère de substitution au stade pré-B. Le récepteur de la cellule pré-B contient une chaîne légère de substitution constituée de deux polypeptides Vpré-B et λ5 associés de façon non covalente. La cellule B immature n'exprime plus la chaîne légère de substitution, mais exprime la chaîne légère κ ou λ, ainsi que la chaîne lourde μ. D'après [2].

c) Le stade B immature

Le développement d'une cellule pré-B en lymphocyte B immature nécessite la production d'une chaîne légère classique qui remplace la pseudo chaîne légère et donne naissance à une IgM de surface conférant à la cellule une spécificité de reconnaissance de l'antigène. Comme les lymphocytes B immatures sont produits dans la moelle osseuse, ils subissent un processus de sélection négative, où les cellules B immatures possédant les immunoglobulines membranaires réactives contre les antigènes du soi avec une grande affinité sont éliminées par apoptose. Il est possible pour ces cellules de réaliser des réarrangements secondaires au locus de chaînes légères et ainsi de changer la spécificité de leurs récepteurs. Ce phénomène est nommé Receptor editing (Figure 4) [6]. Quatre mécanismes sont impliqués dans l'acquisition

de la tolérance centrale des lymphocytes B : 1) la réédition des récepteurs pour l'antigène, 2) la délétion clonale, 3) l'anergie et 4) l'ignorance clonale.



Après avoir subi cette sélection négative, les cellules B immatures qui survivent quittent la moelle osseuse et gagnent les Organes Lymphoïdes Secondaires (OLS) pour suivre les dernières étapes de maturation. Les lymphocytes B immatures naïfs entrent dans les OLS via les veinules à endothélium épais HEV (High Endothelial Venules). La trans-migration des lymphocytes B entre les cellules endothéliales des veinules est constituée d'une succession d'événements coordonnés qui résulte d'un enchaînement de processus d'attachement, de roulement et d'adhésion par l'intermédiaire de molécules d'adhérence et des récepteurs spécifiques de chimiokines [7] (Figure 5). On distingue quatre étapes successives :

- une adhésion primaire transitoire, réversible, et un roulement du lymphocyte sur la surface endothéliale. Elle est médiée par les sélectines.
- une activation lymphocytaire rapide, dépendante des chimiokines.
- une adhésion ferme et stable à la surface endothéliale, contrôlée par les intégrines, prélude à la diapédèse.
- une extravasation du lymphocyte à travers l'endothélium vasculaire vers les tissus.

1.1.2. Phase dépendante de l'antigène

Les cellules B immatures transitent de la moelle osseuse vers les OLS et passent à un stade intermédiaire, le stade des cellules B transitionnelles T1 et T2. Les lymphocytes B T1 présentent un phénotype $IgM^{high}IgD^{-}CD21^{-}CD23^{-}$ [8], et sont localisés dans les manchons lymphoïdes péri artériolaires PALS (Periarteriolar Lymphoid Sheaths) de la rate.

A ce stade de maturation intervient le processus de tolérance périphérique afin d'éliminer par apoptose les clones autoréactifs, les cellules survivantes se différencient en lymphocytes B T2, et acquièrent l'expression d'IgD en plus de l'IgM par épissage alternatif de l'ARNm et d'autres marqueurs de surface CD21 et CD23 [9] et deviennent des lymphocytes B matures naïves. Au contact de l'antigène, ces cellules B matures peuvent se différencier soit en lymphocytes B de la zone marginale (ZM) qui sont impliqués dans les réponses humorales thymo-indépendantes, soit en lymphocytes B folliculaires conventionnels impliqués dans les réponses humorales dépendantes des lymphocytes T (Figure 6).

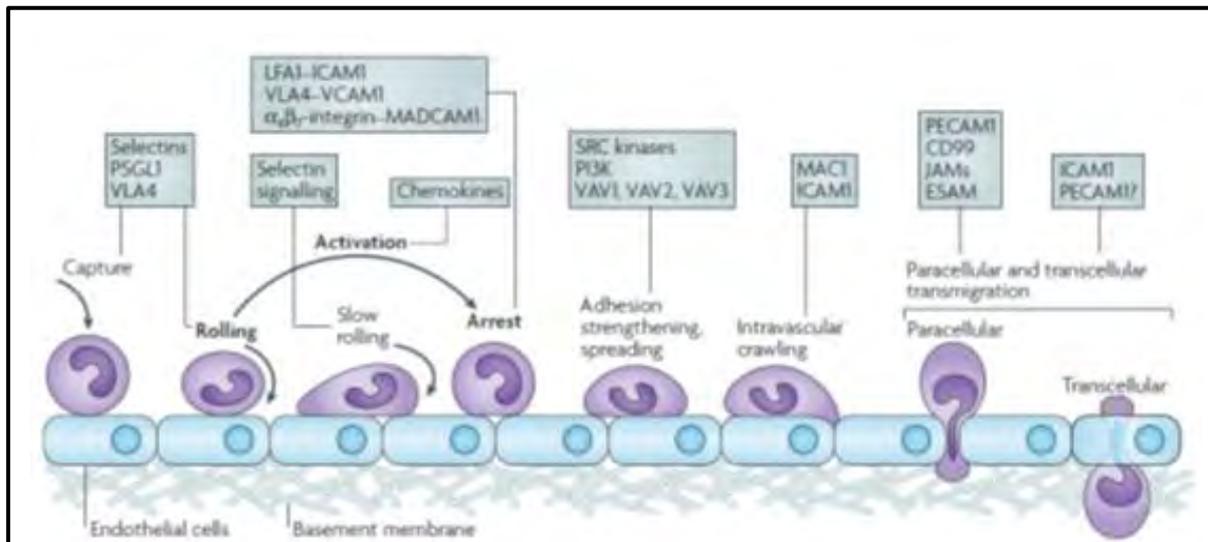


Figure 5. Modèle de l'extravasation des leucocytes. L'extravasation comporte quatre étapes successives: le roulement qui est médiée par les sélectines, l'activation qui est médiée par des chimiokines, l'adhésion qui est médiée par les intégrines (LFA-1, VLA-4), et la diapédèse. Les molécules impliquées dans chaque étape sont indiquée dans les cases. ESAM: Endothelial Cell Selective Adhesion Molecule, ICAM1: Intercellular Adhesion Molecule 1, JAM: Junctional Adhesion Molecule, LFA-1: Lymphocyte Function Associated Antigen-1 (connu également sous le nom $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ -integrin), MAC1: Macrophage Antigen 1, MADCAM1: Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1, PSGL1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand 1, PECAM1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase, VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VLA-4 : Very Late Antigen-4 (connu également sous le nom $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ -integrin). D'après [7].

a) Les lymphocytes B de la zone marginale

Au niveau de la rate, les cellules B de la ZM sont la première ligne de défense contre les agents pathogènes atteignant le sang. Elles sont de phénotype $\text{CD27}^+\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD23}^-\text{CD21}^+\text{CD1c}^+$ et pour la plupart CD5^- [10, 11, 12]. Elles représentent entre 10 et 15% du compartiment B circulant, et sont capables de répondre rapidement aux antigènes thymo-indépendants, sans l'aide des lymphocytes T, entre autres aux polysaccharides capsulaires

bactériens. Elles se développent en plasmocytes extra-folliculaires sécrétant des IgM de faible affinité pour l'antigène [2]. Les cellules B de la ZM humaines expriment une IgM portant d'hypermutations somatiques des régions variables, et elles sont capables de regagner le flux sanguin [12,13].

b) Les lymphocytes B de la zone folliculaire

Ces lymphocytes B folliculaires circulent dans les OLS (la rate, les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer et les amygdales) à la recherche de leur antigène. S'ils ne le trouvent pas, ils quittent l'OLS et gagnent la circulation sanguine. Par contre, s'ils le rencontrent, ils deviennent activés, et l'expression de leur récepteur CCR7 augmente ce qui favorise leur migration vers la zone T [14], où ils vont interagir avec les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et former ainsi un foyer primaire dans les cordons médullaires [3]. Cette interaction peut induire d'une part la différenciation des lymphocytes B folliculaires en plasmocytes extra-folliculaires de courte durée de vie [15], sécréteurs d'IgM principalement et d'autre part, la migration de certaines cellules activées forme un centre germinatif grâce à l'expression de Bcl6 (B-cell lymphoma 6). Dans le centre germinatif, les cellules B diminuent l'expression de leur Ig de surface et deviennent dans la zone sombre des centroblastes qui subissent une prolifération intense, et expriment l'enzyme AID (Activation Induced cytidine Deaminase). Elles initieront également le processus de maturation de l'affinité par le mécanisme d'hypermutation somatique des domaines variables des chaînes lourdes et légères des Ig. Par la suite, la division cellulaire s'arrête, les centroblastes augmentent l'expression de BCR à leur surface et migrent vers la zone claire du centre germinatif. Cela induit la transition vers le stade de centrocytes. Dans la zone claire, les centrocytes vont interagir avec les iccosomes, des complexes immuns présents sur les extensions des cellules dendritiques folliculaires. Les cellules portant des Ig membranaires de forte affinité pour les iccosomes seront activées, et celles qui ont une faible affinité meurent par apoptose. Ensuite, les centrocytes activés interagissent avec les cellules Th (helper) folliculaire par l'interaction CMHII-antigène peptidique et TCR et reçoivent un signal de survie de la part des cellules Th par l'intermédiaire de l'interaction CD40-CD40L. Ceci induit l'activation des Th par un signal de costimulation B7-CD28 et la sécrétion de cytokines, telles qu'IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ , TGF- β , amenant ainsi les centrocytes à proliférer et se différencier.

A cette étape, les centrocytes sont soumis au processus de la commutation de classe et gagnent la partie apicale de la zone claire où ils continueront leur différenciation vers le stade des cellules effectrices. Elles se différencient en plasmocytes sécrétant des anticorps d'isotype IgG, IgA, IgE, et en lymphocytes B mémoires qui quittent le centre germinatif et migrent vers différents tissus pour coloniser les sites drainant l'antigène et constituer un pool au niveau de la zone marginale de la rate. Ils sont capables de vivre longtemps, de répondre très rapidement à des pathogènes et d'induire une réponse immune secondaire rapide et efficace en se différenciant en plasmocytes.

Plusieurs sous populations de cellules B mémoires ont été identifiées chez l'homme sur la base de l'expression de CD27 [16]. Il existe des cellules B mémoires «switchées» de phénotype $CD27^+ IgD^- IgG/A/E^+$ [17] dérivées des réponses thymodépendantes du centre germinatif et contenant des charges élevées de SHM (Somatic Hypermutation) dans leurs gènes Ig [8], et des cellules B mémoires «non-switchées» qui comprennent les cellules B mémoires $CD27^+ IgD^- IgM^+$ et les cellules B de la zone marginale [17].

c) Les lymphocytes B anergiques

Durant le développement des lymphocytes B, 75% des cellules B générées sont autoréactives [18]: environ un tiers de ces cellules autoréactives vont subir le processus de receptor editing dans lequel le réarrangement des gènes des Ig se met en place pour produire une nouvelle chaîne légère assemblée avec la chaîne lourde des Ig existantes pour générer un BCR non autoréactif [19, 20]. A défaut, les cellules B autoréactives sont éliminées par apoptose [21]. Les clones auto-réactifs qui échappent à ces mécanismes seront tolérés par induction d'une anergie qui les rend insensibles aux stimulations antigéniques [22].

Une population de cellules anergiques a été décrite chez la souris, les cellules B T3 ou An1 de phénotype $CD93^+CD23^+IgM^{low}$. Elles ne sont pas considérées comme une population intermédiaire entre les cellules B T2 et les cellules B folliculaires matures, et résident dans les ganglions lymphatiques et le sang périphérique [22].

Chez l'homme, elles ont été identifiées comme étant une population de cellules B naïves auto-réactives de phénotype $CD19^+CD27^-CD21^{-/low}$, réfractaire à une stimulation antigénique [23, 24].

d) Les cellules B-B1

Il existe une sous-population de cellules B, appelées cellules B-B1 qui représentent environ 5% de l'ensemble des cellules B chez la souris [3]. Elles expriment les Igs de surface IgM, IgD et le marqueur CD5 [2]. Apparaissant pendant le développement fœtal et dérivant des précurseurs de la moelle osseuse [25], elles ont la capacité de s'auto-renouveler et se localisent principalement dans les cavités pleurale et péritonéale, et peu dans la rate et les ganglions lymphatiques.

Les cellules B-B1 ont été subdivisées en deux sous-populations, les B-B1a et les B-B1b : Les lymphocytes B-B1a ($B220^{\text{low}}$ $CD19^{\text{high}}$ IgM^{High} IgD^{low} $CD43^{\text{+}}$ $Mac-1^{\text{+}}$ $CD5^{\text{+}}$) [9] participent à la réponse immunitaire innée en produisant des anticorps naturels de type IgM sans stimulation antigénique [26], mais en présence de stimuli cellulaires de type LPS (Lipopolysaccharides) [27]. Les lymphocytes B-B1b se distinguent des cellules B-B1a par l'absence du marqueur CD5, et semblent être la principale source de réponse adaptative productrice d'anticorps contre les polysaccharides de la paroi cellulaire bactérienne et des Ag Thymo-indépendant de type 2 [28]. Elles peuvent subir les mécanismes de HSM (Hypermutation Somatique) et CSR (Class Switch Recombination), et produire des anticorps d'isotype IgA dans la cavité péritonéale [29]. L'existence chez l'homme d'une population B-B 1 est incertaine, et leur équivalent fonctionnel peut être représenté par les lymphocytes B mémoire de la ZM [30].

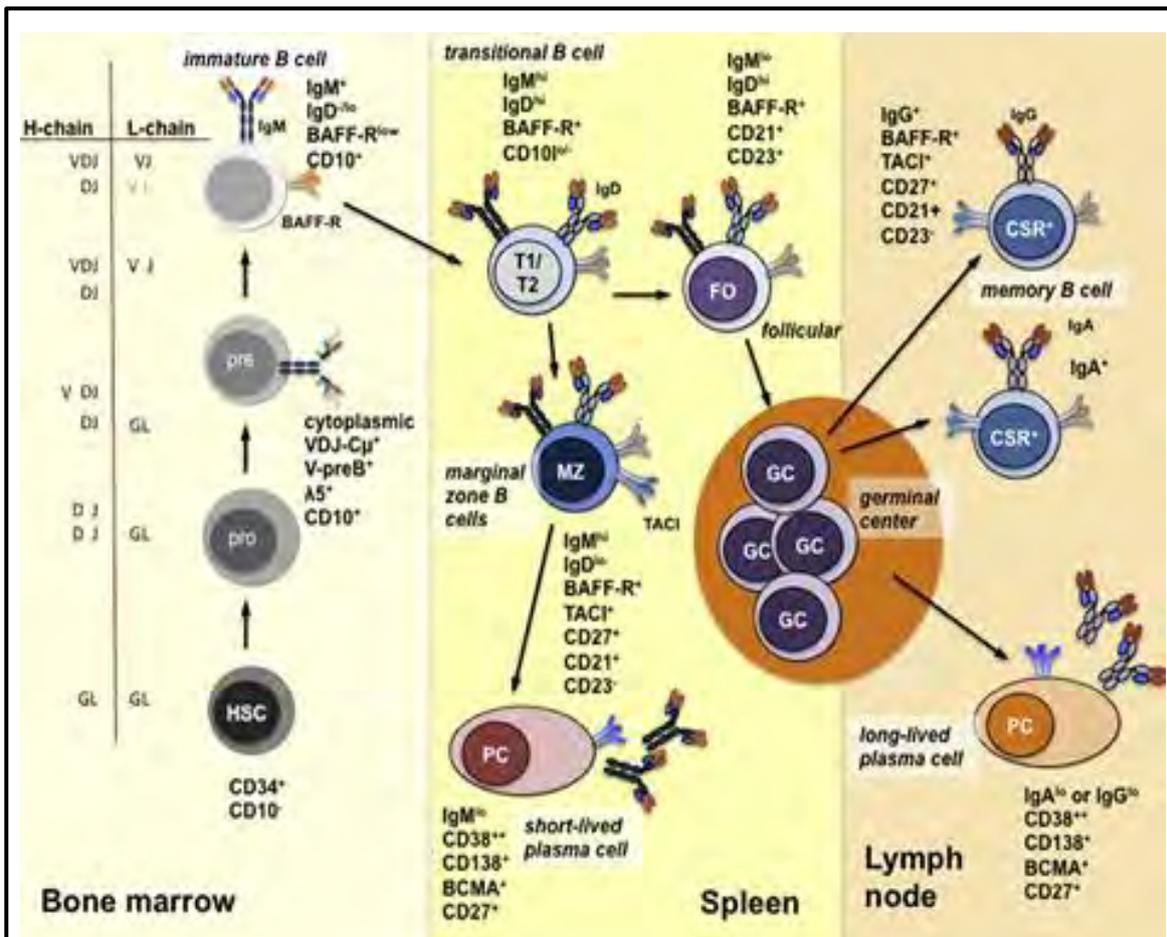


Figure 6. Développement des cellules B et sous-population des cellules B.

Les cellules B se développent dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Le locus de la chaîne lourde se réarrange en premier. Le réarrangement d'un segment du gène D_H avec celui du gène J_H se produit au stade pro-B. Le réarrangement du segment V_H a lieu au stade pré-B. Dans les cellules pré-B CD10⁺ CD19⁺, un réarrangement VDJ_H fonctionnel conduit à l'expression d'une chaîne lourde d'immunoglobuline complète associée aux polypeptides Vpré-B et λ5 composant le récepteur pré-B, qui se trouve principalement dans le cytoplasme. Le pré-BCR induit des signaux inhibant l'expression de RAG, ce qui empêche le réarrangement du second allèle de la chaîne lourde et induit la prolifération. Ensuite, les gènes RAG sont ré-exprimés pour initier le réarrangement des gènes de la chaîne légère. Quand les cellules assemblent correctement la chaîne légère, elles deviennent des cellules B immatures exprimant l'IgM, une immunoglobuline complète membranaire.

Cette IgM exprimée par les cellules B immatures modifie le profil d'expression de nombreux gènes et initie leur circulation. Les cellules B immatures entrent dans la rate comme des cellules transitionnelles, où elles reçoivent des signaux de survie et complètent leur développement en cellules B de la zone marginale, ou en cellules B folliculaires, en fonction de la spécificité de leur BCR. Au contact direct avec l'antigène, les cellules B de la zone marginale peuvent se développer en plasmocytes ayant une courte durée de vie. Les cellules B folliculaires sont activées par la reconnaissance d'un antigène, et en collaboration avec les cellules Th dans le centre germinatif se développent alors en cellules B mémoires ou en cellules plasmiques. L'activation des cellules B induit l'expression de l'enzyme AID et d'autres composantes du processus de SHM, changeant ainsi l'affinité du BCR et l'isotype (IgM à IgG, IgA ou IgE). D'après [13].

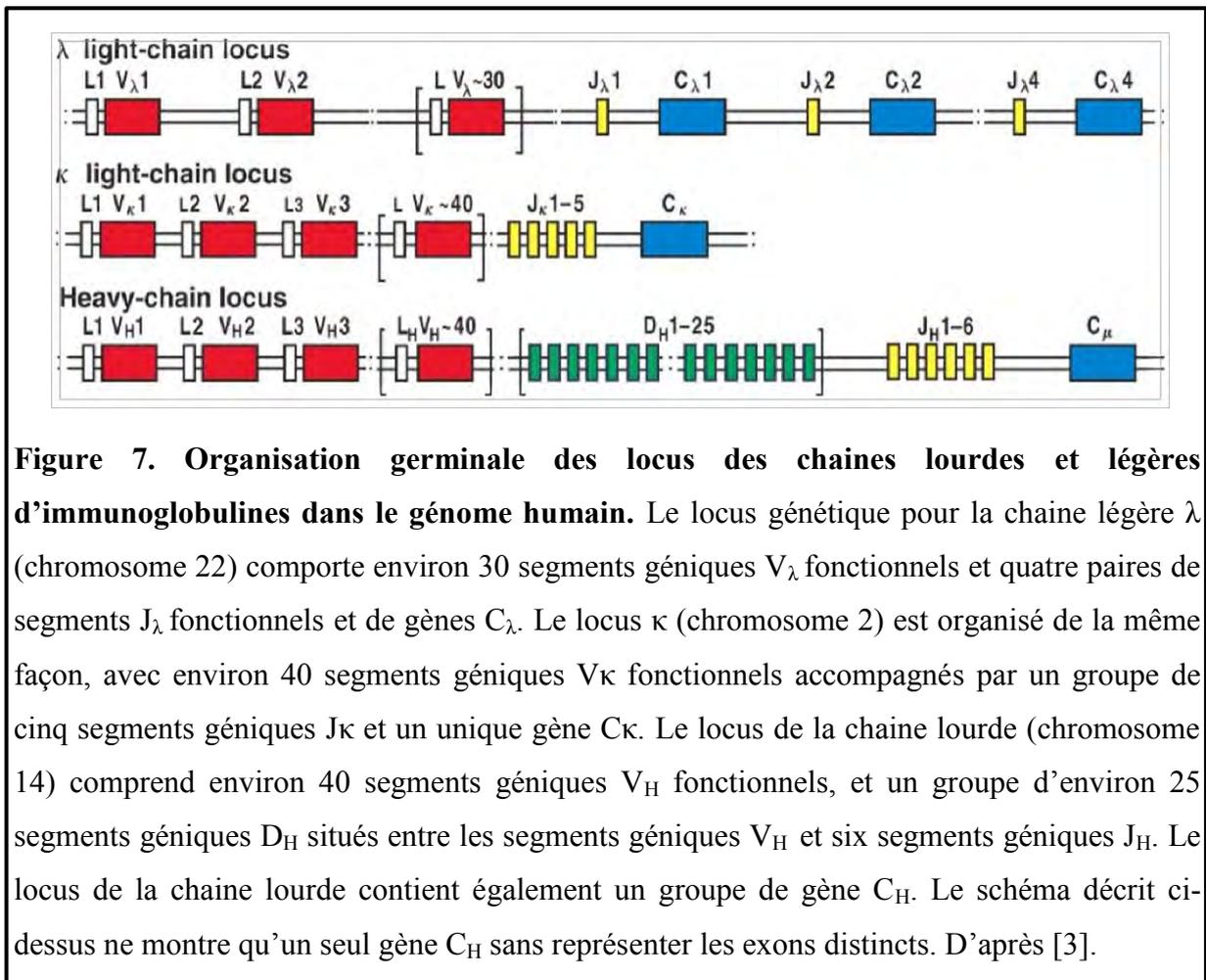
2. Recombinaison V(D)J des gènes du BCR et mécanisme de translocation chromosomique

La recombinaison VDJ est un mécanisme génétique utilisé par les cellules immunitaires pour assembler les gènes des récepteurs BCR et TCR à partir des segments géniques des régions variables V, de diversité D, et de jonction J. Ce mécanisme est initié par l'expression des enzymes recombinases RAG1 et RAG2 (Recombination Activating Genes) qui vont cibler les segments VDJ, se fixer dessus, et induire des cassures double brins dans l'ADN entre les segments des gènes et les séquences RSS (Recombination Signal Sequence).

Par la suite, elles contribuent avec le facteur NHEJ (Non Homologous End Joining) qui consiste à réparer les séquences d'ADN endommagées et à faire la ligation par des complexes protéiques [31].

2.1. Organisation des gènes des immunoglobulines et recombinaison V(D)J

Chez l'homme, les chaînes légères et lourdes des immunoglobulines sont codées par des familles multigéniques situées sur des chromosomes différents : le chromosome 14 (14q32) pour le locus de la chaîne lourde H (Heavy), le chromosome 2 (2p12) pour le locus de la chaîne κ des chaînes légères L (light) et le chromosome 22 (22q11) pour le locus de la chaîne λ des chaînes légères. Chacune de ces familles multigéniques contient plusieurs séquences codantes, appelées segments géniques, comprenant des copies multiples des segments V, J, D (VDJ pour les chaînes lourdes et VJ seulement pour les chaînes légères) et la région des gènes constants C séparées par des régions non codantes. Les gènes codant pour les Ig de la chaîne L ne possèdent pas de segment D. Au cours du développement des lymphocytes B, ces segments géniques sont réarrangés, et réunis pour former des gènes fonctionnels des Igs (Figure 7).



La recombinaison V(D) J de gènes des Igs est guidée par des séquences d'ADN non codantes et conservées, adjacentes aux sites de recombinaison appelées RSS, constituées de motifs consensus très conservés comportant un heptamère, et un nonamère de nucléotides séparés par une séquence *espaceur* peu conservée de longueur de 12 à 23 pnb. Ces motifs sont présents en 3' des segments V, en 5' des régions J et de part et d'autre des segments D [3] (Figure 8).

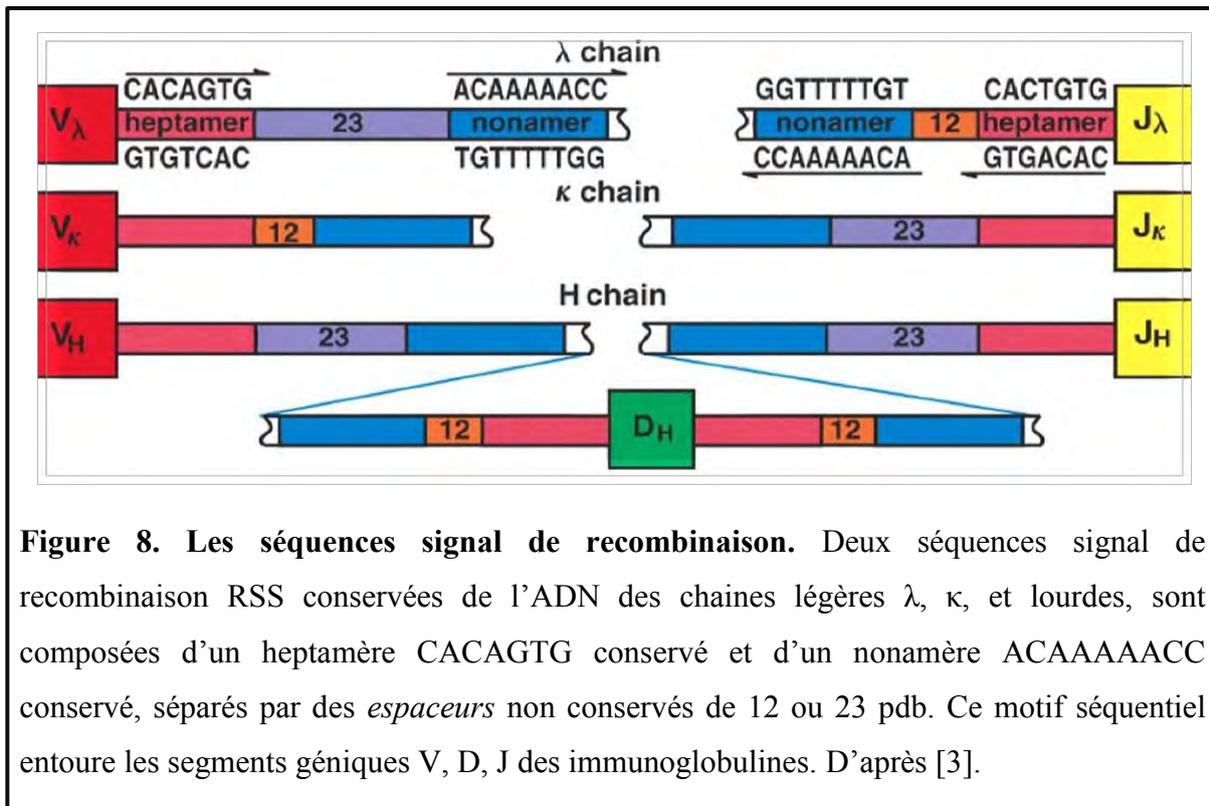
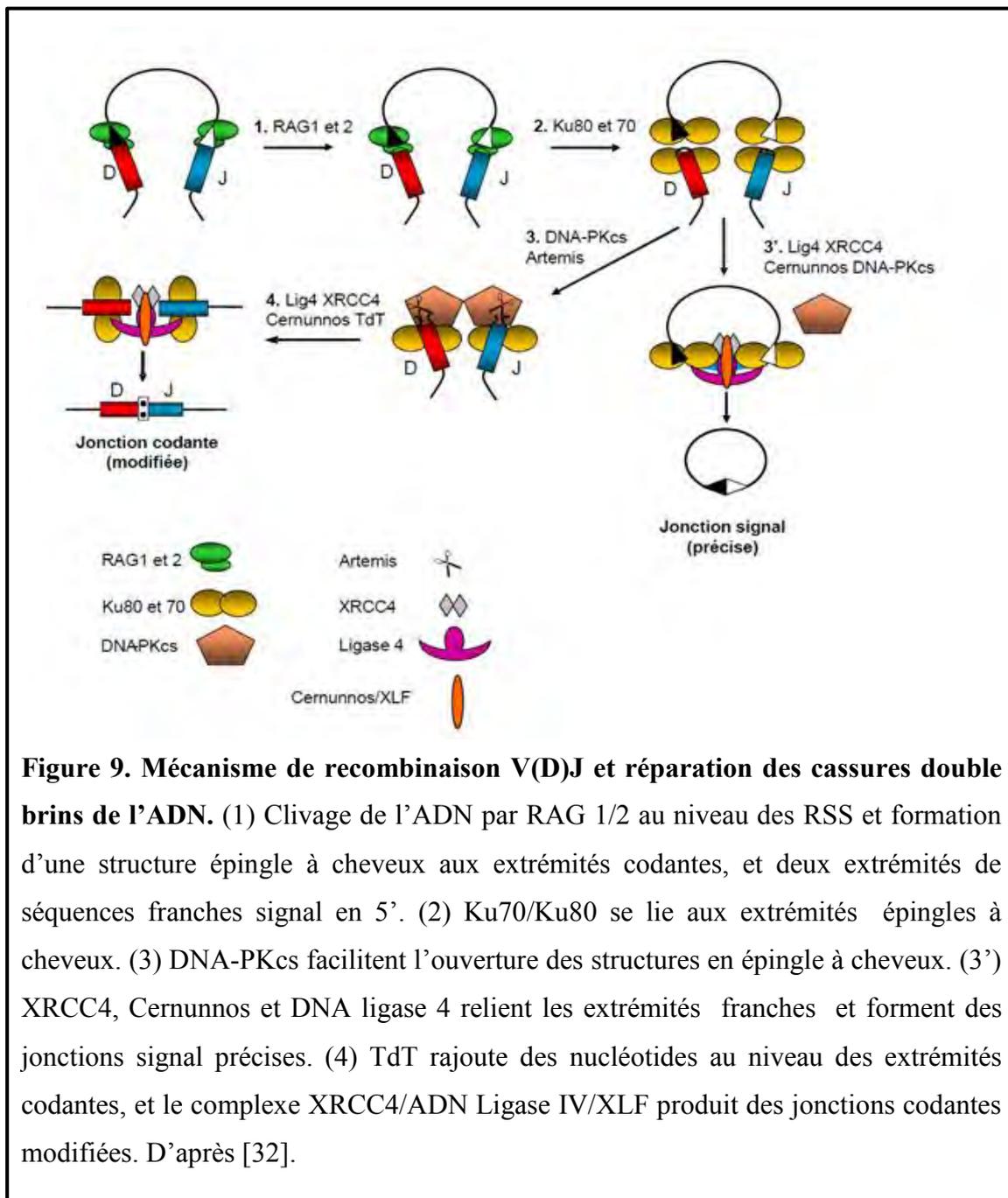


Figure 8. Les séquences signal de recombinaison. Deux séquences signal de recombinaison RSS conservées de l'ADN des chaînes légères λ , κ , et lourdes, sont composées d'un heptamère CACAGTG conservé et d'un nonamère ACAAAAACC conservé, séparés par des *espaceurs* non conservés de 12 ou 23 pnb. Ce motif séquentiel entoure les segments géniques V, D, J des immunoglobulines. D'après [3].

La combinaison des segments V(D) J qui s'effectue par un clivage de l'ADN au niveau des jonctions des RSS et les séquences codantes, est catalysée par l'enzyme recombinaise RAG1 et RAG 2, dans laquelle deux séquences signal RSS et les séquences codantes adjacentes sont amenées à proximité. En effet, Cette coupure de l'ADN double brins produit une boucle d'excision formée par la jonction des séquences RSS qui seront par la suite éliminées. La boucle comprend la séquence d'ADN intermédiaire entre les segments réarrangés. La cassure produit à l'extrémité 3' de l'ADN coupé de chacun des segments un groupement hydroxyle OH entre la fin de la partie codante du segment et l'heptamère de la

RSS [2]. Ensuite, la recombinaise RAG va catalyser une réaction de transestérisation: mise en place d'une liaison phosphodiester unissant l'extrémité 3'-OH libre du brin d'ADN des séquences codantes au brin d'ADN opposé formant une structure d'épingle à cheveux aux extrémités codantes des gènes qui réarrangent, et deux extrémités de séquence RSS franches phosphorylées en 5' [32].

L'étape suivante consiste à former des jonctions des extrémités RSS et des jonctions des extrémités codantes. Cela comprend la voie NHEJ, qui représente la voie ubiquitaire de réparation des cassures double brins de l'ADN. Elle fait intervenir plusieurs facteurs protéiques essentiels, comme Ku70/Ku80 qui se fixe aux extrémités en épingle à cheveux, et recrute la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK). Par la suite le complexe recrute et active le facteur Artémis, qui par son activité endonucléasique ouvre l'épingle à cheveux de l'ADN dans un site aléatoire pour fournir une extrémité libre constituée d'un simple brin d'ADN étendu. Ensuite, la TdT (Terminal désoxynucléotidyl Transférase) rajoute des nucléotides au hasard à l'extrémité des séquences codantes. Finalement, la réparation et la ligation sont assurées par le complexe XRCC4/ADN Ligase IV/XLF, aboutissant à la jonction des séquences codantes et signal [32] (Figure 9).



2.2. Hypermutation somatique

L'hypermutation somatique est un mécanisme de diversification du répertoire des immunoglobulines des lymphocytes B. Elle se développe dans les centres germinatifs des OLS durant la phase d'expansion clonale de cellules B, en introduisant des mutations ponctuelles dans les régions variables des gènes de la chaîne lourde et légère des Igs; ce qui modifie le site de reconnaissance de l'antigène sur le BCR et augmente son affinité. Ce mécanisme se produit à une fréquence de l'ordre de 10^{-3} par paire de bases et par génération. Les mutations induites s'installent à environ 150 pb en aval du promoteur des gènes V des Igs, et s'étendent sur une distance de 1 à 2 kb, cela se traduit par la mutation d'un maximum de 20% des nucléotides sur un segment de 1 à 2 kb qui inclut l'exon VDJ [33], avec une diminution de la fréquence des mutations au niveau de l'intron J-C [34].

L'hypermutation somatique se produit plus fréquemment par mutation de transition que par transversion. Une transition est le remplacement d'une purine par une autre purine ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine. Une transversion est le remplacement d'une base purique par une base pyrimidique ou l'inverse. Toutes les quatre bases peuvent être ciblées pour des mutations. Chez l'homme et la souris, les paires C:G, et A:T sont ciblées approximativement selon la même fréquence [35]. Ces mutations interviennent de façon non aléatoire. De ce fait, il existe des «points chauds» et des «points froids» de mutation. La plupart des points chauds mutationnels au niveau des paires C:G se produisent au sein d'un consensus de WRCY (W = A/T, R = A/G, et Y = C/T) [35]. La majorité de ces motifs sont situés dans les régions hypervariables appelées CDR (Complementary Determining Regions) impliquées dans la liaison à l'antigène et de maturation de l'affinité pour l'antigène [34].

Le mécanisme d'hypermutation somatique est initié par l'enzyme AID, une cytidine-désaminase, qui catalyse la conversion des cytosines (C) en uracile (U) sur un des deux brins de l'ADN, et par conséquent transforme les paires C:G en mésappariement U:G. Suite à la désamination induite par l'AID, le mésappariement U:G sera pris en charge par le système de réparation de mésappariement de l'ADN (Figure 10) [36]:

- 1) Lors de la réplication de la lésion UG, le résidu uracile U est traité comme un résidu thymine T par les ADN polymérases, ce qui donne lieu à une mutation de transition au niveau des paires CG (C en T et G en A). Cependant, le résidu U peut être reconnu et

excisé par l'uracile-ADN glycosylase (UNG), formant ainsi un site abasique qui sera répliqué. Il en résultera des mutations de transversion au niveau des paires CG (remplacement des paires CG par les paires AT ou, avec GC) et des mutations de transition (remplacement des paires CG par une paire TA). Le site abasique peut être le substrat pour une endonucléase apurinique /apyrimidinique (APE), qui peut cliver l'ADN et permettra la réparation médiée par la voie BER (short-patch Base Excision Repair), qui consiste à remplacer le site excisé par l'ajout de nucléotides par l'intermédiaire de l'ADN-polymérase error-prone, ce qui conduit à l'insertion des mutations de transition ou de transversion.

- 2) Successivement, les lésions U:G peuvent être reconnues par le système de réparation des mésappariements nucléotidiques MMR (Mismatch Repair), qui excise le brin d'ADN contenant l'uracile, et pendant la synthèse d'un nouveau brin d'ADN par l'ADN polymérase error-prone, que l'insertion des mutations de transition ou de transversion est produite au niveau des bases A:T situées à proximité des base C:G.

Il existe aussi une voie annexe Long-patch BER qui peut être également une source de mutations au niveau des bases A:T. Toutes ces mutations induites dans les régions variables V des Igs permettent de renforcer l'affinité du BCR pour l'antigène.

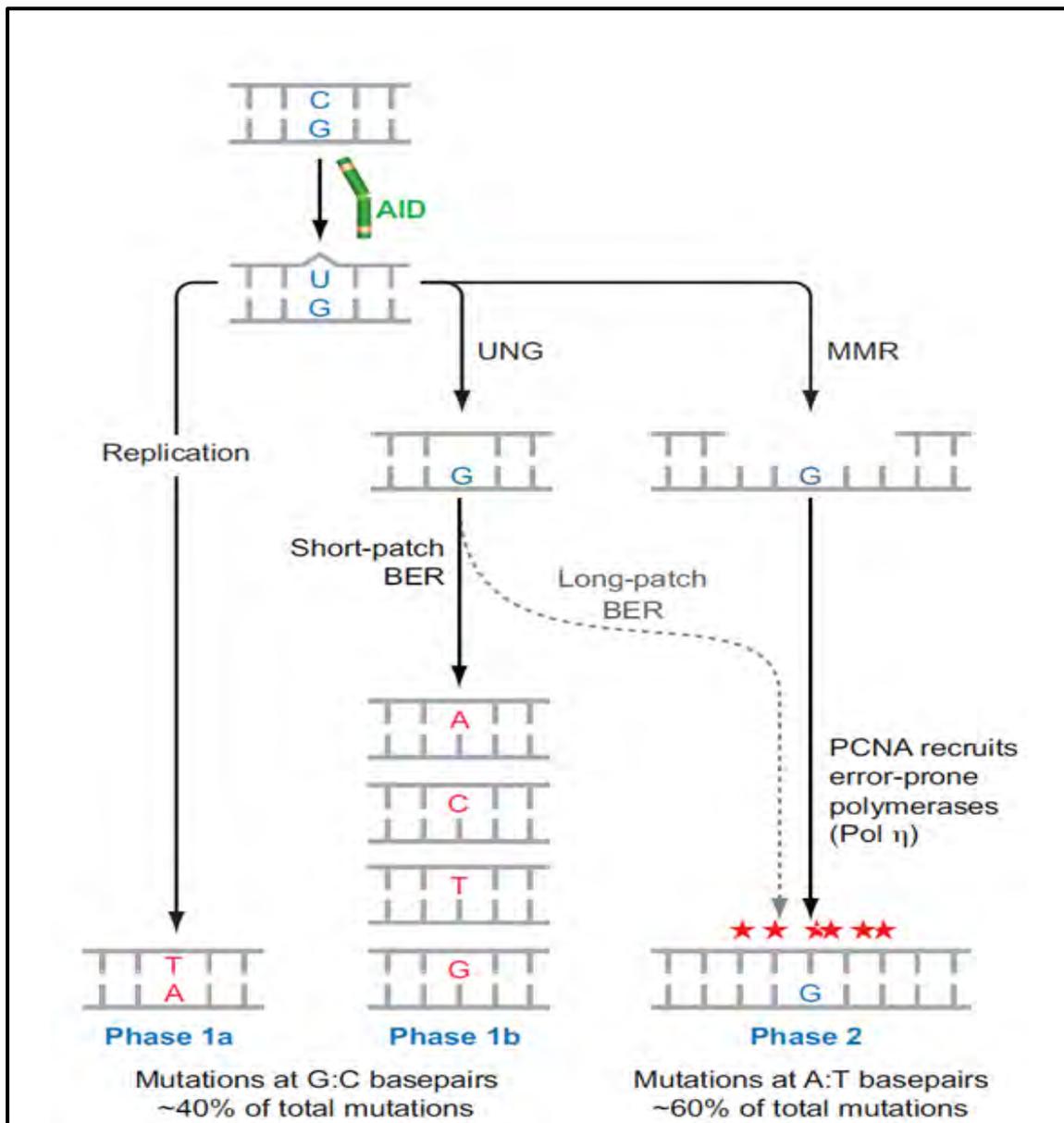


Figure 10. Mécanisme de la désamination de l'ADN lors de l'hypermutation somatique. La cytidine désaminase (AID) induit la déamination des cytosines (C) en uracile (U). Le processus de réparation du mésappariement (U) fait intervenir plusieurs voies (réplication infidèle, BER, et MMR), et aboutissant à l'introduction de mutations ponctuelles au niveau des régions variables des Igs. D'après [36].

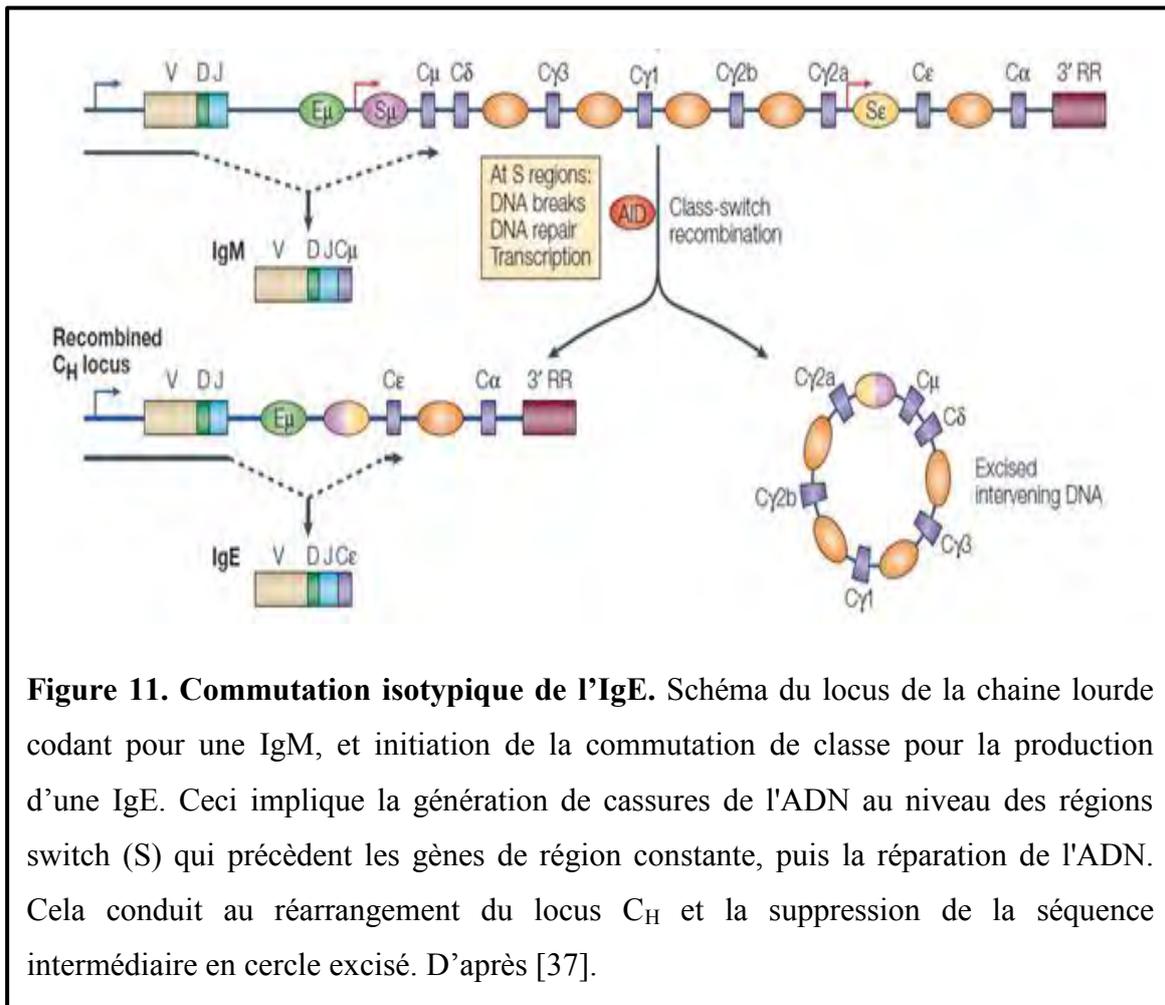
2.3. Commutation de classe

Les immunoglobulines de type IgM produites au cours d'une réponse immunitaire primaire ont presque toujours une faible affinité pour l'antigène, et ne peuvent pas donc accomplir toutes les fonctions effectrices. Aussi, les cellules B doivent produire et sécréter des anticorps d'affinité élevée et de différentes classes pour neutraliser efficacement les agents pathogènes. Suite à une stimulation antigénique, les lymphocytes B entrent en contact avec les lymphocytes Th activés, et sous l'influence des cytokines sécrétées à l'issue du contact intercellulaire par les cellules Th, se mettent à proliférer et se différencier. A ce stade, les gènes de la chaîne lourde d'Ig subissent un mécanisme de remaniement somatique de la partie constante, appelé commutation de classe CSR (Classe Switch Recombination), qui permet aux cellules B à produire des anticorps d'isotypes différents: IgG, IgA ou IgE qui diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques, fonctions biologiques, et les propriétés effectrices des Fc des régions constantes, mais gardent la même spécificité antigénique. Ce processus est primordial pour la diversité fonctionnelle des réponses anticorps (immunoglobuline sécrétée).

La partie constante du gène de la chaîne lourde d'Ig est divisée en plusieurs segments géniques codant pour les différents isotypes que sont, de 5' en 3', C μ pour l'IgM, C δ pour l'IgD, C γ 3 pour IgG3, C γ 1 pour IgG1, C γ 2b pour IgG2b, C γ 2a pour IgG2a, C ϵ pour IgE et C α pour IgA. La commutation de classe est guidée par des séquences S (switch) qui se trouvent en amont de chaque gène de région constante, à l'exception de C δ . Les régions S sont constituées de séquences répétées riches en bases G de 10 à 80 pdb et leur taille totale peut varier entre 1kb et 12 kb [37].

Le mécanisme de la commutation de classe implique la recombinaison intrachromosomique qui se traduit par le remplacement de la région constante d'IgH C μ et C δ par un autre segment de la région constante située en aval, et l'élimination des autres segments par une boucle d'excision, ce qui conduit à la génération des cassures d'ADN au niveau des séquences S précédant chaque segment de la région constante [38] (Figure 11). Cela est médié par l'enzyme AID qui induit une déamination de C en U, et créant un mésappariement. Ensuite, ce mésappariement sera excisé par la glycosylase UNG de la voie BER, et produisant un site abasique. Alors, intervient l'endonucléase APE qui va cliver l'ADN, et générer des cassures simple brins pour permettre la réparation des sites abasiques. Le mécanisme de réparation de mésappariement prend le relais pour convertir les cassures simple brins en cassures doubles brins, qui implique l'interpellation de la machinerie du

système MMR. Les cassures doubles brins générées seront par la suite réparées par le système NHEJ [39], ce qui aboutit à la ligature des brins d'ADN, et la jonction des séquences S qui précèdent le segment génique de la région constante réarrangée.



Conclusion

Les étapes successives de prolifération et d'expansion clonale de cellules B conduisent à la génération de lymphocytes B matures, exprimant des Igs de surface et sécrétées non autoréactives, possédant de haute affinité avec l'antigène, et ayant subi la recombinaison V(D)J, l'hypermutation somatique, et la commutation de classe. Ces derniers constituent les principaux mécanismes de diversification du répertoire immunitaire, et leurs anomalies

présentent un facteur de risque pour le développement de cellules B altérées favorisant l'évolution de néoplasme; par la genèse des remaniements chromosomiques aberrants comme les translocations chromosomiques qui induisent un développement pathologique de lymphocytes B, et l'émergence de lymphome ou de leucémie.

3. Lymphomagenèse

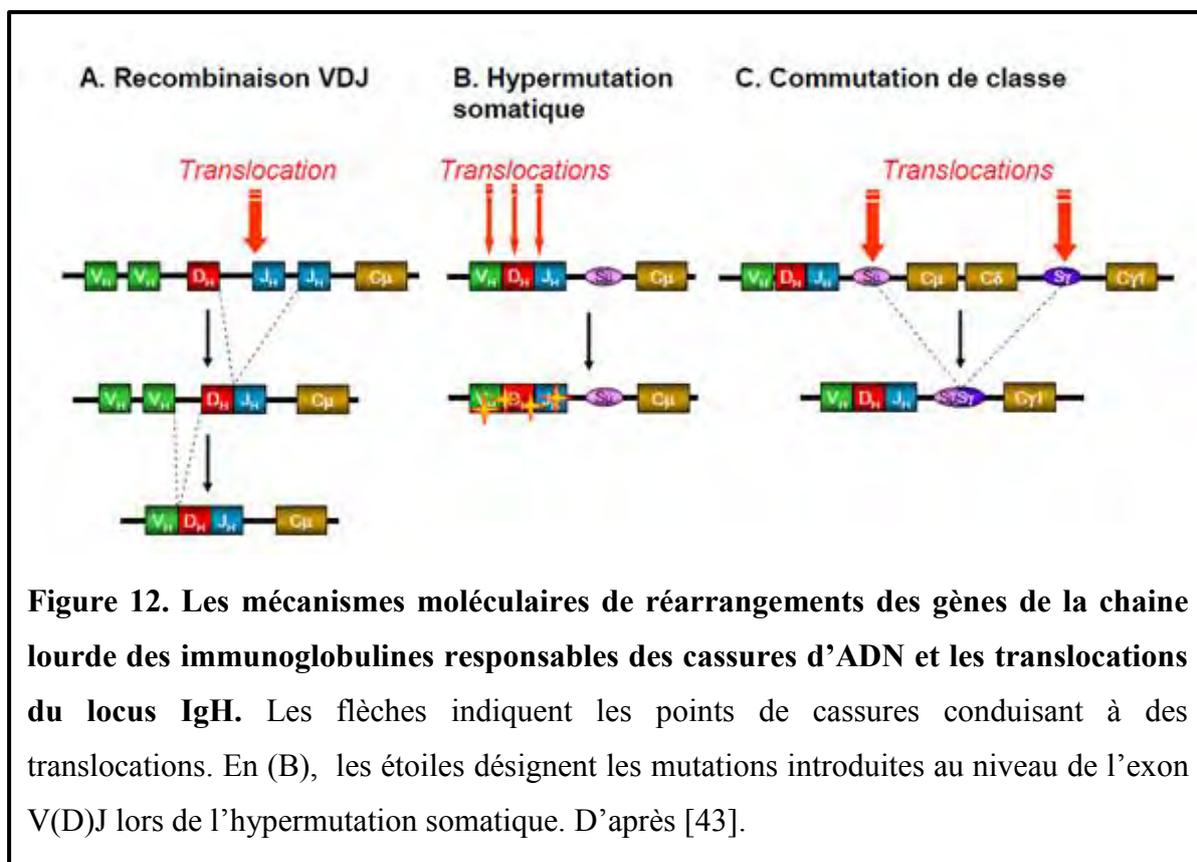
La différenciation des lymphocytes B normaux est en quelque sorte un désastre imminent car les cellules B mettent l'intégrité de leur génome en danger. Tout d'abord, lors de la formation et la révision de leur récepteur. Un second événement potentiellement dangereux est la réponse à l'antigène, où le mécanisme de recombinaison V(D)J des Igs survient dans la moelle osseuse, et consiste en un processus moléculaire à risque car il implique la génération des cassures double brin de l'ADN qui sont lancées par RAG et réparées par le système NHEJ. Il arrive que ces cassures soient réparées de façon aberrante conduisant à des translocations chromosomiques. Dans le centre germinatif, deux processus moléculaires de réarrangement de l'ADN; l'hypermutation somatique, et la commutation de classe d'immunoglobuline génèrent des cassures de l'ADN, et par conséquent pourraient également prédisposer aux translocations chromosomiques [40].

Les translocations chromosomiques réciproques altérant le locus des gènes des Igs et des proto-oncogènes sont l'une des caractéristiques des lymphomes à cellules B matures [41,42], et entraînent habituellement une expression dérégulée du proto-oncogène mis sous le contrôle d'une séquence activatrice (*enhancer*) des Igs. Trois types de points de cassures d'ADN qui mènent à l'apparition des translocations (Figure 12) [43] peuvent être distingués dans le locus d'Igs :

- Des points de cassures qui sont directement adjacents aux segments géniques $J_H D_H$ du locus de la chaîne lourde (H) et la translocation produite résulte des erreurs de la recombinaison V(D)J au cours du développement des cellules B dans la moelle osseuse [42,44]. Exemple: la translocation Bcl2-IgH, associée au lymphome folliculaire.

- Des points de cassures qui se produisent à l'intérieur ou au voisinage du segment V(D)J réarrangé. La translocation provient du produit du processus de l'hypermutation somatique [42]. Exemple: le cas de la translocation c-myc-IgH dans le lymphome de Burkitt.
- Des points de cassures trouvés au niveau des séquences switch «S» survenant au cours du processus de la commutation de classe [42]. Exemple: le cas de la translocation de c-maf, et des gènes de la cycline D1 et D3 dans le myélome multiple.

Les translocations chromosomiques altérant des loci d'Igs constituent les principaux mécanismes qui déclenchent la lymphomagenèse; cependant, de nombreux autres évènements existent qui peuvent être impliqués. C'est le cas des mutations des gènes suppresseurs de tumeur, d'amplification génomique, d'autres translocations chromosomiques n'impliquant pas les loci d'Igs, et des virus comme l'EBV (Epstein-Barr Virus) qui peuvent aussi entraîner la transformation maligne des lymphocytes B [43].



4. Origine cellulaire des lymphomes B

Chaque stade de différenciation des cellules B est caractérisé par une structure particulière du BCR et un profil distinct d'expression des marqueurs de différenciation. Ces processus se déroulent souvent dans des structures histologiques spécifiques et leurs analyses permettent de déterminer l'origine cellulaire des divers lymphomes B humains (Tableau 1) [45,46]. Les cellules B malignes semblent être arrêtées à un stade particulier de différenciation, ce qui reflète leur origine [47]. En effet, la plupart des lymphomes B est dérivée de cellules du centre germinatif ou de cellules post-centre germinatif (Figure 13).

Tableau 1. Les lymphomes B humains matures.

Lymphoma subtype	Immuno-phenotype	Diagnostic molecular features	Etiology	Frequency	Clinical features
 Mantle cell lymphoma (MCL)	CD20, CD5, Cyclin D1, CD10 ⁻ , CD23 ⁻	Cyclin D1 t(11;14) (>95%)	Unknown	7%	Median age 55 Nodal, intestinal, blood, bone marrow Survival 50% at ~3-5 years Curable <10%
 Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL)	CD79a, CD23, CD5, CD20 (weak), CD22 (weak)	ZAP70 (50%)	Unknown; rare familial cases	8%	Median age 65 Blood, bone marrow, spleen, nodal (SLL) Survival 50% at 7 years Curable <10%
 Follicular lymphoma (FL)	CD20, CD10, BCL2, BCL6	BCL2 t(14;18) (>80%)	Unknown	25%	Median age 57 Nodal and bone marrow Survival 73% at 10 years Curable <20%
 Burkitt lymphoma (BL)	CD20, CD10, BCL6	MYC t(8;14), CD10, Ki67; gene expression profiling	EBV (Endemic: 100%, sporadic: 30%); immunodeficiency	<1%	Median age 11 (children), 24 (adults) Extranodal > nodal Survival >80% at 5 years Curable >80%
 Germinal center B cell-like diffuse large B cell lymphoma (GCB DLBCL)	CD20, CD10, BCL6, GCET, LMO2, IRF4 ⁻ , FOXP1 ⁻	Gene expression profiling	Unknown	17%	Median age 61 Nodal and extranodal Survival ~60% at 5 years Curable >50%
 Activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma (ABC DLBCL)	CD20, IRF4, FOXP1, CD10 ⁻ , BCL6 ⁻ , GCET1 ⁻ , LMO2 ⁻	Gene expression profiling	Unknown	15%	Median age 66 Nodal and extranodal Survival ~40% at 5 years Curable >30%
 Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALT)	CD20, CD79a, CD5 ⁻ , CD10 ⁻ , CD23 ⁻	AP12-MALT1 t(11;18) (60%)	<i>H. pylori</i> ; autoimmune disease	9%	Median age 60 Extranodal and bone marrow (20%) Survival >80% at 5 years Curable >50%
 Hairy cell leukemia (HCL)	CD20, CD22, CD79a	BRAF V600E	Unknown	<1%	Median age 55 Spleen, liver, blood Survival >75% at 5 years Curable <30%
 Primary mediastinal B cell lymphoma (PMBL)	CD30, CD20, CD10 ⁻	Gene expression profiling	Unknown	6%	Median age 33 Mediastinal, thoracic > nodal Survival >60% at 5 years Curable >60%
 Hodgkin lymphoma (HL)	CD30, CD15, CD20 ⁻	None	Mononucleosis (EBV); rare familial cases	11%	Bimodal median age: 25 and 60 years Mediastinal, nodal Survival 85% at 15 years Curable >80%

Les pourcentages désignent les fréquences en Europe et en Amérique du Nord. D'après [43].

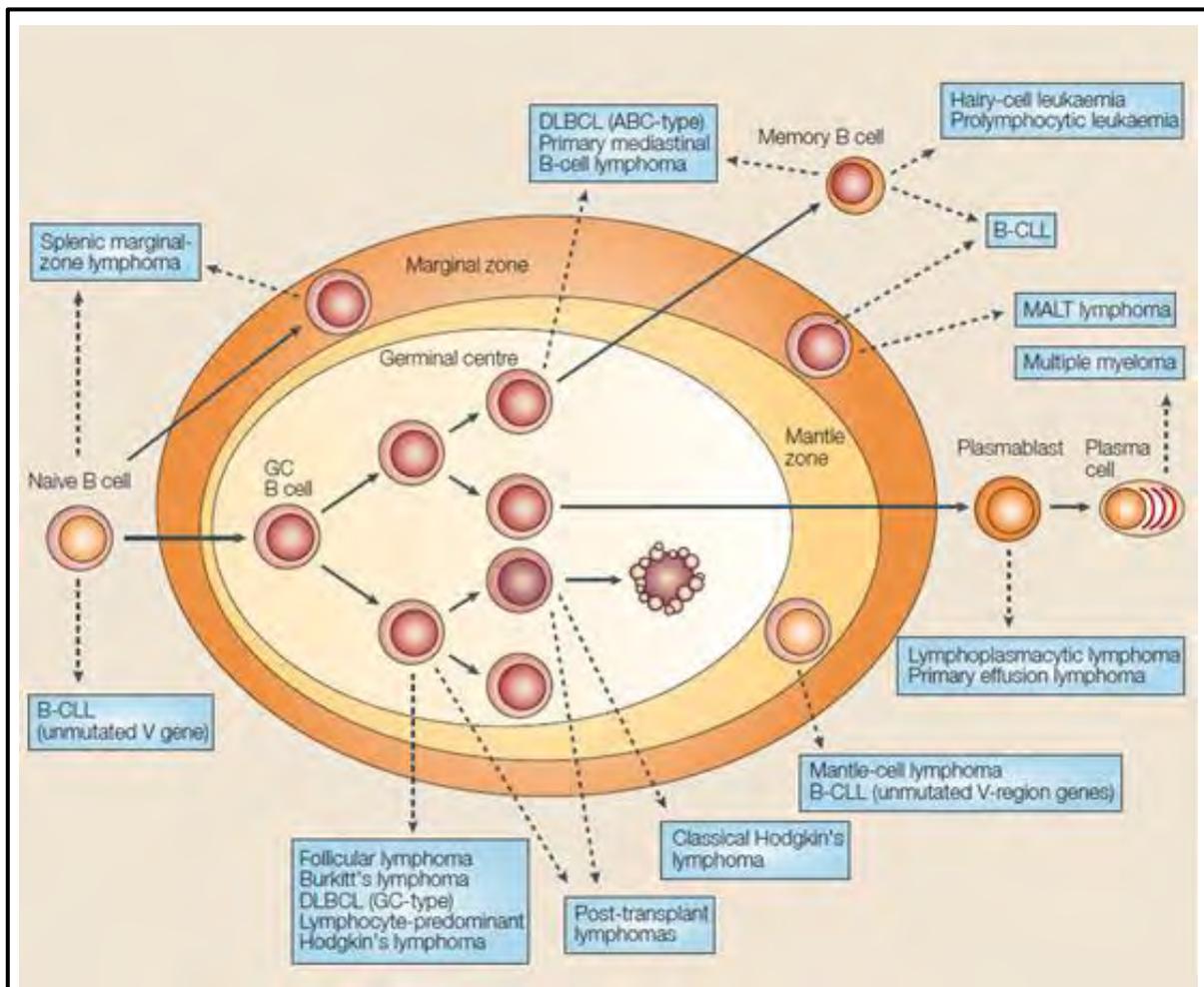


Figure 13. Origine cellulaire des lymphomes B. Les cellules B lymphomateuses sont désignées à partir de leurs homologues de cellules B saines. La plupart des lymphomes sont dérivés des cellules B qui sont passées par le centre germinatif, ce qui indique son rôle dans la pathogenèse de lymphome. Les flèches continues décrivent les étapes de différenciation des cellules B saines et leur progression dans le centre germinatif. Les flèches en pointillé désignent les différentes pathologies de lymphomes, et l'origine cellulaire correspondante. D'après [42].

Plusieurs types de lymphomes B humains dérivent des cellules B du centre germinatif, y compris le lymphome folliculaire qui sera discuté dans le chapitre suivant.

Chapitre II : Lymphome folliculaire

II. Lymphome folliculaire

1. Généralité sur le lymphome folliculaire

Le lymphome folliculaire est le second type le plus fréquent de lymphome non hodgkinien (LNH) de bas grade de malignité [48], avec une survie médiane sans plateau de 8 à 12 ans [49]. Il représente 30 à 40% des hémopathies lymphoïdes B avec une incidence de 4 pour 100 000 habitants par an en France [50,51].

L'incidence des LF a augmenté de 4,6% de 1985 à 1992 en Europe [52]. Son évolution suit une succession de réponses aux traitements et de rechutes avec une durée médiane de survie de 4 à 5 ans après la première rechute. La survie globale estimée à 10 ans est de 49% [51]. Les facteurs environnementaux comme l'exposition aux pesticides, solvants et benzène, ainsi que le tabagisme, ont été suggérés comme facteurs de risque dans les études épidémiologiques [53,54].

La stadification d'Ann Arbor du lymphome folliculaire est déterminée en fonction du nombre et de la localisation des atteintes ganglionnaires [55,56]:

- **Stade I:** atteinte d'une seule aire ganglionnaire sus ou sous diaphragmatique.
- **Stade II:** atteinte de deux ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme.
- **Stade III:** atteinte ganglionnaire de part et d'autre du diaphragme
- **Stade IV:** atteinte viscérale à distance d'un groupe ganglionnaire (médullaire, hépatique, pulmonaire...).

Le stade d'Ann Arbor est complété d'une lettre:

- **A :** en l'absence de signes généraux d'évolutivité tels que la fièvre, l'hypersudation nocturne et l'amaigrissement de plus de 10 %.
- **B :** si présence d'au moins un signe général.
- **E :** si atteinte extra-ganglionnaire contiguë à une atteinte ganglionnaire.

La réponse au traitement et la survie dépendent de plusieurs facteurs de mauvais pronostic : L'âge supérieur à 60 ans, la dissémination de la maladie selon la classification d'Ann Arbor, envahissement de plus de 4 sites ganglionnaires ou plus, un taux sérique du LDH (lactate déshydrogénase) supérieur à la normale (190-390 UI/L), un taux d'hémoglobine inférieur à 10

g/L. Ces facteurs déterminent l'index pronostic FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index). En utilisant cet indice, trois groupes à risque ont été caractérisés : le groupe à faible risque (facteur 0-1), celui à risque intermédiaire (facteur 2) et le groupe à risque élevé (facteur ≥ 3) [51], la survie à 10 ans étant de 70.7%, 50.9% et 35.5% respectivement.

D'autres facteurs ont également été associés à une survie plus courte: un taux de β_2 -microglobulinémie supérieur à 3 mg/L, un taux d'albuminémie inférieur à 35 g/L et l'absence de réponse au traitement [49].

L'âge médian de diagnostic est compris entre 55 et 60 ans, avec une atteinte diffuse dans deux tiers des cas, dont 50% d'atteinte médullaire [54,57, 58]. La transformation vers un sous-type histologique agressif peut se produire à n'importe quel stade de la maladie avec une incidence de 20-70% [58-61]. Le plus souvent, le LF peut se transformer en lymphome diffus à grandes cellules B à variante centroblastique ou immunoblastique [62-64], et plus rarement en lymphomes de Burkitt [63, 65] ou lymphoblastique [66].

2. Phénotype des cellules folliculaires lymphomateuses

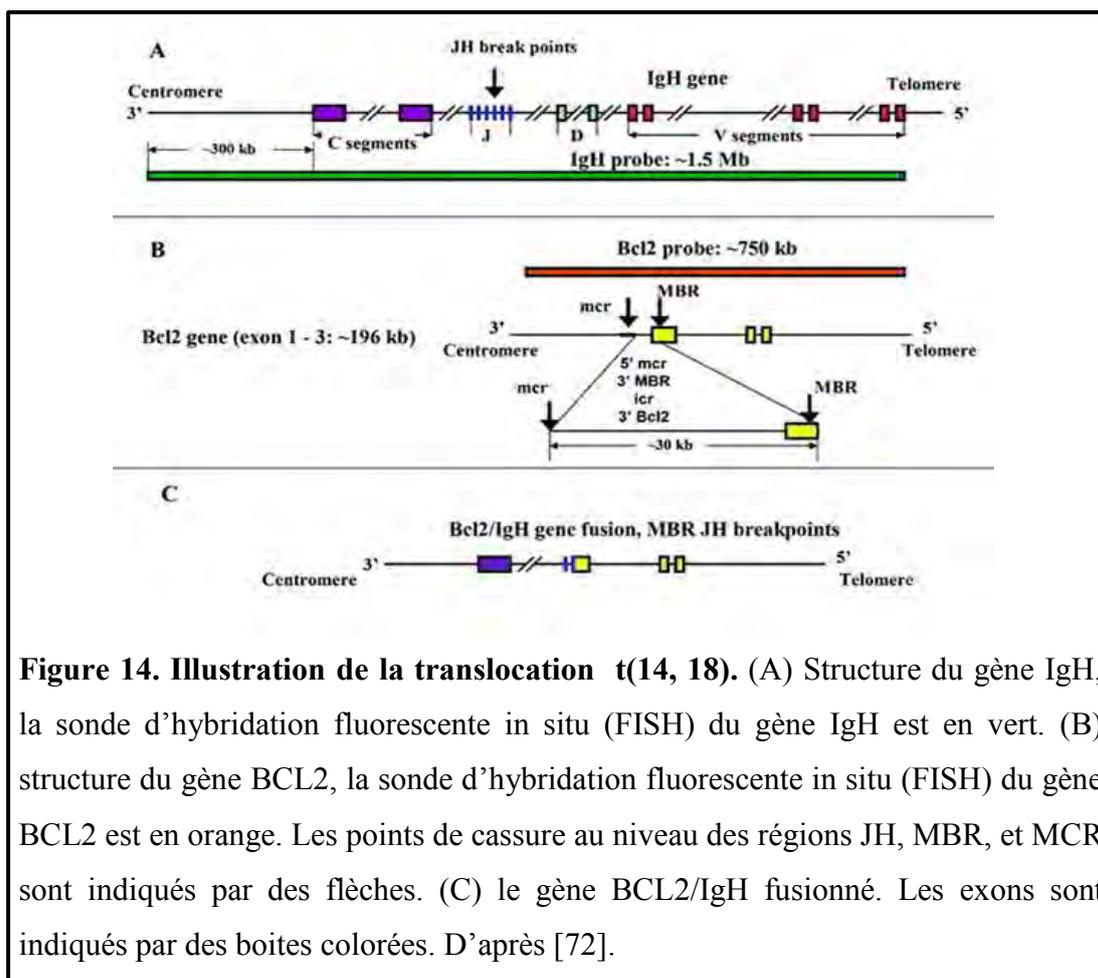
Les cellules de LF sont dérivées des cellules du centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires. Les follicules néoplasiques contiennent des centroblastes, des centrocytes tumorales ainsi que des cellules T non tumorales, des cellules dendritiques folliculaires, et quelques macrophages [67]. Les gènes V d'Ig des cellules du LF présentent des mutations somatiques, similaires à celles observées dans les cellules B mémoires normales ayant rencontré un antigène [68]. Le processus de commutation de classe qui prend place au stade centrocyte du centre germinatif, a été décrit dans le LF. Les cellules du LF peuvent exprimer l'isotype IgM, ou IgG, et certaines sous populations expriment à la fois les deux isotypes, ce qui suggère la diversité clonale de certains cas de LF [67].

Les cellules tumorales du LF sont de phénotype de cellules B des centres germinatifs normaux, elles expriment les marqueurs de surface associés aux cellules B : CD10, CD19, CD20, CD 22, CD24, CD79a, CD9 et Bcl-6 avec un défaut d'expression des marqueurs CD5 CD23, CD11c [67], et les Igs de surface avec une prédominance de l'isotype IgM, IgD de 50% à 60%, 40% IgG, et IgA très rare [69]. La surexpression du proto-oncogène BCL-2 résultant de la translocation t(14;18), est une caractéristique des cellules folliculaires

lymphomateuses [70]. Des aberrations chromosomiques additionnelles affectant des gènes comme P53, MDM2, FCGR2B, REL, BCL6, P73, CDK4, MYC, PTEN ont été identifiées dans les LF, contribuant à la progression de la pathologie, ainsi qu'à l'évolution clinique [71].

3. Pathogenèse et mécanisme de la translocation t(14,18)

La translocation t(14, 18) (q32; q21) est l'événement tumoral primaire dans la plupart des lymphomes folliculaires. Il s'agit d'une translocation réciproque et équilibrée avec échange de matériel génétique entre les chromosomes 14 et 18. Au niveau moléculaire, cette translocation juxtapose le proto-oncogène BCL2 situé en bande 18q21 sur le chromosome 18, à une séquence régulatrice (*enhancer*) du gène de la chaîne lourde des Igs situé en 14q32 sur le chromosome 14, aboutissant à la surexpression du gène et de la protéine Bcl2 (Figure 14).



Les points de cassure sur le 14q32 sont localisés dans la région fonctionnelle du gène de la chaîne lourde (JH) (Figure 14) Tandis que les points de cassure en 18q21 sont regroupés dans deux petites régions chromosomiques : le Major Break point Region (MBR) (Figure 14), qui est touché dans 70% des cas portant la translocation t(14, 18) [73], et la Minor Cluster Region (MCR) (Figure 14), qui est affectée dans 10-15% des LF [73].

La translocation t(14, 18) apparaît à un stade précoce de développement des cellules B, dans la moelle osseuse et elle est médiée par les recombinaisons RAG et RAG2 qui sont responsables des recombinaisons V(D)J et clivent au niveau des régions majeures de cassure situées dans le gène BCL-2 [74].

La conséquence fonctionnelle de cette translocation est le déséquilibre de la balance entre la vie et la mort cellulaire. Le gène BCL-2 appartient à la famille des régulateurs de la mort cellulaire. Il est contrôlé négativement par d'autres molécules comme Bak, Bax et Bad, (protéines mitochondriales pro-apoptotiques). La protéine Bcl-2 résultante de la translocation, est produite en quantité excessive, ce qui aboutit à l'inhibition de l'apoptose et confère un avantage de survie aux cellules néoplasiques [75].

La translocation t(14, 18) est donc l'événement déclencheur dans la pathogenèse moléculaire de LF, mais reste insuffisante à elle seule pour induire le développement du LF. Ceci a été démontré chez des souris transgéniques IgH/BCL2 qui développent une hyperplasie lymphoïde bénigne [76]. Seules 10% progressent vers un lymphome agressif. L'activation du Bcl2 via la translocation t(14, 18) fournit aux cellules B un avantage de survie prolongée, ce qui augmente la probabilité d'acquisition d'anomalies supplémentaires plus complexes, aboutissant à l'émergence d'un clone agressif, par exemple la translocation t(8, 14) (q24, q32) qui touche le proto-oncogène c-myc [76], mutation du gène suppresseur de tumeur p53[77], mutation des protéines du cycle cellulaire p15 et p16 [78,79].

De façon inattendue, une petite fraction des cellules mononucléées du sang périphérique PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell), ainsi que les amygdales et la rate de nombreux individus sains semblent également porter la translocation t(14; 18) [80]. Ceci confirme que la translocation ne peut à elle seule conduire à la malignité des cellules B.

Auparavant, il était admis que les cellules B matures naïves porteuses de la translocation chez les sujets sains étaient au repos. Cependant, Roulland et al. ont montré que ces cellules ont subi la commutation de classe, en réponse à une stimulation antigénique dans le centre germinatif. Ceci implique que les cellules positives pour la translocation t(14; 18) ne sont pas naïves, mais sont capables de répondre à un stimulus antigénique exogène, tel qu'un virus ou peut être un auto-antigène [81].

Comment font les cellules B normales porteuses de la translocation la t(14; 18) pour induire la transformation en LF? Sachant d'une part que cette translocation peut être détectée dans plus de 50% des personnes saines, et que l'incidence du lymphome folliculaire est d'environ 1 cas sur 24.000 personnes par an [82], et d'autre part, qu'un clone de cellules B normales positives pour la translocation t(14; 18) peut persister pendant au moins 3 ans chez les sujets sains [83], et que ces clones présentent des caractéristiques génotypiques et phénotypiques de LF et sont enclins à constituer de puissantes niches précancéreuses pour le développement du LF [81] ?

Récemment, Nadel suggère qu'après un premier passage au centre germinatif conduisant à la différenciation en cellules B mémoire IgM⁺ t(14; 18)⁺ clones acquerraient une capacité accrue à réintégrer et se mettre en activation à nouveau en centre germinatif, entraînant une augmentation de l'exposition à l'instabilité génomique médiée par l'enzyme AID, au cours de remaniements de commutation de classe et mutations somatiques, éventuellement conduisant à l'accumulation d'altérations génétiques secondaires (Figure 15). Au fil du temps, le blocage dans le stade cellules centre germinatif-B-like permet aux cellules d'acquérir de capacités spéciales pour diffuser dans le sang et BM [273].

Actuellement, il est admis que l'accumulation de lésions oncogéniques secondaires dans des cellules porteuses de la translocation t(14; 18) conduit à l'apparition du lymphome folliculaire (Tableau 2).

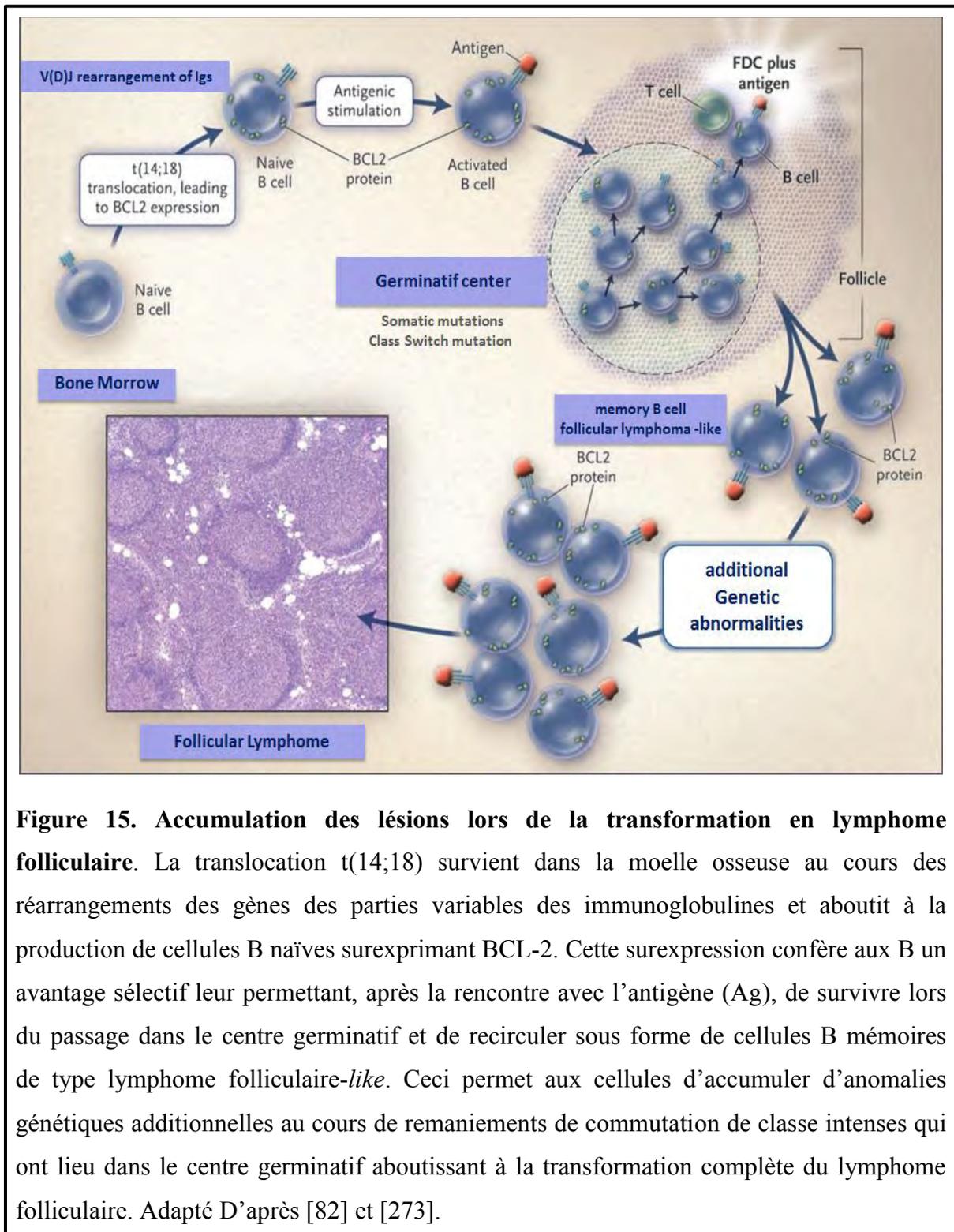


Figure 15. Accumulation des lésions lors de la transformation en lymphome folliculaire. La translocation $t(14;18)$ survient dans la moelle osseuse au cours des réarrangements des gènes des parties variables des immunoglobulines et aboutit à la production de cellules B naïves surexprimant BCL-2. Cette surexpression confère aux B un avantage sélectif leur permettant, après la rencontre avec l'antigène (Ag), de survivre lors du passage dans le centre germinatif et de recirculer sous forme de cellules B mémoires de type lymphome folliculaire-like. Ceci permet aux cellules d'accumuler d'anomalies génétiques additionnelles au cours de remaniements de commutation de classe intenses qui ont lieu dans le centre germinatif aboutissant à la transformation complète du lymphome folliculaire. Adapté D'après [82] et [273].

Tableau 2. Altérations génétiques dans le lymphome folliculaire. D'après [274]

Targeted genes in FL	UDS alterations reported in FL Frequency in FL (%)	Effect (References)	CGH alterations reported in FL precursors Localized in an Amplified (A) / Lost (L) regions	Frequency in FL precursors (%) Mamessier et al. ²⁶
<i>BCL2</i>	85	BCL2 overexpression by IGH/BCL2 translocation, ⁴⁵ BCL2 overexpression by IGH/BCL2 translocation ⁷³	A	58.5
<i>MLL2</i>	89	Histone modification ⁴⁷	A	8.5
<i>IGHV-IGLV</i>	79-100	N-glycosylation motifs ^{48, 49}		
<i>EPHA7</i>	70	Loss of tumor suppressor ⁵⁰		
<i>TNFRSF14</i>	<45	Unknown ^{51, 52}	L	40
<i>TNFRSF25</i>	25.5	Loss of tumor suppressor ^{53, 54}	L	33.5
<i>TP73</i>	25.5	Loss of tumor suppressor ⁵³	L	33.5
<i>BACH2</i>	<5	Oncogene, GC related gene ^{55, 56}	A	33.5
<i>CREBBP</i>	33	Histone modification ^{47, 57}		
<i>MEF2B</i>	15	Histone modification ⁴⁷		
<i>EP300</i>	9	Histone modification ^{47, 57}		
<i>EZH2</i>	27	Oncogenic H3K27me3, GC related gene ^{43, 58, 59}	A	8.5
<i>TNFAIP3/A20</i>	2-26	Loss of tumor suppressor ^{60, 61}		
<i>FAS</i>	6	Decrease apoptosis ⁶²		
<i>EBF1</i>	nd	Oncogene, epigenetic modulator, GC related gene, ⁶³ Oncogene, epigenetic modulator, GC related gene ⁶³	A	25.0
<i>RUNX1</i>	nd	Oncogene	A	16.5
<i>CARD11</i>	nd	Oncogene ⁶⁴	A	8.5
<i>PTEN</i>	<5	Loss of tumor suppressor ^{65, 66}	L	8.5
<i>BCL6</i>	6-14	BCL6 overexpression by BCL6 translocation, GC related gene ^{67, 68}		
<i>AFF3</i>	<5	Oncogene, GC related gene	A	50.0
<i>TP53</i>	<5	Loss of tumor suppressor ^{69, 70}		

4. Traitement

4.1. Traitement des lymphomes folliculaires localisés

La radiothérapie est le traitement de choix des patients au stade I ou II, surtout s'ils sont de grade histologique 1 ou 2 et ne présentent pas de masses volumineuses. Elle permet d'obtenir un taux de rémission complète de 50% des cas pour les stades I et de 25% pour les stades II [84,85]. Le taux cumulatif de rechute est respectivement de 54% et de 56% à 15 et 25 ans. [86]. Une association à des molécules de chimiothérapie augmente le taux de réponse mais pas la survie [87]. La survie à long terme varie de 40 à 50% [86,88].

Dans le cas où les patients sont asymptomatiques et présentent une progression lente de la maladie, la stratégie "wait and watch" est recommandée pour éviter les effets secondaires de la radiothérapie [88].

4.2. Traitement des lymphomes folliculaires disséminés

La plupart des patients diagnostiqués présentent une maladie de stade III ou IV avec une atteinte médullaire dans environ 50% des cas [89]. Aucun traitement curatif n'est encore établi. Etant donné que l'évolution clinique de la maladie est caractérisée par des régressions spontanées jusqu'à 25% des cas et varie considérablement d'un cas à l'autre, le traitement doit être initié uniquement lors de l'apparition de symptômes d'agressivité tumorale, y compris les symptômes B (amaigrissement, fièvre, sueurs nocturnes), déficience hématopoïétique, compression des organes vitaux, ascite, épanchement pleural ou lymphoma-progression rapide [85]. Cette maladie est généralement chimio-sensible mais la plupart des patients rechutent dans les deux premières années [90]. Les options de traitement du lymphome folliculaire sont multiples :

- chimiothérapie par voie orale ou intraveineuse
- chimiothérapie et immuno-thérapie (anticorps monoclonal)
- transplantation de moelle osseuse ou de cellules souches
- radio-immunothérapie

Le traitement de référence actuel de première ligne est une polychimiothérapie (CHVP) associant du cyclophosphamide, une anthracycline (doxorubicine), un alcaloïde (vincristine) et des corticoïdes avec des injections sous-cutanées d'interféron alpha.

L'étude du GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte) montre que les résultats en terme de réponse de survie globale sans événement sont supérieurs aux autres molécules testées en première ligne telle que la fludarabine [91].

Le traitement de deuxième ligne par l'anticorps monoclonal thérapeutique, le rituximab (Mabthera[®]) a montré des résultats significatifs sur des patients atteints de LF. Ceux-ci présentaient de meilleures réponses par rapport aux autres LNHS, et bien qu'aucune rémission complète n'ait été observée probablement due à l'atteinte médullaire des patients traités, 27% des patients ont obtenu une réponse partielle, ce qui a suggéré l'intérêt potentiel d'une combinaison avec la chimiothérapie [92]. La combinaison de chimiothérapie cytotoxique, CHOP (cyclophosphamide, hydroxydaunomycin, oncovin et prednisonel) associée au rituximab chez des patients atteints de LNHS de bas grade, produit une réponse globale de 95% avec 55% de réponse complète. L'étude a montré que 7 patients sur 7 atteints de lymphome folliculaire ont obtenu une réponse complète, et que leurs cellules deviennent négatives pour Bcl-2 [93]. Suite à ces études, la combinaison rituximab-CHOP est actuellement largement utilisée dans le traitement des LF. Une étude rétrospective menée sur 93 patients de stade I-II de lymphome folliculaire a montré que la combinaison rituximab-radiothérapie semble donner de meilleurs résultats en termes de contrôle global de la maladie, mais un suivi plus long et prospectif [275].

Actuellement, l'un des nouveaux agents les plus prometteurs dans le traitement de lymphome folliculaire est lénalidomide. Son mécanisme d'action n'est pas entièrement compris, mais comprend probablement une modulation du microenvironnement de lymphome et la réponse immunitaire anti-lymphome renforcée. Après une activité unique prometteuse de l'agent prometteur, vue en particulier avec les patients réfractaires aux traitements antérieurs. Lénalidomide a été combiné avec rituximab et atteint des taux de réponse élevés dans le traitement de première ligne. Un essai de phase III randomisé prospectif internationale évalue actuellement la combinaison de lénalidomide-rituximab contre la conventionnelle chimiothérapie-rituximab [84].

Chapitre III : Voie PI3K/AKT et cancer

III. Voie PI3K/AKT et cancer

1. Les membres de la famille des enzymes PI3Ks

Les PI3Ks constituent une famille d'enzymes à activité lipide/protéine kinase qui phosphorylent les phosphoinositides (PtdIns) en position 3 du noyau inositol, catalysant ainsi la conversion du PtdIns en PtdIns3P, du PtdIns4P en PtdIns(3,4)P2 et du PtdIns(4,5)P2 en PtdIns(3,4,5)P3 (ou PIP3). Cette réaction de phosphorylation génère des seconds messagers qui contrôlent des propriétés et activités cellulaires, y compris la prolifération, la survie, le métabolisme, le trafic vésiculaire, la motilité et la morphologie [94,95]. Cette famille d'enzyme est divisée en trois classes qui se différencient par leur structure, leur substrat, leur distribution tissulaire, leur mécanisme d'activation et leurs fonctions [95-98] (Figure 16). Les isoformes de la famille PI3K sont composés d'hétérodimères de sous-unités catalytiques et régulatrices.

1.1. PI3K de classe I

Les PI3K de classe I sont formées d'un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une sous-unité régulatrice. *In vitro*, elles catalysent la phosphorylation du PtdIns(4)P et du PtdIns(4,5)P2, tandis qu'*in vivo* leur substrat préférentiel est le PtdIns(4,5)P2. Elles sont divisées en deux sous-familles, selon les récepteurs auxquels elles s'associent. Les PI3K de classe IA sont activées principalement par les récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque (RTK), tandis que celle de la classe IB est activée en particulier par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) [99].

1.1.1. PI3K de classe IA

Les PI3K des classe IA sont des protéines hétérodimères constituées d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une sous-unité régulatrice (la plupart du temps p85). Chez les mammifères, il existe trois gènes, *PIK3R1*, *PIK3R2* et *PIK3R3*, codant respectivement pour les isoformes de la sous-unité régulatrice p85 α (et ses variantes d'épissage p55 α , et p50 α), p85 β et p55 γ . La sous-unité régulatrice permet les interactions protéines-protéines, l'activation et la localisation de l'enzyme [94,100]. Les sous-unités catalytiques des PI3K de classe I (p110 α , β , δ) sont codées par les gènes *PIK3CA*, *PIK3CB*, et *PIK3CD*. L'expression de p110 α et p110 β est ubiquitaire, alors que p110 δ est principalement exprimée dans les leucocytes et dans les plaquettes [101,102].

1.1.2. PI3K classe IB

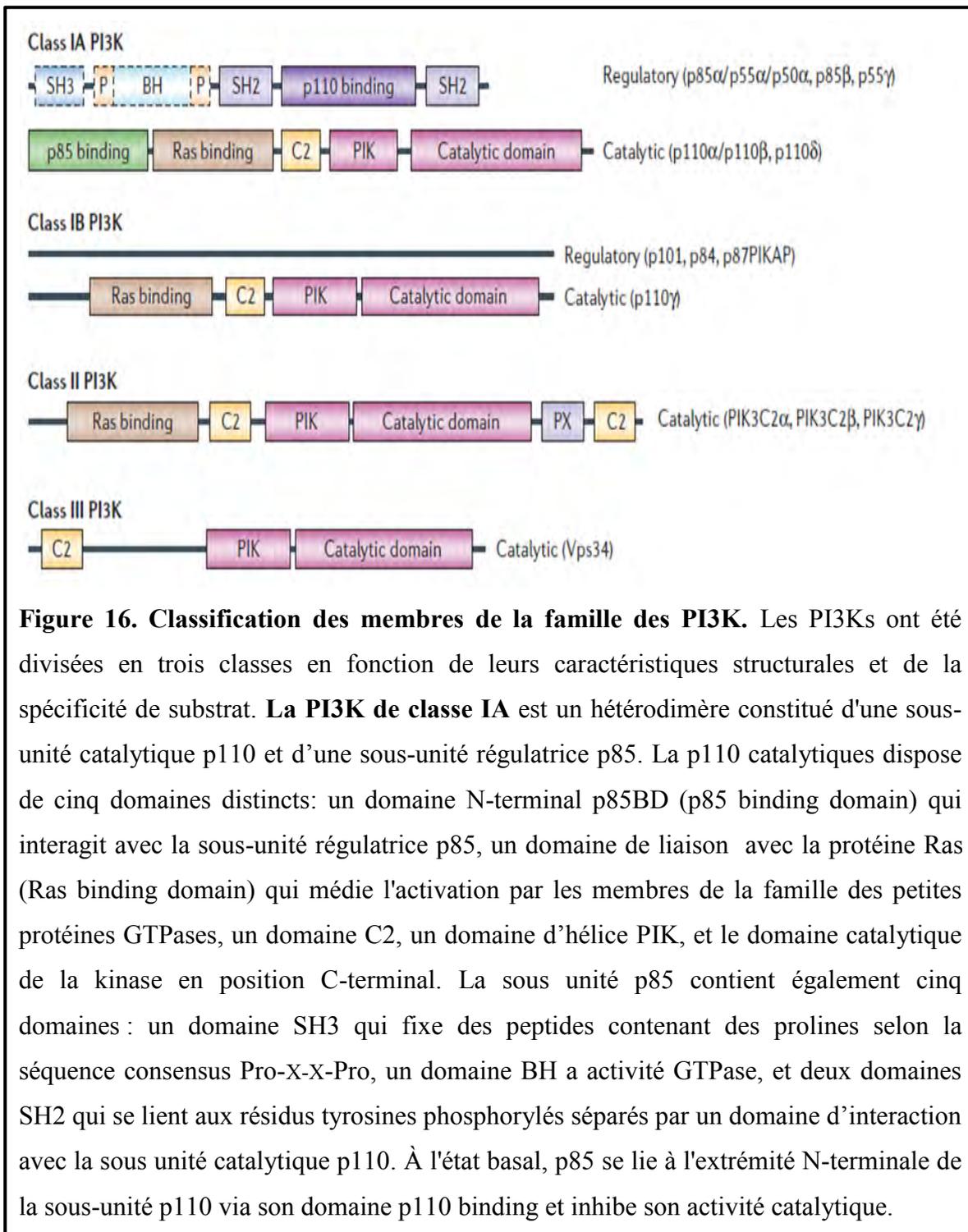
La PI3K de classe IB est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique de p110 γ et d'une sous-unité p101 régulatrice [99]. Deux nouvelles sous-unités régulatrices, p84 et p87PIKAP, ont été décrites [103, 104]. La p110 γ est principalement exprimée dans les leucocytes mais également présente dans le cœur, le pancréas, le foie et les muscles squelettiques [105-107].

1.2. PI3K de classe II

Les PI3K de classe II sont constituées d'une seule sous-unité catalytique. Il s'agit de protéines de haut poids moléculaire, environ 170 à 200 kDa [99]. *In vitro*, elles phosphorylent le PtdIns et le PtdIns4P alors qu'*in vivo*, leur substrat préférentiel semble être le PtdIns4P. Trois isoformes catalytiques sont décrites, *PI3KC2 α* , *PI3KC2 β* et *PI3KC2 γ* , qui peuvent être activées par RTK, les récepteurs de cytokines et des intégrines. Les *PI3KC2 α* et *PI3KC2 β* ont une distribution relativement ubiquitaire, contrairement à l'isoforme *PI3KC2 γ* qui est principalement exprimée dans les hépatocytes [97]. Les fonctions cellulaires spécifiques de cette famille restent encore peu connues [108].

1.3. PI3K de classe III

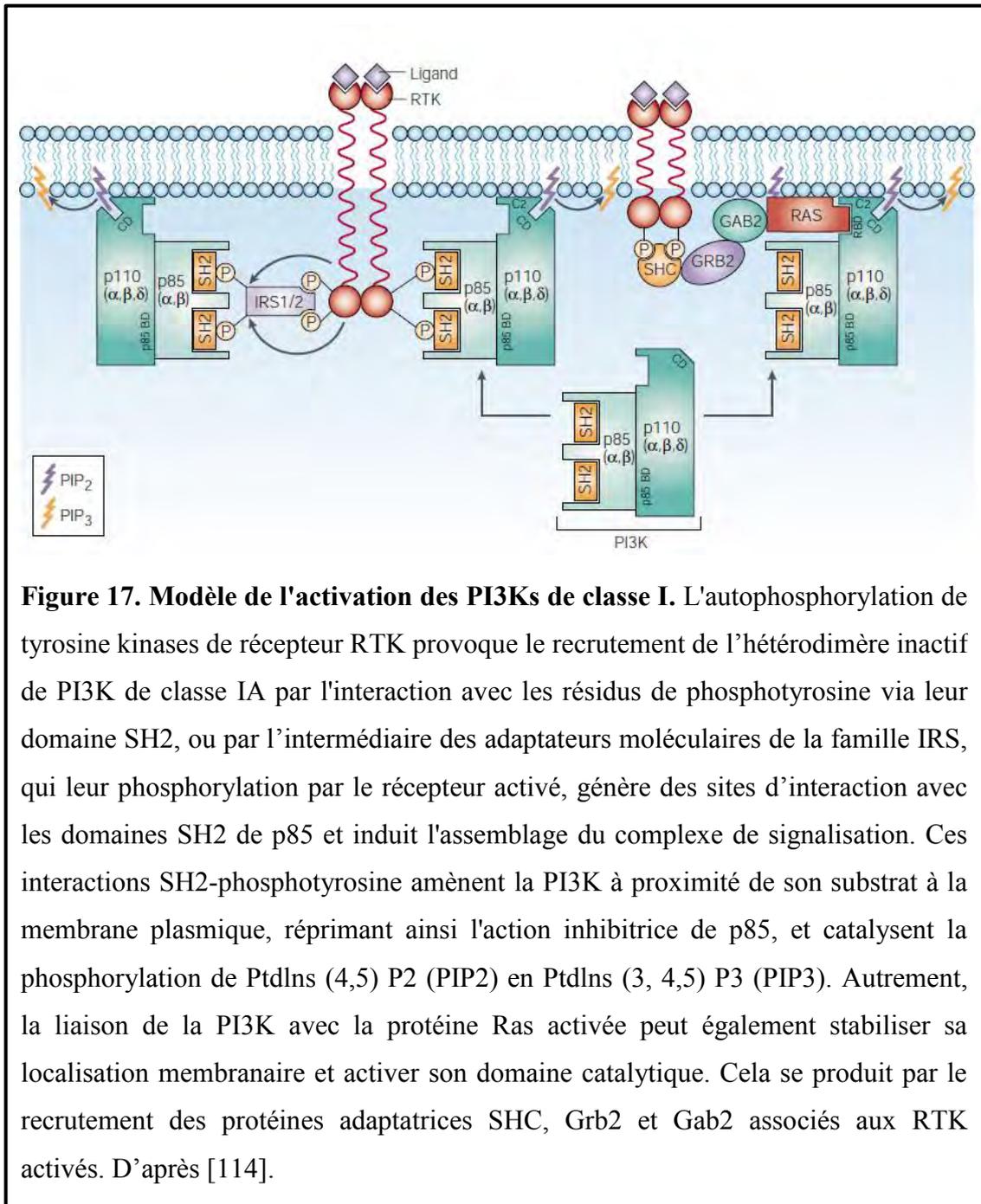
La PI3K de classe III est un homologue de Vps34 (Vacuolar protein-sorting defective34) initialement identifiée dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Chez les mammifères, elle se compose d'une seule sous-unité catalytique de Vps34, qui s'associe avec une protéine sérine-thréonine kinase (Vps15p chez la levure, p150 chez les mammifères), et peut être impliquée dans le trafic des protéines membranaires et vacuolaires. Elle utilise seulement PtdIns comme substrat *in vitro* et est responsable de la génération de la majeure partie de PtdIns3P intracellulaire [108]. La fonction cellulaire majeure de la PI3K de classe III concerne le trafic intracellulaire [99]. De façon intéressante, elle a également été impliquée dans l'activation du complexe mTORC1 (en réponse à une stimulation par les acides aminés) ou dans l'autophagie (en réponse à une carence en acides aminés) [109, 110].



La PI3K de classe IB est composée d'une sous-unité catalytique p110 γ qui montre une homologie de structure avec la p110 de la classe IA, et d'une sous-unité régulatrice p101 qui ne possède aucune similarité de séquence avec la p85 de la classe IA. **La classe II** est constituée d'un monomère avec une seule sous-unité catalytique. Il existe trois isoformes de classe II de la PI3K, *PI3KC2 α* , *PI3KC2 β* et *PI3KC2 γ* , chacun possède une extrémité N-terminale divergente suivie par un domaine de liaison de protéine Ras (Ras binding), un domaine C2, un domaine en hélice PIK, le domaine catalytique, et deux domaines additionnels PX et C2 en C-terminales. **La classe III** se compose d'une seule sous-unité catalytique de Vps34 (homolog of the yeast vacuolar protein-sorting defective 34). D'après [94].

2. Mécanisme d'activation de la PI3K de classe I

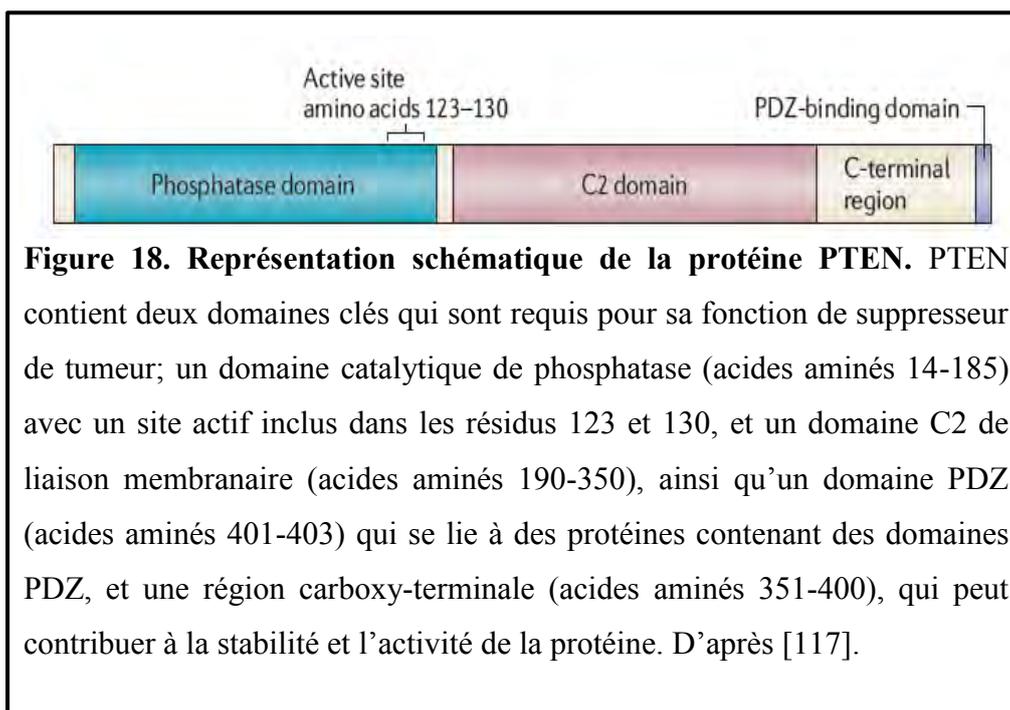
Il est maintenant admis que l'activation de l'enzyme PI3K de classe I est considérée parmi les voies de transduction du signal les plus importantes utilisées par les récepteurs de surface pour contrôler les événements intracellulaires. L'activation du récepteur RTK par un facteur de croissance induit une auto/transphosphorylation au niveau de résidus tyrosines de la partie intracytoplasmique du RTK. Ceci permet le recrutement du complexe p85-p110 via leurs domaines SH2, qui vont interagir avec les résidus tyrosines phosphorylés des motifs YXXM (Y représente la tyrosine, M représente une méthionine, x correspondant à n'importe quel acide aminé), présents soit sur la queue cytoplasmique du récepteur (comme le récepteur au PDGF), soit sur les protéines adaptatrices associées au récepteur comme Gab1 qui est liée au récepteur de l'EGF [111]. Cette interaction permet donc l'activation et la translocation des PI3K de classe IA à proximité de la membrane où résident leurs substrats lipidiques(PIP₂). Les récepteurs RTK peuvent aussi activer la PI3K indirectement par l'intermédiaire de la petite protéine G, Ras, qui peut se lier et activer la sous-unité p110 [112,113] (Figure 17). L'activation des PI3Ks peut être induite par des protéines tyrosine kinases (PTKs) intracellulaires comme les PTKs de la famille Src, FAK ou JAK. En effet, l'activation des RCPG stimule l'activité de certaines PI3K de classe IA, soit via l'activité de PTKs en aval de ces récepteurs, soit par une activation directe de la p110 β , par les sous-unités G $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques *in vitro* [108].



3. Phosphatase PTEN

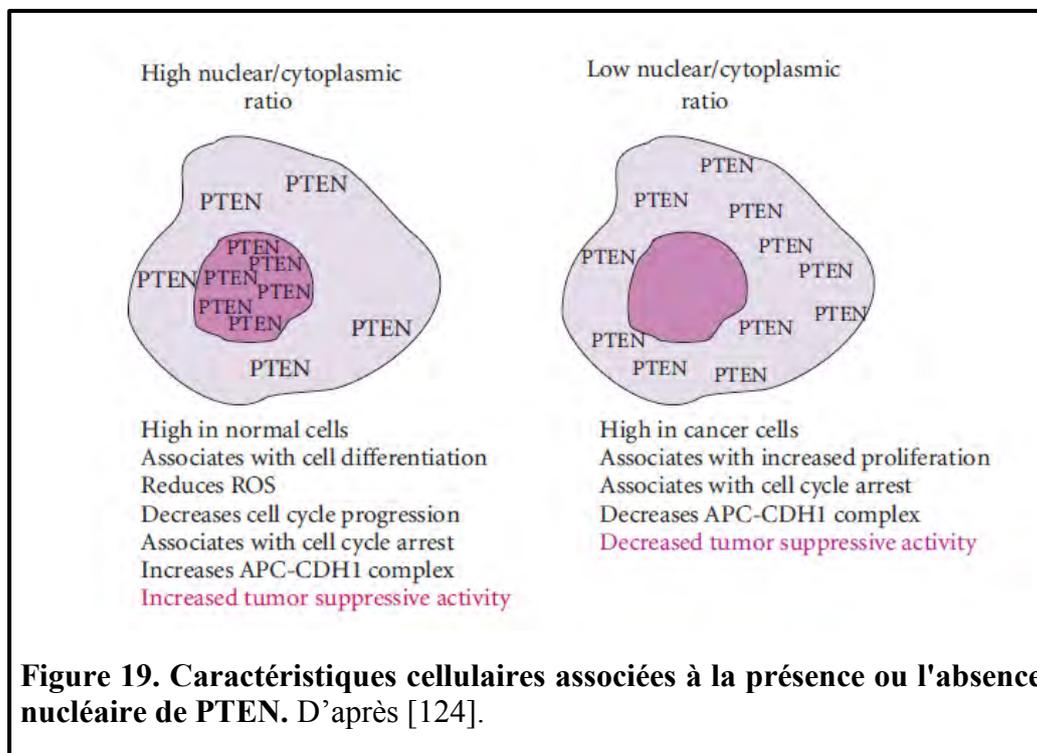
PTEN (Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10), encore appelée MMAC (Mutated in Multiple Advanced Cancer), est un gène suppresseur de tumeur qui antagonise fonctionnellement l'activité kinase de la PI3K par l'intermédiaire de son activité lipidique phosphatase intrinsèque qui réduit le stock cellulaire de PIP3 par la déphosphorylation de PI(3,4,5)P3 en PI(4,5)P2. Dans de nombreux types cellulaires, PTEN est un régulateur majeur de la voie de signalisation de PI3K, en s'opposant aux activités anti-apoptotiques, prolifératives et hypertrophiques de la voie PI3K [115,116].

Le gène PTEN s'étend sur 105 kb sur le chromosome 10q23 et comprend neuf exons. Sa fonction suppressive de tumeur nécessite à la fois un domaine catalytique à activité phosphatase et un domaine C2 requis pour la liaison membranaire (Figure 18).



La localisation nucléaire de PTEN a été signalée dans plusieurs types cellulaires, y compris les neurones primaires et les cellules endothéliales [118], les cellules myoépithéliales des canaux mammaires normales [119], et les cellules thyroïdiennes folliculaires normales [120]. Bien que la localisation nucléaire soit souvent observée dans les cellules normales, elle est principalement cytosolique dans les cellules tumorales [120].

Des études indiquent que l'augmentation de la translocation nucléaire de PTEN est associée à une activité suppressive de tumeur, et qu'une déplétion nucléaire de PTEN est en corrélation avec une progression tumorale accrue [120-123] (Figure 19).



Bien que l'activité lipide/phosphatase de PTEN soit primordiale pour sa fonction suppressive de tumeur, d'autres fonctions cellulaires de PTEN se sont révélées importantes. Par exemple, plusieurs études ont démontré que l'activité protéine phosphatase de PTEN est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire [125,126] et dans l'inhibition de l'invasion cellulaire *in vitro* [127-129], de par son activité lipide phosphatase qui est supposée se produire la plupart du temps à la membrane cellulaire.

Enfin, PTEN joue également un rôle au niveau nucléaire notamment par son interaction avec les protéines CENP-C du centromère pour maintenir la stabilité chromosomique et par sa localisation nucléaire qui lui permet de contrôler les mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN [130].

La perte de fonction de PTEN se produit dans un large spectre de cancers humains par des mutations, délétions, transcription silencieuse, ou instabilité de la protéine à une fréquence qui peut rivaliser avec les altérations de p53 [131].

4. PKB/AKT

AKT est une enzyme serine/thréonine kinase, de 57 kDa qui appartient à la superfamille des kinases AGC (c-AMP dependent protein kinase A/protein kinase G/protein kinase C) [132]. Elle est l'homologue cellulaire de l'oncoprotéine virale v-AKT connue pour induire des leucémies chez la souris [133]. AKT est aussi appelée PKB (Protein kinase B) ou RAC (related to protein kinase A and C). Le génome de mammifères contient trois gènes AKT, codant pour les isoformes AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) et AKT3 (PKB γ) [134]. La localisation chromosomique de chaque gène AKT humain a été identifiée sur trois chromosomes différents 14q32 (AKT1), 19q13.1-13.2 (AKT2) et 1q44 (AKT3) par hybridation in situ [135-137]. AKT2 et AKT3 présentent respectivement 81% et 83% d'homologie de séquence d'acides aminés avec AKT1 [138]. Les trois gènes de mammifères AKT sont largement exprimés dans divers tissus, mais AKT1 est le plus abondant dans le cerveau, le cœur et les poumons, tandis qu'AKT2 est exprimé de façon prédominante dans le muscle squelettique et le tissu adipeux embryonnaire, et qu'AKT3 est principalement exprimé dans le cerveau, le rein, et le cœur embryonnaire [139, 140-142].

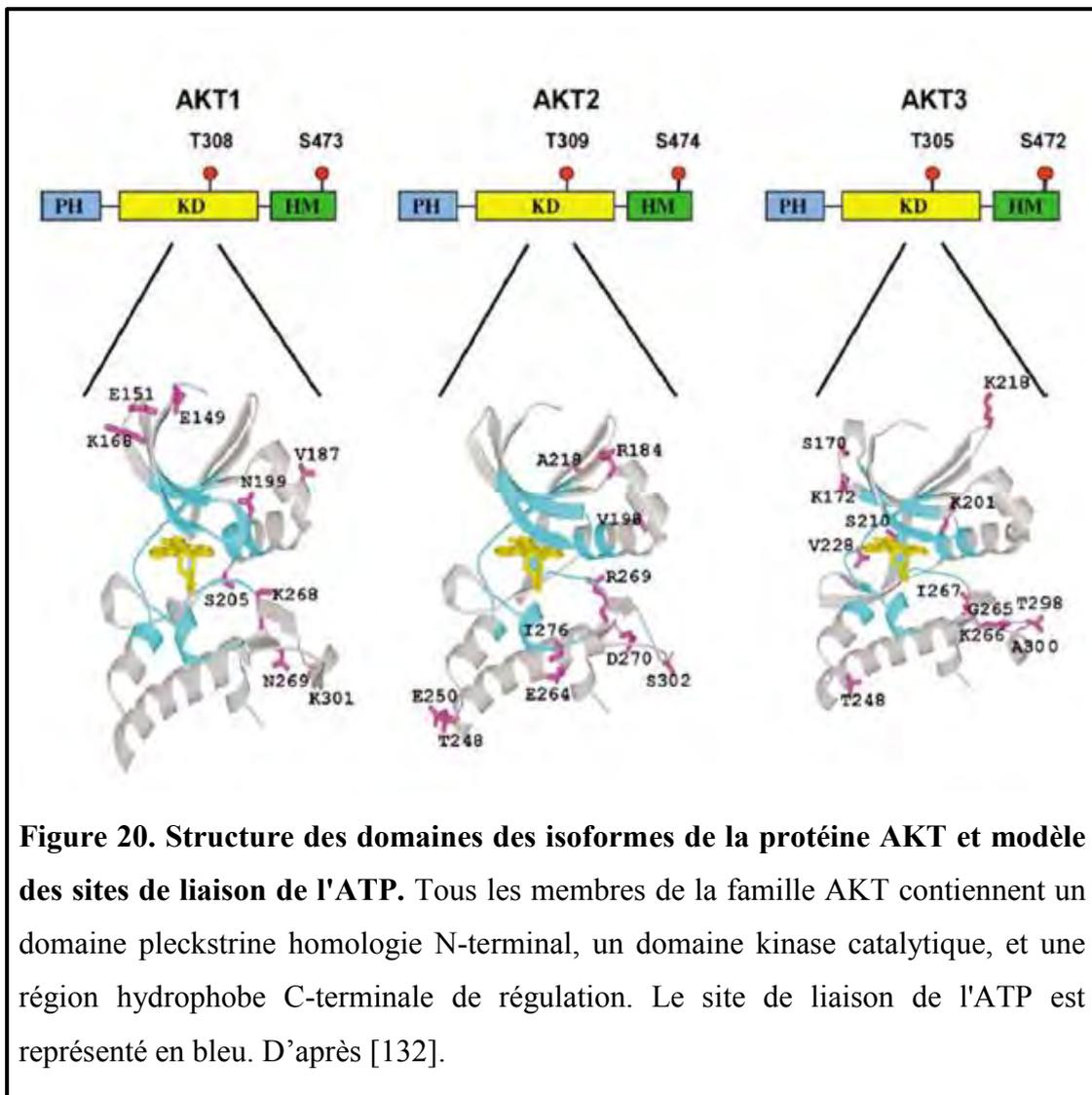
Les trois isoformes possèdent une structure similaire: un domaine PH (Plekstrin Homology) N-terminal, un domaine catalytique central à activité sérine/thréonine kinase, et un petit domaine de régulation C-terminal (Figure 20).

Le domaine PH contient environ 100 acides aminés [143], interagit avec le PIP3 (phosphatidylinositol (3, 4,5)-triphosphate) et le PIP2 (phosphatidylinositol (3,4) diphosphate) avec une affinité similaire [144,145]. La structure cristalline du domaine PH a été déterminée [146] et sert actuellement de modèle pour la conception des inhibiteurs d'AKT [147].

Le domaine catalytique d'AKT présente une grande similitude avec d'autres membres de la famille de kinases AGC telles que la PKA, PKC, p70 S6K, et p90 RSK [148]. L'homologie de séquence du domaine catalytique entre les trois isoformes d'AKT est estimée à plus de 87% [149]. Dans ce domaine se trouve un résidu thréonine (Thr308 dans AKT1, et Thr309 dans AKT3) dont la phosphorylation est nécessaire pour l'activation d'AKT [143, 150]. Les trois kinases AKT sont identiques dans leur site de liaison à l'ATP, à l'exception d'un résidu Ala 230 d'AKT1 qui est conservé dans AKT2 (Ala 232) mais se transforme en Val 228 dans AKT3 [132].

A la suite du domaine kinase, chacune des trois kinases AKT a une extension C-terminale d'environ 40 acides aminés. Cette région possède le **motif hydrophobe** FXX-F/YS/TY/ (X représente n'importe quel acide aminé) qui est caractéristique de la famille des protéines kinases AGC [132]. Sa délétion supprime complètement l'activité de la kinase [151]. La queue C-terminale contient un second site de phosphorylation (Ser473 dans AKT1, Ser474 dans AKT2, Ser472 dans AKT3) [143]. La phosphorylation de la Thr308 et de la Ser473 se produit en réponse à des facteurs de croissance et d'autres stimuli extracellulaires ; elle est essentielle à l'activation maximale de la kinase AKT [150].

La kinase AKT/PKB a émergé comme élément principal et critique de signalisation dans toutes les cellules eucaryotes supérieures qui régule plusieurs processus cellulaires : croissance, prolifération, survie, métabolisme, stabilité du génome, migration, néo-vascularisation [152] et enfin une activation aberrante dans les tumeurs malignes [152, 153].



5. Mécanisme d'activation de la voie PI3K/AKT

L'activation d'AKT est un processus qui implique à la fois sa translocation à la membrane plasmique et la phosphorylation des deux résidus Thr308 et Ser473 [151,154]. Ce mécanisme est déclenché par l'activation des récepteurs tyrosine kinases, par des facteurs de croissance peptidiques et par des cytokines. L'étape critique dans la cascade de transduction du signal conduisant à l'activation de l'AKT est la stimulation de l'enzyme PI3K associée au récepteur tyrosine kinase qui forme un axe direct avec AKT. La PI3K génère des phosphoinositides 3-phosphorylés (PIP3 et PIP2) à la membrane plasmique. Les phospholipides phosphorylés se

lient avec une forte affinité au domaine PH et favorisent la translocation membranaire d'AKT. Cette dernière est alors activée grâce à la phosphorylation de la Thr308 dans la boucle d'activation du site catalytique et de la Ser473 dans le motif hydrophobe de l'extrémité C-terminale.

La phosphorylation de la Thr308 est absolument nécessaire pour l'activation d'AKT car elle stimule l'activité enzymatique d'un facteur 100 [150], Quant à la phosphorylation de la Ser473, celle-ci potentialise l'activité d'AKT de 7 à 10 fois [150] par un changement de conformation dans la boucle du site catalytique. Au final, la phosphorylation au niveau des deux résidus résulte en une augmentation d'environ 1000 fois de l'activité de la protéine kinase AKT. La phosphorylation de la Thr308 est médiée par une autre AGC kinase contenant un domaine PH, PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase1) [151, 155] également activée par les PIP3 et PIP2.

Les résultats de plusieurs études suggèrent que la Ser473 pourrait subir une autophosphorylation [156], ou une phosphorylation par une autre kinase nommée PDK2, dont l'identité reste controversée [157], et un certain nombre de candidats potentiels ont été identifiés, y compris ILK (Integrin Linked Kinase), MAPK APK2 (Mitogen Activated Protein Kinase Activated Kinase 2), PKC β II, DNA-PK (DNA- dependent protein kinase) et ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) [158]. Actuellement, il semble que le complexe mTORC2 (mTOR/riCTOR complex) constitué des protéines mTOR, mLST8, Rictor et SIN1 soit la principale source d'activité de PDK2 et de phosphorylation de la Ser473. Il faciliterait également la phosphorylation de la Thr308 [159].

Une fois phosphorylée sur les deux résidus, l'enzyme AKT peut alors phosphoryler plusieurs protéines cibles localisées dans le compartiment cytoplasmique ou nucléaire, et de ce fait, réguler une large gamme de processus cellulaires impliqués dans la synthèse des protéines, la survie cellulaire, la prolifération et le métabolisme.

Dans certaines circonstances, AKT peut être activée par des mécanismes indépendants de la stimulation de la PI3K. Ainsi, l'augmentation du taux cytoplasmique du calcium peut activer la CaMKK (calcium/calmodulin dependent kinase kinase) et entraîner la phosphorylation d'AKT sur la Thr308 [160].

L'activation de l'axe PI3K/AKT est directement antagonisé par la phosphatase PTEN qui convertit les phosphoinositides phosphorylés en leur forme non phosphorylée [161].

6. Conséquences de l'activation de la voie PI3K/AKT

L'activation de l'axe PI3K/AKT module la fonction de nombreux substrats impliqués dans la régulation de la prolifération, la survie, la croissance, le métabolisme, et l'angiogenèse (Figure 21). La plupart des substrats phosphorylés par AKT porte la séquence consensus RXXRXXS/T.

6.1. Prolifération cellulaire

L'effet prolifératif d'AKT est induit par des mécanismes multiples. La phosphorylation d'AKT inhibe l'activité de la protéine GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) empêchant ainsi la dégradation de la cycline D1. Sans dégradation, le cycle cellulaire peut théoriquement recommencer à l'infini [162]. AKT phosphoryle également la p21/Waf1/Cip1 et p27/Kip2, et induit leurs rétention cytoplasmique pour inhiber leurs effets antiprolifératifs [163,164]. AKT phosphoryle également la protéine ubiquitine ligase Mdm2 (Murine double minute 2), promouvant sa translocation nucléaire où elle peut former un complexe avec la p53 favorisant sa dégradation par le système ubiquitine/proteasome [165]. Or, l'inhibition de la p53 est particulièrement pertinente dans le contrôle et la réparation des lésions d'ADN induites au cours du cycle cellulaire.

6.2. La survie cellulaire

La protéine AKT fournit des signaux de survie qui empêchent la mort cellulaire programmée par plusieurs mécanismes indépendants qui influent à la fois sur la cascade des caspases et sur le contrôle transcriptionnel de l'apoptose [165,166]. L'enzyme AKT inactive par phosphorylation le facteur pro-apoptotique Bad, empêchant la libération du cytochrome C à partir de la mitochondrie, l'événement déclencheur de la cascade des caspases [167]. En parallèle, AKT inhibe directement la cascade des caspases par phosphorylation du facteur (pro) caspase-9, ainsi que par phosphorylation et stabilisation du facteur PED/PEA15, un inhibiteur cytosolique de la caspase-3 [168]. En même temps, la phosphorylation par AKT des facteurs de transcription de la famille Forkhead (FKHR/FoxO1, FoxO2, FKHL1/FoxO3 et

AFX/FoxO4) restreint l'entrée nucléaire, en favorisant leur rétention cytoplasmique, et empêchant la transcription des gènes pro-apoptotiques comme Fas ligand, TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), TRADD (TNF Receptor type 1 Associated Death Domain) et Bim [134,169].

Par contre, AKT favorise la translocation nucléaire de NF- κ B par phosphorylation et activation de la kinase I κ B (IKK). Ceci entraîne la dégradation de la kinase I κ B tandis que l'activation de NF κ B conduit à la transcription des gènes anti-apoptotiques Bcl-XL, les inhibiteurs de caspase, et c-Myb [170,171].

Enfin, AKT phosphoryle et active le facteur de transcription CREB (Cyclic AMP Response Element Binding protein) qui augmente la transcription de gènes anti-apoptotiques, tels que ceux correspondant aux protéines Bcl-2, Mcl-1, et AKT elle-même [172, 173,174].

6.3. Le métabolisme cellulaire

La protéine AKT est également impliquée dans le métabolisme cellulaire, en particulier le métabolisme du glucose, et l'inactivation de son substrat GSK3 par phosphorylation conduit à la synthèse de glycogène [175]. Ainsi, l'insuline est connue pour stimuler le transport du glucose médié par la phosphorylation d'AKT et la translocation membranaire des transporteurs glucose GLUT1 et GLUT4 [176]. AKT stimule la glycolyse par la phosphorylation de la phosphofructokinase 2 [177] et activation de la transcription des enzymes de la glycolyse [178]. Il faut souligner que la réponse métabolique à l'activation d'AKT est étroitement liée à sa fonction anti-apoptotique. Cette interaction entre les différentes fonctions d'AKT est également évidente lors de la régulation d'AKT du mécanisme de croissance cellulaire.

6.4. La croissance cellulaire

La protéine AKT participe également à la régulation de la croissance cellulaire qui est modulée par mTOR (mammalian Target of rapamycin), une kinase stimulant la synthèse des protéines [179]. Activée, mTOR va phosphoryler deux protéines majeures qui ont un impact immédiat sur l'induction de la traduction protéique [180-183]. La première, la protéine p70S6K (70 ribosomal protein S6 kinase) est impliquée dans la biogenèse des ribosomes [182, 184]. La seconde, la protéine 4EBP1, libère après phosphorylation le facteur de

transcription eIF4E et induit la traduction des oncoprotéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (p27, cycline D1, et c-myc) et l'angiogenèse [185,186].

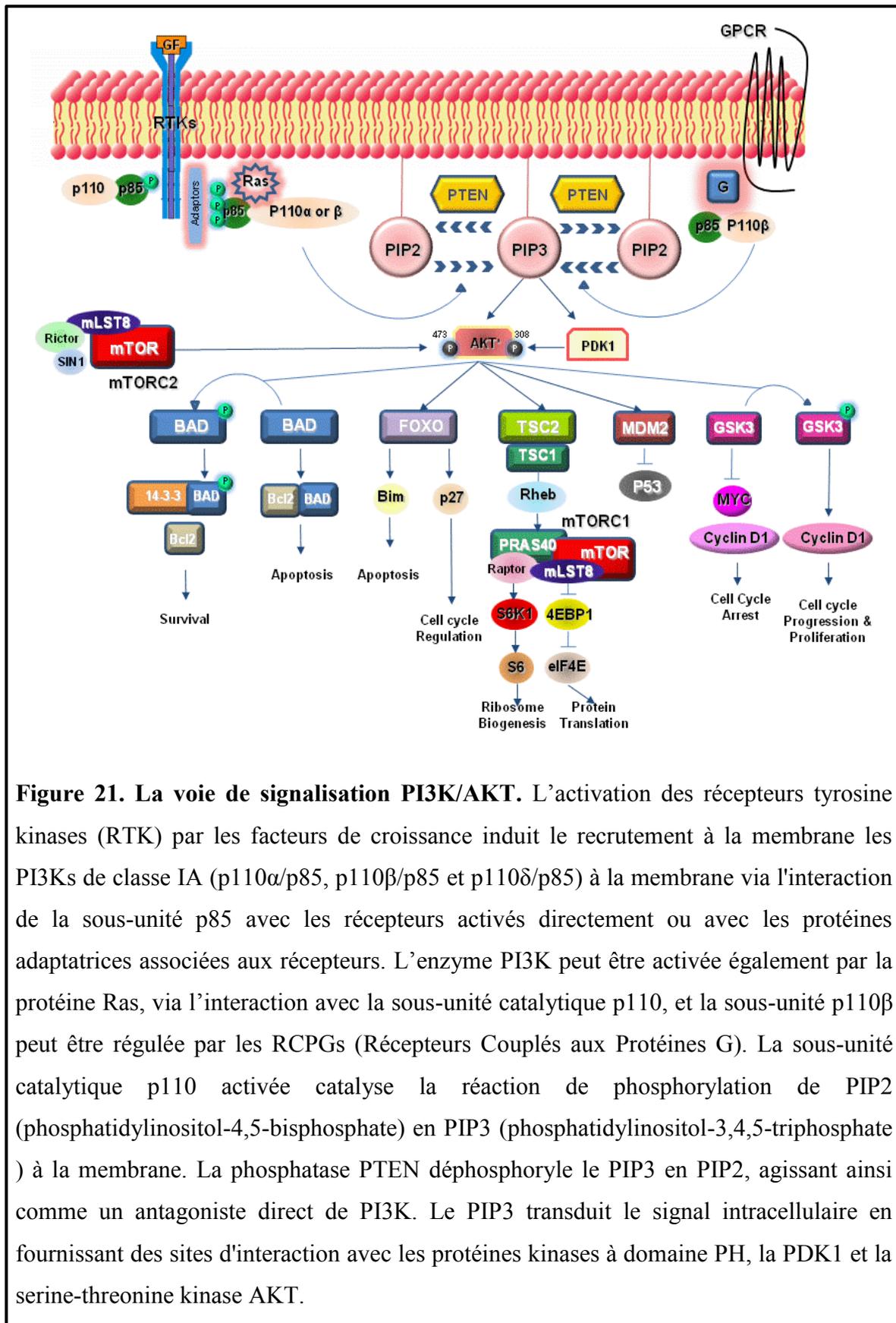
AKT stimule la croissance cellulaire par la phosphorylation du suppresseur de tumeurs TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex) et inhibe la formation d'un complexe TSC1-TSC2. Ce complexe a un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire via la voie de signalisation PI3K/AKT/ mTOR [187], en inhibant la p70S6K (un activateur de la traduction), et en activant 4E-BP1 (un inhibiteur de la traduction) [188,189]. La phosphorylation de TSC2 déstabilise et perturbe son interaction avec TSC1 [188,189]. Cela conduit à l'augmentation de l'activité GTPase de la protéine Rheb, ce qui se traduit par stimulation de la kinase mTOR [187].

6.5. L'angiogenèse

AKT joue un rôle important dans l'angiogenèse physiologique et pathologique par l'intermédiaire d'une production accrue d'oxyde nitrique en phosphorylant l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) [190,191]. La libération d'oxyde nitrique stimule la vasodilatation, le remodelage vasculaire et l'angiogenèse [revue dans 192].

AKT conduit également à une augmentation de la production des facteurs de transcription de la HIF1 α et HIF2 α (Hypoxia Inducible Factor α), grâce à l'activation de mTORC1 [193,194] et l'activation du facteur HIF α dans les cellules endothéliales et autres cellules conduit à l'expression et la sécrétion de VEGF et d'autres facteurs angiogéniques stimulant ainsi l'angiogenèse [195].

Finalement, AKT joue un rôle dans l'invasion tumorale, et métastatique en stimulant la sécrétion des métalloprotéinases de la matrice extracellulaires [196].



Ensuite, PDK1 phosphoryle et active partiellement AKT sur le résidu thréonine 308 dans le domaine catalytique, et son activation complète requiert une deuxième phosphorylation par mTORC2 sur le résidu sérine 473 dans le motif hydrophobe. Une fois activée, AKT régule par phosphorylation la croissance cellulaire et la survie avec divers mécanismes. AKT inhibe les facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (BAD et BAX), les facteurs de transcription de la famille forkhead, le GSK3 (Glycogène Synthase Kinase 3) et régule négativement le facteur de transcription NF- κ B, ce qui conduit à l'augmentation de l'expression des signaux anti-apoptotiques et la survie cellulaire. En outre, AKT phosphoryle et inactive le TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2) qui forme avec la protéine TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1) un complexe inhibiteur de Rheb (Ras homologue enriched in brain). L'inactivation de TSC2 permet à Rheb d'être libéré et activé. Ensuite, Rheb stimule le mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) qui phosphoryle la kinase p70S6 et le facteur 4EBP1, conduisant à la synthèse des protéines. D'après [197].

Au vue de ces données, cette voie de signalisation joue un rôle clé dans le maintien de la balance entre la prolifération et la mort cellulaire, et la rupture de cet équilibre conduit au développement et à la progression de tumeurs malignes.

7. Altérations de la voie PI3K/AKT dans les cancers humains

La dérégulation de plusieurs éléments de la cascade de signalisation PI3K/AKT est reconnue dans de nombreux cancers humains, leur apparition favorisant l'activation de la voie et la transformation oncogénique. Un ensemble de mécanismes moléculaires comprenant les mutations ponctuelles, la délétion, l'amplification et la surexpression affectent certains membres de la voie comme l'enzyme PI3K, AKT, PTEN.

7.1. AKT

Les altérations génétiques des trois isoformes d'AKT ont été aussi observées dans les cancers humains : une mutation activatrice dans le domaine de PH d'AKT1 (E17K) a été identifiée dans le mélanome, cancer du sein, colorectal et ovarien [198,199], ce qui conduit à la translocation membranaire d'AKT en absence de phosphoinositides phosphorylés, et augmentation des niveaux de phosphorylation d'AKT. En outre, une mutation identique dans AKT3 a été détectée dans des échantillons de mélanome ainsi que dans des lignées cellulaires de mélanome [200]. Des mutations rares dans le domaine kinase d'AKT2 ont également été observées dans le cancer colorectal [201]. L'activation d'AKT a été rapportée dans divers cancers humains et corrèle dans certains types de cancer avec la progression de la maladie et/ou le mauvais pronostic (Tableau 2).

Tableau 3. Activation d'AKT dans les cancers humains. D'après [132].

Type de cancer	% de tumeurs avec AKT activé	Nombre des cas	Techniques utilisées	commentaires	Références
Carcinome de la thyroïde	83	46	Immunohistochimie (IHC)	Le marquage phospho-AKT (p-AKT) est plus intense dans les régions de l'invasion capsulaire. Il était nucléaire dans les tumeurs folliculaires et cytoplasmique dans les cancers papillaires. Dans les régions invasives des cancers papillaires, le marquage était à la fois nucléaire et cytoplasmique.	202
Carcinome de la thyroïde	83	6	Western blot (WB)	Le niveau d'expression de phospho-AKT était significativement élevé dans les cancers folliculaires et papillaires.	203
Carcinome du sein	38 (AKT1)	50	Dosage de l'activité kinase IHC, et WB	La plupart des tumeurs avec AKT1 activé étaient en haut grade et en stade III / IV. Une activité élevée de PI3K a été observée dans 7/19 de tumeurs du sein qui présentaient une activation d'AKT1. Toutes les tumeurs avec AKT1 activées expriment PTEN.	204
Carcinome du sein	22	78	IHC	Corrélation inverse significative observée entre une expression réduite de PTEN (36% des cas) et augmentation de l'expression de pAKT.	205

Carcinome pulmonaire à petites cellules	62	42	IHC	Augmentation de l'expression de MAPK phosphorylée, et non pas de phospho-AKT représente un facteur pronostic de la survie.	206
carcinome pulmonaire non à petites cellules	51	110	IHC	L'expression de mTOR et FKHR phosphorylés étaient significativement associées à l'activation d'AKT. L'incidence de l'activation d'AKT est similaire dans les tumeurs de bas et de haut grade, suggérant que l'activation se produit au stade précoce de la progression tumorale.	207
carcinome gastrique	78	311	IHC	L'activation d'AKT corrèle avec l'expression d'APC et de Smad4, suggérant que l'expression de phospho-AKT peut aider à prédire l'évolution clinique des patients atteints de cancer gastrique.	208
Cancer du pancréas	59	78	IHC	L'activation d'AKT corrèle avec la surexpression de HER-2/neu et le grade supérieur de la tumeur.	209
Carcinome ovarien	57	48	IHC	Corrélation inverse significative observée entre l'expression de PTEN et phospho-AKT.	210

Carcinome de la prostate	53 (AKT1)	30	Dosage de l'activité kinase IHC, et WB	La plupart des tumeurs de prostate (13/16) avec AKT1 activée étaient de haut grade et de stade III / IV. Absence d'activité de PI3K dans les tumeurs qui présentaient l'activation d'AKT1. Absence d'expression de PTEN dans 10/16 tumeurs ayant une activité élevée d'AKT1.	204
Carcinome de la prostate	45	74	IHC	L'intensité de marquage de phospho-AKT est significativement plus élevée dans les grades de Gleason 8-10 (92% de cas), en comparaison avec les néoplasies intraépithéliales prostatiques et les autres grades du cancer de la prostate (10% de cas).	211
Carcinome rénal	38	48	IHC	Marquage élevé de phospho-AKT significativement associé avec le grade de la tumeur et l'évolution métastatique de la maladie, mais pas associé au stade de la tumeur ou au sous-type histologique.	212
carcinome de l'endomètre	36 (absence d'expression de PTEN)	103	IHC	Corrélation inverse significative entre l'expression de PTEN et de phospho-AKT.	213

Myélome multiple	89	18	IHC	La plupart des cas ont montré une expression nucléaire forte et une faible réactivité cytoplasmique dans des cellules plasmatiques.	214
Leucémie myéloïde aigue	72	61	WB	La phosphorylation d'AKT est significativement associée à la phosphorylation de GSK3 β , FKHR et de PTEN ainsi qu'à un mauvais pronostic.	215,216

Plusieurs mécanismes peuvent conduire à l'activation d'AKT dans les tumeurs humaines, y compris, la perte d'expression ou l'inactivation de PTEN [217], l'amplification du gène *PIK3CA* [218], la mutation de gènes *PIK3CA* ou *PIK3RI* [219,220], la surexpression des récepteurs de facteurs de croissance tels que HER-2/neu dans le cancer du sein [221-223], et / ou l'activation de Ras [224].

7.2. PTEN

Les mutations germinales du gène PTEN provoquent des prédispositions à des syndromes héréditaires, dont le syndrome de Cowden et le syndrome de Bannayan-Zonana [225] qui sont associés à un risque élevé de cancer du sein et de la thyroïde [226,227]. Des mutations somatiques et l'inactivation biallélique de PTEN sont fréquemment observées dans le glioblastome de haut grade, le mélanome et les cancers de l'endomètre, la vessie, l'ovaire, le côlon, la prostate, le poumon, et le lymphome diffus à grandes cellules B [225, 228-230]. La perte de fonction de PTEN entraîne une augmentation de la concentration de PIP3 (substrat principal *in vivo* pour PTEN), ce qui entraîne une activation constitutive des composants en aval de la voie PI3K, y compris les kinases AKT et mTOR [161]. Ainsi, l'analyse par western blot de 103 cancers de l'endomètre a montré une corrélation inverse significative entre l'expression de PTEN et AKT phosphorylée [213], et des souris PTEN hétérozygotes (+/-) ont développé spontanément des néoplasmes de diverses origines

histologiques [231]. La perte de la fonction de PTEN peut également se produire par la méthylation verrouillant la transcription de PTEN, ou par l'instabilité de la protéine [131, 232].

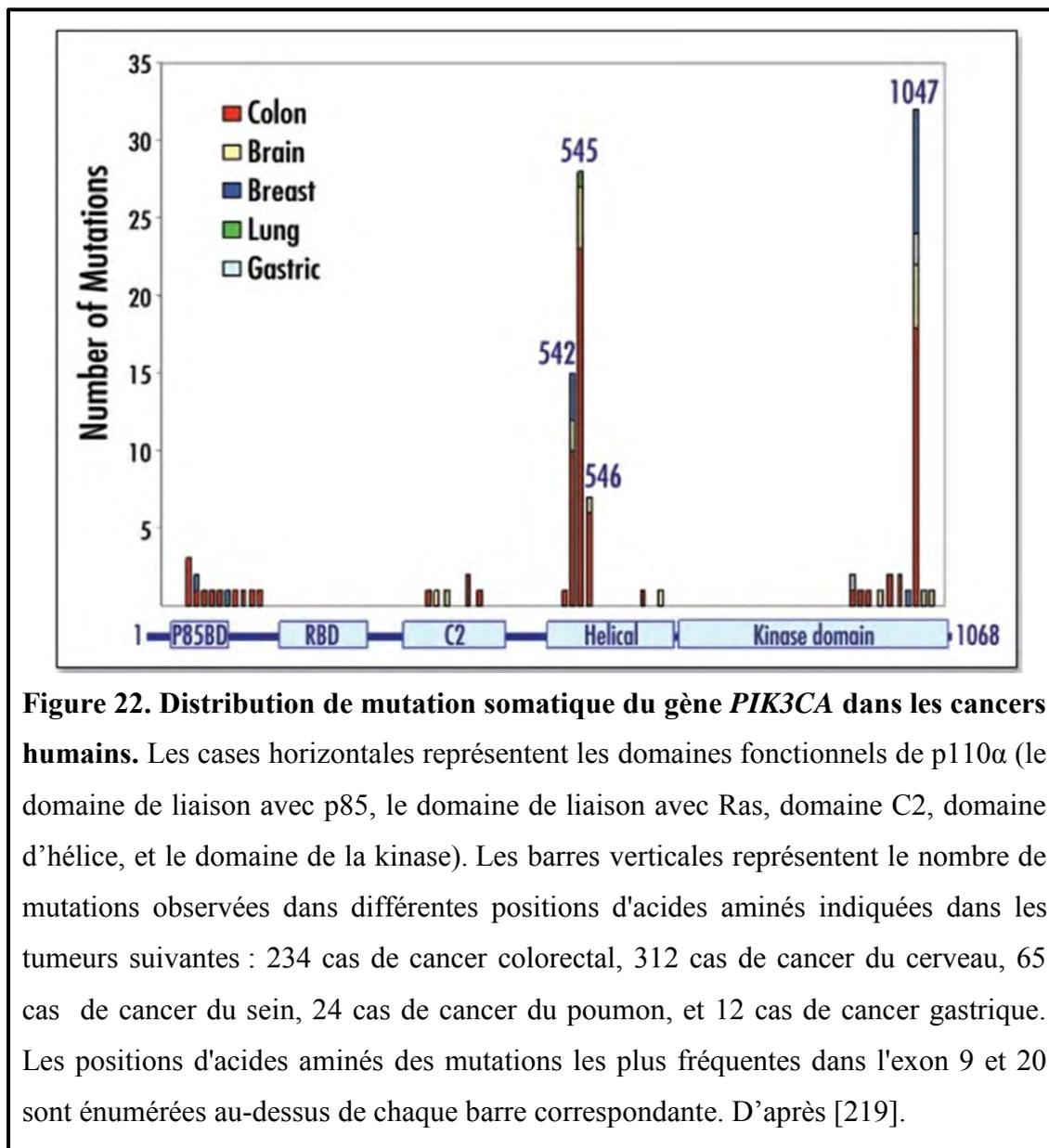
7.3. PI3K

L'importance de la PI3K dans le cancer a été confirmée par la découverte du fait que le gène *PIK3CA* codant pour la sous-unité p110 α est fréquemment muté dans certaines tumeurs humaines [219, 233,234]. Ces altérations génétiques de *PIK3CA* composées exclusivement de mutations somatiques faux-sens regroupées dans deux régions de "hots spots" dans les exons 9 et 20, correspondaient respectivement au niveau protéique aux mutations E542K et E545K situées au domaine d'hélice, et à la mutation H1047R située dans le domaine kinase de la sous-unité p110 α .

Ces mutations augmentent l'activité enzymatique de la PI3K in vitro [100,235,236], conduisant à l'activation indépendante d'AKT des facteurs de croissance [235-237], et induisant une transformation oncogénique [235-239].

Des mutations somatiques du gène *PIK3CA* ont été signalées dans plusieurs types de cancers humains, en particulier, carcinome colorectal (32%), les glioblastomes (27%), les cancers gastriques (25%), du sein (8%) et du poumon (4%) [219]. Une étude ultérieure a élargi l'analyse mutationnel du gène *PIK3CA* dans le cancer du sein et a montré que 25% de tumeurs contenait des mutations somatiques dans le gène *PIK3CA* situées majoritairement dans le domaine kinase. De plus, plusieurs études ont montré l'amplification du gène *PIK3CA*. Ainsi, dans les carcinomes de l'ovaire, l'amplification du gène *PIK3CA* a été associée avec l'augmentation de transcription et d'expression de la protéine p110 α , ainsi qu'avec une augmentation de l'activité enzymatique de PI3K [218]. De même, dans les carcinomes gastriques primaires, l'amplification du gène *PIK3CA* a été observée dans 20/55 (36%) tumeurs qui expriment PTEN et elle a été fortement associée à une augmentation de transcription de *PIK3CA* et à des niveaux élevés de phospho-AKT [240]. Cette amplification a été également détectée dans le cancer du col de l'utérus, le carcinome épidermoïde de la tête et du cou [241,242]. Enfin, l'amplification de *PIK3CD* et de *PIK3C2B* survient aussi dans le glioblastome [243].

La sous-unité régulatrice p85 de la PI3K codée par le gène *PIK3R1* est également la cible de mutations dans les cancers humains. Des mutations somatiques du gène *PIK3R1* ont été indiquées dans les tumeurs primaires humaines, et dans des lignées cellulaires colorectales et ovariennes [244] ainsi que dans des glioblastomes humains [245]. La plupart de ces mutations sont situées dans le domaine de liaison avec la p110 de p85 α et sont capables de perturber le contact inhibiteur de p85 α avec p110, menant à l'activation constitutive de la PI3K [244,246].



8. Activation de la voie PI3K/AKT dans les tumeurs malignes lymphoïdes

Le rôle potentiel de la sur-activation de voie PI3K/AKT dans le développement des tumeurs lymphoïdes malignes a été identifié dans une étude utilisant des souris transgéniques exprimaient une forme active de PI3K dans des lymphocytes T. Ces animaux développaient des troubles lymphoprolifératifs ainsi que de maladies auto-immunes [247].

Herman et al. ont également montré que les cellules de la leucémie lymphoïde chronique présentent une activité intrinsèque de la p110 δ , la partie catalytique de PI3K, statistiquement plus élevée par rapport aux cellules hématopoïétiques normales [248]. Dans une autre étude, Ikeda et al. ont reporté une hyperactivation de la p110 δ dans les tumeurs et les lignées cellulaires de myélome multiple [249].

De même, la voie PI3K/AKT est activée dans des lignées cellulaires et tumeurs primaires de lymphome diffus à grandes cellules B, où des mutations de *PIK3CA* et une inactivation de PTEN ont été détectées [250], et dans lesquelles une expression élevée de phospho-AKT a été associée à une mauvaise survie de patients [251]. Une étude rétrospective a montré que 25% des patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B présentaient une forte expression immunohistochimique de phospho-AKT, et avaient des résultats cliniques défavorables par rapport aux patients ayant une faible activité de phospho-AKT même suite à un traitement en immunochimiothérapie [252].

Le lymphome du manteau a également été associé à l'activation constitutive de phospho-AKT, en absence de mutations de *PIK3CA* ; la perte d'expression de PTEN pourrait expliquer l'activation d'AKT dans le lymphome du manteau [253]. La perte d'expression de PTEN et / ou l'amplification du gène *PIK3CA* constituent des mécanismes mutuellement exclusifs dans l'activation de l'AKT et semblent particulièrement impliqués dans la pathogenèse du lymphome du manteau [254]. Enfin, l'activation de la voie PI3K/AKT est impliquée dans le lymphome B à grandes cellules du médiastin et la maladie de Hodgkin [255,256].

En ce qui concerne le lymphome folliculaire, l'analyse protéomique d'échantillons tissulaires a permis d'identifier une augmentation de l'expression d'AKTSer473 phosphorylée [257,258]. De plus, le NVP-BEZ235, un inhibiteur qui cible à la fois la PI3K et mTOR a été montré comme étant efficace pour inhiber la prolifération des cellules de lymphome folliculaire [259].

Enfin, de manière intéressante, il a été prouvé récemment que l'Idelalisib (CAL-101), un inhibiteur de PI3K δ régule négativement l'expression de phospho-AKT et induit l'apoptose de lignées cellulaires de lymphome folliculaire [260]. Ce résultat a débouché sur une étude clinique de phase I avec des résultats prometteurs chez les patients atteints de lymphome non hodgkinien [261], et sera étendue à un essai clinique de phase II [262].

Chapitre IV : Objectif du projet

IV. Objectif du projet

Comme expliqué précédemment, le dysfonctionnement de la voie PI3K/AKT joue un rôle important dans la pathogenèse de plusieurs cancers humains, notamment les tumeurs lymphoïdes. L'activation aberrante de cette voie est ainsi associée à la progression tumorale et à la chimiorésistance.

L'activation oncogénique de la voie PI3K peut se produire par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes, y compris des mutations ou amplifications du gène *PIK3CA*, augmentations de phosphorylation d'AKT et des mutations ou pertes d'expression de PTEN.

Des études par microarrays de protéines sur des échantillons tissulaires de lymphome folliculaire ont démontré une augmentation d'activation d'AKT [257,258]. Par ailleurs, il semble exister une efficacité relative des inhibiteurs de cette voie (anti PI3K ou anti mTOR) sur des lignées cellulaires de lymphome folliculaire [259]. Récemment, il a été démontré que la drogue l'Idelalisib (CAL-101), un inhibiteur de PI3K δ régule négativement l'expression de phospho-AKT et induit l'apoptose des lignées cellulaires de lymphome folliculaire [260]. Sur la base de ces résultats une étude clinique de phase I avec des résultats prometteurs chez les patients atteints de lymphome non hodgkinien a été réalisée [261]. Ces travaux sont maintenant étendus à un essai clinique de phase II [262].

L'ensemble de ces travaux indiquent que le dysfonctionnement de la voie PI3K/AKT pourrait être impliqué dans la pathogenèse de lymphome folliculaire par certains mécanismes non identifiés à ce jour.

Il apparaît donc utile de pouvoir disposer dans les lymphomes folliculaires de biomarqueurs pronostiques de la voie PI3K/AKT et d'une nouvelle cible thérapeutique.

Dans ce but, nous avons cherché à mieux caractériser ces dysfonctionnements putatifs dans une série de tissus biopsiques de lymphome folliculaire en réalisant d'une part l'analyse mutationnelle du gène *PIK3CA* par séquençage selon la méthode de Sanger et d'autre part l'évaluation du statut d'activation de la voie PI3K/AKT, en étudiant le profil d'expression des protéines AKT, phospho-AKT (pAKT), et PTEN par western blot et immunohistochimie.

Chapitre V : Méthodologies expérimentales

V. Méthodologies expérimentales

1. Patients et échantillons tissulaires tumoraux

Des tissus biopsiques de 38 patients atteints de lymphome folliculaire au moment du diagnostic et avant tout traitement ont été congelés entre 2002 et 2012.

Au diagnostic, l'immunophénotypage a montré que tous les échantillons de LF contenaient plus de 70% de cellules tumorales B (en se basant sur l'expression immunohistochimique du marqueur CD20), alors que la composante des cellules T réactives identifiées par la positivité du marqueur CD3 était inférieure à 30%. Deux échantillons de lymphadénites bénins ont été utilisés comme témoins.

En parallèle des biopsies congelées, des échantillons tissulaires fixés au formol et inclus en paraffine de chaque patient ont été également recueillis. La classification de lymphome folliculaire a été faite selon les critères de classification de l'Organisation Mondiale de la Santé [263]. Les échantillons ont été classés en grade 1-2 (n = 34), grade 3 (n = 2) et non gradable (n = 2). Le suivi médian des patients était de 94 mois. Les caractéristiques cliniques des patients sont présentées dans le Tableau 1 [voir chapitre VI, page 76 (article, page 3)].

Tous les patients ont donné leur consentement éclairé, et l'étude a été approuvée par le Comité d'Orientation Stratégique de l'Institut Paoli-Calmettes.

2. Extraction d'ADN, d'ARN et de protéine

L'ADN génomique, l'ARN, et les protéines ont été extraits simultanément à partir des tissus congelés en utilisant le kit de purification AllPrep DNA/RNA/Protein de Qiagen conformément au protocole du fabricant (Figure 23).

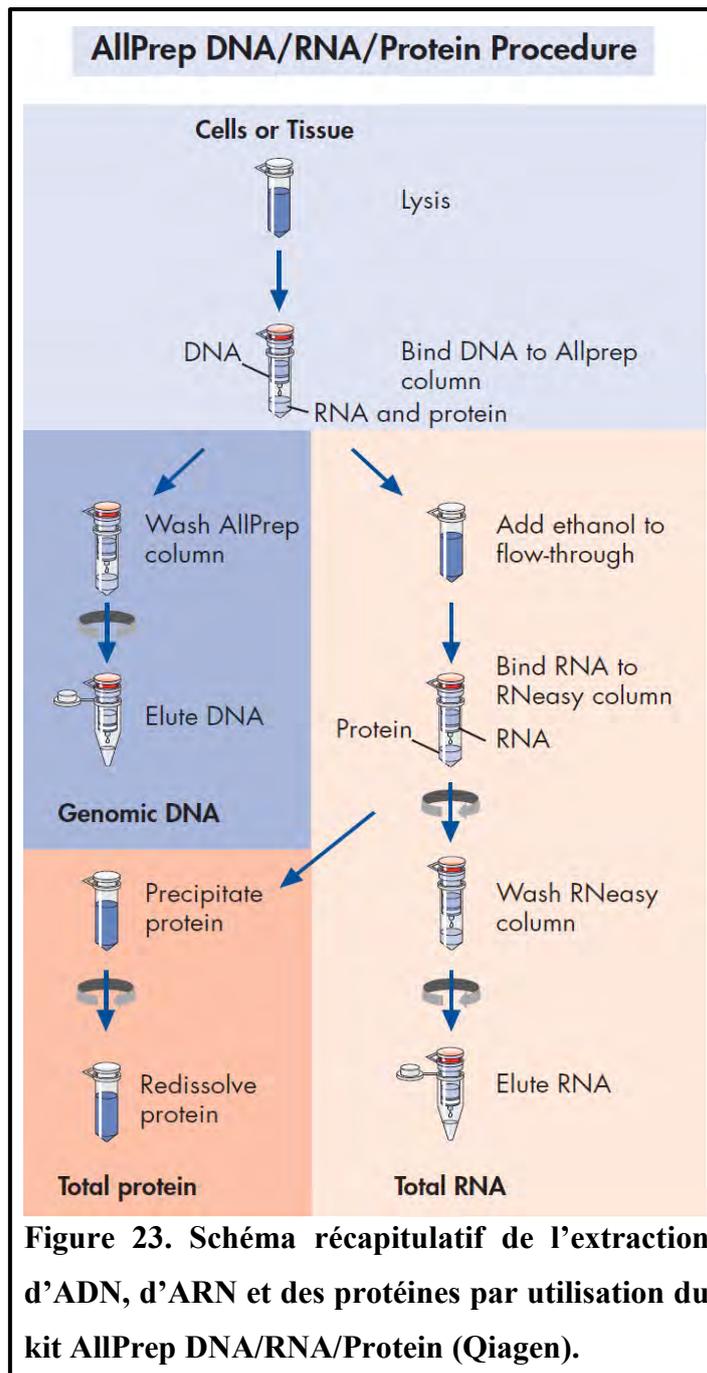
❖ Protocole

- 1) 30 mg de tissu sont lysés dans des tubes en présence de billes d'acier et d'une solution de lyse constituée de tampon *RLT* et de β -mercaptoéthanol 1%. Le tampon contient de la guanidine-thiocyanate à fort pouvoir dénaturant qui inactive les DNases, RNases ainsi que les protéases afin d'assurer l'extraction intacte de l'ADN, l'ARN, et des

protéines. La lyse est réalisée à l'aide d'un broyeur-homogénéisateur Precellys 24 (Bertin Technologies).

- 2) Le lysat obtenu est déposé directement sur une colonne QiaShredder et centrifugé à 13000 rpm pendant 3 min afin d'éliminer les débris cellulaires. L'éluat est ensuite transféré dans une colonne Allprep DNA mini, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 30s.
- 3) La colonne Allprep DNA mini est conservée à température ambiante pour une purification d'ADN ultérieure tandis que l'éluat récupéré est homogénéisé avec de l'éthanol 100%. Ce mélange est alors déposé sur une colonne RNeasy mini et centrifugé durant 15s à 10000 rpm. Du tampon *APP* qui permet de précipiter les protéines est rajouté à l'éluat récupéré, et l'ensemble est incubé pendant 10min à température ambiante.
- 4) Un premier tampon de rinçage *RWI* est appliqué sur la colonne RNeasy mini puis celle-ci est à nouveau centrifugée à 10000 rpm pendant 15s.
- 5) L'éluat de la colonne mini RNeasy est jeté, et l'on procède au lavage des colonnes ADN et ARN. Le tampon de rinçage *AWI* est déposé sur la colonne Allprep DNA mini, ainsi que le tampon *RPE* sur la colonne RNeasy mini. Les deux colonnes sont centrifugées 15s à 10000 rpm. Un deuxième rinçage est effectué en appliquant du tampon *RPE* sur la colonne RNeasy mini et de l'éthanol à 80% sur la colonne Allprep DNA mini. Ces deux dernières subissent à nouveau une centrifugation à 13000 rpm, pendant 2 min.
- 6) Afin de récupérer l'ADN, du tampon d'élution *EB* est ajouté à la colonne Allprep DNA mini et incubée pendant 2 min à température ambiante. Une dernière centrifugation de la colonne (1 min à 13000 rpm) permet de récupérer l'ADN. Pour éluer l'ARN, on procède de la même manière en prenant soin d'utiliser de l'eau RNase free à la place du tampon d'élution.

- 7) Les concentrations d'ADN et d'ARN sont déterminées par lecture de la densité optique (DO) à 260 nm sur un spectrophotomètre (Thermo Scientific NanoDropTM 1000, logiciel ND-1000 V3.5.1, Labtech, France). La pureté des acides nucléiques ADN et ARN est contrôlée par la détermination du rapport de DO 260/280 nm, qui doit être compris entre 1.7-1.9 pour l'ADN et 1.9-2.1 pour l'ARN. L'ADN et l'ARN sont conservés respectivement à -20°C et à -80°C.
- 8) En ce qui concerne les protéines, après avoir incubé le mélange contenant les protéines pendant 10 min (étape 3). Une centrifugation à 13000 rpm pendant 10 min permet de précipiter les protéines.
- 9) Le surnageant est soigneusement enlevé et le culot protéique est précipité par de l'éthanol à 70% lors d'une centrifugation à 10000 rpm pendant 1min.
- 10) Ce dernier culot est séché pendant 15 min dans un Vacuum Concentrator 5301 afin d'éliminer toute trace d'éthanol.
- 11) Le culot protéique est ensuite dissout dans du tampon *Laemmli sample buffer* et incubé à 95°C pendant 5 min sous agitation, pour favoriser la dissolution complète et la dénaturation des protéines.
- 12) Enfin, une dernière centrifugation pendant 1 min à 10000 permet d'agglutiner toute matière insoluble résiduelle. Les protéines sont conservées à -20°C.



3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse mutationnelle des hot spots du gène *PIK3CA* (exons 9 et 20)

3.1.PCR

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier selon un mode exponentiel un fragment d'ADN double brin. L'ADN est synthétisé par la polymérase de la bactérie thermophile *Thermophilus aquaticus* (Taq DNA polymérase) par extension à partir de deux amorces oligonucléotidiques capables de s'hybrider de part et d'autre de la séquence cible à amplifier, l'une avec le brin sens et l'autre avec le brin anti-sens. Cette réaction d'amplification implique trois étapes réalisées en plusieurs fois (de 20 à 35 cycles) :

- Une dénaturation réalisée à température élevée (95-96°C) pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.
- Une hybridation qui permet l'appariement des deux brins d'ADN avec les amorces à une température définie selon la composition des amorces (entre 50 et 60°C).
- Une élongation à 72°C qui réalise la synthèse des brins complémentaires par la Taq DNA polymérase.

Ces cycles thermiques sont réalisés dans un thermocycleur qui permet de programmer les différentes températures, la durée de chaque étape et le nombre de cycles.

❖ Protocole

La PCR est réalisée à partir d'ADN génomique. Dans un volume final de 25µl, le mélange de PCR contient 25ng d'ADN, 0,4 µM de chaque amorce (les séquences sens et anti-sens des amorces de l'exon 9 et 20 sont indiquées dans le Tableau 3), 0,2 mM de dNTP, 0,04 U de Taq ADN polymérase, dans un tampon optimisé pour l'activité de l'enzyme contenant 1,5 mM de MgCl₂.

Pour amplifier l'exon 20, une dénaturation initiale à 95°C est effectuée pendant 10 min. Puis, un cycle comprenant une dénaturation (30s à 95°C), une hybridation (30s à 55°C), et une élongation (30s à 72°C) est répété 35 fois. La réaction est enfin terminée par une élongation finale de 10 min à 72°C.

Pour amplifier l'exon 9, une «touch-down PCR» a été réalisée afin d'empêcher l'amplification non spécifique des produits de PCR, dus à la présence de pseudogène. Cette réaction consiste à utiliser une température d'hybridation très haute lors des premiers cycles afin de favoriser les interactions spécifiques amorces-ADN, puis à descendre de manière séquentielle la température d'hybridation afin de privilégier l'amplification spécifique.

Les étapes d'activation, de dénaturation, d'élongation et de terminaison sont les mêmes que celles utilisées pour amplifier l'exon 20. Seules, changent les températures de l'étape d'hybridation : 4 cycles à 60°C, 4 cycles à 59°C, 4 cycles à 58°C, 6 cycles à 57°C, 6 cycles à 56°C, 8 cycles à 55°C et enfin 13 cycles à 54°C.

Les produits amplifiés sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% pour visualiser sous ultraviolet les fragments marqués au Syber Safe (intercalant permettant de visualiser les acides nucléiques). Leur taille est estimée grâce à un marqueur de poids moléculaire qui est mis à migrer en même temps que les échantillons d'intérêt.

Tableau 4. Séquences des amorces de PCR

Gène <i>PIK3CA</i>	Amorce sens	Amorce anti-sens
Exon 9	5'TTGCTTTTCTGTAAATCATCTGT3'	5'CTGCTTTATTTATTCCAATAGGTATG3'
Exon 20	5'CTCAATGATGCTTGGCTCTG3'	5'GGAATCCAGAGTGAGCTTTC3'

3.2.Réaction de séquence et analyse des mutations du gène *PIK3CA*

Les produits de PCR amplifiés sont purifiés par filtration sous vide à l'aide d'une plaque Multiscreen (Millipore).

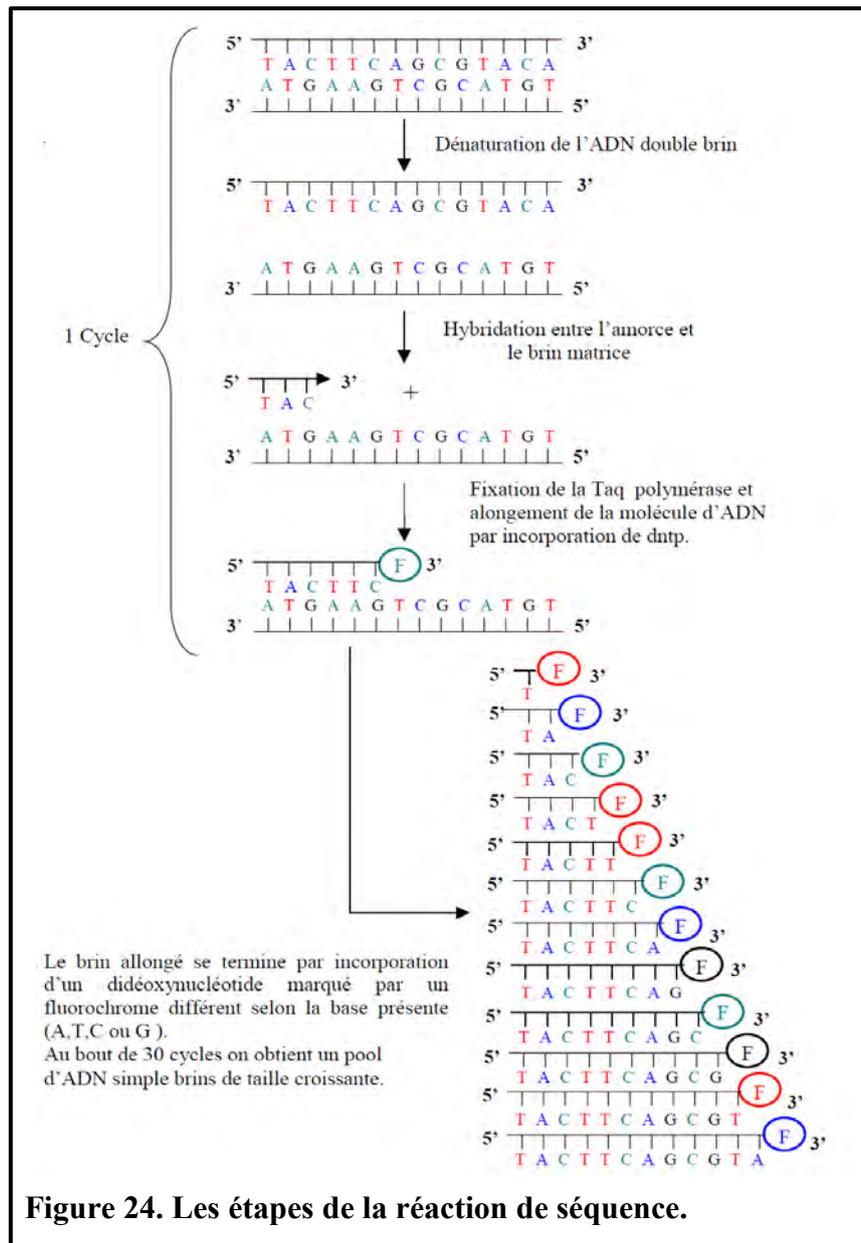
L'ADN amplifié et purifié est soumis à une réaction de séquence sens et anti-sens en utilisant le kit ABI Big Dye Terminator V1.1 (Applied Biosystems), dont le mélange réactionnel contient des analogues de nucléotides portant des fluorochromes différents (ddNTP = didésoxyribonucléotides), des dNTP, de l'ADN polymérase et un tampon contenant du MgCl₂. Les amorces utilisées sont les mêmes que précédemment mais avec une concentration de 0.32µM. La réaction de séquence se fait dans le thermocycleur selon le programme suivant :

Programme de réaction de séquence			
Hot start	1min	96°C	1 cycle
Dénaturation	10sec	96°C	 25cycles
Hybridation	5sec	50°C	
Elongation	2min	60°C	

Le principe de cette technique consiste à synthétiser des fragments d'ADN, dont la synthèse est interrompue par l'incorporation aléatoire d'un des analogues de nucléotides ddNTP qui bloque la réaction de polymérisation. Cela permet d'obtenir des fragments d'ADN de tailles différentes marqués par des fluorochromes portés par les ddNTP (Figure 24).

Après la réaction de séquence, la purification des fragments d'ADN obtenus est réalisée par filtration sur résine SephadexG50 super fine pour éliminer les nucléotides ddNTP non incorporés et les amorces de PCR en excès.

Par la suite, le produit de la réaction de séquence est analysé dans un séquenceur automatisé capillaire ABI 3730 (Applied Biosystems) qui détecte la fluorescence des fragments d'ADN et leur taille précise sur le principe de l'électrophorèse. L'analyse des données et la détermination des mutations sont réalisées à l'aide du logiciel SeqScape (Applied Biosystems).



4. Western Blot

Le Western Blot (WB) est une technique de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un mélange complexe de protéines extraites d'un échantillon biologique. Elle se déroule en trois étapes : (1) la séparation par électrophorèse, (2) le transfert vers une membrane souple, et (3) le marquage de la protéine cible en utilisant un anticorps primaire, et un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est souvent lié à une enzyme telle que la phosphatase alcaline

ou la peroxydase de raifort, utilisée en conjonction avec un substrat chimioluminescent qui émet une luminescence lors de la conversion par l'enzyme. La lumière émise au site de la conversion du substrat peut être capturé sur un film radiographique.

❖ Protocole

Après dénaturation pendant 5 min à 95°C, les lysats protéiques (15µg) sont déposés sur un gel de polyacrylamide 9% en condition dénaturante, et migrent par électrophorèse pendant 1h30 à 130V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Millipore) pendant 1h à 20V. Pour saturer les sites de liaison non spécifiques, les membranes sont mises sous agitation pendant une 1h dans du tampon TBS Tween 20 (0.1%), 5% de BSA. Elles sont ensuite incubées sur la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire dilué dans une solution du TBS Tween 20 0.1%, 5% de BSA (Tableau 4).

Tableau 5. Anticorps primaires utilisés en western-blot.

Anticorps primaires	Référence	Type	Dilution
anti-AKT	Cell Signaling Technology, 9272	IgG polyclonale lapin	1:1800
anti-phospho-AKT	Cell Signaling Technology, 4058	IgG polyclonale lapin	1:1000
anti-PTEN	Cell Signaling Technology,9552	polyclonale lapin	1:1000
anti-GAPDH	mAbcam 9484	IgG monoclonale	1:5000

Après 3 lavages pendant 10 minutes dans du tampon TBS Tween 20 0.1%, les membranes sont incubées pendant 1h sous agitation et à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase HRP (Dako Cytomation) dilué au 1/20000 dans du tampon TBS Tween 20 0.1%. Après autres 3 lavages de 10 min la révélation chimioluminescente est réalisée avec le Kit ECL PIERCE.

Des lysats protéiques des lignées cellulaires T Jurkat (PTEN-, pAKT+) et SupT1 (PTEN+, pAKT-) ont été utilisées respectivement comme contrôles positifs et négatifs pour l'expression de phospho-AKT et de PTEN.

La protéine AKT a été utilisée comme témoin de charge pour évaluer l'expression de phospho-AKT (pAKT) dans chaque échantillon. La même méthode a été utilisée pour évaluer l'expression de PTEN. De plus, la protéine GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge supplémentaire pour PTEN.

La quantification des bandes d'expression d'AKT et de pSer473-AKT a été réalisée par analyse densitométrique en utilisant le logiciel ImageJ, et les valeurs du ratio pSer473-AKT/AKT de chaque échantillon ont été normalisées par rapport à la valeur du contrôle positif (cellules Jurkat).

5. Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) est une technique permettant la détection morphologique de l'expression d'une protéine intra-tissulaire par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps. Ces anticorps peuvent être conjugués directement avec des enzymes (peroxydase, phosphatase alcaline) ou des marqueurs de fluorescence, ou reconnus par des anticorps secondaires conjugués avec des marqueurs de fluorescence ou avec des enzymes de révélation (peroxydase, phosphatase alcaline), qui provoquent une réaction colorimétrique en présence de chromogène (DAB, ACE) visible sous microscope optique. Cette technique se réalise sur des coupes tissulaires congelées ou paraffinées.

❖ Protocole

5 µm de tissu inclus en bloc de paraffine ont été coupés, étalés sur des lames et séchés sur la nuit à température ambiante. Le marquage a été réalisé dans l'automate Autosteiner Dako en utilisant le kit EnVision FLEX (Dako) selon les instructions fournies par le fabricant (Dako, Glostrup, Danemark). Afin de restaurer l'antigénicité des épitopes, un déparaffinage et un démasquage antigénique sont réalisés grâce à l'utilisation d'un tampon EnVision FLEX target retrieval solution à pH 6 (DAKO) pendant 40 min à 99°C. Ensuite, les coupes tissulaires sont refroidies à température ambiante pendant 20 min, et rincées pendant 5 min dans le tampon de lavage EnVision FLEX.

L'activité peroxydase endogène est inhibée par incubation des coupes pendant 5 min dans une solution Peroxidase-blocking reagent (Dako) contenant du peroxyde d'hydrogène H₂O₂, ainsi qu'un sérum bloquant pour saturer les sites de réaction non spécifiques. Les lames sont ensuite lavées dans le tampon de lavage EnVision FLEX, puis incubées avec l'anticorps primaire anti-phospho-AKT (anticorps monoclonal de souris, clone 587F11, 4051 Cell Signaling Technology, dilution 1:200), ou anti-PTEN (anticorps monoclonal de souris, clone

6H2.1, DAKO, dilution 1:150) à température ambiante pendant 60 min, suivie d'un rinçage dans le tampon EnVision FLEX DAKO.

Pour amplifier l'immuno-marquage de PTEN, les coupes tissulaires sont incubées avec le Linker souris EnVision FLEX (DAKO) pendant 15 minutes.

La révélation des anticorps primaires fixés aux antigènes est réalisée par incubation de 20 min avec le polymère de dextran conjugué à des anticorps secondaires et à l'enzyme peroxydase. Après lavage, le substrat DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Dako) est utilisé pendant 10 min pour révéler l'activité peroxydase. Après un dernier rinçage, les coupes sont contre-colorées à l'hématoxyline pendant 5min, et déshydratées dans l'éthanol à concentration croissante (70%, 80%, 95%, 100%), puis dans l'Histolemon. Les coupes sont enfin montées et observées sous microscope optique. La positivité consiste en une coloration brunâtre et granulaire, nucléaire, cytoplasmique ou membranaire. Des coupes histologiques de cancer du sein déjà testés positivement pour l'expression de phospho-AKT, et de cancer de l'utérus pour l'expression de PTEN, sont utilisées comme témoins positifs.

6. Analyse statistique

L'association de l'expression de phospho-AKT avec les caractéristiques cliniques des patients a été analysée à l'aide du test chi carré (χ^2) pour les données catégorielles. La survie globale a été mesurée de la date du diagnostic à la date du décès ou à la date de la dernière visite de suivi pour les patients vivants. La survie sans progression a été définie comme le temps de réponse après la première chimiothérapie.

L'analyse de survie a été réalisée en utilisant la méthode de Kaplan-Meier et le test du log-rank a été utilisé pour comparer les groupes. Les données statistiques ont été produites par le logiciel SPSS.

Chapitre VI : Résultats

Article: Constitutive AKT activation in follicular lymphoma

Ouardia I. Yahiaoui, Jacques A. Nunès, Céline Castanier, Raynier Devillier, Florence Broussais, Aurélie J. Fabre, Dalila Naimi, Réda Bouabdallah, Daniel Olive, Luc Xerri.

BMC Cancer 2014, 14:565

VI. Résultats

Afin de disposer d'un biomarqueur prédictif, et d'apporter une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du lymphome folliculaire, nous avons procédé à l'analyse des anomalies moléculaires affectant les mécanismes d'activation de la voie PI3K/AKT, non identifiés dans le lymphome folliculaire. Pour ce faire nous avons d'une part recherché des mutations du gène *PIK3CA*, et d'autre part évaluer le statut d'activation des effecteurs de la voie PI3K/AKT.

1. Absence de mutations activatrices du gène *PIK3CA* dans le LF

Nous avons procédé à l'analyse mutationnelle dans 38 échantillons de LF pour détecter des mutations somatiques dans les exons 9 et 20 du gène *PIK3CA*. Le screening mutationnel a été réalisé afin d'évaluer des «hot spots» dans les domaines hélicoïdal (exon 9) et kinase (exon 20), dans lesquels 80% des mutations sont rapportées [219]. Cependant, nous n'avons pas décelé de mutations dans les LF étudiés.

2. Expression d'AKT, pAKT et PTEN dans le lymphome folliculaire

❖ *Western blot*

Afin d'étudier l'état de l'activation de la voie PI3K/AKT dans le LF, nous avons évalué le niveau d'expression des protéines AKT, AKT phosphorylée (Ser473), et PTEN, en procédant par western blot (WB) et immunohistochimie (IHC).

L'analyse par WB a révélé une expression d'AKT dans tous les échantillons congelés à 60 kDa de masse moléculaire. L'expression de phospho-AKT a été observée chez 14/38 (37%) des échantillons de LF à 60 kDa (Figure 1A, voir article ci-dessous, page 5).

La quantification densitométrique de l'intensité des bandes de phospho-AKT subdivise notre série en trois groupes (Figure 2, voir article ci-dessous, page 5) :

- 9/38 (24%) des patients avec un taux élevé de protéine phospho-AKT
- 5/38 (13%) des patients avec un faible niveau d'expression de phospho-AKT
- 24/38 (63%) des cas de LF négatifs pour l'expression de phospho-AKT

Pour approfondir l'étude des mécanismes de l'activation d'AKT dans le LF, nous avons évalué le profil d'expression de la protéine PTEN dans les mêmes échantillons. L'analyse par WB a montré que 30/38 (79%) des cas exprimaient PTEN à 54 kDa de masse moléculaire. Alors que 8/38 (21%) des cas étaient négatifs pour l'expression de PTEN (Figure 1A, voir article ci-dessous, page 5).

Parmi les huit cas qui ont une perte d'expression de PTEN, seulement trois cas ont été associés à l'expression de phospho-AKT, dont deux cas montrent un taux élevé d'activation d'AKT, et un seul cas présente un faible niveau d'activation d'AKT, tandis que les cinq restants ne présentaient aucune expression de phospho-AKT.

La perte de PTEN et l'absence de phosphorylation de la sérine d'AKT à la position 473 (pAKT) dans ces cinq cas ont été validées dans une analyse indépendante de WB, dans laquelle la protéine GAPDH a été utilisée comme témoin de charge (Figure 1B, voir article ci-dessous, page 5).

Onze des quatorze échantillons qui sont positifs pour phospho-AKT expriment PTEN.

L'analyse par WB montre l'expression des protéines AKT et PTEN dans les lymphadénites (cas N°39 et N°40). Les lymphadénites expriment faiblement AKT phosphorylée (Figure 1A, voir article ci-dessous, page 5). La valeur relative de phospho-AKT a été estimée, respectivement, à 0,48 et 0,56 pour le cas N°39 et N°40 (Figure 2, voir article ci-dessous, page 5).

❖ *Immunohistochimie*

Nous avons examiné par IHC le statut d'expression de phospho-AKT et PTEN, en utilisant des tissus fixés au formol et inclus en paraffine, correspondant aux tissus congelés de LF.

L'immuno-marquage de phospho-AKT a été observé dans les cellules B malignes intra-folliculaires à des intensités variables chez 15/38 échantillons de LF (Figure 3A, voir article ci-dessous, page 6). Parmi ces 15 cas, des cellules T réactives interfolliculaires rares présentaient un marquage positif de phospho-AKT dans un seul cas. 18/38 échantillons de LF étaient négatifs pour phospho-AKT, alors que le statut d'IHC ne pouvait être évalué dans 5 échantillons.

L'immuno-marquage de PTEN était positif dans les cellules B malignes intra-folliculaires dans 30/38 cas, et 18 de ces 30 échantillons montrent également la même positivité de PTEN dans des cellules T et des macrophages interfolliculaires réactifs.

Le signal d'immuno-marquage de PTEN était hétérogène dans 12 de ces 30 échantillons, présentant soit une forte positivité de PTEN dans les cellules B malignes folliculaires, associées à un faible marquage dans les cellules T et les macrophages réactifs autour des follicules, ou un profil inverse de positivité (Figure 3B et C, voir article ci-dessous, page 6). L'immuno-marquage de PTEN était négatif dans 3/38 échantillons, alors que le statut IHC ne pouvait être évalué dans 5 échantillons.

Quant aux lymphadénites bénignes, elles présentaient un marquage homogène positif pour l'expression de PTEN. Alors que pour phospho-AKT, le cas N°39 avait quelques cellules positives en dehors des follicules et le cas N°40 était négatif pour phospho-AKT.

❖ *Les corrélations entre IHC et WB*

Les 8 cas négatifs en PTEN par WB ont montré différents profils d'expression d'IHC: 1 seul cas a été complètement négatif; un cas n'était pas évaluable en raison du bruit de fond élevé, tandis que les autres cas montraient une expression hétérogène dans une fraction de cellules malignes ou réactives.

Bien que les données d'IHC corrélaient avec les résultats de WB dans la plupart des échantillons, il est à noter que la corrélation n'est pas parfaite. Ceci peut être dû à différents niveaux de sensibilité de chaque technique et/ou à l'hétérogénéité intra-tumorale. Dans cette mesure, l'analyse par WB est apparue plus fiable pour évaluer le niveau d'expression de phospho-AKT et PTEN, car il reflète une quantité moyenne globale de chaque protéine, ce qui pourrait être quantifiée par densitométrie. En revanche, il n'a pas été possible d'évaluer le seuil de positivité d'expression par IHC en raison des variations dans le nombre de cellules positives au sein de sections histologiques.

Cependant, l'IHC était utile et nécessaire pour localiser l'expression dans les cellules malignes et/ou réactives. Le résumé des résultats est présenté dans le Tableau 2 (voir article ci-dessous, page 7).

3. Corrélation avec les caractéristiques cliniques des patients

Nous nous sommes intéressés à tester la corrélation entre le statut d'expression de phospho-AKT et les paramètres clinico-pathologiques des patients, comme le grade histologique, le volume de la tumeur, la survie globale et la survie sans progression. Aucune corrélation significative n'a été observée avec tous les paramètres testés. Les caractéristiques cliniques des patients sont présentées dans le Tableau 1 (voir article ci-dessous, page 3).

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Constitutive AKT activation in follicular lymphoma

Ouardia I Yahiaoui^{1,2,3,4,5,9*}, Jacques A Nunès^{1,2,3,4}, Céline Castanier^{1,2,3,4}, Raynier Devillier^{1,4,6}, Florence Broussais⁶, Aurélie J Fabre^{7,8}, Dalila Naimi⁵, Réda Bouabdallah⁶, Daniel Olive^{1,2,3,4} and Luc Xerri^{1,2,3,4,7}

Abstract

Background: The phosphoinositide 3- kinase (PI3K) pathway is involved in the growth of various human cancers, including lymphoid malignancies. However its role in the pathogenesis of follicular lymphoma (FL) has not been yet described.

Methods: To clarify this point, biopsy tissue samples from 38 human FL cases were investigated for PIK3CA somatic mutations in exon 9 and 20 using direct sequencing. The same samples were analyzed using western blotting and immunohistochemistry to detect expression of AKT, phosphorylated AKT (pAKT), and PTEN proteins. Two cases of benign lymphadenitis were used as controls.

Results: AKT expression was present in all FL and lymphadenitis cases. 14/38 (37%) FL and 2/2 lymphadenitis cases expressed pAKT. 9/38 (24%) FL samples showed high level of pAKT, whereas 5/38 (13%) FL cases and 2/2 benign lymphadenitis samples expressed low level of pAKT. PTEN expression was observed in 30/38 (79%) FL and 2/2 benign lymphadenitis cases, whereas 8/38 (21%) FL cases showed loss of PTEN expression. 3 cases with positive pAKT did not express PTEN. PIK3CA mutations were not detected in any sample.

Conclusions: These data suggest that the PI3K/AKT signaling pathway could be activated in a subset of FL cases, due to either AKT phosphorylation or PTEN downregulation, in the absence of PIK3CA mutations.

Keywords: Follicular lymphoma, PIK3CA mutations, AKT phosphorylation, PTEN

Background

Follicular lymphoma is the most frequent occurring form of low grade of Non Hodgkin lymphoma (NHL) and account for approximately 20% of NHL cases [1]. The clinical course of FL is relatively indolent when chemotherapeutic agents are combined with rituximab [2]. Nonetheless, a significant proportion of cases either relapses or transform into aggressive diffuse large B cell lymphomas (DLBCL) [2]. Thus there is a need for more efficient therapies to improve the outcome of FL patients. The use of immunomodulating agents has recently proved to be of clinical interest [3]. Other targets related to FL pathogenesis could offer new opportunities.

FL is derived from germinal center B cells and characterized in most cases by the chromosomal translocation t(14; 18) (q32; q21), causing deregulated expression of the anti-apoptotic Bcl2 protein [1]. This translocation is

considered as an initiating event in the molecular pathogenesis in the FL, but is not sufficient in the development of FL [1]. Additional pathogenic events that are required for the manifestation of FL remain poorly understood. They may be related to molecular mechanisms involved in the regulation of physiological process including cell proliferation, survival, angiogenesis and tumor growth, such as the PI3K/AKT/mTOR pathway [4,5].

PI3Ks are a family of lipid kinases classified into three major subfamilies. The PI3K class I is activated by cell surface receptors and consists of two subfamilies, class IA and class IB, which are composed of heterodimers of catalytic and regulatory subunits, identified as p110 (α , β , δ)/p85(α , β) and p110 γ /p101 for class IA and class IB, respectively [6,7]. Class II PI3Ks are monomeric isoforms p110-like catalytic subunit that can be activated by RTK, cytokine receptors, and integrin. The class III includes heterodimeric enzymes composed of VP34 catalytic and p150 adaptor PI3K subunits [6,7].

In response to growth factors, protein tyrosine kinases receptors can recruit and activate PI3K, which in turn

* Correspondence: imene.yahiaoui@inserm.fr

¹Inserm, U1068, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France

²Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

Full list of author information is available at the end of the article

induces an increase in phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (PIP3) levels. The phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein dephosphorylates PIP3 to PIP2, acting as an antagonist of PI3K. PIP3 transduces intracellular signaling by recruiting and participating to the phosphorylation of variety of proteins including the serine/threonine kinase AKT. Subsequently, activated AKT may phosphorylate a range of substrates, thereby activating these targets and favoring cell survival [8,9].

Constitutive activation of the PI3K/AKT pathway occurs in various human cancers due to genetic aberrations. They include mutation or amplification of the catalytic subunit p110 α encoded by PIK3CA gene [10-15], loss of PTEN function through mutations, deletions, promoter methylation silencing, or protein instability [16,17]. Similarly, gain of function of AKT can occur by amplification, overexpression, and increased phosphorylation [18-20], or mutation of p85 α regulatory subunit of PI3K [21,22]. Activating mutations of PIK3CA p110 α are among the most frequent alterations in human cancers [23,24].

Only a few studies have reported dysregulation of the PI3K/AKT pathway in lymphoid malignancies. PIK3CA mutations and PTEN inactivation were detected in DLBCLs, and high pAKT expression was associated with poor survival [25,26]. Mantle cell lymphomas (MCL) were shown to lack PIK3CA mutations, but often display constitutive AKT activation, resulting from loss of PTEN expression in some cases [27]. Loss of PTEN expression and/or PIK3CA gene amplification were found to be mutually exclusive mechanisms of AKT activation in the pathogenesis of MCL [28].

FL tissue samples analyzed using proteomic analysis showed increased expression of phosphorylated AKT at the position Ser473 [29,30]. Besides, there is a relative effectiveness of PI3K and mTOR inhibitors (NVP-BEZ235) on human lymphoma cell lines [2].

Recently, idelalisib (CAL-101), a PI3K δ inhibitor was shown to downregulate pAKT expression and to induce apoptosis in FL cell lines [31], leading to a phase I study with promising results in patients with Non Hodgkin Lymphoma [32] that will be extended in phase II study [33]. Altogether these previous works indicate that dysfunction of PI3K/AKT pathway might be involved in the pathogenesis of FL by some mechanisms that remain unclear to date.

In the present study, we have sought to better characterize this putative PI3K/AKT dysfunction in a series of FL tissue samples using a combination of methods including DNA sequencing, western blot (WB) and immunohistochemistry (IHC).

Methods

Tumor tissue samples and patients

Frozen tissue samples were collected between 2002 and 2012 from 38 FL patients at the time of diagnosis, prior

to any treatment. Immunophenotyping at the time of diagnosis showed that all FL cases contained more than 70% of tumor B cells (based on immunohistochemical CD20 expression), whereas the reactive T-cell component identified by CD3 positivity was lower than 30%. Two benign lymphadenitis samples were used as controls. All patients gave informed consent and the study was approved by the ethical board of the Paoli-Calmettes institute.

The corresponding formalin fixed and paraffin embedded samples were also available. The diagnosis of FL was made according to the World Health Organization classification [34], the FL samples were classified as grade 1-2 (n = 34), grade 3 (n = 2) and not gradable (n = 2). The clinical characteristics of the patients are detailed in Table 1. Median follow-up of patients was 94 months.

DNA, RNA, and protein extraction

Genomic DNA, RNA, and proteins were extracted from frozen tissues using AllPrep DNA/RNA/Protein purification kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. The concentration and purity of DNA and RNA of each sample were measured using a Nanodrop.

Polymerase Chain Reaction (PCR) and PIK3CA hotspot mutations analysis

The PCR mixture contained 25 ng of DNA, 0.4 μ M of each primer (forward and reverse for exon 9 or 20, see below for sequences), 0.2 mM of dNTP, 0.04 U of Taq DNA polymerase, 1.5 mM MgCl₂ in TE buffer. To amplify exon 20, after an initial activation at 95°C for 10 minutes, 35 cycles were done, which include 30 seconds at 95°C for denaturation step, 30 seconds for annealing step at 55°C and 30 seconds for elongation step at 72°C.

Finally, termination step followed at 72°C for 10 minutes. To amplify exon 9, a touch-down PCR was done to avoid amplification of a non-specific PCR product. Activation, denaturation, elongation and termination steps were the same as exon 20 but annealing temperatures changed: 4 cycles at 60°C, 4 cycles at 59°C, 4 cycles at 58°C, 6 cycles at 57°C, 6 cycles at 56°C, 8 cycles at 55°C and 13 cycles at 54°C. PCR products were then separated by 2% agarose gel electrophoresis to visualize the appropriate bands. The PCR products were cleaned-up using a Multiscreen plate (Millipore) according to the manufacturer's protocol and subjected to sequencing reaction in forward and reverse directions using ABI Big Dye Terminator V1.1 and an ABI 3730 automated capillary sequencer (Applied Biosystem). The data were analyzed with SeqScape software. The primers used for PCR and sequencing were as follows: exon 9, 5'-TTGCTTTTT CTGTAAATCATCTGT-3' (forward) and 5'-CTGCTTTA TTTAT'TCCAATAGGTATG-3' (reverse); exon 20, 5'-CT CAATGATGCTTGGCTCTG-3' (forward) and 5'-GGAAT CCAGAGTGAGCTTTC-3' (reverse).

Table 1 Clinical characteristics and pAKT expression status of FL patients

	Total	Negative pAKT		Positive pAKT		P
		n	%	n	%	
NO, patients	36	22	61	14	39	
Sex	Male	10	45	6	43	0.577
	Female	12	55	8	57	
Age	< 60 years	15	68	10	71	0.569
	≥ 60 years	7	32	4	29	
	Median [range]	56 [30-72]		52 [34-68]		0.575
Lactate dehydrogenase	N	19	86	8	57	0.03
	>N	2	9	6	43	
	Unknown	1	5	0	0	
Performance status	0	7	32	2	14	0.045
	1	0	0	3	22	
	Unknown	15	68	9	64	
B symptoms	0	5	23	4	29	0.601
	1	4	18	4	29	
	Unknown	13	59	6	42	
Ann Arbor stage	I-II	7	32	2	14	0.254
	III-IV	15	68	11	79	
	Unknown	0	0	1	7	
Adenopathy	0-3	14	64	7	50	0.282
	4 or more	6	27	6	43	
	Unknown	2	9	1	7	
Hemoglobin	≥ 12 g/dl	13	59	9	64	0.684
	< 12 g/dl	3	14	2	14	
	Unknown	6	27	3	22	
β2 microglobulin	N	9	41	5	36	0.306
	> N	4	18	5	36	
	Unknown	9	41	4	28	
Bone marrow involvement	0	9	41	7	50	0.58
	1	10	45	7	50	
	Unknown	3	14	0	0	
FLIPI	0-1	3	14	1	7	0.390
	2	7	32	4	29	
	≥ 3	4	18	6	43	
	Unknown	8	36	3	21	
Follow up (months)	Median [range]	90 [9-200]		97 [50-200]		0.687

Western blot analysis

Protein pellets were isolated after purification of genomic DNA and RNA according to the manufacturer's instructions, and were then dissolved in 2 × Laemmli buffer. Protein samples were heated at 95°C for 5 minutes and resolved by standard 9% SDS-polyacrylamide gels. Immunoblots were performed as previously described [35]. The primary antibodies used are commercially available, anti- AKT (Cell Signaling Technology (CST), # 9272,

used at 1:1800 dilution) anti- phospho Ser473-AKT (CST, # 4058, used at 1:1000 dilution), anti- PTEN (CST, # 9552, clone 138G6, used at 1:1000 dilution) and anti-GAPDH (Abcam, clone mAbcam 9484, used at 1:5000 dilution). These antibodies were used in TBS - 0.1% Tween 20 - 5% BSA, overnight at 4°C under agitation. Lysates from the Jurkat (loss of PTEN) and SupT1 (PTEN-positive) T cell lines were used as positive and negative controls for AKT phosphorylation, and PTEN expression, respectively.

The AKT protein was used as a loading control to evaluate the expression of phosphorylated form of AKT (pAKT) in each sample. The same method was used to evaluate PTEN expression, except that GAPDH was used as an additional loading control.

Densitometric analysis of AKT and pSer473-AKT bands were quantified using ImageJ software and the ratio pSer473-AKT/AKT values of each sample were normalized to the value of Jurkat cell condition as positive control.

Immunohistochemistry

4 µm paraffin sections were cut, mounted on glass slides and air dried overnight at room temperature. The staining protocol was performed using an Envision FLEX/Dako Autostainer system according to the manufacturer's supplied instructions (Dako, Glostrup, Denmark). Antigen retrieval was accomplished by heating the slides in EnVision FLEX target retrieval solution pH 6 (Dako) at 99°C for 40 minutes. The slides were cooled down at room temperature for 20 minutes, washed for 5 minutes in the EnVision FLEX wash buffer. Endogenous peroxidase activity and non-specific binding sites were blocked with EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako) for 5 minutes. The slides were then washed with EnVision FLEX wash buffer, then incubated with either the mouse mAb anti-pSer473-AKT (CST, # 4051, clone 587 F11, used at 1:200 dilution), or with the mouse mAb anti-PTEN (Dako, clone 6H2.1, used at 1:150 dilution) at room temperature for 60 minutes, followed by washing in the EnVision FLEX wash buffer.

To obtain an optimal amplification of the PTEN staining, slides were incubated with the EnVision FLEX Mouse LINKER (Dako) for 15 minutes. After washing, immunodetection was achieved using Envision FLEX system [EnVision FLEX HRP for 20 minutes, followed by incubation in the EnVision FLEX DAB + Chromogen solution (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Dako) for 10 minutes], rinsed with EnVision FLEX wash buffer to remove residue 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, counterstained with EnVision FLEX Hematoxylin for 5 minutes. Positive controls were breast tumors expressing pAKT and normal uterus samples expressing PTEN.

Statistical analysis

The association of pAKT expression with patient's characteristics was performed using chi-squared (χ^2) tests for categorical data. Overall survival (OS) was measured from date of diagnosis to date of death or until the date of last follow up visit for alive patients. Progression free survival (PFS) was defined as the response time after the first chemotherapy. Survival analysis was carried out using Kaplan-Meier method and the log rank test was used when comparing groups. Statistical data was produced by the software SPSS.

Results

Absence of activating mutation of the PIK3CA gene in FL
Mutational analysis of the somatic mutations within exon 9 and 20 of PIK3CA was done to assess the two hotspots regions in the helical (exon 9) and kinase (exon 20) domains, in which 80% of the reported mutations are found [10]. We did not detect any mutations in our 38 FL cases.

Expression of AKT, activated AKT, and PTEN in FL Western blot

To investigate the activation status of PI3K/AKT pathway in follicular lymphoma, we assessed the expression of AKT and phosphorylated AKT (Ser473), and PTEN protein expression level using WB and IHC. WB analysis revealed in all 38 FL frozen samples a 60 kDa band evidencing AKT expression. Expression of pAKT was observed in 14/38 (37%) FL samples (Figure 1A) at a similar molecular weight of 60 kDa.

Densitometric measurement of the relative intensity of pAKT bands categorizes our series into three groups: 9/38 (24%) FL cases with high level of pAKT protein, 5/38 (13%) FL cases with low level of pAKT protein, and 24/38 (63%) FL cases negative for pAKT expression (Figure 2). In the positive control (Jurkat cells) and negative control (SupT1 cells), the relative value of pAKT protein was considered as 1, and 0.04, respectively. It was estimated between 0.83 and 1.25 for the FL group with high pAKT expression level. In comparison the value was evaluated between 0.31 and 0.56 in FLs with low pAKT level, and between 0.01 and 0.28 in the negative pAKT expression group (Figure 2).

To further study the mechanisms of AKT activation in FL, we evaluated PTEN profile expression in the same samples. WB analysis showed that 30/38 (79%) FL expressed PTEN at 54 kDa, whereas 8/38 (21%) of cases showed no expression of PTEN (Figure 1A). Of the 8 cases with loss of PTEN, only 3 were associated with pAKT expression, including 2 cases (cases #31 and #32) with high level of AKT activation, and 1 case (case #30) with low level of AKT activation (Figure 1A), whereas 5 of the 8 cases with loss of PTEN had no pAKT expression. Loss of PTEN and the absence of serine phosphorylation of AKT at the position 473 (pAKT) in these 5 cases were further validated in an independent WB analysis, in which GAPDH was used as a loading control (Figure 1B).

Eleven out of 14 FL cases with positive pAKT expressed PTEN. WB showed expression of AKT and PTEN proteins in the lymphadenitis samples (cases #39 and #40) (Figure 1A), which also expressed phosphorylated AKT at low level. Relative value of pAKT was estimated as 0.48 and 0.56 for case #39 and case #40, respectively (Figure 2).

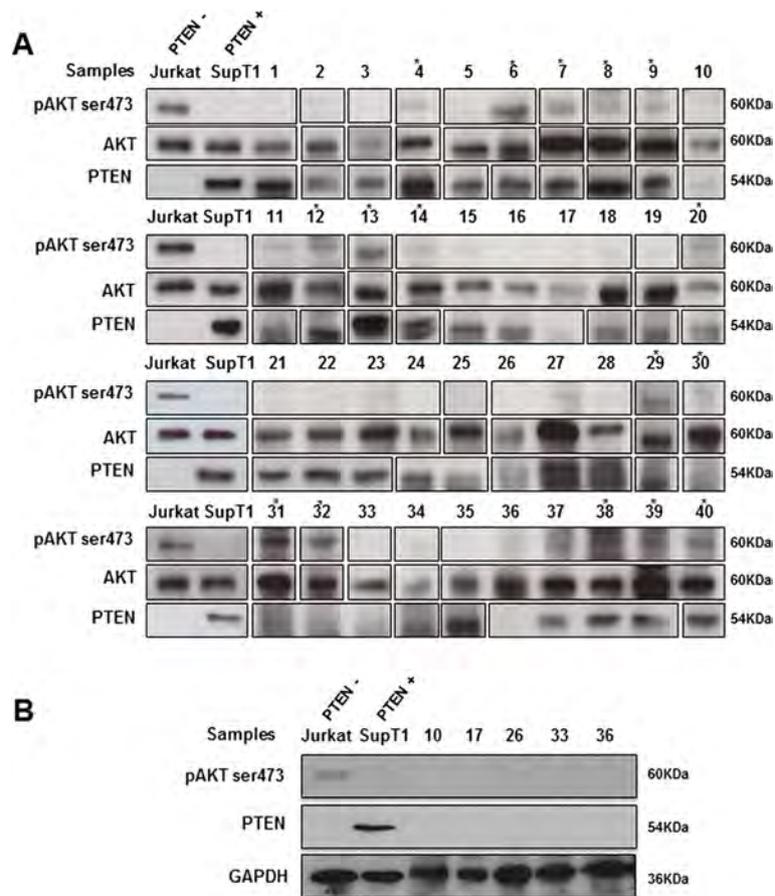


Figure 1 Representative western blot analysis of AKT, activated AKTSer473, and PTEN in 38 FL samples (#1-38) and lymphadenitis cases (#39 and #40). AKT was detected in all examined samples, and is shown as a loading control for pAKT detection (panel A). GAPDH is also used as a loading control for PTEN detection (panel B). Asterisks indicate positive samples for pAKT; pAKT expression was detected at high level in samples #6, #7, #9, #13, #14, #29, #31, #32, and #38; and at low level in samples #4, #8, #12, #20, #30, #39, and #40. Jurkat cells served as a positive control for pAKT expression. SupT1 cells served as a positive control for PTEN expression. These results shown are representative of 3 independent experiments.

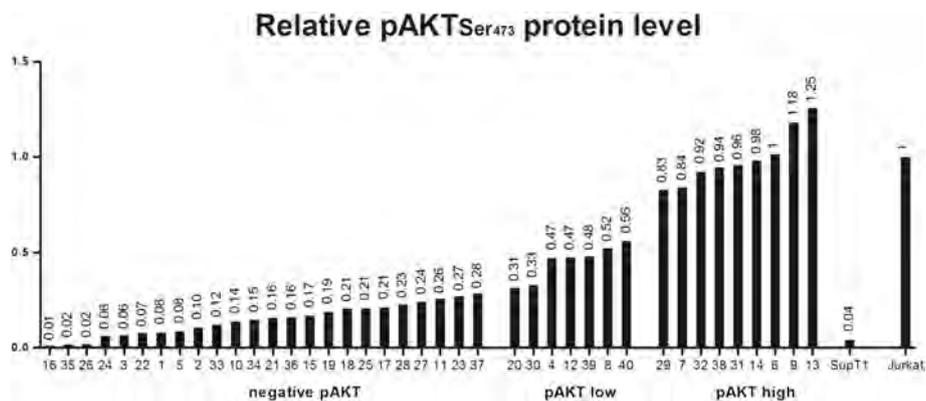


Figure 2 Quantification of relative p-Ser473 AKT (pAKT) protein amount in FL samples (#1-38) and lymphadenitis cases (#39 and #40). Samples are ordered according to their p-Ser473AKT level of expression (values are indicated above each bar). The numbering of samples is similar to Figure 1. Jurkat (positive control) and SupT1 (negative control) correspond to the expected profile.

Immunohistochemistry

The expression of pAKT and PTEN was examined using immunohistochemistry in the corresponding paraffin-embedded FL samples. Positive pAKT immunostaining of variable intensity was observed in intra-follicular malignant B-cells from 15/38 FL samples (Figure 3A). Among these 15 cases, rare interfollicular reactive T-cells showed positive pAKT staining in one case. 18/38 FL specimens were negative for pAKT staining, whereas the IHC status could not be assessed in 5 specimens.

PTEN immunostaining was positive in malignant intra-follicular B-cells in 30/38 cases, and 18 out of these 30 samples also displayed the same intensity of PTEN positivity in reactive interfollicular T-cells and macrophages. PTEN signals were heterogeneous in 12 out of these 30 samples, displaying either strong PTEN positivity in malignant B-cell follicles associated with low staining of reactive T-cells and macrophages around the follicles, or an inverse profile of positivity (Figure 3B and C). PTEN

staining was negative in 3/38 specimens, whereas the IHC status could not be assessed in 5 specimens.

The benign lymphadenitis cases showed homogeneous positive staining of PTEN. For the pAKT staining, case #39 had rare positive cells, and case #40 showed negative staining of pAKT.

Correlations between IHC and WB

The 8 PTEN WB-negative cases showed different pattern of IHC expression: 1 case was completely negative; one case was not evaluable due to high background, whereas the other cases showed heterogeneous expression in a fraction of malignant or reactive cells.

Although IHC data correlated with WB results in most samples, it is noteworthy that the correlation was not perfect. This may be due to the different levels of sensitivity of each method and/or to the intra-tumoral heterogeneity. In this extent, WB appeared more reliable to evaluate the level of pAKT and PTEN expression because it reflects

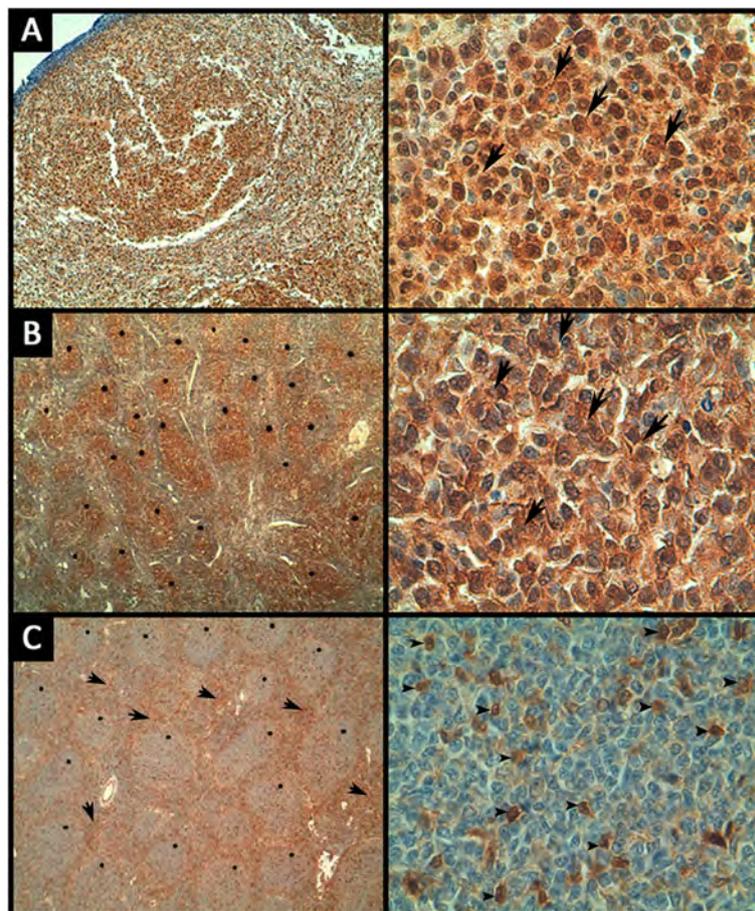


Figure 3 Representative images of immunohistochemical staining of pAKT and PTEN in FL samples. **(A)** Strong nuclear and cytoplasmic pAKT staining in lymphoma cells (arrows) (magnification is $\times 40$ and $\times 630$ for the left and right panels, respectively). **(B)** Strong PTEN staining in lymphoma cells (arrows) within the malignant follicles (stars) (magnification is $\times 40$ and $\times 630$ for the left and right panels, respectively). **(C)** Strong positivity of PTEN around follicles (arrows) with weak expression in lymphoma cells within the follicles (stars), reactive T cells are positive (arrowheads) (magnification is $\times 40$ and $\times 630$ for the left and right panels, respectively).

an overall average amount of each protein, which could be quantified using densitometry. In contrast, it was not possible to assess a reliable positive cut-off for IHC expression due to the variations in the number of positive cells within sections. However, IHC was useful and necessary to localize the expression in malignant and /or reactive cells. The results are summarized in Table 2.

Correlation with clinical features

We were interested in testing the relationship between pAKT expression status and clinicopathological parameters like histological grade, tumor volume, overall survival (OS), and progression free survival (PFS). No significant correlations were found with any parameters. The clinical features of patients are summarized in Table 1.

Discussion

The PI3K/AKT pathway is frequently activated in human carcinomas by oncogenic mutations of the PIK3CA gene encoding for the α isoform of the PI3K p110 subunit (24). Only a few studies have focused on the PI3K/AKT pathway in lymphoid neoplasms. It was reported to be activated in DLBCL [25,26] and MCL [27,28] due to the presence of phosphorylated AKT (Ser473). As to FL, an increase of phosphorylated AKT (Ser473) has also been shown in two different reports using a proteomic approach by laser capture microdissection and reverse phase protein microarray, but the mutational status of PI3K was not addressed [29,30]. Due to the scarcity of data in the literature, we aimed in the present study to further clarify the abnormalities of the PI3K/AKT pathway in FL.

We could detect phosphorylation of AKT using WB in 37% of FL samples, most of them displaying high level of pAKT expression. This finding is in accordance with those previously obtained using a reverse phase protein microarray approach [29,30], suggesting that activation of the PI3K/AKT pathway might contribute in the development of FL.

Of note, correlations between WB and IHC data were not strictly correlated, probably due to the visual scoring used for IHC analysis, which resulted in less accurate quantification than the automatic densitometry method used for WB analysis. This may be also explained by the requirement of different antibodies and by the different threshold levels of sensitivity in each method. WB results were considered for subsequent statistical and clinical correlations because the intra-tumoral heterogeneity can account for a biased pattern of IHC expression in a single tissue section, whereas WB is more likely to accurately reflect a given level of protein expression in the whole tissue sample. IHC was however useful to confirm that pAKT and PTEN expression were located in

Table 2 Summary of western blot analysis of AKT, pAKT, and PTEN expression

Samples	AKT expression	pAKT expression	PTEN expression
1	+	-	+
2	+	-	+
3	+	-	+
4	+	+	+
5	+	-	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	-	-
11	+	-	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	-	+
16	+	-	+
17	+	-	-
18	+	-	+
19	+	-	+
20	+	+	+
21	+	-	+
22	+	-	+
23	+	-	+
24	+	-	+
25	+	-	+
26	+	-	-
27	+	-	+
28	+	-	+
29	+	+	+
30	+	+	-
31	+	+	-
32	+	+	-
33	+	-	-
34	+	-	+
35	+	-	+
36	+	-	-
37	+	-	+
38	+	+	+
39	+	+	+
40	+	+	+

Follicular Lymphoma samples (#1-38); lymphadenitis samples (#39 and 40). All samples are wild type for the mutation of PIK3CA gene. +: expression; -: no expression.

malignant and/or reactive cells. We did not find any correlations of pAKT WB expression with clinicopathological data, but this could be attributed to the relatively small number of cases in our series.

Aberrant regulation of the PI3K/AKT signaling pathway in MCL occurs most frequently by loss of PTEN expression and/or PIK3CA gene amplification, whereas the PIK3CA gene was found unmutated [27,28]. Similarly, no activating mutations of PIK3CA gene have been identified in our series of FL. Since we analyzed only hot spot loci in both the helical and kinase domains, we cannot rule out the hypothesis that some mutations could be located in other domains. This seems unlikely since the hot spot loci are common to a wide variety of human tumors [10,11,23,36].

Altogether, these results suggest that PIK3CA mutations are not a frequent AKT activating mechanism in lymphoid neoplasm. We have thus searched for another mechanism of AKT activation. In our cohort, we found loss of PTEN in 3 cases with activated AKT, including 2 cases with a high level of pAKT expression. However only a minority of pAKT activated FL samples displayed loss of PTEN, which argues against a crucial role of PTEN dysfunction in FL pathogenesis. Activation of PI3K/AKT pathway may thus occur in FL through alternative events previously evidenced in other cancer types, including mutation or gene amplification of membrane receptors, overexpression of growth factors, AKT gene amplification, and PIK3CA gene amplification [37,38,18]. The latter abnormality has been demonstrated in MCL as an additional mechanism of AKT activation [28]. As to FL, AKT activation may also be related to PI3K δ . Although no mutation of PI3K δ was previously found [39], it is expressed at high levels in lymphocytes and lymphoid tissue [40], and is involved in the survival of B cells [41]. It will be interesting to further analyze phosphorylation events in FL patient samples at the single cell level using detection of phospho-epitopes like phosphoflow analysis [42].

Of note, loss of PTEN expression was also observed in 5 samples lacking pAKT expression. This suggests that loss of PTEN expression may arise in FL without subsequent AKT activation. This may be related to negative regulation of AKT by direct dephosphorylation of the hydrophobic motif by the phosphatase PHLPP [43].

Conclusions

The present report suggests that the PI3K/AKT pathway may be constitutively activated in some FL cases in the absence of PIK3CA mutation. However, since these abnormalities were detected in only a fraction of FL cases, they may be not sufficient to explain previous observations that a dual PI3K and mTOR inhibitor (NVP-BEZ235) has a potential efficiency against FL cell lines [2] and that the PI3K δ inhibitor idelalisib (CAL- 101)

has clinical activity against FL [31-33]. Further studies are thus needed to better understand the mechanisms involved by drugs targeting AKT and PI3K in FL.

Abbreviations

DLBCL: Diffuse large B cell lymphoma; FL: Follicular lymphoma; IHC: Immunohistochemistry; MCL: Mantle cell lymphoma; NHL: Non Hodgkin lymphoma; OS: Overall survival; pAKT: Phosphorylated AKT; PCR: Polymerase Chain Reaction; PFS: Progression free survival; PI3K: Phosphoinositide 3- kinase; PIP3: Phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate; PTEN: Phosphatase and tensin homolog; WB: Western blot.

Competing interests

The authors declare that they have no potential conflicts of interest.

Authors' contributions

OIY designed and performed experiments, analyzed data, drafting and revised the manuscript; JAN contributed to the data interpretation, and revised the manuscript; CC designed and performed experiments then analyzed data. RD, FB, and RB performed statistical analysis; AJF contributed to the data analysis and revised the manuscript; DN, and DO supervised study and revised the manuscript; LX designed the project strategy, interpreted results, and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr. Dominique Payet-Bornet for providing the SupT1 T cell line. This work was supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique and Aix-Marseille University to CRCM and by a specific grant from the Averroes Erasmus Mundus program. O.I. Yahiaoui was supported by a fellowship of the Averroes Erasmus Mundus program and C. Castanier is supported by a post-doctoral fellowship from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. J.A. Nunès and D. Olive laboratory is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20140329534). J.A. Nunès was a recipient of a Contrat d'Interface Clinique with the Department of Hematology (Institut Paoli Calmettes). D. Olive is a scholar of the Institut Universitaire de France.

Author details

¹Inserm, U1068, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France. ²Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France. ³CNRS, UMR7258, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France. ⁴Aix-Marseille Université, Marseille, France. ⁵Université Constantine 1, Laboratoire de génie microbiologique et applications, équipe de biologie physiologie cellulaire et moléculaire, Constantine, Algeria. ⁶Institut Paoli-Calmettes, Department of Hematology, Marseille, France. ⁷Institut Paoli-Calmettes, Department of Biopathology, Marseille, France. ⁸Present Address: Inserm UMR S910, Department of Medical Genetics and Functional Genomics, Faculté de la Timone, 27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France. ⁹Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, 27 Bd Leï Roure -BP 30059, 13273 Marseille cedex 9, France.

Received: 17 February 2014 Accepted: 23 July 2014

Published: 5 August 2014

References

1. Nogai H, Dörken B, Lenz G: Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 2011, **29**(14):1803-1811.
2. Bhende PM, Park SI, Lim MS, Dittmer DP, Damania B: The Dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235 is Efficacious against Non Hodgkin Lymphoma. *Leukemia* 2010, **24**(10):1781-1784.
3. Desai M, Newberry KJ, Romaguera J, Zhang L, Ou Z, Wang M: Immunomodulation therapy with lenalidomide in follicular, transformed and diffuse large B cell lymphoma: current data on safety and efficacy. *J Hematol Oncol* 2013, **6**:55.
4. Vivanco I, Sawyers CL: The Phosphatidylinositol 3 Kinase AKT Pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(7):489-501.
5. Jiang BH, Liu LZ: PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 2009, **102**:19-65.
6. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD: Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999, **253**(1):239-254.

7. Engelman JA, Luo J, Cantley LC: **The evolution of Phosphatidylinositol 3-Kinase as regulators of growth and metabolism.** *Nat Rev Genet* 2006, **7**(8):606–619.
8. Cantley LC: **The phosphoinositide 3-kinase pathway.** *Science* 2002, **296**(5573):1655–1657.
9. Osaki M, Oshimura M, Ito H: **PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer.** *Apoptosis* 2004, **9**(6):667–676.
10. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: **High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers.** *Science* 2004, **304**(5670):554.
11. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, Cristiano BE, Pearson RB, Phillips WA: **Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer.** *Cancer Res* 2004, **64**(21):7678–7681.
12. Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Park JJ, Chae KS, Kim HJ, Chi SG: **Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma.** *Int J Cancer* 2003, **104**(3):318–327.
13. Massion PP, Tafan PM, Shyr Y, Rahman SM, Yildiz P, Shakhthour B, Edgerton ME, Ninan M, Andersen JJ, Gonzalez AL: **Early involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in lung cancer progression.** *Am J Respir Crit Care Med* 2004, **170**(10):1088–1094.
14. Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, Gonzalez MV: **Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma.** *Int J Cancer* 2005, **114**(2):242–248.
15. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, Liu JM, Yang DM, Yang WK, Shen CY: **PIK3CA as an oncogene in cervical cancer.** *Oncogene* 2000, **19**(23):2739–2744.
16. Ali IU, Schriml LM, Dean M: **Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity.** *J Natl Cancer Inst* 1999, **91**(22):1922–1932.
17. Chalhoub N, Baker SJ: **PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer.** *Annu Rev Pathol* 2009, **4**:127–150.
18. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G, Benedetti Panici P, Mancuso S, Neri G, Testa JR: **Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas.** *Int J Cancer* 1995, **64**(4):280–285.
19. Min YH, Eom JJ, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, Lee ST, Lee MH, Hahn JS, Ko YW: **Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable.** *Leukemia* 2003, **17**(5):995–997.
20. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlir M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL, Thomas JE: **A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer.** *Nature* 2007, **448**(7152):439–444.
21. Jücker M, Südel K, Horn S, Sichel M, Wegner W, Fiedler W, Feldman RA: **Expression of a mutated form of the p85 α regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in a Hodgkin's lymphoma-derived cell line (CO).** *Leukemia* 2002, **16**(5):894–901.
22. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, Thomas RJ, Phillips WA: **The phosphatidylinositol 3'-kinase p85 α gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors.** *Cancer Res* 2001, **61**(20):7426–7429.
23. Samuels Y, Velculescu VE: **Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers.** *Cell Cycle* 2004, **3**(10):1221–1224.
24. Samuels Y, Ericson K: **Oncogenic PI3K and its role in cancer.** *Curr Opin Oncol* 2006, **18**(1):77–82.
25. Abubaker J, Bavi PP, Al-Harbi S, Siraj AK, Al-Dayel F, Uddin S, Al-Kuraya K: **PIK3CA mutations are mutually exclusive with PTEN loss in diffuse large B-cell lymphoma.** *Leukemia* 2007, **21**(11):2368–2370.
26. Uddin S, Hussain AR, Siraj AK, Manogaran PS, Al-Jomah NA, Moorji A, Atizado V, Al-Dayel F, Belgaumi A, El-Solh H, Ezzat A, Bavi P, Al-Kuraya KS: **Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival.** *Blood* 2006, **108**(13):4178–4186.
27. Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, Pham TH, Fend F, Jaffe ES, Quintanilla-Martinez L, Raffeld M: **Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma.** *Blood* 2006, **108**(5):1668–1676.
28. Psyrrri A, Papageorgiou S, Liakata E, Scorilas A, Rontogianni D, Kontos CK, Argryriou P, Pectasides D, Harhalakis N, Pappa V, Kolialexi A, Economopoulou C, Kotsioti F, Maratou E, Dimitriadis G, Economopoulou P, Economopoulos T: **Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(18):5724–5732.
29. Zha H, Raffeld M, Charboneau L, Pittaluga S, Kwak LW, Petricoin E 3rd, Liotta LA, Jaffe ES: **Similarities of prosurvival signals in Bcl-2-positive and Bcl-2-negative follicular lymphomas identified by reverse phase protein microarray.** *Lab Invest* 2004, **84**(2):235–244.
30. Gulmann C, Espina V, Petricoin E 3rd, Longo DL, Santi M, Knutsen T, Raffeld M, Jaffe ES, Liotta LA, Feldman AL: **Proteomic analysis of apoptotic pathways reveals prognostic factors in follicular lymphoma.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(16):5847–5855.
31. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, Kashishian A, Steiner B, Johnson AJ, Byrd JC, Tyner JW, Loriaux MM, Deininger M, Druker BJ, Puri KD, Ulrich RG, Giese NA: **CAL-101, a p110 δ selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability.** *Blood* 2011, **117**(2):591–594.
32. Kahl B, Byrd JC, Flinn IW, Wagner-Johnston N, Spurgeon S, Benson DM Jr, Furman RR, Brown JR, Coutre S, Lannutti B, Giese NA, Ulrich RG, Webb HK, Peterman S, Holes L, Yu AS: **Clinical safety and activity in a phase 1 study of CAL-101, an isoform-selective inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase P110 δ , in patients with relapsed or refractory Non-Hodgkin lymphoma [abstract].** *Blood* 2010, **116**(21):1777. ASH Annual Meeting Abstracts.
33. Castillo JJ, Furman M, Winer ES: **CAL-101: a phosphatidylinositol-3-kinase p110-delta inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies.** *Expert Opin Investig Drugs* 2012, **21**(1):15–22.
34. Jaffe ES: **The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009, 523–531.
35. Gérard A, Ghiotto M, Fos C, Guittard G, Compagno D, Galy A, Lemay S, Olive D, Nunès JA: **Dok-4 is a novel negative regulator of T cell activation.** *J Immunol* 2009, **182**(12):7681–7689.
36. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK: **Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(12):921–929.
37. Knobbe CB, Reifenberger G: **Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas.** *Brain Pathol* 2003, **13**(4):507–518.
38. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR: **Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting.** *Adv Cancer Res* 2005, **94**:29–86.
39. Cornillet-Lefebvre P, Cucchini W, Bardet V, Tamburini J, Gillot L, Ifrah N, Nguyen P, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D: **Constitutive phosphoinositide 3-kinase activation in acute myeloid leukemia is not due to p110 δ mutations.** *Leukemia* 2006, **20**(2):374–376.
40. Chantry D, Vojtek A, Kashishian A, Holtzman DA, Wood C, Gray PW, Cooper JA, Hoekstra MF: **p110 δ , a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes.** *J Biol Chem* 1997, **272**(31):19236–19241.
41. Clayton E, Bardi G, Bell SE, Chantry D, Downes CP, Gray A, Humphries LA, Rawlings D, Reynolds H, Vigorito E, Turner M: **A crucial role for the p110 δ subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation.** *J Exp Med* 2002, **196**(6):753–763.
42. Firaguay G, Nunes JA: **Analysis of signaling events by dynamic phosphoflow cytometry.** *Sci Signal* 2009, 2:3.
43. Gao T, Furnari F, Newton AC: **PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth.** *Mol Cell* 2005, **18**(1):13–24.

doi:10.1186/1471-2407-14-565

Cite this article as: Yahiaoui et al.: Constitutive AKT activation in follicular lymphoma. *BMC Cancer* 2014 **14**:565.

Chapitre VII : Discussion et Conclusion

VII. Discussion et Conclusion

La voie PI3K/AKT est souvent activée dans les carcinomes humains par des mutations oncogéniques du gène *PIK3CA* codant pour l'isoforme α de la sous-unité p110 de l'enzyme PI3K [247]. Quelques travaux se sont intéressés à l'étude du statut de la voie PI3K/AKT dans les néoplasmes lymphoïdes. Une activation constitutive de la voie PI3K/AKT médiée par l'expression d'AKT phosphorylée en Ser473 a été démontrée dans le lymphome diffus à grandes cellules B [250, 251] et dans le lymphome du manteau [253, 254].

Concernant le lymphome folliculaire, une augmentation d'AKT phosphorylée (Ser473) a également été démontrée par une approche protéomique, en utilisant la microdissection par capture laser et des biopuces à protéines en phase reverse. Par contre, le statut mutationnel de PI3K n'a pas été abordé [258,259]. Du fait de la rareté des données sur le statut de la voie PI3K/AKT dans le lymphome folliculaire, nous avons donc cherché dans le présent travail à mieux caractériser les anomalies de la voie PI3K/AKT dans le LF.

Nous avons pu détecter la phosphorylation d'AKT dans 37% des échantillons de LF, avec un niveau élevé d'expression de phospho-AKT dans la majorité des cas. Cette constatation est en accord avec les résultats obtenus précédemment en utilisant des biopuces à protéines en phase reverse [258,259], ce qui suggère que l'activation de la voie PI3K/AKT pourrait contribuer au développement du LF.

Les données obtenues de WB et IHC ne permettent pas d'établir des corrélations absolues, probablement parce que la notation visuelle utilisée pour l'analyse d'IHC aboutit à une quantification moins précise que la méthode de densitométrie automatisée utilisée pour l'analyse de WB. Ceci peut être également expliqué par l'utilisation d'anticorps différents et par les différents niveaux de seuil de sensibilité de chaque technique.

Les résultats de WB ont été utilisés pour établir des corrélations statistiques et cliniques, en raison de l'hétérogénéité intra-tumorale qui peut entraîner un biais d'expression par IHC au sein de la même section tissulaire; alors que le WB est plus susceptible de refléter avec précision un niveau donné d'expression d'une protéine dans la totalité de l'échantillon tissulaire.

Cependant, l'IHC a été utile pour confirmer que l'expression de phospho-AKT et PTEN étaient localisées dans les cellules malignes et/ou réactives.

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'expression de phospho-AKT et les données clinico-pathologiques des patients. Cela pourrait être dû au nombre relativement réduit des cas étudiés dans notre série.

La régulation aberrante de la voie de signalisation PI3K/AKT dans le lymphome du manteau se traduit le plus souvent par une perte d'expression de PTEN et/ou l'amplification du gène *PIK3CA*, mais ne semble pas impliquer de mutation du gène *PIK3CA* [253, 254]. Il est à noter qu'aucune mutation activatrice du gène *PIK3CA* n'a été identifiée dans notre série de LF.

Vu que nous avons analysé les loci des points chauds «hot spots» dans les deux domaines hélicoïdale et kinase, nous ne pouvons exclure l'hypothèse que certaines mutations pourraient être situées dans d'autres domaines. Cependant, cela semble peu probable étant donné que les mutations au niveau des «hot spots» sont les plus fréquentes dans une grande variété de tumeurs humaines [100, 219,264, 265].

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la mutation du gène *PIK3CA* n'est pas un mécanisme fréquent d'activation d'AKT dans les tumeurs lymphoïdes. Nous avons donc cherché un autre mécanisme d'activation d'AKT. Dans notre cohorte, nous avons constaté une perte d'expression de PTEN dans 3 cas exprimant AKT phosphorylé, dont 2 cas présentent un niveau élevé d'expression de phospho-AKT. Cependant, une minorité d'échantillons de LF exprimant phospho-AKT montre une perte d'expression de PTEN ce qui plaide contre un rôle crucial de dysfonctionnement de PTEN dans la pathogenèse du lymphome folliculaire. L'activation de la voie PI3K/AKT peut ainsi se produire dans le LF à travers d'autres événements alternatifs représentés précédemment dans d'autres types de cancer, y compris la mutation ou l'amplification des gènes des récepteurs membranaires [266], la surexpression des facteurs de croissance [132], l'amplification du gène AKT [267], l'activation de Ras [224] et l'amplification du gène *PIK3CA* [254]. Cette dernière anomalie a été démontrée dans le lymphome du manteau comme un mécanisme additionnel d'activation d'AKT [255].

En ce qui concerne le LF, bien qu'aucune mutation de PI3K δ n'ait été trouvée à ce jour [268], l'activation d'AKT pourrait également être liée à l'isoforme PI3K δ . Elle est exprimée à des niveaux élevés dans les lymphocytes et les tissus lymphoïdes [269] et impliquée dans la survie des cellules B [270].

De plus, il serait intéressant d'analyser la phosphorylation d'AKT dans les échantillons de LF, au niveau de l'unité cellulaire en utilisant la détection de phospho-épitopes comme l'analyse de phosphoflow [271].

On note que la perte d'expression de PTEN a également été observée dans 5 échantillons n'exprimant pas phospho-AKT. Ceci suggère que la perte d'expression de PTEN peut survenir dans le LF sans activation subséquente d'AKT. Cela peut être associé à la régulation négative d'AKT par déphosphorylation directe du motif hydrophobe par la phosphatase PHLPP [272].

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que la voie PI3K/AKT peut être constitutivement activée dans certains cas de LF en absence de mutation de *PIK3CA*. Cependant, étant donné que ces anomalies ont été seulement détectées dans une fraction des cas de LF, elles ne sont pas suffisantes pour expliquer les observations précédentes à savoir: (i) que l'inhibiteur de la PI3K et mTOR (NVP-BEZ235) a une efficacité potentielle contre les lignées cellulaires de LF [259], et (ii) que l'Idelalisib (CAL-101), un inhibiteur de PI3K δ montre une activité clinique contre le LF [260-262]. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués par des drogues ciblant phospho-AKT et PI3K en LF.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

1. Burris HA, 3rd (2013) Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 829-842.
2. Kindt, T, J. 2008. *IMMUNOLOGIE*. 6^{ème} éd. Paris : DUNOD.
3. Janeway, C. Murphy, K. Travers, P. Walport, M. 2009. *Immunobiologie*. 3^{ème} éd. Bruxelles : De Boeck.
4. Nagata K, Nakamura T, Kitamura F, Kuramochi S, Taki S, et al. (1997). "The Ig alpha/Ig beta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* 7(4): 559-70.
5. Karasuyama H, Rolink A, Melchers F. (1993) A complex of glycoproteins is associated with VpreB/lambda 5 surrogate light chain on the surface of mu heavy chain-negative early precursor B cell lines. *J Exp Med* 178(2): 469-78.
6. Nemazee D. (2006) Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 6(10):728-40.
7. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678-689.
8. Chung J.B, Silverman M, and Monroe J.G. (2003) Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol* 24(6):343-9.
9. LEE CHANG Catalina. Étude de l'homéostasie lymphocytaire B dans la physiopathologie de la sclérose en plaques : de l'approche expérimentale à l'Homme [en ligne]. Thèse Science. Lille : université Lille 2, 2010, 16 p. Disponibles sur: <http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/60/64/15/PDF/ThA_se-leechang.pdf> (consulté le 12.02.2014).
10. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, et al. (2004) Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104: 3647-3654.
11. Ettinger R, Sims GP, Robbins R, Withers D, Fischer RT, et al. (2007) IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *J Immunol* 178: 2872-2882.

12. Weill J.C, Weller S, Reynaud C.A. (2009) Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 27:267-85.
13. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H (2013) B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131: 959-971.
14. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, et al. (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99: 23-33.
15. Tarlinton D, Radbruch A, Hiepe F, Dorner T (2008) Plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* 20: 162-169.
16. Agematsu K, Nagumo H, Yang FC, Nakazawa T, Fukushima K, et al. (1997) B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol* 27: 2073-2079.
17. Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, et al. (2011) Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 118: 2150-2158.
18. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, et al. (2003) Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301: 1374-1377.
19. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M (1993) Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* 177: 999-1008.
20. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D (2011) Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 193. 177: 1009-1020. *J Immunol* 186: 1313-1324.
21. Nemazee DA, Burki K (1989) Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337: 562-566.
22. Merrell KT, Benschop RJ, Gauld SB, Aviszus K, Decote-Ricardo D, et al. (2006) Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* 25: 953-962.
23. Isnardi I, Ng YS, Menard L, Meyers G, Saadoun D, et al. (2010) Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood* 115: 5026-5036.

24. Cambier JC, Gault SB, Merrell KT, Vilen BJ (2007) B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol* 7: 633-643.
25. Esplin BL, Welner RS, Zhang Q, Borghesi LA, Kincade PW (2009) A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5773-5778.
26. Dono M, Cerruti G, Zupo S (2004) The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2105-2111.
27. Yang Y, Tung JW, Ghosn EE, Herzenberg LA (2007) Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4542-4546.
28. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF (2005) B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23: 7-18.
29. Roy B, Shukla S, Lyszkiewicz M, Krey M, Viegas N, et al. (2009) Somatic hypermutation in peritoneal B1b cells. *Mol Immunol* 46: 1613-1619.
30. Jacquot S, Boyer O (2006) Heterogeneity and function of human B lymphocytes. *Med Sci (Paris)* 22: 1075-1080.
31. JEENVAN-RAJ Beena Patricia. Molecular mechanisms underlying AID target specificity diversification. [en ligne]. Thèse Science. Strasbourg: Université de Strasbourg, 2011, 2p. Disponibles sur: < http://scd-theses.u-strasbg.fr/2329/01/JEEVAN-RAJ_Beena_Patricia_2011r.pdf > (consulté le 19.02.2014)
32. Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH, Alt FW (2005) Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* 86: 43-112.
33. IMGT, Somatic hypermutations [En ligne], Disponible sur : < http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/_UK/SomaticHypermutations/ > (Consultée le 23.02.2014).
34. Yves Levy. (1999) Mécanisme d'hypermutation somatique des gènes des immunoglobulines. *Hématologie* 5(6):469-479.

35. Di Noia JM, Neuberger MS (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76: 1-22.
36. Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, et al. (2008) The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 26: 481-511.
37. Chaudhuri J, Alt FW (2004) Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* 4: 541-552.
38. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE (2008) Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26: 261-292.
39. Kotnis A, Du L, Liu C, Popov SW, Pan-Hammarstrom Q (2009) Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 653-665.
40. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM (2002) Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2: 920-932.
41. Willis TG, Dyer MJ (2000) The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 96: 808-822.
42. Kuppers R, Dalla-Favera R (2001) Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20: 5580-5594.
43. Shaffer AL 3rd, Young RM, Staudt LM (2012) Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol* 30:565-610.
44. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 229: 1390-1393.
45. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K (1999) Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341: 1520-1529.
46. Stevenson FK, Sahota SS, Ottensmeier CH, Zhu D, Forconi F, et al. (2001) The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. *Adv Cancer Res* 83: 81-116.
47. Greaves MF (1986) Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. *Science* 234: 697-704.

48. Clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. (1997) The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89(11):3909-18.
49. Bastion Y, Sebban C, Berger F, Felman P, Salles G, et al. (1997) Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 15: 1587-1594.
50. Solal-Celigny P (2005) Prognosis of follicular lymphomas. *Clin Lymphoma* 6: 21-25.
51. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, et al. (2004) Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 104: 1258-1265.
52. Cartwright R, Brincker H, Carli PM, Clayden D, Coebergh JW, et al. (1999) The rise in incidence of lymphomas in Europe 1985-1992. *Eur J Cancer* 35: 627-633.
53. Vose JM, Chiu BC, Cheson BD, Dancey J, Wright J (2002) Update on epidemiology and therapeutics for non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 241-262.
54. Reiser M, Diehl V (2002) Current treatment of follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer* 38: 1167-1172.
55. Barosi G, Carella A, Lazzarino M, Marchetti M, Martelli M, et al. (2005) Management of nodal indolent (non marginal-zone) non-Hodgkin's lymphomas: practice guidelines from the Italian Society of Hematology, Italian Society of Experimental Hematology and Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica* 90: 1236-1257.
56. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, et al. (1989) Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 7: 1630-1636.
57. Gandhi MK, Marcus RE (2005) Follicular lymphoma: time for a re-think? *Blood Rev* 19: 165-178.
58. Rohatiner AZ, Lister TA (2005) The clinical course of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 18: 1-10.
59. Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, Stansfeld AG, Richards MA, et al. (1986) Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol* 4: 1470-1480.

60. Yuen AR, Kamel OW, Halpern J, Horning SJ (1995) Long-term survival after histologic transformation of low-grade follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 13: 1726-1733.
61. Garvin AJ, Simon RM, Osborne CK, Merrill J, Young RC, et al. (1983) An autopsy study of histologic progression in non-Hodgkin's lymphomas. 192 cases from the National Cancer Institute. *Cancer* 52: 393-398.
62. Hubbard SM, Chabner BA, DeVita VT, Jr., Simon R, Berard CW, et al. (1982) Histologic progression in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 59: 258-264.
63. Salles G, Coiffier B (1998) Histologic transformation in follicular lymphoma. *Ann Oncol* 9: 803-805.
64. Bernstein SH, Burack WR (2009) The incidence, natural history, biology, and treatment of transformed lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 532-541.
65. Sham RL, Phatak P, Carignan J, Janas J, Olson JP (1989) Progression of follicular large cell lymphoma to Burkitt's lymphoma. *Cancer* 63: 700-702.
66. Mukhopadhyay S, Readling J, Cotter PD, Shrimpton AE, Sidhu JS (2005) Transformation of follicular lymphoma to Burkitt-like lymphoma within a single lymph node. *Hum Pathol* 36: 571-575.
67. Aarts WM, Bende RJ, Steenbergen EJ, Kluin PM, Ooms EC, et al. (2000) Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. *Blood* 95: 2922-2929.
68. Bahler DW, Campbell MJ, Hart S, Miller RA, Levy S, et al. (1991) Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. *Blood* 78: 1561-1568.
69. Doyen C, Delos M, Michaux L, Bosly A. (2004) Lymphomes folliculaires. *EMC-Hématologie* 1:83–105.
70. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443.
71. Viardot A, Barth TF, Moller P, Dohner H, Bentz M (2003) Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. *Semin Cancer Biol* 13: 183-190.

72. Pathologyoutlines.(2012) *Lymphoma - B cell neoplasms: Follicular lymphoma-general* [en ligne]. Disponible sur : <<http://reperere.enssib.fr>> [Consulté le 7 Mars 2014].
73. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, McLaughlin P, Smith T, et al. (1999) Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood* 93: 3081-3087.
74. Raghavan SC, Swanson PC, Wu X, Hsieh CL, Lieber MR (2004) A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature* 428: 88-93.
75. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336.
76. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ (1991) Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349: 254-256.
77. Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, et al. (1993) p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 82: 1994-2004.
78. Pinyol M, Cobo F, Bea S, Jares P, Nayach I, et al. (1998) p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 91: 2977-2984.
79. Elenitoba-Johnson KS, Gascoyne RD, Lim MS, Chhanabai M, Jaffe ES, et al. (1998) Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma. *Blood* 91: 4677-4685.
80. Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, Price CG, Young BD, et al. (1991) Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 6: 2271-2276.
81. Roulland S, Navarro JM, Grenot P, Milili M, Agopian J, et al. (2006) Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med* 203: 2425-2431.
82. Staudt LM (2007) A closer look at follicular lymphoma. *N Engl J Med* 356: 741-742.

83. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Heutte N, Nadel B, et al. (2006) Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia* 20: 158-162.
84. Hiddemann W, Cheson BD (2014) How we manage follicular lymphoma. *Leukemia* 28(7):1388-95.
85. Ghilmini M, Vitolo U, Kimby E, Montoto S, et al. (2013) 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* 24(3):561-76.
86. Winter JN, Gascoyne RD, Van Besien K (2004) Low-grade lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 203-220.
87. Mac Manus MP, Rainer Bowie CA, Hoppe RT (1998) What is the prognosis for patients who relapse after primary radiation therapy for early-stage low-grade follicular lymphoma? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 365-371.
88. Advani R, Rosenberg SA, Horning SJ (2004) Stage I and II follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of no initial therapy. *J Clin Oncol* 22: 1454-1459.
89. Hauke RJ, Armitage JO (2000) A new approach to non-Hodgkin's lymphoma. *Intern Med* 39: 197-208.
90. Archuleta TD, Armitage JO (2004) Advances in follicular lymphoma. *Semin Oncol* 31: 66-71.
91. Coiffier B, Neidhardt-Berard EM, Tilly H, Belanger C, Bouabdallah R, et al. (1999) Fludarabine alone compared to CHVP plus interferon in elderly patients with follicular lymphoma and adverse prognostic parameters: a GELA study. *Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. Ann Oncol* 10: 1191-1197.
92. Hauke RJ, Armitage JO (2000) Treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Curr Opin Oncol* 12: 412-418.
93. Czuczman MS (1999) CHOP plus rituximab chemoimmunotherapy of indolent B-cell lymphoma. *Semin Oncol* 26: 88-96.
94. Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7: 606-619.

95. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 253: 239-254.
96. Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657.
97. Deane JA, Fruman DA (2004) Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 22: 563-598.
98. Wymann MP, Pirola L (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436: 127-150.
99. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, et al. (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 615-675.
100. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 5: 921-929.
101. Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, et al. (1997) P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4330-4335.
102. Zhang J, Vanhaesebroeck B, Rittenhouse SE (2002) Human platelets contain p110delta phosphoinositide 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 178-181.
103. Voigt P, Dorner MB, Schaefer M (2006) Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem* 281: 9977-9986.
104. Suire S, Coadwell J, Ferguson GJ, Davidson K, Hawkins P, et al. (2005) p84, a new Gbetagamma activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr Biol* 15: 566-570.
105. Chang JD, Sukhova GK, Libby P, Schwartz E, Lichtenstein AH, et al. (2007) Deletion of the phosphoinositide 3-kinase p110gamma gene attenuates murine atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8077-8082.
106. Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, et al. (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118: 375-387.
107. Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, et al. (2000) Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287: 1040-1046.

108. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, et al. (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70: 535-602.
109. Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 152: 519-530.
110. Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Dann SG, Kim SY, et al. (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14238-14243.
111. Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K., and Stephens, L. R. (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 34, 647-662.
112. Rodriguez-Viciana, P. et al. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527-532.
113. Kodaki T, Woscholski R, Hallberg B, Rodriguez-Viciana P, Downward J, et al. (1994) The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol* 4: 798-806.
114. Vivanco I, Sawyers CL. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 489-501.
115. Leslie, N. R. & Downes, C. P. (2004) PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem. J* 382, 1-11.
116. Goberdhan DC, Wilson C (2003) PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2: R239-248.
117. Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA (2011) PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer* 11: 289-301.
118. Sano T, Lin H, Chen X, Langford LA, Koul D, et al. (1999) Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res* 59: 1820-1824.
119. Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, et al. (1999) Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* 155: 1253-1260.
120. Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, et al. (2000) Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 156: 1693-1700.

121. Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK, et al. (2002) Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 99: 63-67.
122. Tachibana M, Shibakita M, Ohno S, Kinugasa S, Yoshimura H, et al. (2002) Expression and prognostic significance of PTEN product protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 94: 1955-1960.
123. Zhou XP, Loukola A, Salovaara R, Nystrom-Lahti M, Peltomaki P, et al. (2002) PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. *Am J Pathol* 161: 439-447.
124. Fata JE, Debnath S, Jenkins EC, Jr, Fournier MV. (2012) Nongenomic Mechanisms of PTEN Regulation. *Int J Cell Biol* 2012: 379685.
125. Hlobilkova, A Guldberg P, Thullberg M, Zeuthen J, Lukas J, et al. (2000) Cell cycle arrest by the PTEN tumor suppressor is target cell specific and may require protein phosphatase activity. *Exp. Cell Res.* **256**, 571–577.
126. Weng LP, Brown JL, Eng C (2001) PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* 10: 599-604.
127. Dey N, Crosswell HE, De P, Parsons R, Peng Q, et al. (2008) The protein phosphatase activity of PTEN regulates SRC family kinases and controls glioma migration. *Cancer Res* 68: 1862-1871.
128. Davidson L, Maccario H, Perera NM, Yang X, Spinelli L, et al. (2010) Suppression of cellular proliferation and invasion by the concerted lipid and protein phosphatase activities of PTEN. *Oncogene* 29: 687-697.
129. Poon, J. S., Eves, R. & Mak, A. S. (2010) Both lipid- and protein-phosphatase activities of PTEN contribute to the p53-PTEN anti-invasion pathway. *Cell Cycle* 9, 4450–4454.
130. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, et al. (2007) Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128: 157-170.
131. Chalhoub N, Baker SJ (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 4:127-150.
132. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR (2005) Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 94: 29-86.

133. Osaki M, Oshimura M, Ito H (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9: 667-676.
134. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13: 2905-2927.
135. Staal SP, Huebner K, Croce CM, Parsa NZ, Testa JR (1988) The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* 2: 96-98.
136. Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, et al. (1992) AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9267-9271.
137. Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, et al. (1999) Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* 274: 21528-21532.
138. Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: More than just a road to PKB. *Biochem J* 346: 561-576.
139. Coffey PJ, Woodgett JR (1991) Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* 201: 475-481.
140. Altomare DA, Guo K, Cheng JQ, Sonoda G, Walsh K, et al. (1995) Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene* 11: 1055-1060.
141. Altomare DA, Lyons GE, Mitsuuchi Y, Cheng JQ, Testa JR (1998) Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the Akt2 kinase is activated by insulin. *Oncogene*; 16: 2407-2411.
142. Brodbeck D, Cron P, Hemmings BA (1999) A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem* 274: 9133-9136.
143. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, et al. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30: 193-204.
144. Frech M, Andjelkovic M, Ingley E, Reddy KK, Falck JR, et al. (1997) High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology

- domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem* 272: 8474-8481.
145. James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJ, Holmes AB, et al. (1996) Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J* 315 (Pt 3): 709-713.
 146. Thomas CC, Deak M, Alessi DR, van Aalten DM (2002) High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr Biol* 12: 1256-1262.
 147. Castillo SS, Brognard J, Petukhov PA, Zhang C, Tsurutani J, et al. (2004) Preferential inhibition of Akt and killing of Akt-dependent cancer cells by rationally designed phosphatidylinositol ether lipid analogues. *Cancer Res* 64: 2782-2792.
 148. Peterson RT, Schreiber SL (1999) Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr Biol* 9: R521-524.
 149. Kumar CC, Diao R, Yin Z, Liu Y, Samatar AA, et al. (2001) Expression, purification, characterization and homology modeling of active Akt/PKB, a key enzyme involved in cell survival signaling. *Biochim Biophys Acta* 1526: 257-268.
 150. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, et al. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15: 6541-6551.
 151. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, et al. (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272: 31515-31524.
 152. Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L (2004) A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol Ther* 3: 268-275.
 153. Luo J, Manning BD, Cantley LC (2003) Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4: 257-262.
 154. Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, et al. (1998) Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17: 313-325.
 155. Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, Hawkins PT (1998) Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* 8: 684-691.

156. Toker A, Newton AC (2000) Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 275: 8271-8274.
157. Chan TO, Tsichlis PN (2001) PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci STKE* 2001: pe1.
158. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8: 627-644.
159. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.
160. Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396: 584-587.
161. Di Cristofano A, Pandolfi PP (2000) The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 100: 387-390.
162. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12: 3499-3511.
163. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, et al. (2002) PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8: 1145-1152.
164. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, et al. (2001) Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 3: 245-252.
165. Testa JR, Bellacosa A (2001) AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10983-10985.
166. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22: 8983-8998.
167. Creagh EM, Martin SJ (2001) Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans* 29: 696-702.
168. Trencia A, Perfetti A, Cassese A, Vigliotta G, Miele C, et al. (2003) Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action. *Mol Cell Biol* 23: 4511-4521.
169. Nicholson KM, Anderson NG (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14: 381-395.

170. Barkett M, Gilmore TD (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6910-6924.
171. Lauder A, Castellanos A, Weston K (2001) c-Myb transcription is activated by protein kinase B (PKB) following interleukin 2 stimulation of Tcells and is required for PKB-mediated protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 21: 5797-5805.
172. Pugazhenti S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, et al. (2000) Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 275: 10761-10766.
173. Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, et al. (1999) The anti-apoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 19: 6195–6206.
174. Reusch JE, Klemm DJ (2002) Inhibition of cAMP-response element-binding protein activity decreases protein kinase B/Akt expression in 3T3-L1 adipocytes and induces apoptosis. *J Biol Chem* 277: 1426-1432.
175. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, and Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785–789.
176. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, and Roth R A. (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 271:31372–31378.
177. Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, and Rider MH. (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other proteinkinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem* 272 : 17269–17275.
178. Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, et al. (2004) mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat. Med.* 10, 594–601.
179. Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103: 253-262.
180. Gingras AC, Sonenberg N (1997) Adenovirus infection inactivates the translational inhibitors 4E-BP1 and 4E-BP2. *Virology* 237: 182-186.

181. Long X, Muller F, Avruch J (2004) TOR action in mammalian cells and in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Top Microbiol Immunol* 279: 115-138.
182. Martin KA, Blenis J (2002) Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. *Adv Cancer Res* 86: 1-39.
183. Proud CG (2004) Role of mTOR signalling in the control of translation initiation and elongation by nutrients. *Curr Top Microbiol Immunol* 279: 215-244.
184. Ruggero D, Pandolfi PP (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 3: 179-192.
185. Bjornsti MA, Houghton PJ (2004) The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4: 335-348.
186. Thomas GV (2006) mTOR and cancer: reason for dancing at the crossroads? *Curr Opin Genet Dev* 16: 78-84.
187. Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL (2004) TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 29: 32-38.
188. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4: 648-657.
189. Potter CJ, Pedraza LG, Xu T (2002) Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 4: 658-665.
190. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, et al. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605.
191. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, et al. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601.
192. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M (2003) Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des* 9: 521-530.
193. Gordan JD, Simon MC (2007) Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 17: 71-77.
194. Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732.

195. Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261-1274.
196. Thant AA, Nawa A, Kikkawa F, Ichigotani Y, Zhang Y, et al. (2000) Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 18: 423-428.
197. Sarris EG, Saif MW, Syrigos KN (2012) The Biological Role of PI3K Pathway in Lung Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)* 5: 1236-1264.
198. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, et al. (2008) An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 68: 6084-6091.
199. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, et al. (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448: 439-444.
200. Davies MA, Stemke-Hale K, Tellez C, Calderone TL, Deng W, et al. (2008) A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer* 99: 1265-1268.
201. Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, Bardelli A, Cummins JM, et al. (2005) Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 436: 792.
202. Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, et al. (2004) Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* 41: 161-170.
203. Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, et al. (2001) Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 61: 6105-6111.
204. Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, et al. (2001) AKT1/PKB α kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 159: 431-437.
205. Shi W, Zhang X, Pintilie M, Ma N, Miller N, et al. (2003) Dysregulated PTEN-PKB and negative receptor status in human breast cancer. *Int J Cancer* 104: 195-203.
206. Blackhall FH, Pintilie M, Michael M, Leigh N, Feld R, et al. (2003) Expression and prognostic significance of kit, protein kinase B, and mitogen-activated protein kinase in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 9: 2241-2247.
207. Balsara BR, Pei J, Mitsuuchi Y, Page R, Klein-Szanto A, et al. (2004) Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. *Carcinogenesis* 25: 2053-2059.

208. Nam SY, Lee HS, Jung GA, Choi J, Cho SJ, et al. (2003) Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis. *APMIS* 111: 1105-1113.
209. Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ (2003) Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* 89: 2110-2115.
210. Kurose K, Zhou XP, Araki T, Cannistra SA, Maher ER, et al. (2001) Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 158: 2097-2106.
211. Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, et al. (2002) Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8: 1168-1171.
212. Horiguchi A, Oya M, Uchida A, Marumo K, Murai M (2003) Elevated Akt activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma. *J Urol* 169: 710-713.
213. Terakawa N, Kanamori Y, Yoshida S (2003) Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 10: 203-208.
214. Alkan S, Izban KF (2002) Immunohistochemical localization of phosphorylated AKT in multiple myeloma. *Blood* 99: 2278-2279.
215. Cheong JW, Eom JI, Maeng HY, Lee ST, Hahn JS, et al. (2003) Phosphatase and tensin homologue phosphorylation in the C-terminal regulatory domain is frequently observed in acute myeloid leukaemia and associated with poor clinical outcome. *Br J Haematol* 122: 454-456.
216. Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, et al. (2003) Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia* 17: 995-997.
217. Eng C (2003) PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* 22: 183-198.
218. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, et al. (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 21: 99-102.

219. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, et al. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304: 554.
220. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, et al. (2001) The phosphatidylinositol 3' kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* 61: 7426-7429.
221. Bacus SS, Altomare DA, Lyass L, Chin DM, Farrell MP, et al. (2002) AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival. *Oncogene* 21: 3532-3540.
222. Stal O, Perez-Tenorio G, Akerberg L, Olsson B, Nordenskjold B, et al. (2003) Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Res* 5: R37-44.
223. Zhou BP, Hung MC (2003) Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. *Semin Oncol* 30: 38-48.
224. Liu AX, Testa JR, Hamilton TC, Jove R, Nicosia SV, et al. (1998) AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3- kinase in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 58: 2973-2977.
225. Sansal I, Sellers WR (2004) The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 22: 2954-2963.
226. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, et al. (1997) Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 16: 64-67.
227. Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Parsons R, et al. (1997) Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet* 16: 333-334.
228. Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, et al. (1997) Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* 57: 4997-5000.
229. Kim SK, Su LK, Oh Y, Kemp BL, Hong WK, et al. (1998) Alterations of PTEN/MMAC1, a candidate tumor suppressor gene, and its homologue, PTH2, in small cell lung cancer cell lines. *Oncogene* 16: 89-93.
230. Gronbaek K, Zeuthen J, Guldborg P, Ralfkiaer E, Hou-Jensen K (1998) Alterations of the MMAC1/PTEN gene in lymphoid malignancies. *Blood* 91: 4388-4390.

231. Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, et al. (1999) Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1563-1568.
232. Georgescu MM, Kirsch KH, Akagi T, Shishido T, Hanafusa H (1999) The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10182-10187.
233. Thomas RK, Baker AC, DeBiasi RM, Winckler W, Laframboise T, et al. (2007) High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 39: 347-351.
234. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, et al. (2008) An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 68: 6084-6091.
235. Kang S, Bader AG, Vogt PK (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 802-807.
236. Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, Luo J, Brachmann SM, et al. (2005) Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Res* 65: 10992-11000.
237. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, et al. (2005) Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 7: 561-573.
238. Zhao JJ, Liu Z, Wang L, Shin E, Loda MF, et al. (2005) The oncogenic properties of mutant p110alpha and p110beta phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18443-18448.
239. Bader AG, Kang S, Vogt PK (2006) Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1475-1479.
240. Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Park JI, et al. (2003) Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 104: 318-327.
241. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, et al. (2000) PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 19: 2739-2744.
242. Woenckhaus J, Steger K, Werner E, Fenic I, Gamerding U, et al. (2002) Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with

- progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol* 198: 335-342.
243. Knobbe CB, Reifenberger G (2003) Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol* 13: 507-518.
244. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, et al. (2001) The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* 61: 7426-7429.
245. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, et al. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321: 1807-1812.
246. Mizoguchi M, Nutt CL, Mohapatra G, Louis DN (2004) Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol* 14: 372-377.
247. Borlado LR, Redondo C, Alvarez B, Jimenez C, Criado LM, et al. (2000) Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo. *FASEB J* 14: 895-903.
248. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, et al. (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 116: 2078-2088.
249. Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, Perrone G, Miura N, et al. (2010) PI3K/p110{delta} is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Blood* 116: 1460-1468.
250. Abubaker J, Bavi PP, Al-Harbi S, Siraj AK, Al-Dayel F, et al. (2007) PIK3CA mutations are mutually exclusive with PTEN loss in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 21: 2368-2370.
251. Uddin S, Hussain AR, Siraj AK, Manogaran PS, Al-Jomah NA, et al. (2006) Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* 108: 4178-4186.
252. Hasselblom S, Hansson U, Olsson M, Toren L, Bergstrom A, et al. (2010) High immunohistochemical expression of p-AKT predicts inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Br J Haematol* 149: 560-568.

253. Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, Pham TH, Fend F, et al. (2006) Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood* 108: 1668-1676.
254. Psyrri A, Papageorgiou S, Liakata E, Scorilas A, Rontogianni D, et al. (2009) Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 15: 5724-5732.
255. Renne C, Willenbrock K, Martin-Subero JI, Hinsch N, Doring C, et al. (2007) High expression of several tyrosine kinases and activation of the PI3K/AKT pathway in mediastinal large B cell lymphoma reveals further similarities to Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 21: 780-787.
256. Meadows SA, Vega F, Kashishian A, Johnson D, Diehl V, et al. (2012) PI3Kdelta inhibitor, GS-1101 (CAL-101), attenuates pathway signaling, induces apoptosis, and overcomes signals from the microenvironment in cellular models of Hodgkin lymphoma. *Blood* 119: 1897-1900.
257. Zha H, Raffeld M, Charboneau L, Pittaluga S, Kwak LW, et al. (2004) Similarities of prosurvival signals in Bcl-2-positive and Bcl-2-negative follicular lymphomas identified by reverse phase protein microarray. *Lab Invest* 84: 235-244.
258. Gulmann C, Espina V, Petricoin E, 3rd, Longo DL, Santi M, et al. (2005) Proteomic analysis of apoptotic pathways reveals prognostic factors in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res* 11: 5847-5855.
259. Bhende PM, Park SI, Lim MS, Dittmer DP, Damania B (2010) The dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, is efficacious against follicular lymphoma. *Leukemia* 24: 1781-1784.
260. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, Kashishian A, Steiner B, et al. (2011) CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 117: 591-594.
261. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, Kashishian A, Steiner B et al. (2010) Clinical safety and activity in a phase 1 study of CAL-101, an isoform-selective inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase P110 δ , in patients with relapsed or refractory Non-Hodgkin lymphoma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 116(21):1777.
262. Castillo JJ, Furman M, Winer ES (2012) CAL-101: a phosphatidylinositol-3-kinase p110-delta inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 21: 15-22.

263. Jaffe ES (2009) The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 523-531.
264. Samuels Y, Velculescu VE (2004) Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* 3: 1221-1224.
265. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, et al. (2004) Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 64: 7678-7681.
266. Knobbe CB, Reifenberger G (2003) Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol* 13: 507-518.
267. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, et al. (1995) Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 64: 280-285.
268. Cornillet-Lefebvre P, Cuccuini W, Bardet V, Tamburini J, Gillot L, et al. (2006) Constitutive phosphoinositide 3-kinase activation in acute myeloid leukemia is not due to p110delta mutations. *Leukemia* 20: 374-376.
269. Chantry D, Vojtek A, Kashishian A, Holtzman DA, Wood C, et al. (1997) p110delta, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes. *J Biol Chem* 272: 19236-19241.
270. Clayton E, Bardi G, Bell SE, Chantry D, Downes CP, et al. (2002) A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med* 196: 753-763.
271. Firaguay G, Nunes JA. (2009) Analysis of signaling events by dynamic phosphoflow cytometry. *Sci Signal* 2:3.
272. Gao T, Furnari F, Newton AC (2005) PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18: 13-24.
273. Bertrand N (2014) Early follicular lymphoma pathogenesis. *Hematology Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association* 2014;8:137-144

274. Mamessier E, Broussais-Guillaumot F, Chetaille B, Bouabdallah R, Xerri L, et al.(2014) Nature and importance of follicular lymphoma precursors. *Haematologica* 99(5):802-10.
275. Janikova A, Bortlicek Z, Campr V, Kopalova N, et al. (214) Radiotherapy with rituximab may be better than radiotherapy alone in first line treatment of early-stage follicular lymphoma. Is it time to change the standard strategy? . *Leuk Lymphoma* 26:1-26.

للقبيحي اويبن تونسي
إلسم : وري قاي مان

دكتوراه : علم الأمراض بشريّة / علم الأورام (جامعة إي كس صدي لي ا)
لعل ولطيبول وجية / علم الأورام لمديعية (جامعة سن طنة 1)
5112-5112

تخليق تفعل المسار PI3K / AKT في سرطان لاغدد الفلويّة الجيبي

الإشراف هتش تركل رسال ل دكتور ابي ن جماعة إي كس صدي لي ا و جامع سن طنة 1

للمخص

يشار كالمسار PI3K/AKT في نمو مضطرب لسرطان اتلشيريّ بملهي ذلك الأورام الضيقة اللغفاهية.

لكن دوره في التسبب في سرطان الغدد اللغفاهية لا محوري من اللبعض الآليات التي لم يتم وصفها لحد الآن. ورسالة لتقارير تركز على درلة إخال لالمسار PI3K / AKT في اللغفاهية والجيبي، من أجل توفير هدف الجيحيدي.

لتوضيح هذه البقطة تمالك تخيقي في عينات خزعات الأنسجة لتيتعود ل 83 ملق سرطان لاغدد اللغفاهية لا محوري للشري، وذلك لإجراء لتحاليل لظرات للموثة PIK3CA في الإسونات 9 و 02 بملتختم لسلسان جر. وقد تم تحليل فس العينات باستخدام Western blot و Immunohistochemie لكشف عن تعبير البروتينات AKT، AKT (فيفر pAKT)، و PTEN. وقد استخدمت طليين من حالات هاب العق دل الغفاهية قال جي دل كمش هود.

بينت النتيج أن تعبير البروتين AKT كان حضر في جميع حالات سرطان الغدد اللغفاهية لا محوري والت هاب العق دل الغفاهية قال جي حيدة، كما أعيت 83/41 (83%) من عينات سرطان الغدد اللغفاهية لا محوري و 0/0 من حالات هاب العق دل الغفاهية قال جي حيدة عن تعبير البروتين الفيفر pAKT، حيث أظهرت 83/9 (9%) من عينات سرطان الغدد اللغفاهية لا محوري مستوى عال من تعبير البروتين الفيفر pAKT في عين أظهرت 83/5 (48%) من عينات سرطان الغدد اللغفاهية لا محوري و 0/0 من حالات هاب العق دل الغفاهية قال جي حيدة مستوى منخفض من تعبير البروتين pAKT. لوحظ تعبير البروتين PTEN في 83/82 (39%) من عينات سرطان الغدد اللغفاهية لا محوري و 0/0 من حالات هاب العق دل الغفاهية قال جي حيدة. بين ما 83/3 (04%) من للاحالات السرطانية أظهرت فقدان تعبير البروتين PTEN بالإضافة لى ذلك فإن 8 حالات سرطانية تيعر عن البروتين pAKT تظهر فقدان تعبير البروتين PTEN. لم يتم الكشف عن ظرات الموثة PIK3CA في أي من العينات المدروسة.

تشير هذه النتائج لى أن المسار PI3K / AKT يمكن أن يكون نشيط في مجموع قريّة من حالات سرطان الغدد اللغفاهية لا محوري، إلبسب سفير البروتين AKT أوسب بفقدان تعبير البروتين PTEN في غياب ظرات الموثة PIK3CA.

كلم التلبحح: الأورام الفلوية طفرات PIK3CA، pAKT، PTEN

هذالعمل كان مدعما من طرف بونام بقتبادل ابن رشدي ريس موس هوندوس

هياك اللبحح: INSERM، U1068، CNRS، UMR7258، مركز ببحاموس لي لسرطان، مع هبلوي لكل ماط، جامعة طيكس مر سدي، جامع سن طنة 4.

PhD in Human Pathology / Oncology Specialty (AMU)
Biological Sciences / Immuno-oncology Specialty (UC1)
2014-2015

Last name : Yahiaoui - Bentounsi
First name : Ouardia Imene

Analysis of the activation of the PI3K / AKT pathway in follicular lymphoma

Theses in joint guardianship between Aix Marseille University and Constantine 1 University

Abstract

The phosphoinositide 3- kinase (PI3K) pathway is involved in the growth of various human cancers, including lymphoid malignancies. However its role in the pathogenesis of follicular lymphoma (FL) has not been yet described.

The PhD work focuses on the study of alterations in the PI3K/AKT pathway in follicular lymphoma, in order to provide a new therapeutic target.

To clarify this point, biopsy tissue samples from 38 human FL cases were investigated for *PIK3CA* somatic mutations in exons 9 and 20 using Sanger sequencing. The same samples were analyzed using western blotting and immunohistochemistry to detect expression of AKT, phosphorylated AKT (pAKT), and PTEN proteins. Two cases of benign lymphadenitis were used as controls.

AKT expression was present in all FL and lymphadenitis cases. 14/38 (37%) FL and 2/2 lymphadenitis cases expressed pAKT. 9/38 (24%) FL samples showed high level of pAKT, whereas 5/38 (13%) FL cases and 2/2 benign lymphadenitis samples expressed pAKT at low level. PTEN expression was observed in 30/38 (79%) FL and 2/2 benign lymphadenitis cases, whereas 8/38 (21%) of FL cases showed loss of PTEN expression. In addition, 3 cases with positive pAKT did not express PTEN. *PIK3CA* mutations were not detected in any sample.

These data suggest that the PI3K/AKT signaling pathway could be activated in a subset of FL cases, due to either AKT phosphorylation or PTEN downregulation, in the absence of *PIK3CA* mutations.

Keywords: Follicular Lymphoma, *PIK3CA* mutations, pAKT, PTEN

This work was supported by a fellowship of the Averroes Erasmus Mundus program

Research structures: Inserm, U1068, CNRS, UMR7258, Cancer Research Center of Marseille, Paoli Calmettes Institute, Aix Marseille University, Constantine 1 University.

Doctorat en Pathologie humaine / Spécialité : Oncologie (AMU)
Sciences Biologiques / Spécialité : Immuno-oncologie (UC1)
2014-2015

Nom : Yahiaoui - Bentounsi
Prénom : Ouardia Imene

Analyse de l'activation de la voie PI3K/AKT dans le lymphome folliculaire

Co-tutelle de thèse de doctorat entre Aix Marseille Université et l'Université Constantine 1

Résumé

La voie PI3K/AKT est impliquée dans la croissance et la progression de divers cancers humains, et semble jouer un rôle majeur dans le développement de tumeurs lymphoïdes. Elle pourrait être impliquée dans la pathogénie du lymphome folliculaire (LF) par certains mécanismes non identifiés.

Les travaux de thèse portent sur l'étude des anomalies de la voie PI3K/AKT dans le lymphome folliculaire, dans le but d'apporter une nouvelle cible thérapeutique.

38 biopsies tissulaires de LF humain ont été étudiées pour une analyse mutationnelle du gène *PIK3CA* dans les exons 9 et 20 par le séquençage selon la méthode de Sanger. Les mêmes échantillons ont été analysés par western blot et immunohistochimie pour détecter l'expression des protéines AKT, AKT phosphorylée (pAKT), et PTEN. Deux cas de lymphadénite ont été utilisés comme témoins.

Les résultats obtenus montrent que l'expression d'AKT était présente dans tous les cas de LF et lymphadénite, et 14/38 (37%) échantillons de LF et 2/2 cas de lymphadénite exprimaient pAKT. 9/38 (24%) échantillons de LF ont montré un niveau élevé d'expression de pAKT, alors que 5/38 (13%) cas de LF, et 2/2 échantillons de lymphadénite montraient un faible niveau d'expression de pAKT. L'expression de PTEN a été observée dans 30/38 (79%) cas de LF et 2/2 cas de lymphadénite, tandis que 8/38 (21%) cas ont montré une perte d'expression de PTEN. En outre, 3 cas qui expriment pAKT montrent une perte d'expression de PTEN. Aucune mutation du gène *PIK3CA* n'a été détectée dans les échantillons étudiés.

Ces données suggèrent que la voie PI3K/AKT peut être activée dans certains cas de LF, soit en raison de la phosphorylation d'AKT, soit en raison d'une perte d'expression de PTEN, en absence de mutations de *PIK3CA*.

Mots-clés: lymphome folliculaire, mutations *PIK3CA*, phospho-AKT, PTEN

Ce travail a été soutenu par le programme d'échange Averroès Erasmus Mundus

Structures de recherche : Inserm, U1068, CNRS, UMR7258, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Institut Paoli Calmettes, Aix Marseille Université, Université Constantine 1.