

**Université de LIMOGES**

**Faculté de Médecine**

Ecole Doctorale 534 BIOLOGIE, SANTE, « BIO-SANTE »

*IFR 145, Equipe d'accueil 3842 Homéostasie cellulaire et pathologies*

Grade de Docteur en sciences

Discipline : Biologie Santé  
Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Cynthia BELLANGER

***Bad et circuits autocrines de survie dans les  
lymphomes diffus à grandes cellules B : Implication  
des neurotrophines***

Thèse dirigée par le Pr Danielle TROUTAUD

Soutenue le 10 décembre 2010

Jury : Marie-Lise GOUGEON, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris, rapporteur

Alphonse GARCIA, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris, rapporteur

Dominique BORDESSOULE, Professeur des universités, Limoges, examinateur

Danielle TROUTAUD, Professeur des universités, Limoges, examinateur

Invitée : Marie-Odile JAUBERTEAU, Professeur des Universités, Limoges



---

## ***Bad et circuits autocrines de survie dans les lymphomes diffus à grandes cellules B : Implication des neurotrophines***

Ce travail concerne la compréhension des mécanismes de survie et de résistance thérapeutique dans les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) par deux approches, l'étude de la molécule pro-apoptotique Bad, et le rôle de facteurs de croissance, les neurotrophines NGF et BDNF. Premièrement, une étude rétrospective à partir de biopsies de patients a permis d'établir le rôle de Bad dans l'hétérogénéité clinique des DLBCL. La corrélation négative significative entre son expression et le stade clinique des patients suggère son rôle de suppresseur tumoral. Cette expression est corrélée avec celle de la sous unité catalytique PP1 $\alpha$ , phosphatase impliquée dans l'activation de Bad. Ces données et la présence de formes phosphorylées (inactives) de Bad soulignent l'intérêt à cibler les «Bad-phosphatases» dans de futures thérapies. De plus, nous montrons que la forte expression de la molécule AIF est associée significativement à la survie des patients traités par polychimiothérapie CHOP, suggérant l'importance potentielle de cette voie de mort dans la sensibilisation des cellules tumorales aux traitements. Deuxièmement, nous démontrons, dans des lignées cellulaires de DLBCL, l'expression de NGF et BDNF, et de leurs récepteurs p75<sup>NTR</sup>, la sortiline et gp95TrkB. Ces productions (dont le récepteur TrkA) peuvent être modulées selon les conditions de culture (privation sérique, anti-BCR, présence de rituximab). Enfin, les données préliminaires sur l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk montrent une forte diminution de la viabilité cellulaire. L'ensemble de nos résultats suggèrent un rôle des neurotrophines dans des boucles de régulation de la balance survie/mort dans les DLBCL.

Mots-clefs: DLBCL, apoptose, rituximab, Bad, neurotrophines.

### ***Bad and neurotrophins in the regulation of cell survival pathways in diffuse large B-cell lymphoma.***

This work aimed to study the involvement of the pro-apoptotic molecule, Bad, and neuronal growth factors, NGF and BDNF, in malignant cell survival and therapeutic resistance in diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL. It was structured around two axis. We first showed, in a retrospective study of biopsy samples of nodal DLBCL, that lower Bad expressions were significantly related to advanced clinical stages of the patients, possibly reflecting its function as tumor suppressor. Moreover, Bad staining was positively correlated with PP1 $\alpha$  staining (the catalytic subunit of PP1 involved in activation of Bad). Of note, phosphorylated (inactive) Bad was also noticed in these tumors. Finally, high expression of AIF, involved in caspase-independent cell death, proved to be predictive of a longer overall survival in non-rituximab-treated patients (CHOP). Thus, these results collectively suggest the potential clinical relevance of targeting Bad phosphatases and AIF-mediated mitochondrial apoptosis for future therapeutic strategies. In the second study, we showed expression of neurotrophins, NGF and BDNF, and their low (p75<sup>NTR</sup> with its co-receptor, sortilin) and high (TrkB gp95) affinity receptors in DLBCL cell lines. Interestingly, we showed for the first time that NGF and BDNF production and Trk receptor expression, including TrkA, are regulated by culture conditions (serum deprivation, anti-BCR, rituximab). Finally recent results on pharmacological inhibition of Trk signalling showed a strong cytotoxicity in DLBCL cell cultures. In summary, our results suggest that a neurotrophin axis may contribute in DLBCL to malignant cell survival.

Keywords: DLBCL, apoptosis, rituximab, Bad, neurotrophins



---

*A mes parents, Josiane et Thierry,  
Mes deux petites sœurs, Solène et Edwige,  
Et ma tante et mon oncle, Isabel et Alain.*



---

## Remerciements

*Je remercie Madame le Professeur Marie-Odile Jauberteau de m'avoir accueillie au sein de l'EA3842.*

*Je remercie particulièrement Madame le Professeur Danielle Troutaud qui a dirigé cette thèse. Merci pour tes qualités humaines. Merci de m'avoir fait partager ton expérience scientifique, merci pour ta très grande disponibilité en toutes circonstances, ton soutien et la patience dont tu as su faire preuve et qui m'ont permis d'apprécier pleinement ce domaine, de m'épanouir dans cette voie. Puisse-tu trouver ici l'expression de toute mon admiration et de mes plus sincères remerciements.*

*J'exprime ma profonde gratitude envers les membres du jury, Mme Marie-Lise Gougeon et Mr Alphonse Garcia pour avoir accepté de rapporter ma thèse, Mme Dominique Bordessoule pour l'avoir examinée.*

*Je remercie la Ligue contre le cancer et le Comité d'orientation Recherche Cancer du Limousin pour le soutien financier au cours de ces quatre années.*

*Enfin, un grand merci pour tous les bons moments passés au cours de ce doctorat aux membres du laboratoire EA3842 passés et présents.*

*Un grand merci en particulier à Aurélie pour sa gentillesse, sa grande capacité d'écoute, et oui, je pense que tu seras contente que j'arrête de me plaindre et de râler.*

*Mon petit Carolus, l'estomac sur patte du labo, toujours prête pour s'amuser et un petit café, son enthousiasme débordant qu'elle arrive toujours à transmettre à son entourage, même dans des domaines « para-scientifiques ». Un petit coucou en salle de Sdff !*

*Mes collègues de bureaux, Mathilde, pour sa grande gentillesse et ses taquineries, et Marie-Claude, ma jumelle. Et oui, tu es grande et noire, je suis petite et blanche !!! Le seul « homme » du bureau, Julian.*

*La petite Elodie, un grand merci pour toutes les crises cardiaques que j'ai pu avoir au moment d'aller prendre notre premier café du matin pour se réveiller, à 7h00, c'est dur.*

*Aux trop rares représentants masculins du labo : Romain, JAPAN !!!! Je te fais une petite dédicace, il faut biensûr l'imaginer, je te fais la danse du cygne mort !!!! Hussein, notre libanais national, Thomas, ses conseils et sa grande gentillesse, un sandwich jambon beurre ? Biensûr Pierre. Et l'EA3842 ne serait pas ce qu'elle est sans Fafa, toujours à courir à droite et à gauche et pourtant toujours prêt à rendre service.*

*Je n'oublie pas les ex blondes du labo Gaëlle et Elodie pour leurs conseils et leur bonne humeur, Nathalie et la piscine du lundi soir, loin désormais. Barbara, ses coups de semonces et ses encouragements. Et puis, la petite dernière, qui vient d'arriver, Lydie, son enthousiasme et ses envies festives.*

*Je tiens aussi à remercier Anne-Laure, Mireille, Marie-Hélène et Serge pour leurs conseils.*



---

*Je remercie le service d'anatomo-pathologie et en particulier le Dr Barbara Petit et Brigitte. Je n'oublie pas non plus le service d'hématologie clinique et le Dr Marie-Pierre Chaury.*

*Au niveau personnel, je tiens à remercier mes amis, Sana, Aline, Noémie, Franck, Marc et Bastien pour les bons moments passés ensemble, trop peu nombreux pendant ses quatre années, quand on vit à Limoges et que les sorties se font à Paris ce n'est pas simple.*

*Je remercie Cathy et mes copines de danse : Cécile, Blandine, Margot, Marion, Julie, Virginie, Alex, Caro, Michèle, Françoise, Sophie, Laura, Sylvie, Cathy bis, Vanessa, Anaïs et je suis sûre que j'en oublie. Je repense à ces spectacles sur des scènes plus ou moins étranges, la gare SNCF de Limoges, le stade Beaublanc et les quart de finale de Basket, une première partie au Zénith « mémorable » et biensûr la scène en pente de Jean Gagnant ! Sans vous je n'aurai pas pu me changer les idées et extérioriser mes frustrations.*

*Je remercie mes parents et mes proches pour leur soutien et leur confiance de tous les instants, avec une pensée pour ceux qui nous ont quittés trop tôt. Mon petit Patachon, Bichon, Bouchon, Chaton et le petit mail du matin qui a écouté mes milles et uns déboires et pour m'avoir gardée dans le droit chemin et sans oublier nos égarements philosophiques. Mon petit Pi, ses coups de téléphones tardifs durant jusqu'à 2h15, vive le téléphone illimité, et tous nos délires qui ne s'arrêtent jamais. Mon papa et ma maman sans qui je ne serai pas arrivée jusqu'ici, aujourd'hui. D'un soutien sans faille, toujours à l'écoute de vos filles, qui il faut le dire sont très bavardes et un peu, voir complètement dingues. Mon oncle et ma tante, pour leur soutien et leur présence. Je vous dédie cette thèse, mille mercis.*



---

---

## Table des matières

---

<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>17</b>
<hr/>	
<b>I. L'apoptose.....</b>	<b>27</b>
I.1. Quelques généralités : Définitions et place de l'apoptose dans les processus de mort cellulaire.....	28
I.1.1. La nécrose.....	28
I.1.2. L'apoptose.....	28
I.2 Les gènes de l'apoptose : de <i>C.elegans</i> aux mammifères.....	29
I.3 Les différentes étapes de l'apoptose.....	31
I.3.1 La phase d'induction.....	31
I.3.2 La phase effectrice ou d'exécution de l'apoptose.....	32
I.3.2 La phase de destruction et d'élimination.....	32
I. 4 Les caspases : acteurs principaux de la phase d'excécution.....	32
I. 5 Les voies d'activation de l'apoptose.....	35
I.5.1 La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort (Figure 5).....	37
I.5.2 La voie intrinsèque mitochondriale.....	38
I.5.3 La voie du réticulum endoplasmique.....	47
I.6 Régulation de l'apoptose.....	48
I.6.1 Les inhibiteurs de l'apoptose.....	48
I.6.2. Régulation des membres de la famille Bcl-2.....	48
<b>II. De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B</b>	<b>49</b>
.....	49
II.1. Structure.....	50
II.2. La régulation de l'activité de Bad par phosphorylation.....	50
II.2.1. Aspects structuraux et subcellulaires.....	50
II.2.2. Les kinases et phosphatases de Bad (Figure 13).....	52
II.3. Les interactions lipidiques: un élément important du trafic intracellulaire de Bad.....	54
II.4. Le double rôle de Bad: de l'homéostasie cellulaire à l'homéostasie glucidique.....	56
II.5. Bad : une sentinelle de la balance survie / apoptose : Bad et lymphomes B.	57

II-5.1 Bad et Cancers.....	58
II-5.2 Apport des modèles de souris déficientes : Bad et DLBCL.....	59
<b>III- Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) .....</b>	<b>60</b>
III-1 Rappels sur la formation des centres germinatifs au cours de l'activation des lymphocytes B .....	60
III-2. Origine cellulaire et classification des Lymphomes B.....	62
III-2.1. Historique sur la classification des lymphomes .....	62
III-2.2. Classification des lymphomes B .....	63
III-3. Présentation générale des lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) .....	64
III-4 Pathogénicité des DLBCL : aspects cytogénétiques.....	64
III-4.1 Translocations chromosomiques.....	64
III-4.2 Hypermutations somatiques aberrantes.....	65
III-4.3 Autres anomalies cytogénétiques .....	66
III-5 Origine cellulaire, Caractérisation histologique et sous types.....	66
III-5.1 Origine cellulaire .....	66
III-5.2 Aspects immunohistochimiques: profils d'expression génique.....	67
III- 6. Facteurs de pronostic .....	70
III-6.1 Index pronostique international.....	70
III-6.2 Autres facteurs de pronostic.....	71
III-7. Traitements .....	71
III-7.1 Avant l'ère du Rituximab : Polychimiothérapie CHOP .....	72
III-7.2 Le Rituximab .....	72
<b>IV. Les neurotrophines et leur implication dans la survie des lymphocytes B .....</b>	<b>77</b>
IV.1. Généralités sur les neurotrophines.....	77
IV-1.1 Structure, production et fonctions neurobiologiques des neurotrophines (NGF, BDNF).....	78
IV-1.2 Les récepteurs aux neurotrophines.....	84
IV-1.3 Bilan : signalisation des neurotrophines et balance survie/apoptose.....	102
IV-2. Généralités sur la découverte du rôle des neurotrophines dans le système immunitaire.....	103
IV-3. Neurotrophines et survie des lymphocytes B .....	105
IV-3.1. Production et fonctions biologiques de NGF et BDNF.....	105

IV-3.2 Expression des récepteurs .....	108
IV-3.3 Bilan: les neurotrophines facteurs autocrines de survie des lymphocytes B ? Implications physiopathologiques.....	110
<b>I -Rôle de Bad dans l'hétérogénéité clinique des patients .....</b>	<b>118</b>
I.1. Synopsis.....	118
I.2. Article 1: Prognostic Significance of BAD and AIF Apoptotic Pathways in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. ....	120
I.3. Données complémentaires sur le statut de phosphorylation de Bad dans les DLBCL .....	130
I.3.1. Matériels et méthodes .....	130
I.3.2. Résultats.....	131
I.3. Discussion / Conclusion .....	132
<b>II. Les neurotrophines dans les DLBCL : Implication dans les circuits autocrines de survie ? .....</b>	<b>134</b>
II.1. Synopsis .....	134
II.2. Article 2 : A neurotrophin axis in diffuse large B-cell lymphoma: involvement in cell survival pathway and sensitivity to rituximab- induced apoptosis. ....	136
II.3. Données complémentaires : Effet de l'ajout de neurotrophines exogènes et de l'inhibition des récepteurs Trk sur la survie des cellules B tumorales de DLBCL. ....	168
II.3.1. Matériels et méthodes .....	168
II.3.2. Résultats .....	170
II.3.3. Discussion / Conclusion.....	172
<b>Discussion générale / Conclusion / Perspectives .....</b>	<b>176</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>186</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>218</b>



Figure 1 : Observation par microscopie des modifications morphologiques de cellules en apoptose.)	29
Figure 2: Protéines impliquées dans l'apoptose chez <i>C.elegans</i> et les mammifères.....	31
Figure 3 : Activation des caspases.....	33
Figure 4 : La « démolition » cellulaire orchestrée par les caspases.....	35
Figure 5 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.....	36
Figure 6 : Dualité fonctionnelle de la mitochondrie, productrice d'ATP et régulatrice de l'apoptose.	39
Figure 7: Modèles de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.....	41
Figure 8: fragmentation de la mitochondrie et oligomérisation de Bax/Bak.....	42
Figure 9: Classification des protéines de la famille Bcl-2.....	44
Figure 10 : Modélisation du rôle des protéines BH3-only.	
Figure 11 : Activation et formation du pore Bax/Bak.....	46
Figure 12: Régulation de Bad par phosphorylation.....	51
Figure 13 : Voies de signalisation impliquées dans la phosphorylation de Bad.....	53
Figure 14 : Modèle de l'amplification des effets de la déphosphorylation cytoplasmique de Bad.....	55
Figure 15 : Modèle de régulation de Bad par phosphorylation et ses conséquences sur son trafic intracellulaire.....	56
Figure 16 : Différenciation et activation des cellules B dans le centre germinatif.....	61
Figure 17 : Programme transcriptionnel du développement des cellules B du centre germinatif et des cellules post-germinatives.....	62
Figure 18 : Origine cellulaire des cellules B des différentes classes de lymphomes. DLBCL.....	63
Figure 19: Modélisation de la pathogenèse des lymphomes diffus à grandes cellules B.....	66
Figure 20 : Classification des DLBCL selon Hans.....	68
Figure 21 : Mécanismes d'induction de l'apoptose par le Rituximab au cours d'une thérapie.....	76
Figure 22: Schéma du pre-pro-NGF.....	79
Figure 23 : Du pré-pro-BDNF au BDNF.....	82
Figure 24 : Structure du récepteur p75 <sup>NTR</sup> .....	85
Figure 25: Les différentes formes du récepteur p75 <sup>NTR</sup> .....	86
Figure 26 : les ligands des récepteurs p75 <sup>NTR</sup> et Trk.....	87
Figure 27: Les voies de signalisation activées par p75 <sup>NTR</sup> .....	89
Figure 28: p75 <sup>NTR</sup> et ses co-récepteurs.....	90
Figure 29: Structure des récepteurs Trk.....	94
Figure 30: Isoformes principales du récepteur TrkA.....	96
Figure 31: Les différentes isoformes de TrkB.....	97
Figure 32: Les voies de signalisations activées par les récepteurs Trk et leurs acteurs.....	100
Figure 33: Schéma récapitulatif de la signalisation des neurotrophines.....	103
Figure 34 : Etude du statut de phosphorylation de la protéine Bad dans des biopsies de patients atteints de DLBCL.....	132
Figure 35: Effet des neurotrophines NGF et BDNF exogènes sur la viabilité cellulaire des cellules SUDHL-4.....	170
Figure 36: Effet des neurotrophines exogènes sur la mort cellulaire des lignées de DLBCL induite par la privation sérique et le traitement au rituximab.....	171
Figure 37 : Effet de l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk sur la viabilité cellulaire des cellules SUDHL-4.....	172
Figure 38: Modélisation des voies de sensibilisation à l'apoptose dans les DLBCL.....	183

---

<i>Tableau 1 : Les différents types de mort cellulaire programmée.....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 2 : Principales caractéristiques des anticorps utilisés en immunohistochimie.....</i>	<i>131</i>

## Abréviations

### A

**ABC:** Activated B-like DLBCL  
**ACST :** transplantation de cellules souches autologues  
**ADAM17:** a disintegrin and metalloproteinase17  
**ADCC :** cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante  
**ADN:** acide désoxyribonucléique  
**ADNc:** ADN complémentaire  
**ADP:** acide diphosphate  
**AIF:** Apoptosis-inducing factor  
**AMPC:** acide monophosphate cyclique  
**AP-1:** activator protein 1  
**Apaf-1:** apoptotic protease activating factor 1  
**ARMS:** ankyrin repeat-rich membrane-spanning  
**ARN:** acide ribonucléique  
**ARNm:** ARN messagers  
**ATP:** acide triphosphate

### B

**Bad:** Bcl-X<sub>L</sub>/Bcl-2 associated death promoter  
**Bak:** Bcl-2 homologous antagonist killer  
**Bax:** Bcl-2 associated X protein  
**Bcl-2:** B cell lymphoma 2  
**Bcl-6:** B cell lymphoma 6  
**Bcl-X<sub>L</sub>:** B cell leukemia XL  
**BCR:** B cell receptor  
**BDNF:** brain derived neurotrophic factor  
**BH:** Bcl-2 homology domain  
**Bid:** BH3 interacting domain death agonist  
**Bim:** Bcl-2 interacting mediator of cell death  
**BIR:** baculoviral IAP repeat

### C

**C/EBP:** CCAAT/enhancer binding protein  
**C3b:** complément 3b  
**Ca<sup>2+</sup>:** calcium  
**CAD:** caspase activated DNase  
**CAM:** protéine kinase calcium/calmoduline dépendante  
**CARD :** caspase recrutement domain  
**CARF :** facteur de transcription calcium-dépendant

**CD:** Cluster of differentiation  
**CDC:** cytotoxicité complément dépendante  
**CDK:** cyclin dépendant linase  
**CEBPA:** CCAAT/enhancer-binding protein alpha  
**CHOP:** Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisone  
**CKII:** Casein kinase II  
**CRD:** carbohydrate-recognition domain  
**CRE:** cAMP responsive element  
**CREB:** cAMP Response Element Binding protein  
**CSF2RA:** colony stimulating factor 2 receptor  
**Cyp-D:** cyclophiline D

### D

**Da:** Dalton  
**DAG:** diacylglycérol  
**DD:** death domain  
**DED:** death effector domain  
**DISC:** death inducing signaling compexe  
**DLBCL:** diffuse large B cell lymphoma  
**DR:** death receptor  
**Drp1:** dynamin-related protein 1

### E

**EBV:** Epstein Barr virus  
**ECOG:** Eastern Cooperative Oncology Group  
**EFS:** survie sans évènements  
**EGF:** Epidermal growth factor  
**EGFL7:** EGF-like domain-containing protein  
**EndoG:** endonuclease G  
**ERK:** extracellular signal regulated kinase

### F

**FABP:** fatty acid binding protein  
**FADD:** fas-associated death domain  
**Fc:** fragment crystallizable region  
**FcR:** Fc receptor  
**FDC:** Folliular Dendritic Cells  
**FKHRL:** facteur de transcription « Forkhead »

**FLIP:** FADD-like ICE inhibitory proteins

### G

**GAP:** GTPases activating proteins  
**GC:** germinal center  
**GCB:** Germinal Center B-like DLBCL  
**GEF:** guanines nucleotide exchange factors  
**GK:** glucokinase  
**Grb:** Growth factor receptor bound protein  
**GSK:** glycogen synthase kinase  
**GTP:** guanine triphosphate

### H

**HDT:** thérapies à haute dose  
**hsp-70:** heat shock proteins 70 kilodalton

### I

**IAP:** Inhibitor of Apoptosis Protein  
**ICAD:** inhibitor of caspases activated DNase  
**ICE:** interleukin-1 $\beta$  converting enzyme  
**Ig:** Immunoglobuline  
**Ig-C2:** Ig de type C2  
**IKK:** I $\kappa$ B kinase  
**Il:** interleukine  
**INF- $\gamma$ :** interferon- $\gamma$   
**IP<sub>3</sub>:** inositol triphosphate  
**IPI:** index pronostique international  
**IRAK:** Il-1 receptor associated kinase  
**IRF-4(Bai et al.):** Interferon regulatory factor 4  
**I $\kappa$ B:** Inhibitor of NF $\kappa$ B

### J

**JAK:** Janus Kinase  
**JNK:** Jun N terminal Kinase

### K

**KDa:** Kilodalton  
**KDR:** Kinase insert domain receptor

### L

**LBD:** LIM domain-binding protein

## Abréviations

**Lck**: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase  
**LDH**: lactico-déshydrogénase  
**LLC** : lymphoïde chronique  
**LNH** : lymphomes non hodgkiniens  
**LPS**: Lipopolysaccharide  
**Lyn**: Src-Family Kinase

### M

**MAGE**: Melanoma-associated antigens  
**MALT**: Mucosa Associated Lymphoid Tissue  
**MAPK**: mitogen activated protein kinase  
**Mcl-1**: myeloid leukemia cell differentiation protein  
**MDGI**: myelin-derived growth inhibitors  
**MME** : membrane externe de la mitochondrie  
**MMI** : membrane interne mitochondriale  
**MMP** : Matrix metalloproteinase

### N

**NADE**: p75<sup>NTR</sup> Associated Cell Death Executor  
**NES**: séquence-signal d'export nucléaire  
**NGF**: nerve growth factor  
**NK**: natural killer  
**NK-κB**: nuclear factor-κB  
**NLS**: séquences-signal d'adressage nucléaire  
**NRAGE**: neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog  
**NRH2**: neurotrophin-Receptor homolog-2  
**NRIF**: neurotrophin Receptor Interacting Factor  
**NT**: neurotrophine  
**NuMa**: nuclear mitotic apparatus protein

### P

**p75<sup>ECD</sup>**: p75<sup>NTR</sup> extracellular domain  
**p75<sup>ICD</sup>**: p75<sup>NTR</sup> intracellular domain

**p75<sup>NTR</sup>**: p75 neurotrophin receptor  
**p90RSK**: 90-kDa ribosome S6 protein kinase  
**PAK**: serine-threonine kinase p21-activated kinase  
**PARP**: Poly (Byrd et al.) polymerase  
**Pax**: paired box  
**PC**: protéine convertase  
**PDE4B**: cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B  
**PDK**: hosphoinositide-dependent protein kinase  
**PI3K**: phosphatidyl inositol 3 kinase  
**PK**: protein kinase  
**PLC-γ** : phospholipase C-γ  
**PMA** : phorbol12-myristate 13-acetate  
**PP1α** : sous unité catalytique α de la phosphatase protein 1  
**PP2A**: phosphatase protein 2A  
**pRB**: protéin du rétinoblastome  
**PRDM1/Blimp-1**: PR domain zinc finger protein  
**PTEN**: Phosphatase tensin  
**PTP**: permeability transition pore  
**PTPN**: Tyrosine-protein phosphatase non-receptor

### R

**RAP**: Receptor-Associated Protein  
**R-CHOP**: Rituximab-CHOP  
**RE**: réticulum endoplasmique  
**REAL** : revised european american classification of lymphoid neoplasm  
**RhoA**: Ras homolog gene family, member A  
**RING**: doigt de zinc  
**RIP**: Receptor-interacting protein

### S

**SC-1**: Schwann cell factor-1  
Ser: sérine  
**SH2**: Src homology-2 containing protein  
**SIDA**: syndrome de l'immunodéficience acquise

**SMAC** (Creagh et al.): second mitochondria-derived activator of caspases  
**SNC** : système nerveux central  
**SNP** : système nerveux périphérique  
**SOS**: Son of sevenless  
**STAT**: Signal Transducer and Activator of Transcription

### T

**TACE**: TNFα converting enzyme  
**TGF-β**: Transforming Growth Factor β  
**TIMP**: tissue inhibitor of metalloproteinases  
**TM**: transmembrane domain  
**TNF**: Tumor necrosis factor  
**TNF-R**: TNF receptor  
**TRADD**: TNFR associated death domain  
**TRAIL**: TNF related apoptosis inducing ligand  
**TRAIL-R**: TRAIL receptor  
**Trk**: tropomyosin-related kinase

### U

**UPR**: Unfolded protein response  
**USF**: Upstream Stimulatory Factor  
**UV**: Ultraviolet

### V

**VDAC**: voltage dependent anion channel  
**VEGF**: Vascular endothelial growth factor  
**Vps10p**: Vacuolar carboxy-Peptidase Sorting receptor-10

### W

**WAVE**: WASP-family verprolin-homologous protein  
**WHO** (Allen and Dawbarn): World Health Organization

### X

**XBP**: X-box binding protein  
**XIAP**: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

# **INTRODUCTION GENERALE**

---



La mort cellulaire programmée ou apoptose est un des systèmes par lequel des cellules enclenchent leur processus de mort. De façon paradoxale, c'est un processus vital, qui est notamment impliqué dans le développement embryonnaire, fœtal et adulte, l'homéostasie cellulaire, l'immunité et l'élimination de cellules devenues inutiles ou dangereuses pour l'organisme. Dans le système immunitaire, ce mécanisme de mort cellulaire a un rôle essentiel. Il participe au processus de sélection négative des lymphocytes, qui permet au système immunitaire de différencier le soi du non-soi, évitant la formation de lymphocytes auto-réactifs. De plus, en périphérie il favorise l'élimination des cellules excédentaires produites au cours de l'expansion clonale en réponse à une infection, par exemple. Plusieurs voies de signalisations mènent à l'apoptose. L'une de ces voies détermine des modifications de la perméabilité membranaire mitochondriale aboutissant finalement à la libération de protéines apoptogènes dans le cytosol comme le cytochrome c et l'AIF. Ces événements sont contrôlés par des molécules de la famille Bcl-2, pro et anti-apoptotiques. Celles-ci sont elles-mêmes régulées par des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation. La protéine Bad appartient à cette famille, et plus précisément fait partie des membres pro-apoptotiques. Elle possède un rôle de sentinelle dans l'apoptose des cellules et sa présence semble nécessaire à réprimer le processus tumoral des lignées lymphoïdes d'origine murine. En effet, selon son état d'activation, c'est-à-dire de phosphorylation, elle favorisera les voies de survie ou de mort cellulaire. Si elle est activée / déphosphorylée, elle peut former des complexes avec des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et/ou être relocalisée au niveau de la membrane mitochondriale et déclencher la libération de facteurs apoptogènes. Au cours de l'apoptose, des dérégulations peuvent survenir. Elles peuvent avoir de multiples causes et conduire entre autre à des cancers. Dans ce contexte, alors que les acteurs anti-apoptotiques peuvent jouer le rôle de proto-oncogènes, favorisant la survie et la prolifération des cellules tumorales (pour exemple : Bcl-2), il est suggéré que certains membres pro-apoptotiques, comme Bad pourraient fonctionner comme des suppresseurs tumoraux.

Les cancers représentent depuis le milieu du XX<sup>e</sup> siècle une des maladies les plus redoutées. C'est à cette même période que Metchnikoff a envisagé pour la première fois le rôle des globules blancs dans la défense de l'organisme. Certains globules blancs (polynucléaires et granulocytes) peuvent se déplacer et ingérer (phagocytose) des agents nuisibles. Le rôle du lymphocyte dans l'immunité spécifique a été reconnu beaucoup plus tard. Le lymphome est un terme générique attribué historiquement aux proliférations malignes des tissus lymphoïdes. Actuellement, ce mot désigne des cancers qui dérivent des lymphocytes, acteurs majeurs du système immunitaire. Bien que dépendant du type de lymphomes, souvent les cellules tumorales n'envahissent pas la circulation sanguine, mais ciblent les tissus, et en particulier les ganglions lymphoïdes.

Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) constituent les plus fréquents des lymphomes non-Hodgkiniens (LNH), aujourd'hui, encore entre 20 et 30%. Tout comme d'autres cancers, leur tumorigenèse est un processus à multi-étapes. Ils sont cliniquement et biologiquement hétérogènes. La base du traitement, avant les années 2000, reposait sur une polychimiothérapie cytotoxique dont le standard est le CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone). Bien que ce protocole ait permis de guérir un certain nombre de malades, la réponse complète à ce traitement n'est que de 45 à 55%, avec un taux de guérison d'environ 35%. A partir de la fin des années 1990, l'association du Rituximab (Anticorps monoclonal chimérique anti-CD20) à la chimiothérapie (R-CHOP) a permis d'augmenter de façon sensible (entre 10 et 15%) la survie des patients atteints de DLBCL. Le rituximab lié à la cellule CD20-positif (cellule B normale et DLBCL) agit par 3 mécanismes principaux : une lyse dépendante du complément, une cytotoxicité cellulaire dépendante du complément et l'induction modérée d'apoptose. Cependant, son efficacité n'est pas

applicable à tous les patients, et parmi les « répondeurs », des mécanismes de résistance semblent exister, limitant l'éradication des cellules tumorales.

Une activation constitutionnelle de certaines voies de signalisation cellulaire impliquées dans la survie a été observée dans les cellules B tumorales d'un grand nombre de LNH dont les DLBCL. Parmi ces voies qui confèrent un avantage de survie aux cellules B malignes, on peut citer la voie PI3K/Akt, qui, par ailleurs, converge aussi sur la phosphorylation de la protéine Bad. Parmi les facteurs de croissance qui régulent ces voies il y a les neurotrophines.

Les neurotrophines (NT) sont des facteurs de croissance initialement décrits comme impliqués dans l'homéostasie du système nerveux central et périphérique. Cette famille, dont le premier membre, le NGF (« Nerve Growth Factor ») a été découvert dans les années 50, régule la survie et le développement des cellules neuronales et astrocytaires, par la suite d'autres neurotrophines, le BDNF (« Brain Derived Growth Factor ») et la neurotrophine-3 ont été découvertes. Aujourd'hui, de nombreuses publications permettent d'étendre le champ d'action de ces neurotrophines au fonctionnement normal du système immunitaire. En effet, les neurotrophines sont présentes en abondance au niveau des tissus médullaires et thymiques au cours du développement. Chez l'adulte, les neurotrophines et leurs récepteurs sont détectés dans de nombreuses cellules effectrices de la réponse immunitaire normale et pathologique. Elles apparaissent de plus en plus comme des cytokines capables de moduler la réponse B humorale spécifique. De ce point de vue, il est tout à fait intéressant de souligner que les neurotrophines représenteraient au sein du système immunitaire des facteurs autocrines de survie des lymphocytes B et des cellules lymphoblastoïdes B. Cet effet semble concerner notamment des cellules B impliquées dans la réponse immune secondaire d'où proviennent la plupart des lymphomes B, y compris la majorité des lymphomes diffus à grandes cellules. Ainsi, la sécrétion de ces neuropeptides par les cellules tumorales B pourrait être une nouvelle voie pour approcher les mécanismes de survie de ces cellules et de leur sensibilisation à l'apoptose à visée thérapeutique.

L'objectif de ma thèse a été de préciser, dans un premier temps, le rôle de la protéine Bad dans la pathogénicité du DLBCL, et plus particulièrement d'évaluer son rôle dans l'hétérogénéité clinique des patients. Puis, nous avons étudié l'expression des neurotrophines (NGF, BDNF) et de leurs récepteurs dans des lignées cellulaires issues de ce type de lymphomes. Plus précisément, nous avons recherché dans ce contexte pathologique des arguments expérimentaux nous permettant d'envisager l'existence, par la production de ces neurotrophines, de circuits de régulation de la survie cellulaire.

Dans une première partie bibliographique, nous présenterons l'apoptose, ses voies de signalisation et de régulation et ses différents acteurs, dont la protéine Bad à laquelle nous nous intéresserons tout particulièrement et qui nous permettra de faire le lien avec les DLBCL. Nous ferons alors une présentation des lymphomes B et plus spécifiquement des DLBCL. Puis, nous finirons cette partie par une étude des neurotrophines, dont les données acquises sur leur rôle dans le système nerveux, nous permettront d'aboutir à la compréhension des mécanismes complexes de leur signalisation. Nous verrons également que la fonction des neurotrophines dépasse largement le cadre du système nerveux, en considérant notamment les données acquises, au démarrage de notre travail, sur le rôle des neurotrophines dans le fonctionnement du système immunitaire, et tout particulièrement des cellules B.

La deuxième partie du mémoire présentera les résultats obtenus au cours de cette thèse. Dans un premier temps, nous avons cherché à préciser le rôle de Bad notamment dans l'hétérogénéité clinique de ces lymphomes. Nous avons ainsi participé à la réalisation d'une

étude rétrospective par immunohistochimie à partir de biopsies primaires tumorales réalisées lors du diagnostic, issues de 46 patients atteints de DLBCL. Ce travail a porté sur l'analyse de l'expression de Bad dans les cellules tumorales des patients, mais aussi d'autres acteurs/partenaires de Bad ou de la signalisation induite par Bad.

Puis, la 2<sup>e</sup> partie des résultats concernera notre second objectif du travail de thèse dans le cadre de l'étude que nous avons initiée sur l'implication de neurotrophines (NGF, BDNF) et plus particulièrement leur rôle dans la balance mort / survie dans les DLBCL. Ce travail a été majoritairement réalisé sur des lignées cellulaires humaines validées comme modèles d'étude de ce lymphome. Nous avons recherché dans ces lignées l'expression et la production de NGF, BDNF et de leurs récepteurs (haute affinité, Trk et basse affinité p75<sup>NTR</sup>) par diverses approches méthodologiques, et dans différentes conditions expérimentales d'apoptose (privation sérique, réponse au Rituximab) ou de survie (stimulation du récepteur à l'antigène, BCR). Les résultats de cette étude seront complétés par des données préliminaires sur la fonctionnalité de ces neurotrophines, en utilisant des neurotrophines exogènes et en inhibant pharmacologiquement la voie des récepteurs de survie Trk.

Enfin, nous terminerons ce mémoire par une discussion et une conclusion générales et les perspectives qui peuvent en découler.



# **Introduction bibliographique**

---



## I. L'apoptose

L'apoptose encore appelée « mort cellulaire programmée » est nécessaire au développement et au maintien du bon fonctionnement des organismes multicellulaires. Ainsi au cours des nombreuses mitoses et différenciation cellulaires qui permettront de créer un organisme à partir d'un « œuf », il est en permanence nécessaire d'éliminer les cellules superflues ou potentiellement dangereuses. Ce phénomène d'élimination sélective des cellules est réalisé par un processus appelé APOPTOSE (le nom apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne; *apo* pour éloignement et *ptose* pour chute). La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr *et al*, pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique. Entre ces deux représentations historiques et opposées du processus de mort cellulaire, on sait aujourd'hui qu'il existe une multitude d'autres formes, certaines partageant des caractéristiques de l'apoptose d'autres de la nécrose (Kroemer et al. 2009). Selon les altérations morphologiques et l'implication d'enzymes exécutrices de la mise à mort ou caspases, la mort des cellules peut être classée en différents types selon le tableau 1 ci-dessous :

Types de mort cellulaire	Modifications morphologiques			Modifications biochimiques
	Nucléaire	Cytoplasmique	membranaire	
Apoptose	Diminution du volume Condensation de la chromatine Fragmentation de l'ADN (Formation de « barreaux d'échelles »)	Diminution du volume cellulaire Fragmentation, formation de corps apoptotiques	Bourgeonnement membranaire Reconnaissance et dégradation phagocytaire	Modification du $\Delta\Psi_m$ mitochondrial, Dépendante des caspases, exposition des PS à la membrane plasmique externe Activation des membres de la famille Bcl-2
Autophagie	Condensation partielle de l'ADN sans formation de « barreaux d'échelles »	Vacuolisation massive Augmentation du nombre de vésicules autophagiques	Bourgeonnement membranaire Peu ou pas de dégradation phagocytaire	Indépendante des caspases Augmentation de l'activité lysosomale Dissociation de Beclin/Bcl-2 ou Beclin/Bcl-X <sub>L</sub> Conversion de LC3-I en LC3-II Dégradation de p62 <sup>Lck</sup>
Cornification	Perte du noyau	élimination des organites	Modification de la membrane plasmique Accumulation de lipides dans des granules de type F et L Extrusion de lipides dans l'espace extracellulaire	Activation protéases => desquamation Expression de transglutaminases et de leurs substrats Production de kératine
Nécrose	Condensation modérée de la chromatine Fragmentation aléatoire de l'ADN	Augmentation des vacuoles Gonflement et ruptures des organites	Rupture de la membrane plasmique Pas ou peu de dégradation phagocytaire	Absence d'inhibiteurs connus Perte de l'homéostasie ionique Activation de calpaïnes et de cathepsines Baisse d'ATP Surproduction de ROS Phosphorylation et ubiquitinylation de RIP1

**Tableau 1 : Les différents types de mort cellulaire.** (Okada and Mak 2004; Kroemer et al. 2009)

Dans notre travail nous avons évalué la balance survie/mort en étudiant plus particulièrement le processus de mort par apoptose. C'est pourquoi nous nous intéresserons dans la suite du manuscrit uniquement à la mort cellulaire de type apoptose.

## **I.1. Quelques généralités : Définitions et place de l'apoptose dans les processus de mort cellulaire**

A l'époque de la découverte de l'apoptose, la nécrose était la seule forme de mort cellulaire connue et décrite. Il était alors classique de comparer et opposer ces 2 types majeurs de mort (Figure 1).

### **I.1.1. La nécrose**

La nécrose est une mort cellulaire dite "accidentelle" qui survient lors d'un dommage tissulaire et qui implique des groupes de cellules. Pendant longtemps, la nécrose a été considérée comme un processus passif et incontrôlé de mort cellulaire. Toutefois, les preuves s'accumulent pour dire que la nécrose peut être aussi réglementée tout comme l'apoptose (Vanlangenakker et al. 2008). Au cours de ce phénomène, les cellules vont se gorger d'eau au point d'entraîner la lyse de leur membrane plasmique. L'ADN nucléaire va être dégradé de manière aléatoire. Cette véritable explosion cellulaire conduit au relargage dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique et provoque localement une inflammation et l'intervention de l'immunité adaptative, alors qu'aucune réaction inflammatoire n'est associée à l'apoptose. Une explication de cette différence de comportement est que les cellules apoptotiques ne libèrent pas leurs constituants cellulaires dans les tissus environnants et sont rapidement phagocytés par les macrophages et les cellules parenchymateuses, sans la production de cytokines pro-inflammatoires (Savill 2000; Burz et al. 2009).

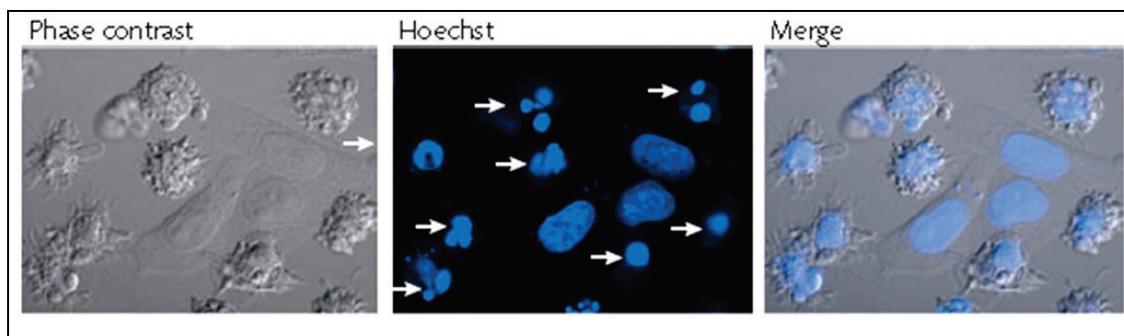
### **I.1.2. L'apoptose**

L'apoptose au contraire est une forme « physiologique » de mort cellulaire, hautement régulée (Kerr 1972; Duvall et al. 1985; Elmore). C'est un mécanisme régulateur essentiel à l'intégrité tissulaire qui intervient dans l'homéostasie cellulaire, et constitue le type de mort cellulaire tout désigné pour l'élimination des cellules excédentaires ou « nuisibles ». Cette mort physiologique douce a un rôle fondamental notamment au cours du développement embryonnaire et foetal, dans l'organisation du système nerveux central, ainsi que dans l'élaboration du système immunitaire (Opferman and Korsmeyer 2003). Sa dérégulation peut mener à de nombreuses pathologies. Pour exemple, les cancers et certaines maladies auto-immunes présentent des défauts d'apoptose. Au contraire une sur-activation de l'apoptose est observée dans d'autres maladies comme certaines maladies neuro-dégénératives ou des désordres immunitaires comme le SIDA (Gougeon 2003; Danial and Korsmeyer 2004; Elmore 2007). Ainsi, un intérêt croissant est constaté dans la compréhension des mécanismes régulant les voies apoptotiques à visée thérapeutique, notamment dans les futurs traitements des cancers comme ceux d'origine hématopoïétique. Ces enjeux expliquent que l'apoptose soit aussi la forme la plus étudiée et décrite parmi les programmes de mort cellulaire.

Au cours de l'apoptose, les cellules mettent en place un mécanisme de « suicide ». Il se traduit par toute une série de perturbations de l'architecture cellulaire, liées à des modifications biochimiques, qui contribuent non seulement à la mort de la cellule mais aussi à préparer son élimination par des cellules spécialisées, les phagocytes. Cette élimination est primordiale car elle permet de ne laisser aucune trace dans le tissu où survient l'apoptose (on parle de « mort discrète »), en particulier elle prévient toute nécrose secondaire qui aurait pour conséquence la libération aléatoire du contenu cellulaire et permet ainsi de limiter l'établissement d'une réaction inflammatoire (Taylor et al. 2008). C'est un processus hautement contrôlé, procédant par différentes phases. Tout d'abord, les cellules en apoptose

vont s'isoler des autres cellules (perte des contacts entre les cellules). De nombreuses modifications morphologiques caractérisent les cellules en apoptose. L'un des points morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire. Ces modifications ont été observées par microscopie optique et électronique (Figure 1), y compris la condensation de la chromatine. Les mitochondries subissent plusieurs modifications majeures : diminution du potentiel membranaire  $\Delta\Psi_m$ , modification de la perméabilité mitochondriale par l'ouverture notamment de pores spécialisés mtPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore) (Marchetti et al. 1996; Zamzami et al. 1996) et le relargage de molécules apoptogènes comme le cytochrome c dans le cytoplasme (Kluck et al. 1997). Le noyau se condense, puis la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 pnb donnant un profil caractéristique dit en "barreaux d'échelle" après électrophorèse de l'ADN (Wyllie et al. 1984). La membrane plasmique bourgeonne et conduit à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines (PS) qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire (Platt et al. 1998). L'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours de ce processus, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire et ainsi prévenir tout dommage infligé aux tissus alentours.

Ainsi, l'apoptose doit être distinguée de la nécrose qui aboutit à l'éclatement de la cellule, suivie d'une réaction inflammatoire locale. La nécrose donne finalement l'image d'un phénomène anarchique et désordonné à caractère explosif, tandis que l'apoptose est un processus actif et bien contrôlé d'implosion cellulaire.



**Figure 1 : Observation par microscopie des modifications morphologiques de cellules en apoptose.** Des noyaux de cellules apoptotiques ont été colorés (bleu) avec du Hoechst. Une superposition (Merge) des cellules observées en contraste de phase et de cette coloration est effectuée pour visualiser les cellules dans leur ensemble. A titre de comparaison, un mélange de cellules viables et apoptotiques est affiché. Les cellules apoptotiques (flèches) présentent un vaste bourgeonnement de la membrane plasmique et contiennent des noyaux qui sont condensés et / ou fragmentés en plusieurs morceaux. (Taylor et al. 2008)

## **I.2 Les gènes de l'apoptose : de *C.elegans* aux mammifères**

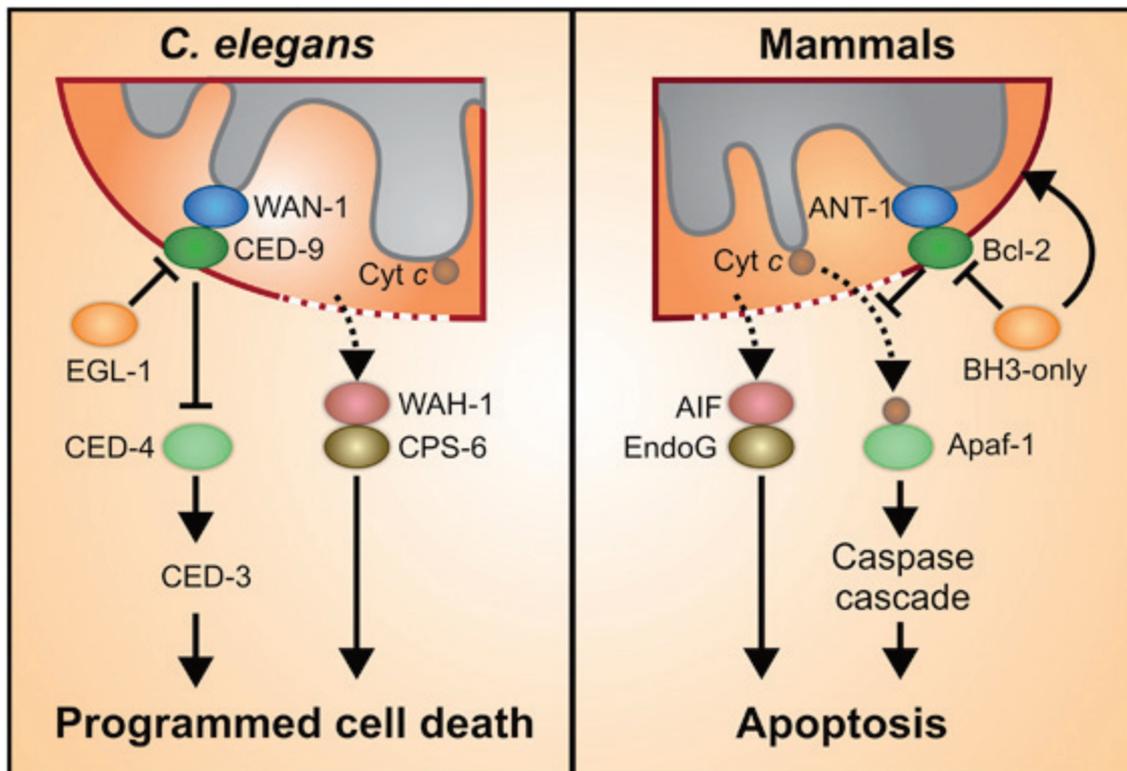
L'apoptose est une réponse hautement conservée des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères (Ameisen et al. 1995). Cette forme de mort cellulaire active, qui nécessite la participation de la cellule pour sa propre mort, est placée sous contrôle génétique. La découverte des familles de gènes et protéines impliqués dans le déroulement de l'apoptose

et de sa régulation provient de travaux menés sur le développement d'un petit ver transparent, le nématode : *Caenorhabditis elegans* ou *C.elegans* (Hengartner and Horvitz 1994).

Au cours du développement de ce ver qui ne dure que 3 jours et est composé de 1090 cellules, 131 cellules meurent au cours d'un processus qui se produit étonnamment dans tous les embryons à peu près au même endroit et en même temps. La sélection par mutagenèse chimique de larves présentant des défauts d'élimination des cellules au cours du développement a permis l'identification de 4 gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée chez *C. elegans*. Parmi eux, trois furent identifiés comme des régulateurs clés de l'apoptose dans toutes les cellules somatiques, il s'agit de *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* (*ced* pour *C*ænorhabditis *e*legans *d*eath). *Ced-3* et *ced-4* sont tous deux requis pour la mort cellulaire. *Ced-9*, pour sa part, a une fonction antagoniste de *ced-3* et *ced-4* ; il est capable de promouvoir la survie. Finalement, un quatrième gène *egl-1* (*egg-laying defective*) a été mis en évidence, il agit en amont des gènes *ced-9*, *ced-4* et *ced-3* et régule négativement l'activité de *ced-9*. La mort cellulaire est déclenchée quand la protéine EGL-1 se lie à CED-9 et l'inactive, libérant ainsi CED-4 qui peut alors s'oligomériser avec CED-3 et provoquer son auto activation (Figure 2) (Metzstein et al. 1998).

Suite au clonage de ces différents gènes, des homologues ont été identifiés chez les mammifères (Couzinet *et al*, 2002). Ainsi (Figure 2):

- *ced-3* code pour une protéase à cystéine homologue à l'enzyme de conversion de l'IL-1 $\alpha$  (ICE). Rebaptisée plus tard « caspase 1 » elle a conduit à la description de toute une série de membres de la même sous-famille de cystéine protéases appelées caspases (Yuan et al. 1993).
- *ced-4* code pour une protéine ayant des homologies avec la protéine humaine Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) qui est un régulateur apoptotique des phases post-mitochondriales (Zou et al. 1997).
- *ced-9* code pour une protéine homologue à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 préalablement identifiée chez l'Homme (White 1996), prototype d'une famille de protéines du même nom régulatrices de la mort cellulaire.
- *Egl-1* code pour une protéine homologue des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 à domaine BH3 comme Bax, Bak ou Bad (Conradt and Horvitz 1998).



**Figure 2: Protéines impliquées dans l'apoptose chez C.elegans et les mammifères.** Les principaux processus et acteurs qui conduisent à la mort cellulaire programmée chez C.elegans et à l'apoptose dans les cellules de mammifères affichent un niveau élevé de conservation à travers l'évolution. Toutefois, certaines différences importantes existent, telles que la libération du cytochrome c (Cyt c) de l'espace intermembranaire mitochondrial, un événement qui semble se produire uniquement dans les cellules de mammifères. AIF, induisant l'apoptose des facteurs; ANT-1, translocase adénine 1; Apaf-1, peptidase apoptotiques facteur d'activation 1; BH3, domaine d'homologie Bcl-2 3; ENDOG, endonucléase G (Zhivotovsky et al. 2009)

Les cellules de mammifères expriment plusieurs membres de chacune de ces quatre familles de protéines et ont donc élaboré des réseaux complexes de signalisation conduisant à la mort cellulaire.

### I.3 Les différentes étapes de l'apoptose

La réponse apoptotique des cellules est une suite chronologique d'événements morphologiques et biochimiques qui peut être divisée selon trois étapes : la phase d'induction réversible, la phase d'exécution régulable, la phase de destruction et d'élimination irréversible.

#### **I.3.1 La phase d'induction**

La survie des cellules dépend de leur capacité à trouver dans leur environnement proche des signaux qui leur permettent de réprimer, jour après jour, le déclenchement de leur suicide. Ces signaux seront intégrés par la cellule qui en fonction de son génotype et de son état physiologique, orientera sa réponse soit vers la mort, soit vers la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire. Leur nature peut être très variable aussi bien physiologique

que pathologique, intra- qu'extracellulaire, comme par exemple des facteurs de croissance, des hormones, ou des facteurs mitochondriaux.

### **I.3.2 La phase effectrice ou d'exécution de l'apoptose**

Cette phase d'exécution ou phase effectrice implique une cascade d'événements moléculaires se caractérisant par l'activation d'une cascade enzymatique de protéines « carrefour », les caspases (cysteinyl aspartate-specific proteinase), hautement régulée. L'activation des caspases est commune à toutes les voies possibles de transduction du signal inducteur. Les changements morphologiques de l'apoptose sont dus à l'action de ces molécules hautement conservées, dont nous reparlerons dans le chapitre 1.4. Il s'agit d'une phase régulable correspondant à l'intégration du signal apoptotique et des signaux inhibiteurs d'apoptose, présents au sein de la cellule ou dans son milieu environnant. Parmi les molécules qui contrôlent cette phase, on retrouve les molécules de la famille Bcl-2, qui seront présentées ultérieurement.

### **I.3.2 La phase de destruction et d'élimination**

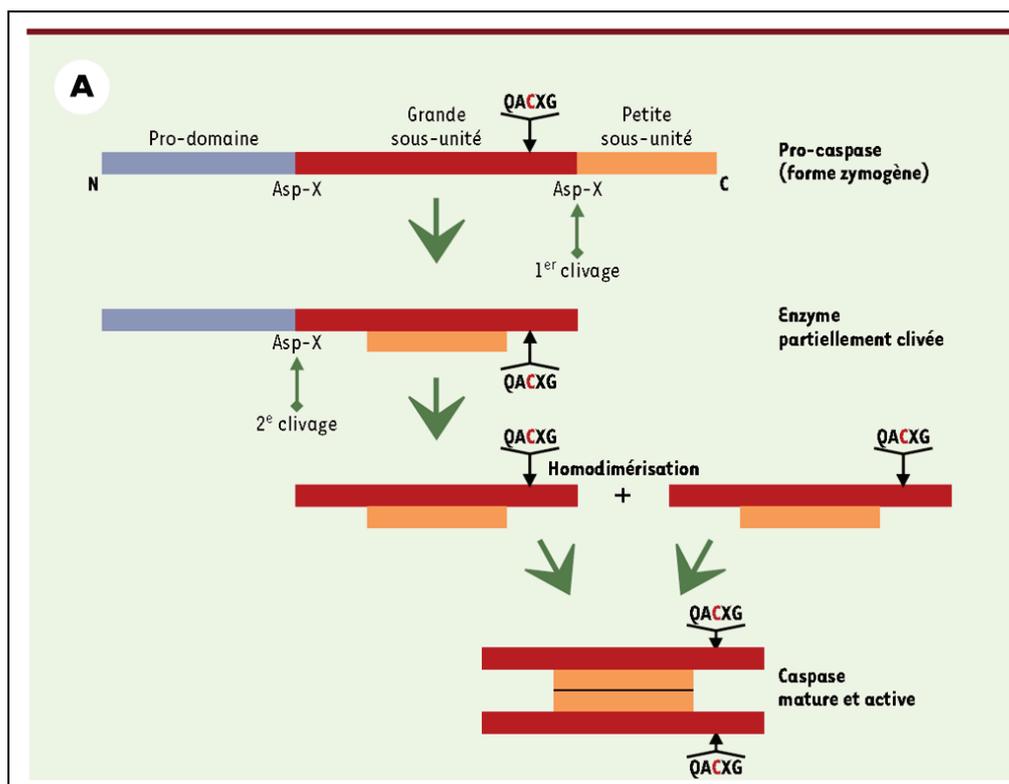
Pendant le processus de mort cellulaire, les cellules apoptotiques acquièrent de nouvelles molécules à la surface cellulaire permettant une reconnaissance spécifique des phagocytes, afin de limiter la réaction inflammatoire. Ces phagocytes sont attirés grâce à des molécules chimiotactiques libérées par les cellules apoptotiques. Ces molécules de surface sont remarquablement conservées au cours de l'évolution des métazoaires, leur reconnaissance ne montre aucune restriction spécifique à l'espèce. Ainsi, lors du processus d'apoptose, on observe une translocation, de la face interne à la face externe de la membrane plasmique des phosphatidylsérines. Les phagocytes les reconnaissent grâce à une molécule de surface, CD36, et répondent aux cellules apoptotiques notamment avec une répression très précoce de la transcription d'un nombre varié de gènes spécifiques, dont ceux codant pour des cytokines inflammatoires (Burz et al. 2009).

## **I. 4 Les caspases : acteurs principaux de la phase d'exécution**

L'apoptose est irréversiblement déclenchée par l'activation de protéases intracellulaires : les caspases. Elles sont largement exprimées dans la plupart des cellules sous une forme inactive. Elles activent d'autres procaspases à leur tour, amplifiant ainsi les voies de signalisation de l'apoptose et conduisant à la mort cellulaire (Lamkanfi et al. 2007). Elles possèdent un domaine catalytique comprenant un résidu cystéine localisé dans un motif conservé QACXG et reconnaissent, puis clivent, des chaînes polypeptidiques au niveau d'un résidu aspartique de la partie carboxy-terminale (Budihardjo et al. 1999). Cette spécificité de clivage n'est partagée qu'avec une seule autre protéase, le granzyme B (une sérine protéase présente dans les lymphocytes T cytotoxiques). La nomenclature proposée par Alnemri en 1996 a regroupé les protéases apoptogènes sous le nom de CASPASE. Le C représente la cystéine du centre actif (QACxG) et aspase définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique. L'ICE, qui fut chronologiquement la première caspase caractérisée, a donc été tout naturellement rebaptisée caspase-1. À ce jour, 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères mais il ne fait aucun doute que cette liste n'est pas exhaustive (Kumar 2007).

- **Leur structure**

Les caspases existent normalement dans le cytoplasme de la cellule sous forme de précurseurs inactifs appelés zymogènes ou procaspases. Elles ont toutes une structure très conservée comprenant, un pro-domaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (17-21 kDa, qui porte le site catalytique) et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité (10-14 kDa). L'enzyme active ainsi formée est composée de deux hétérodimères composés chacun de l'association des deux sous-unités. Certains membres de la famille des caspases possèdent un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité (Figure 3).



**Figure 3 : Activation des caspases.**

*Dans leur forme inactive, les caspases sont constituées d'un prodomaine, d'une grande sous-unité (portant le site catalytique) et d'une petite sous-unité. Leur clivage s'effectue en deux étapes successives, libérant d'abord la petite sous-unité puis la grande ce qui conduit à la formation de la forme active de l'enzyme : deux hétérodimères composés chacun de l'association des deux sous-unités, et comprenant donc deux sites catalytiques. (Couzinet et al, 2002).*

Toutes les caspases possèdent, en position N-terminale, un pro-domaine dont la taille, variable, est à l'origine d'un mode d'activation particulier qui a permis une classification supplémentaire de ces enzymes (Alnemri et al. 1996; Chowdhury et al. 2008).

Elles sont subdivisées en fonction de leur activité :

- En caspases « pro-inflammatoires » ou caspases de Groupe I (caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 et 14). Ces caspases, à long pro-domaine, jouent un rôle dans la maturation cytokinique et les réponses inflammatoires.
- En caspases pro-apoptotiques. Ces dernières sont regroupées en caspases initiatrices (2, 8, 9, 10) et caspases effectrices (3, 6, 7) :

- Les caspases de Groupe II ou caspases initiatrices à long pro-domaine (>90 aa) contiennent des motifs d'interaction protéine-protéine, tels que les domaines effecteurs de mort DED (*death effector domain*) pour les caspases 8 et 10, ou un Domaine de Recrutement des Caspases CARD (*caspase recruitment domain*) pour les caspases 2 et 9. Ces domaines permettent le recrutement des caspases au niveau de complexes protéiques de signalisation déterminant leur auto-activation. Ce recrutement met en jeu toute une variété de molécules adaptatrices intracellulaires (FADD/ TRADD ou Apaf-1) présentant des motifs identiques (DED ou CARD).
- Les caspases de Groupe III ou caspases effectrices (caspases 3, 6, et 7) possèdent quant à elles, un pro-domaine plus court (10 à 40 résidus). Ce domaine ne leur permet pas d'être recrutées et de s'oligomériser. Elles sont activées à la suite de leur clivage par une autre caspase (à pro-domaine court ou long) ou par la granzyme B, aboutissant à un fonctionnement dit en cascade. Leur activation conduit au clivage de diverses protéines à l'origine de la plupart des événements biochimiques, structuraux ou morphologiques de l'apoptose qui seront détaillés ultérieurement.

- **Leur activation**

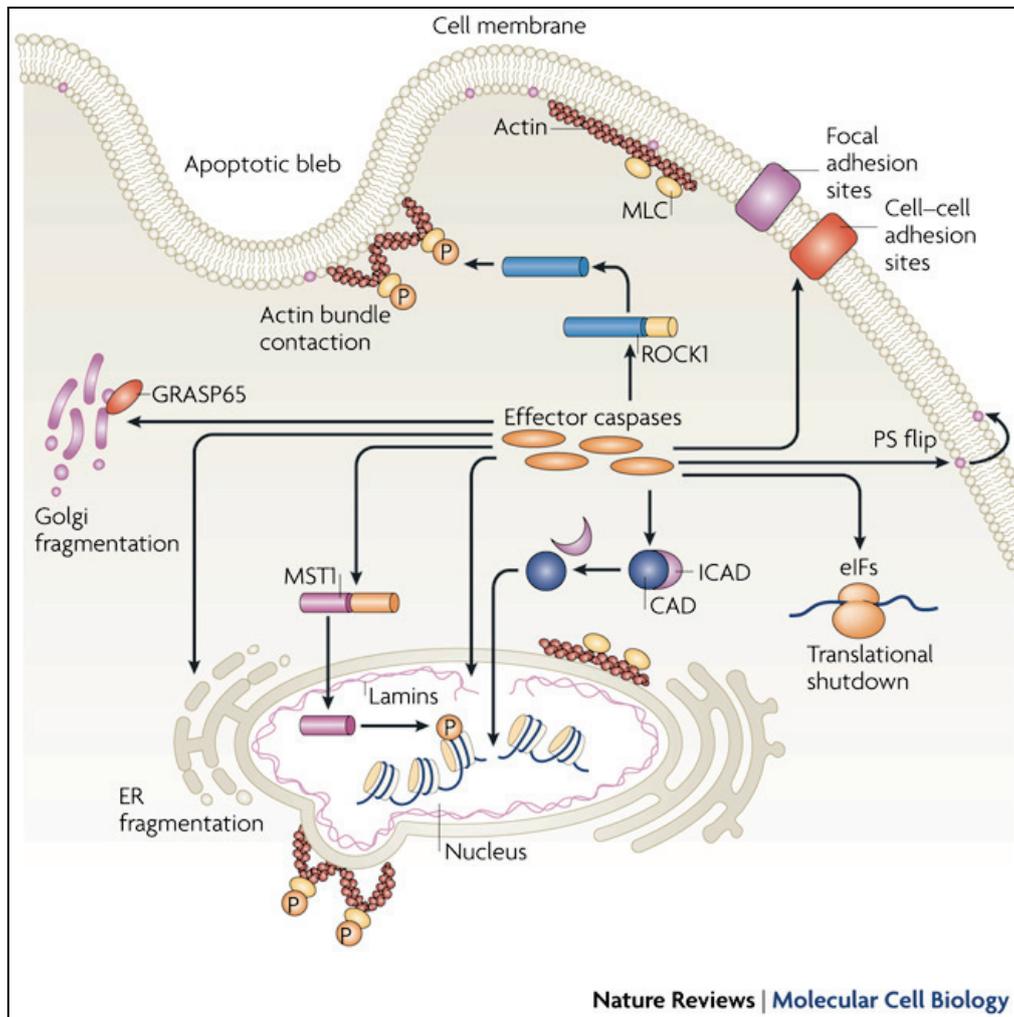
La conversion de la caspase à l'état de zymogène en une enzyme mature nécessite au moins deux clivages au niveau de liaison Asp-X. Ces clivages successifs ont lieu de manière séquentielle. Tout d'abord, une coupure entre la grande et la petite sous-unité se produit (donc il y a libération de la petite sous-unité du reste de la molécule). Cette coupure est suivie par la libération du prodomaine (Figure 3). La caspase va alors pouvoir s'assembler sous sa forme active, composée de deux grandes et de deux petites sous-unités (Couzinet *et al.*, 2002). La structure générale ainsi obtenue est [p20<sub>2</sub>-p10<sub>2</sub>] (Wilson *et al.* 1994; Rotonda *et al.* 1996). Les caspases vont pouvoir s'auto-activer et/ou être activées par d'autres caspases. Cette remarque introduit la notion de cascade d'activation. Ainsi une fois les caspases initiatrices activées, elles vont pouvoir cliver d'autres caspases encore à l'état de zymogène (notamment les caspases effectrices). Ce type d'activation en cascade permet probablement la régulation et l'amplification du signal.

Les caspases effectrices (3, 6 et 7 chez les mammifères) orchestrent le démantèlement des structures cellulaires (Figure 4). Collectivement, ces événements protéolytiques entraînent des changements phénotypiques à la cellule qui sont caractéristiques de l'apoptose. Plus de 200 substrats des caspases ont été identifiés et on peut les regrouper en 5 catégories principales en référence à leur fonction cellulaire (Earnshaw *et al.* 1999; Jin and El-Deiry 2005; Taylor *et al.* 2008) avec :

- Des protéines cytoplasmiques structurales ou impliquées dans les jonctions/adhérences cellulaires (actine, gelsoline, keratine 18,  $\beta$ -catenin ...), des protéines nucléaires (lamine A et B, NuMa...) expliquant certaines modifications morphologiques observées au cours du processus apoptotique. En effet suite à ces clivages, l'architecture cellulaire est altérée, les cellules perdent le contact avec la matrice extracellulaire et se détachent les unes des autres, le noyau se condense... Il est à noter que le processus de translocation des phosphatidylsérines est aussi caspases dépendant.
- Des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN cellulaire (ICAD, PARP, ARN polymérase I, ADN topoisomérases...) expliquant notamment

l'activation d'endonucléases CAD clivant la chromatine au niveau des sites internucléosomiques et donc la fragmentation de l'ADN en « échelle ». Des protéines kinases (PKC et ses isoformes; MAPK, ERK, Akt, Wee1)

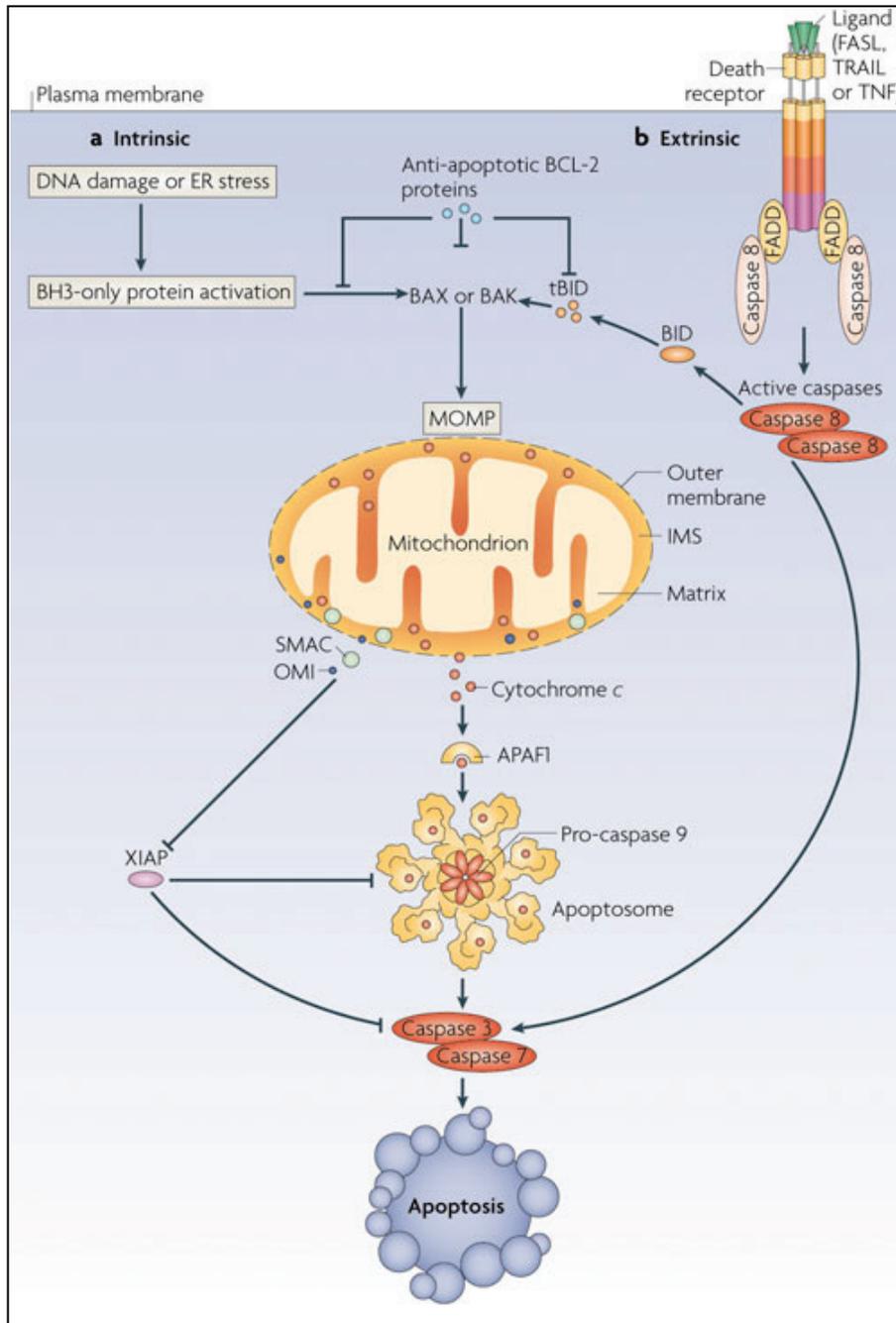
- Des protéines impliquées dans la prolifération et le cycle cellulaires, et plus particulièrement p27<sup>Kip1</sup>, pRB, p21<sup>CIP1</sup> ...
- Des protéines actrices ou régulatrices de l'apoptose (caspases effectrices, Bid, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, IAPs, FLIP<sub>L</sub>...)



**Figure 4 :** La « démolition » cellulaire orchestrée par les caspases. Les caspases effectrices ciblent un grand nombre de protéines qui subissent des événements protéolytiques qui conduiront au démantèlement de la cellule. (Taylor et al. 2008)

### **I. 5 Les voies d'activation de l'apoptose**

Différentes voies sont impliquées au cours de l'apoptose, la voie extrinsèque, la voie intrinsèque mitochondriale, la voie du réticulum endoplasmique, toutes sous la dépendance de caspases. Au cours de notre thèse, nos travaux ont concerné principalement la régulation de la voie intrinsèque mitochondriale, qui fera donc l'objet d'un développement plus spécifique (Figure 5).



**Figure 5 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.** a/ Des stimuli apoptotiques intracellulaires, comme des lésions de l'ADN ou un stress du réticulum endoplasmique (ER), activent des protéines de la famille Bcl2 « BH3-only » (Bax ou Bak) qui induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP). Celle-ci entraîne le relargage de diverses protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial (IMS). Cette perméabilisation peut être inhibée par des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl2. La formation de l'apoptosome, oligomérisation de cytochrome c, APAF1 et de procaspase 9, promeut l'activation des caspases et l'apoptose. b/ La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par la reconnaissance des récepteurs de mort par leurs ligands. Cette reconnaissance permet le recrutement de la protéine adaptatrice FADD puis de la caspase 8, entraînant sa dimérisation et son activation. Ainsi, le clivage et l'activation des caspases 3 et 7 peuvent en découler directement et conduire à l'apoptose. Une connexion entre ces deux voies existe à travers le clivage et l'activation de BID (Tait et Green 2010).

### **I.5.1 La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort (Figure 5)**

La voie extrinsèque est initiée par la stimulation de récepteurs transmembranaires par la liaison de ligands spécifiques qu'ils soient solubles ou présentés par d'autres cellules. Les récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs du TNF (TNF, Tumor necrosis factor), composée de nombreux membres. Ces membres ont un domaine extracellulaire riche en cystéines permettant de reconnaître spécifiquement leurs ligands et sont caractérisés par la présence d'un domaine de mort (DD), dans leur région cytoplasmique. Ce DD d'environ 80 acides aminés joue un rôle essentiel dans la transmission du signal de mort, de la surface cellulaire aux voies intracellulaires (Lavrik et al. 2005).

Les récepteurs de mort sont distribués, chez l'homme, de façon ubiquitaire à la surface des cellules de la plupart des tissus sains et tumoraux, et notamment au niveau du système immunitaire, où ils jouent un rôle important au cours de la différenciation et l'homéostasie lymphocytaire T et B (Janssen et al. 2003; Bouillet and O'Reilly 2009; Guicciardi and Gores 2009).

Actuellement, six récepteurs de mort sont connus, TNF-R1 (DR1, p55, CD120a), Fas (DR2 / CD95 / APO-1), DR3 (APO-3), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5/APO-2) et DR6 (Guicciardi and Gores 2009). La voie extrinsèque est initiée par la fixation sur les récepteurs de mort transmembranaires de leurs ligands spécifiques, cytokines appartenant à la super-famille du TNF (TNF $\alpha$  pour TNF-R1, FasL pour Fas, APO3L/DR3 APO2L pour DR4 et DR5 ...). Cette liaison induit une oligomérisation du récepteur, la forme active étant un trimère. Une fois activés, et suite à des changements conformationnels, les domaines intracellulaires de ces récepteurs (DD) recrutent des protéines adaptatrices comme FADD (Fas-associated death domain) ou TRADD (TNFR-associated death domain) qui recrutent à leur tour la procaspase-8/10, formant un complexe de signalisation de mort ou DISC (Death –inducing signaling complex). Ensuite, la procaspase-8 est activée par protéolyse et sert de caspase «initiatrice», activant en aval des protéines effectrices telles que les caspases 3 et 7 qui engagent la dégradation des cellules, provoquant ainsi une mort inévitable (Peter and Krammer 2003).

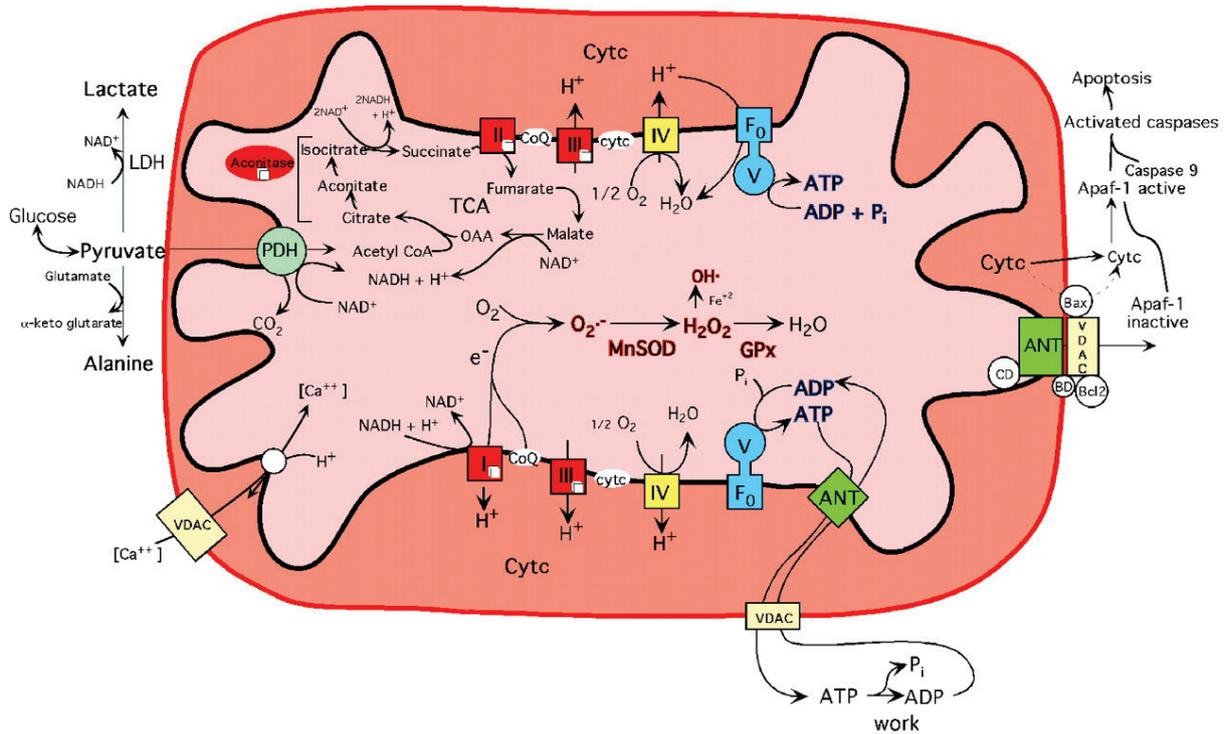
Deux variants dans la signalisation intracellulaire induite par le DISC ont été définis pour la voie extrinsèque apoptotique et sont caractérisés par la formation de hauts (type I) ou faibles (type II) niveaux d'activation de la caspase 8. Dans le type I, des quantités suffisantes de DISC sont formées et aboutissent à la stabilisation de hauts niveaux d'activation de la caspase 8 qui est alors suffisante pour activer les caspases effectrices (comme la caspase 3) et induire la mort par apoptose. Dans ce type, la sur-expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> n'empêche pas le processus apoptotique de se réaliser. En revanche, dans les cellules de type II, la formation des complexes DISC est différée et moins efficace et une amplification du processus par la voie intrinsèque mitochondriale est nécessaire. En effet, la sur-expression de Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub> bloque l'apoptose dans ce cas (Guicciardi and Gores 2009).

Ainsi, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque mitochondriale sont étroitement interconnectées. La caspase 8 activée clive la protéine pro-apoptotique Bid (BH3-interacting domain death agonist) en une forme tronquée active appelée tBID, qui peut se lier aux protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. Il en résulte une perméabilisation des membranes mitochondriales et la libération des protéines mitochondriales, comme le cytochrome c et DIABLO (Ozoren and El-Deiry 2002).

Finalement, des données plus récentes montrent que ces « récepteurs de mort » possèdent aussi des fonctions biologiques non cytotoxiques et peuvent même activer de façon contradictoire des voies de survie menant à la prolifération cellulaire. Ces signalisations sont activées secondairement aux signalisations de mort pour les récepteurs Fas et TRAIL, et majoritairement pour les récepteurs au TNF engagés plus dans les processus inflammatoires que ceux de la mort cellulaire. De façon générale, ces signalisations de survie/prolifération impliquent le recrutement de protéines adaptatrices différentes telles que RIP1 (Receptor-interacting protein 1), TRADD ou TRAF1/2 (TNFR -associated factor) et aboutissent finalement à l'activation de voies comme NF- $\kappa$ B ou des MAPK (JNK, Erk...) (Guicciardi and Gores 2009).

### **I.5.2 La voie intrinsèque mitochondriale**

La voie intrinsèque implique les mitochondries. Les mitochondries sont effectivement une source de génération d'ATP pour la cellule mais également un élément régulateur de l'apoptose. Cette voie mitochondriale de l'apoptose est généralement activée par la perte de signaux dus à des facteurs de croissance ou en réponse à des stimuli létaux internes, tels que les dommages de l'ADN, un stress oxydatif, l'hypoxie, ou les médicaments chimiothérapeutiques. Les mitochondries, organites très spécialisés, ont une membrane externe, séparée par un espace inter-membranaire d'une membrane interne elle-même limitant la matrice mitochondriale. La membrane interne contient les complexes moléculaires de la chaîne de transport des électrons, qui génère le gradient en ions  $H^+$  nécessaire à la production d'ATP. L'ATP produit dans la matrice est ensuite échangé avec de l'ADP provenant du cytosol *via* le translocateur de nucléotide à adénine (ANT) inséré dans la membrane interne mitochondriale et le canal ionique voltage dépendant VDAC (voltage dependent anion channel) ou porine présent sur la membrane externe de la mitochondrie (MME) (figure 6). Pour maintenir ce gradient et donc le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), la perméabilité des membranes externe et interne est hautement régulée. Nous verrons que les molécules de la famille Bcl-2 interviennent dans la régulation de la perméabilité de la membrane externe (Harris and Thompson 2000).



**Figure 6 : Dualité fonctionnelle de la mitochondrie, productrice d'ATP et régulatrice de l'apoptose.** Ce schéma illustre les relations entre la phosphorylation oxydative mitochondriale et la production d'énergie (ATP), la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et l'initiation de l'apoptose. Les complexes enzymatiques impliqués dans la phosphorylation oxydative respiratoire sont le complexe I [NADH: ubiquinone oxydoréductase], (désignés par un cube); le complexe II [succinate: ubiquinone oxydoréductase]; le complexe III [ubiquinol: cytochrome c oxydoréductase]; le complexe IV [cytochrome c oxydase] et le complexe V [H-translocation ATP synthase]. Les petites molécules diffusent à travers la membrane externe via le canal anion voltage-dépendant (VDAC) ou porine. VDAC, ANT, Bax et la cyclophiline D (CD) se réunissent à la membrane mitochondriale pour créer le pore de transition mitochondrial (mtPTP). Bax est pro-apoptotique et interagit avec la protéine Bcl2 anti-apoptotique et le récepteur des benzodiazépines (BD). L'ouverture de la mtPTP est associée à la libération de l'AIF et de cyt c, et l'activation par le cyt c de Apaf-1 et de la pro-caspase-9. La caspase-9 initie alors la dégradation protéolytique de protéines cellulaires, entraînant la mort cellulaire. (Wallace 1999)

### I.5.2.1 Les altérations mitochondriales

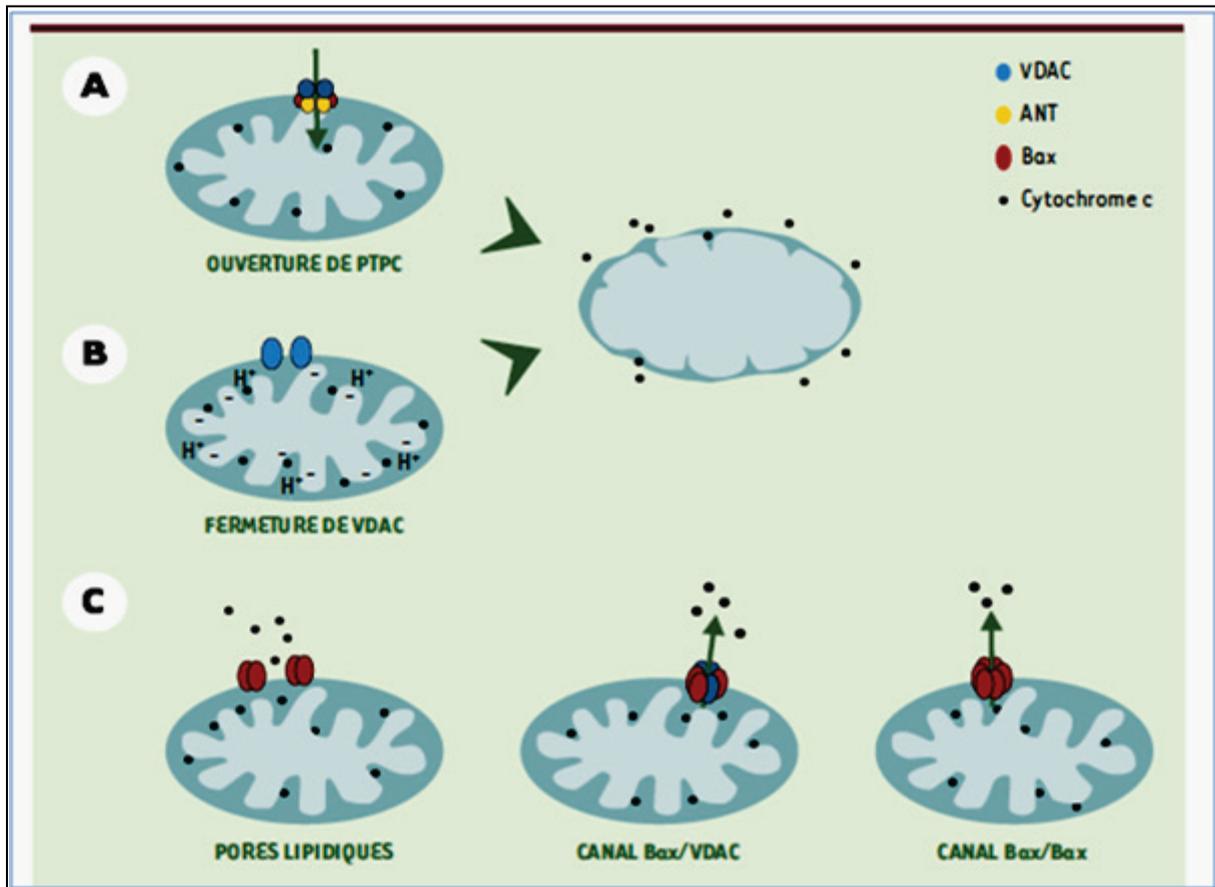
Les altérations de la perméabilité mitochondriale sont un événement central de la voie intrinsèque de l'apoptose. Notamment la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale précipite la mort cellulaire soit en libérant des molécules impliquées dans l'apoptose, soit par la perte de fonctions mitochondriales essentielles à la survie des cellules (Green and Kroemer 2004; Jin and El-Deiry 2005)

L'espace intermembranaire et la membrane interne de la mitochondrie contiennent de nombreuses protéines impliquées dans l'induction de la mort de la cellule, telles que le cytochrome c, l'AIF (Apoptosis-inducing factor), l'Omi/HtrA2, l'EndoG et Smac / DIABLO. En fait, ce rôle apoptotique n'est pas leur fonction biologique principale car la plupart de ces protéines présentent une double fonction favorisant la survie, par leurs effets sur la physiologie (oxydo-réductions) et l'homéostasie mitochondriales, et inductrices de mort lorsqu'elles sont anormalement déversées dans le cytosol en réponse à un signal de mort. L'exemple le plus étudié, en dehors du cytochrome c, est sans doute l'AIF, molécule caractérisée initialement comme pro-apoptotique mais dont la présence est nécessaire à la

survie des cellules (Garrido and Kroemer 2004). Ainsi, les stimuli qui aboutissent à des modifications de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale déterminent la plupart du temps des modifications de la membrane mitochondriale interne produisant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, PTP (« permeability transition pore ») accompagné par la perte du potentiel mitochondrial transmembranaire  $\Delta\Psi_m$  et la libération dans le cytosol des protéines apoptogènes séquestrées dans l'espace intermembranaire.

En fait, la sortie des molécules pro-apoptotiques hors de la mitochondrie a été clairement associée à la liaison directe de molécules pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax et Bak, à des composantes spécifiques de la membrane externe mitochondriale (Marzo et al. 1998; Pastorino et al. 1999; Chipuk and Green 2008). Cependant, les mécanismes précis de cette perméabilisation membranaire restent encore très controversés. Ainsi, si les molécules de la famille Bcl-2 sont souvent présentées comme des modulateurs de l'activité du PTP, certaines comme Bax, ou Bak sont aussi capables de former des pores multimériques sur la membrane externe mitochondriale par dimérisation ou oligomérisation (Harris and Thompson 2000; Antignani and Youle 2006). Plusieurs modèles sont proposés et pourraient coexister (Figure 7):

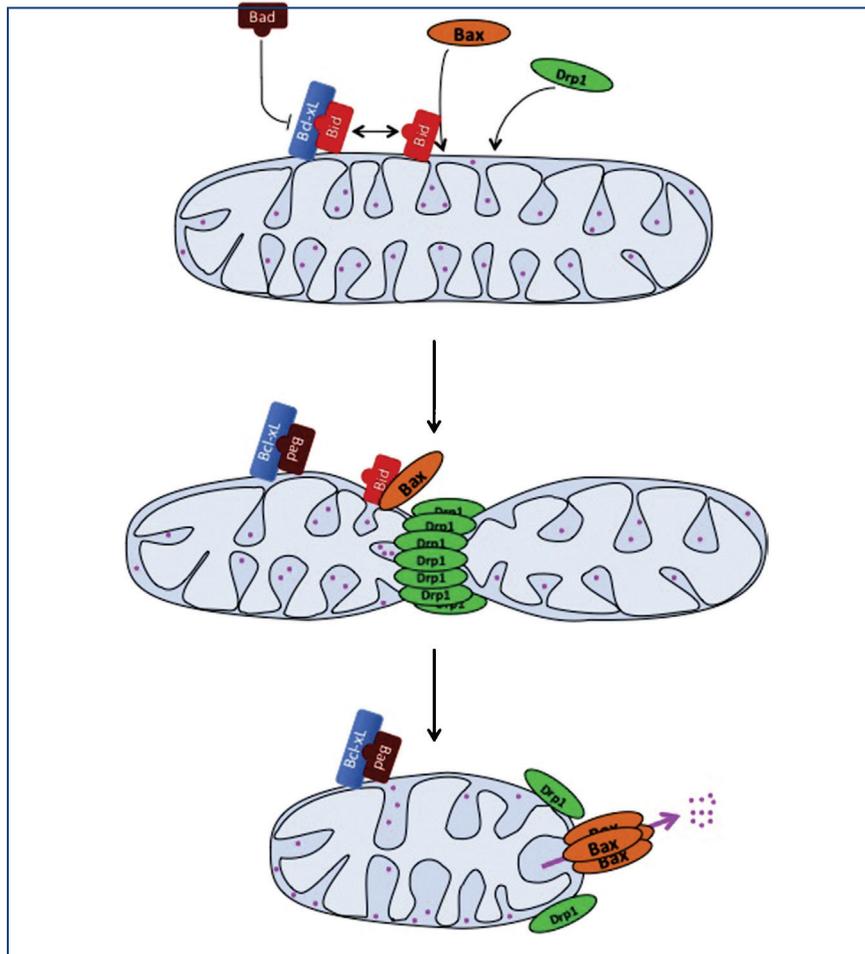
- Ainsi, l'ouverture du mégapore mitochondrial PTP (permeability transition pore), complexe multiprotéique composé dans sa configuration minimale du VDAC (MME) l'ANT et de la cyclophiline D (Cyp-D, matrice) pourrait être due à son association avec des protéines proapoptotiques telles que Bax. Celles-ci favoriseraient son ouverture, provoquant ainsi un gonflement de la matrice mitochondriale, entraînant une rupture mécanique de la membrane externe mitochondriale.
- Un deuxième modèle suppose un dysfonctionnement de l'échange ATP/ADP mitochondrial lié à la fermeture de VDAC, provoquant une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, responsable à la fois du gonflement de la matrice et d'une production de radicaux oxygénés. Ce processus conduit aussi à la rupture de la membrane externe mitochondriale. Ce modèle ne permet cependant pas d'expliquer comment une libération des protéines apoptotiques pourrait précéder la chute du  $\Delta\Psi_m$  (Zamzami and Kroemer 2001).
- Un troisième modèle suggère la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale externe permettant la libération de protéines dans le cytosol sans altération physique de la mitochondrie. La formation de ces pores pourrait impliquer la molécule Bax par oligomérisation ou en s'associant au VDAC, ou bien encore par la formation d'homo ou d'hétérodimères avec un autre membre de la famille Bcl-2. Elle pourrait aussi être réalisée par des lipides associés ou non à des protéines (Korsmeyer et al. 2000; Desagher and Martinou 2000). Finalement la protéine t-Bid peut aussi s'oligomériser dans la MME et induire l'apoptose *via* une fuite de cytochrome c (Grinberg et al. 2002).



**Figure 7: Modèles de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.** A/ L'ouverture du mégapore mitochondrial PTP, composé de VDAC, ANT et de protéines pro-apoptotiques comme Bax, pourrait entraîner le gonflement de la matrice mitochondriale externe conduisant à la rupture mécanique de la membrane. B/Le gonflement et la rupture de la membrane mitochondriale pourraient être dus à un dysfonctionnement de l'échange ATP/ADP, découlant de la fermeture du VDAC et d'une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire mitochondrial. C/ La formation du pore mitochondrial et la libération de protéines dans le cytosol pourraient impliquer des lipides associés ou non à des protéines, ou une oligomérisation de Bax avec VDAC ou avec d'autres protéines de la famille Bcl2.

(Couzinet et al, 2002)

Récemment, il a été proposé que la fragmentation mitochondriale, qui se produit précocément et massivement au cours du processus apoptotique, pourrait contribuer aux mécanismes de perméabilisation de la MME. Un lien a été effectivement mis en évidence entre la molécule Drp1 (dynamamin-related protein 1), protéine impliquée dans la machinerie de la fission mitochondriale, et l'apoptose, et plus précisément le relargage du cytochrome c (Frank et al. 2001; Estaquier and Arnoult 2007). Au cours de l'apoptose, Drp-1 est recrutée au niveau des mitochondries et forme un anneau de constriction autour de l'organite, en même temps que Bax est transloquée et activée à la membrane externe mitochondriale (figure 8). Des travaux récents indiquent que le recrutement de Drp-1 est dépendant de la présence de Bax/Bak (Arnoult et al. 2005). Dans ce modèle, la fragmentation mitochondriale contribuerait à la perméabilisation de la MME de façon complémentaire à celle induite par l'oligomérisation de Bax/Bak, par l'ouverture des jonctions intercrêtes mitochondriales aboutissant au relargage complet du cytochrome c (Jourdain and Martinou 2009)



**Figure 8: fragmentation de la mitochondrie et oligomérisation de Bax/Bak**

Au cours de l'apoptose, Drp-1 est recrutée par les mitochondries et forme un anneau de constriction autour de l'organite. Dans le même temps, tBID s'insère dans la MME et permet le recrutement de Bax. Les protéines anti-apoptotiques (par exemple, Bcl-X<sub>L</sub>) sont inhibées par les protéines BH3-only (par exemple Bad). Dans la MME, Bax s'oligomérisent et permeabilisent la membrane par un mécanisme qui n'est pas encore clair. Cela se traduit par l'efflux du cytochrome c (points violets) et de nombreuses autres protéines (Jourdain and Martinou 2009)

Après sa libération dans le cytoplasme, le cytochrome c stimule la formation de l'apoptosome, un complexe comprenant une protéine activatrice de caspases, le facteur Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), le cytochrome c et la pro-caspase 9. Le cytochrome c se lie à l'Apaf-1 et induit son oligomérisation ce qui permet le recrutement de la pro-caspase 9 suivi de son activation (Li et al. 1997b; Zou et al. 1999; Hill et al. 2004). L'apoptosome recrute alors à son tour la pro-caspase 3 qui, suite à son clivage par la caspase 9 active, va déclencher l'apoptose par une cascade d'activation de caspases effectrices qui clivent des substrats critiques pour la survie de la cellule (Zimmermann and Green 2001).

Parmi les molécules mitochondriales libérées, celles-ci peuvent être subdivisées en 2 groupes. La plupart, comme le cytochrome c, agissent de façon dépendante de l'activation des caspases, avec Smac/Diablo et Omi/HtrA2. Ainsi, ces molécules peuvent interagir avec les inhibiteurs des caspases (IAP), de façon similaire aux caspases, fonctionnant comme des inhibiteurs compétitifs (Creagh et al. 2004). D'autres induisent l'apoptose indépendamment des caspases, comme l'AIF et l'endonucléase Endo-G. Au cours de l'apoptose, AIF et Endo-G sont libérées puis redirigées vers le noyau où ils participent à la condensation de la chromatine et à la fragmentation de l'ADN (Susin et al. 2000; Joza et al. 2001; Li et al. 2001; Jin and El-

Deiry 2005). De plus, l'AIF entraîne également une chute du potentiel membranaire mitochondrial provoquant une libération de molécules apoptogènes comme le cytochrome c, une activation de la caspase-9 et le « flip-flop » membranaire des phosphatidylsérines.

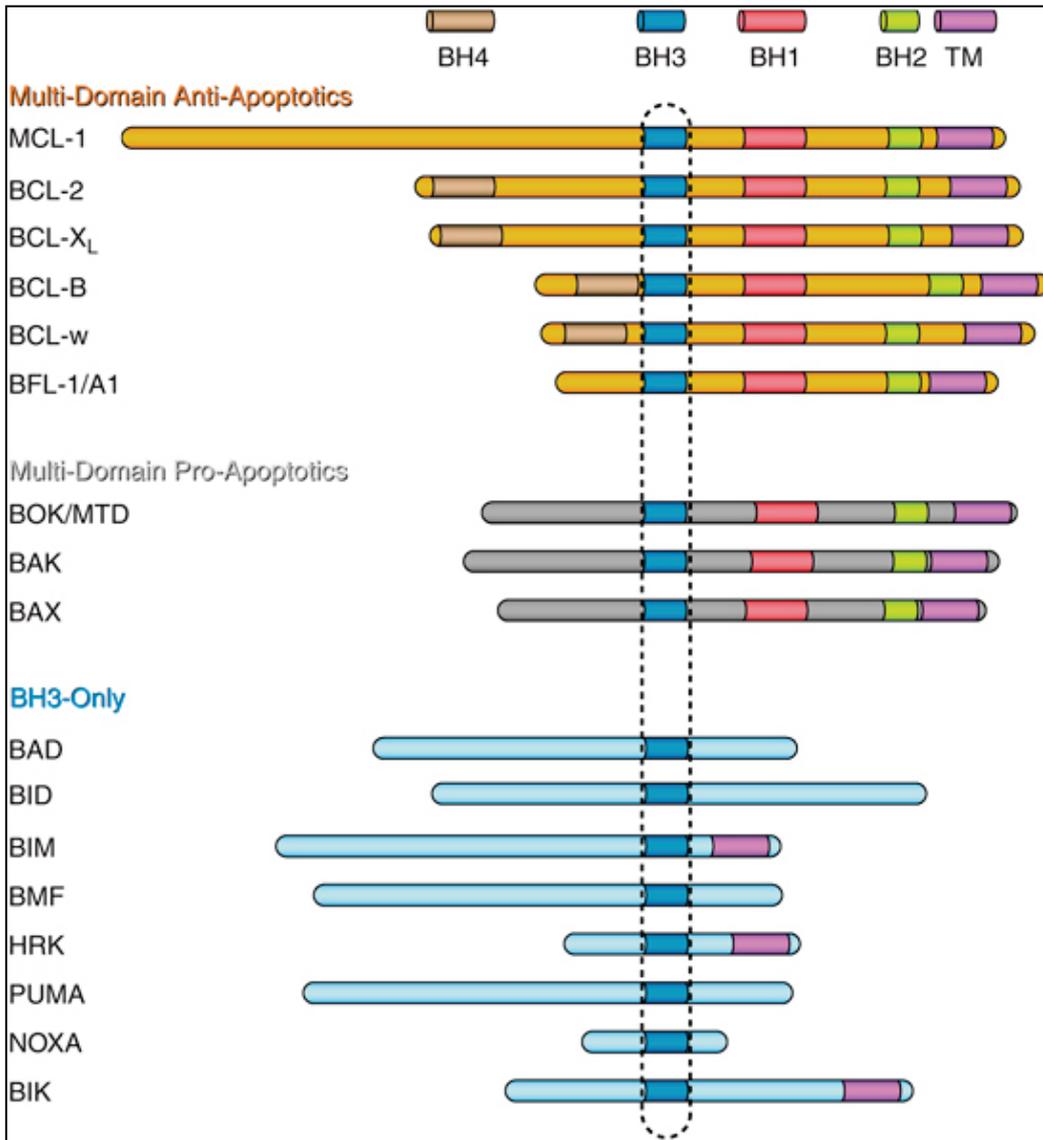
### **I.5.2.2 La famille Bcl-2**

La voie intrinsèque est contrôlée par des interactions entre les membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille des protéines Bcl-2 (Cory and Adams 2002). La famille Bcl-2 a été découverte, il y a plus de 20 ans, lors de l'identification de son premier membre Bcl-2 chez l'homme à partir de la translocation chromosomale t(14; 18) dans le locus des chaînes lourdes des immunoglobulines. Cette translocation conduit à une expression constitutive de Bcl-2 dans les cellules B (Bakhshi et al. 1985). Cette sur-expression de Bcl-2 bloquant la mort des lymphocytes B caractérise les lymphomes folliculaires de l'homme. Il a été appelé Bcl-2, pour B cell lymphoma 2, et à la différence des autres oncogènes connus à ce moment là, sa fonction n'est pas de promouvoir la prolifération cellulaire, mais plutôt d'inhiber la mort cellulaire (Vaux et al. 1988). Le nombre croissant de protéines identifiées apparentées à Bcl-2 par les homologies de séquence, et par leur implication dans le contrôle de l'apoptose a conduit à la définition d'une « famille Bcl-2 » (Cory and Adams 2002).

Il y a au moins 20 protéines dans la famille Bcl-2, qui sont divisées en 3 groupes. Le groupe I regroupe les membres anti-apoptotiques, alors que celles du groupes II et III sont pro-apoptotiques. Les membres de la famille Bcl-2 peuvent être définis par la présence de 4 motifs conservés connus sous le nom de domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1 à BH4). Chacun de ces domaines BH a une fonction différente, et les membres de la famille contiennent un ou plusieurs d'entre eux (Danial 2008) (Figure 9).

La plupart des protéines anti-apoptotiques contiennent les quatre domaines conservés BH. Les protéines pro-apoptotiques peuvent avoir un ou plusieurs des domaines BH.

- Les membres du premier groupe sont les protéines anti-apoptotiques à multi-domaines BH (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1...). Ils bloquent l'apoptose. Les domaines BH1, BH2 et BH3 de ces molécules forment un sillon hydrophobe dans lequel le domaine BH3 d'une protéine peut venir se fixer (Sattler et al. 1997).
- Les membres du second groupe sont les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines BH (Bax, Bak...). Les domaines BH1 et BH2 de ces protéines permettent de former des homodimères et des hétérodimères (Yin et al. 1994).



**Figure 9: Classification des protéines de la famille Bcl-2.** Ces protéines sont regroupées en 3 groupes définis par l'expression de 4 motifs conservés, appelés domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1 à BH4). Les deux premiers groupes correspondent à des protéines à multidomains BH. Le premier regroupe les protéines anti-apoptotiques et le second les protéines pro-apoptotiques. Le troisième groupe correspond à des protéines pro-apoptotiques avec un seul domaine, le domaine BH3. Ce groupe est appelé BH3-only.

BH: Bcl-2 homology; TM: transmembranaire

(Danial 2008).

- Les membres du dernier groupe correspondent aux protéines pro-apoptotiques de la sous-famille avec seulement le domaine BH3 ou « BH3-only » (Bad, Bid, Bim...). Ces molécules sont souvent considérées comme des sentinelles reliant et intégrant les signaux de vie ou de mort extracellulaires au cœur de la machinerie apoptotique, la mitochondrie (Danial and Korsmeyer 2004).

Le domaine BH3 forme une hélice alpha permettant d'interagir avec le sillon hydrophobe des membres anti-apoptotiques. Seul le domaine BH3 des molécules pro-apoptotiques est nécessaire pour interagir avec d'autres protéines pro- ou anti-apoptotiques, alors que les molécules anti-apoptotiques requièrent la présence des 3 domaines BH1, BH2 et BH3 (Clohessy et al. 2006).

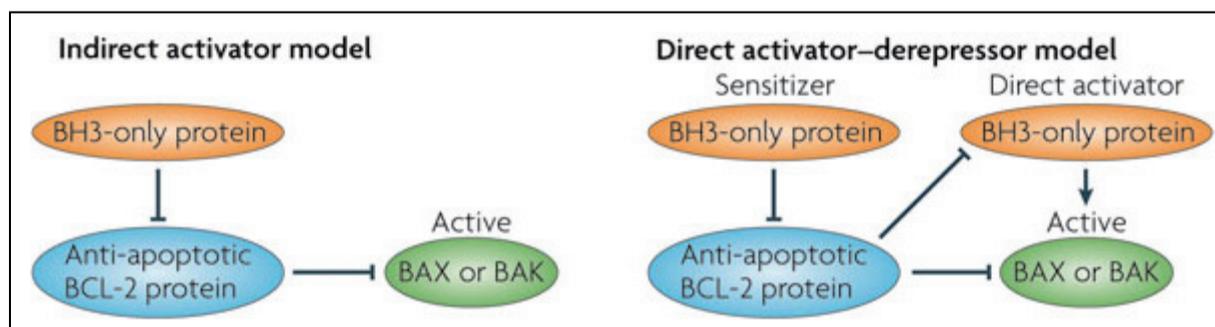
Les protéines de la famille Bcl-2 sont cytosoliques mais la plupart possèdent un domaine C-terminal hydrophobe (TM, transmembrane domain) leur permettant de s'insérer dans les membranes cellulaires principalement au niveau de la mitochondrie (MME), du réticulum endoplasmique et du noyau (Krajewski et al. 1993).

- **Les protéines « BH3-only » et l'activation des molécules pro-apoptotiques**

Les protéines BH3-only sont des régulateurs clés de l'activation de la voie mitochondriale et orchestrent la décision de la cellule vis-à-vis de l'apoptose, notamment dans le système immunitaire (Strasser 2005). Ces protéines à longue demi-vie sont constamment présentes dans la cellule, mais sous une forme inactive (voir plus loin la régulation des molécules Bcl-2). Au cours de notre thèse, nous avons étudié plus particulièrement l'activation de la molécule Bad, qui fera ainsi l'objet d'un paragraphe spécifique, en liaison avec notre modèle pathologique, les lymphomes diffus à grandes cellules B.

La voie intrinsèque de l'apoptose débute avec l'activation post-traductionnelle de ces protéines (Youle and Strasser 2008). Elles intègrent les signaux apoptotiques provenant des différents compartiments cellulaires et les transmettent aux membres pro-apoptotiques à multi-domaines BH, régulant leur activité. Elles ont la capacité de former des oligomères par l'intermédiaire de leur domaine BH3. Certaines protéines BH3 peuvent interagir avec des membres pro et anti-apoptotiques, alors que d'autres (Bad) interagissent et neutralisent seulement des partenaires anti-apoptotiques (Chen et al. 2005; Danial 2008). De plus, on remarque qu'elles n'ont pas toutes la même affinité vis-à-vis des membres anti-apoptotiques (Lomonosova and Chinnadurai 2008).

Les données existantes sont compatibles avec deux modèles pour expliquer l'activité de ces molécules « BH3-only », mutuellement exclusifs (Figure 10).



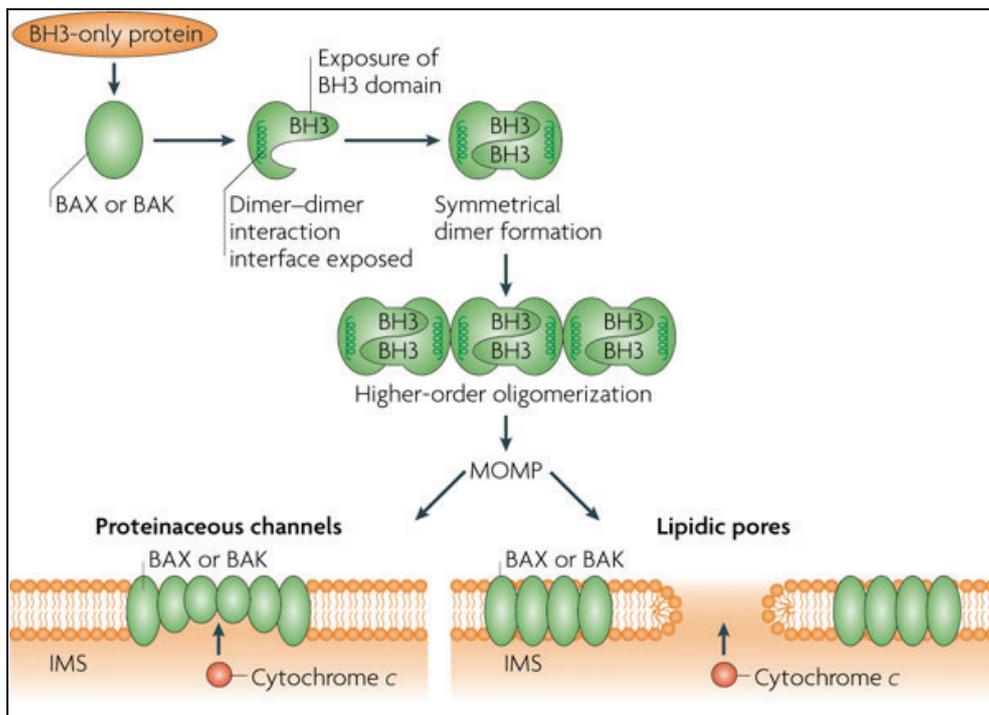
**Figure 10 : Modélisation du rôle des protéines BH3-only.** On distingue 2 modèles.

a) Activation indirecte : Les protéines BH3 séquestrent les protéines de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques, mais n'activent pas directement Bax ou Bak. b) Activation directe : Les protéines BH3 interagissent directement avec des protéines pro-apoptotiques Bax/Bak (Tait and Green, 2010).

Dans le premier modèle, les molécules à domaine BH3 sont dites facilitatrices (Bad, Bik, Noxa) et activent de façon « indirecte » les molécules pro-apoptotiques. Selon ce modèle les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 normalement, activées ou semi-activées, sont tenues en échec par les molécules à domaine BH3 en les séquestrant de manière réversible. Dans ce modèle, les protéines BH3-only peuvent favoriser l'apoptose en inhibant exclusivement les membres de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques, mais sont incapables de directement lier et activer Bax et Bak (Willis et al. 2007). Une interaction compétitive entre

les protéines BH3-only et les membres de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques est suffisante pour libérer Bax et Bak qui sont ainsi activées (Tait and Green, 2010). Cependant, des études ont montré que Bax et Bak ne sont pas inhibées par des protéines anti-apoptotiques (Kim et al. 2006), ou encore que des protéines BH3-only à proximité sont en mesure d'engager et d'activer Bax et Bak (Letai et al. 2002).

Dans le second modèle, les molécules à domaine BH3 sont dites activatrices (tBid, Bim, Puma) et se lient directement sur les molécules pro-apoptotiques à multi-domaines BH pour les activer. Ainsi, selon ce modèle, l'activation et l'oligomérisation de Bak/Bax, par changement conformationnel qui entraîne l'exposition de leur domaine BH3, résultent d'une interaction directe avec t-Bid, Bim et Puma (Figure 11) (Green and Chipuk 2008; Tait and Green, 2010).



**Figure 11 : Activation et formation du pore Bax/Bak.** L'oligomérisation et l'activation des protéines Bax ou Bak entraînent un changement de conformation et l'exposition de leur domaine BH3. Cette exposition permet une interaction directe avec les protéines BH3-only. Le changement de conformation engendre aussi le démasquage d'un sillon hydrophobe qui permet la formation du pore mitochondrial externe (Tait and Green, 2010).

Comme les données expérimentales existent pour soutenir les deux modèles, il est possible que, selon le type cellulaire et le contexte, les deux mécanismes fonctionnent (Merino et al. 2009). Par exemple, Puma semble fonctionner dans les deux sens (Gallenne et al. 2009). Indépendamment des différents rôles attribués aux interactions entre les membres de la famille Bcl-2, les deux modèles s'accordent sur une activité proapoptotique des protéines BH3-only en se liant et en contrôlant les deux autres sous-groupes régulateurs de la famille Bcl-2. Ils sont essentiels pour la perméabilité mitochondriale et l'engagement de la mort cellulaire. Ils fonctionnent comme des capteurs de signaux de mort, des sentinelles spécifiques, et des vecteurs de l'information de la voie apoptotique de base.

- **Les activités des protéines anti-apoptotiques**

Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 exercent leur activité en se liant aux membres pro-apoptotiques Bax et Bak, et préviennent les dommages mitochondriaux. Il y a une dizaine d'années, les chercheurs croyaient que la décision de mourir de la cellule était dépendante

d'un équilibre stoechiométrique entre les protéines de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques et pro-apoptotiques (le modèle «rhéostat »). Le nombre croissant de travaux contradictoires met en évidence la faiblesse de ce modèle. Par exemple, les cellules peuvent passer d'un état de vie à une situation apoptotique sans modification dans les niveaux respectifs des protéines anti et pro-apoptotique Bcl-2.

On sait aujourd'hui que les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 empêchent la mort des cellules en interrompant la signalisation en amont de l'oligomérisation de Bax/Bak, essentiellement en se liant et en séquestrant les molécules à domaine BH3 activatrices, prévenant ainsi leur interaction avec Bax/Bak (Letai et al. 2002; Taylor et al. 2008).

Les interactions sélectives et spécifiques entre les membres de la famille Bcl-2 représentent les éléments clés du contrôle de la perméabilité mitochondriale et du destin cellulaire. Ainsi, les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont inactivés lorsque les protéines BH3-only facilitatrices s'insèrent, *via* leur dans leur domaine BH3, au niveau de leur sillon hydrophobe constitué par le repliement des domaines BH1, BH2, BH3 (Sattler et al. 1997). Comme on l'a déjà signalé, en dépit de leur similarité structurelle, chaque protéine BH3-only a son propre modèle d'interaction avec des protéines anti-apoptotiques.

### **I.5.3 La voie du réticulum endoplasmique**

A côté des 2 voies principales de déclenchement de l'apoptose, une attention particulière a été portée à un mécanisme d'amplification de ces voies pouvant être réalisé par le réticulum endoplasmique (RE). En effet, ce compartiment cellulaire, outre le fait qu'il subit des remaniements et une fragmentation massive tardive lors du processus apoptotique, participe à la signalisation apoptotique induite par un stress.

La voie du réticulum endoplasmique souligne un déséquilibre entre des protéines immatures et matures, l'activation d'une série de réponses compensatoires, appelées collectivement la réponse des protéines dépliées (UPR, Unfolded protein response). Cette réponse peut être aussi induite par de multiples conditions de stress du RE, tels que l'appauvrissement en calcium, des altérations de la glycosylation, la résistance à l'insuline, le rayonnement UV. La réaction à ces divers signaux du RE est une tentative pour corriger l'accumulation des protéines, et dans le cas où les corrections sont insuffisantes ou lors d'un stress soutenu, la persistance de la réponse conduit à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Ferri and Kroemer, 2001; Kaufman; Criddle et al. 2007). Le RE est le site majeur de la réserve intracellulaire de  $Ca^{2+}$ , dont l'efflux est souvent associé à une entrée dans la mitochondrie. Les flux calciques ont souvent été impliqués dans la mort cellulaire, même si les données sont parfois contradictoires.

Certains membres de la famille Bcl-2, anti et pro-apoptotiques, sont localisés dans le RE, mais leur fonction reste peu connue. Ils pourraient influencer l'homéostasie du RE en régulant la perméabilité de sa membrane et le relargage du calcium vers le cytosol. Des études ont montré que Bcl-2 exerçait son rôle anti-apoptotique au niveau aussi du RE, empêchant la sortie de  $Ca^{2+}$  et son accès à la mitochondrie (Rudner et al. 2001). Suite à un stimulus apoptotique, Bax et Bak peuvent s'insérer dans les membranes du RE, induire une fuite de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol et activer la caspase 12 qui déclenchera la mort cellulaire *via* l'activation de la caspase 3 (Scorrano et al. 2003; Zong et al. 2003; Jin and El-Deiry 2005).

La voie intrinsèque du RE peut réguler à la fois les mécanismes qui interviennent dans les voies extrinsèques et intrinsèques de mort cellulaire.

## **I.6 Régulation de l'apoptose**

Comme nous venons de le voir, la réponse apoptotique fait intervenir de multiples voies de signalisations, complexes et interconnectées. Elle est donc hautement contrôlée. De nombreuses protéines cytotoxiques impliquées lors de cette réponse sont constitutivement exprimées, mais inactives dans la cellule. Leur état d'activation dépend donc de leur localisation cellulaire, de leur stabilité ou encore de leurs interactions avec d'autres protéines.

### **I.6.1 Les inhibiteurs de l'apoptose**

- **La voie des récepteurs de mort**

Un mécanisme d'inhibition de la signalisation des récepteurs de mort implique la régulation négative de la procaspase-8. En effet, plusieurs régulateurs agissent au niveau de la formation du DISC. Les plus connus sont les FLIP (FADD-like ICE inhibitory proteins), des isoformes de la caspase 8, possédant deux domaines DED mais pas de site catalytique actif (Irmeler et al. 1997; Krueger et al. 2001).

- **Les inhibiteurs des caspases**

Les caspases sont modulées par plusieurs facteurs cellulaires endogènes. Ces polypeptides constituent une famille de protéines, les IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins) initialement découvertes chez des cellules d'insectes infectées par un baculovirus. Ces protéines sont caractérisées par un domaine de 70 à 80 acides aminés situés en position N-terminale, appelé le domaine BIR (baculoviral IAP repeat) qui semble se lier et inhiber les caspases actives. Huit protéines IAP ont été identifiées à ce jour chez les mammifères (Burz et al. 2009). Tous les membres de cette famille contiennent un à trois domaines BIR, et un domaine conservé C-terminal RING (zinc finger). Chaque domaine BIR a des fonctions différentes, le troisième domaine BIR inhibant l'activité de la caspase 9. Globalement, ces molécules inhibent l'activité de la caspase initiateur 9 et des caspases effectrices 3 et 7. Les IAPs ne se lient pas ou n'inhibent pas la caspase 8, mais en inhibant son substrat, la procaspase 3. Ces molécules arrêtent la cascade protéolytique et protègent de la mort induite par la signalisation de Fas (Deveraux et al. 1998). Le domaine RING, qui se comporte comme une E2 ubiquitine-ligase permet la dégradation des IAPs et des caspases qu'elles fixent. L'activité des membres de la famille IAP peut être modulée par d'autres facteurs cellulaires endogènes libérés par les mitochondries. Par exemple, les effets inhibiteurs de XIAP peuvent être modulés par des fonctions antagonistes de protéines mitochondriales, comme Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 (Chowdhury et al. 2008)

### **I.6.2. Régulation des membres de la famille Bcl-2**

Les protéines de la famille Bcl-2 sont les intervenants principaux de la réponse apoptotique. Comme on l'a vu précédemment, leur rôle décisif dans le devenir d'une cellule dépend de leur ciblage vers différentes membranes intracellulaires comme la MME et les membranes du RE. Pour être dirigées et relocalisées vers ces sites où elles sont fonctionnelles, ces molécules doivent subir un changement conformationnel, ou des modifications post-traductionnelles ou les 2 (Schinzel et al. 2004). Les modifications post-traductionnelles contrôlant les protéines de la famille Bcl-2 comme la phosphorylation et le clivage protéolytique ou l'addition de groupements lipidiques, sont apparues comme des mécanismes

possibles de l'intégration dynamique des signaux extracellulaires de survie et de mort (Danial and Korsmeyer 2004; Youle and Strasser 2008) (Thèse de Pauline Robinet, 2010).

La phosphorylation/déphosphorylation des molécules Bcl-2 est le principal facteur de régulation de leur activité. Ces mécanismes sont sous le contrôle de kinases et de phosphatases cellulaires qui sont activées ou inactivées selon les signaux reçus par la cellule. Cela peut être en présence ou en l'absence de cytokines, d'hormones ou des facteurs de croissance (Zhou et al. 2000). L'activité de ces enzymes est sous le contrôle de voies de signalisations complexes et souvent interconnectées. On a ainsi pu caractériser des voies de signalisation anti-apoptotiques activées par des facteurs de croissance qui impliquent la PI3K/Akt (ou PKB) ou des kinases activées en aval de la voie Ras. Pour exemple, PI3K/Akt peut phosphoryler Bax sur sa serine 184, inhibant ainsi son activité (Gardai et al. 2004). Elle peut agir aussi de manière indirecte en phosphorylant GSK3, qui devenue inactive ne peut plus phosphoryler Bax sur sa serine 163, l'empêchant d'être adressée à la mitochondrie (Linseman et al. 2004). Cette même voie PI3K/Akt phosphoryle Bad sur la Ser136, comme nous le verrons par la suite, contribuant à son inactivation (Datta et al. 2002). D'autres protéines peuvent être régulées par phosphorylation, comme Mcl-1 ou Bim, Puma, Bcl-xl (Maurer et al. 2006). Les conséquences de la phosphorylation des molécules de la famille Bcl-2 sont parfois complexes variant (inhibition/activation) en fonction des kinases activées et du résidu ciblé par ces kinases. Ainsi dans le cas de Bcl-2, sa phosphorylation a d'abord été associée à une perte de sa fonction anti-apoptotique et donc à la mort cellulaire. Mais par la suite, certains travaux ont montré que la phosphorylation sur la sérine 70 était associée à un signal de survie. Cette phosphorylation est sous le contrôle de la PKC $\alpha$  et est nécessaire à son activité anti-apoptotique. En effet, et contrairement à la précédente réalisée sur d'autres résidus (Ser87, Thr69) par des kinases Erk1/2, elle n'altère pas la possibilité pour Bcl-2 d'interagir avec Bax (May et al. 1994; Cheng et al. 2001; Ruvolo et al. 2001).

Il est intéressant de noter que la phosphorylation de certaines protéines de la famille Bcl-2, comme Bcl-2, ou Bid, Bim et Bik les rend souvent sensibles au phénomène d'ubiquitinylation, les adressant ainsi au protéasome pour les dégrader (Dimmeler et al. 1999; Thompson et al. 2008). Ainsi, l'inhibition du protéasome initie l'apoptose et s'accompagne d'une stabilisation des protéines à domaine BH3 (Henderson et al. 2005), révélant le rôle sans doute important du système ubiquitine-protéasome dans la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

Au cours de notre thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux modifications post-traductionnelles de la molécule BH3-only, Bad, et notamment par phosphorylation. Aussi, nous avons choisi d'illustrer ces mécanismes en prenant pour exemple Bad dans un paragraphe spécifique.

## **II. De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B**

---

La protéine Bad (Bcl antagonist of cell death) fait partie de la sous-famille des protéines pro-apoptotiques « BH3-only ». Ce fut la première protéine BH3 à être découverte en 1995 par le groupe de Stanley Korsmeyer (Yang et al. 1995). Cependant, à la différence des autres « protéines BH3 » (comme Bim, tBid ou Puma), Bad (de même que Noxa et Bmf) n'est que faiblement inducteur d'apoptose constituant un autre sous-groupe de protéines à domaine BH3 dites « facilitatrices ». Ces dernières semblent fonctionner comme des

activateurs des membres pro- apoptotiques à multi-domaines BH en formant des complexes et en neutralisant des partenaires anti-apoptotiques, comme la protéine Bcl-2. Les études chez l'homme et la souris ont montré que Bad était très largement exprimée par des types cellulaires très variés, avec notamment une expression marquée dans les tissus nerveux. Globalement, la fonction physiologique de Bad est de répondre à des stress cellulaires et d'induire la voie mitochondriale de l'apoptose. Ainsi, Bad régule le devenir de la cellule en connectant des signaux extra-cellulaires, émanant notamment de facteurs de croissance, à la machinerie apoptotique (Yang et al. 1995; Danial 2008).

## **II.1. Structure**

Le gène isolé du rat compte quatre exons. Il existe deux variants d'épissage de l'ARNm de Bad dans les tissus de rat. Ceux-ci donnent naissance à deux protéines : Bad- $\alpha$ (S) et Bad- $\beta$ (L). Elles diffèrent dans leur région C-terminale mais contiennent toutes deux un domaine BH3. Bad- $\alpha$ (S) est toujours plus abondante que Bad- $\beta$ (L) (Hamner et al. 2001). Il existe des différences importantes entre la protéine humaine, celle de souris et celle de rat. La protéine humaine compte 168 acides aminés et celle de souris 204 tandis que chez le rat, Bad- $\alpha$ (S) en contient 205 et Bad- $\beta$ (L) 220. Le domaine BH3 est absolument nécessaire à la fonction pro-apoptotique de Bad car il est requis pour l'hétérodimérisation avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Des études structurales ont effectivement révélé que la face hydrophobique de l'hélice- $\alpha$  amphipatique s'insérait dans la poche hydrophobe formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (Petros et al. 2004). Cette interaction neutralise la fonction anti-apoptotique de ces protéines et aboutit à la libération des molécules apoptotiques comme Bax et Bak, qui étaient séquestrées sous une forme inactive complexée aux molécules Bcl-2 de survie. L'activation de Bak et Bax modifie leur conformation, aboutissant comme nous l'avons vu, à la libération de molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome c et finalement à l'exécution du programme de mort.

## **II.2. La régulation de l'activité de Bad par phosphorylation**

La phosphorylation de Bad régule son rôle pro-apoptotique en altérant son interaction avec des partenaires anti-apoptotiques, mais aussi influence sa localisation subcellulaire (Wang et al. 1996; Datta et al. 2000).

### **II.2.1. Aspects structuraux et subcellulaires**

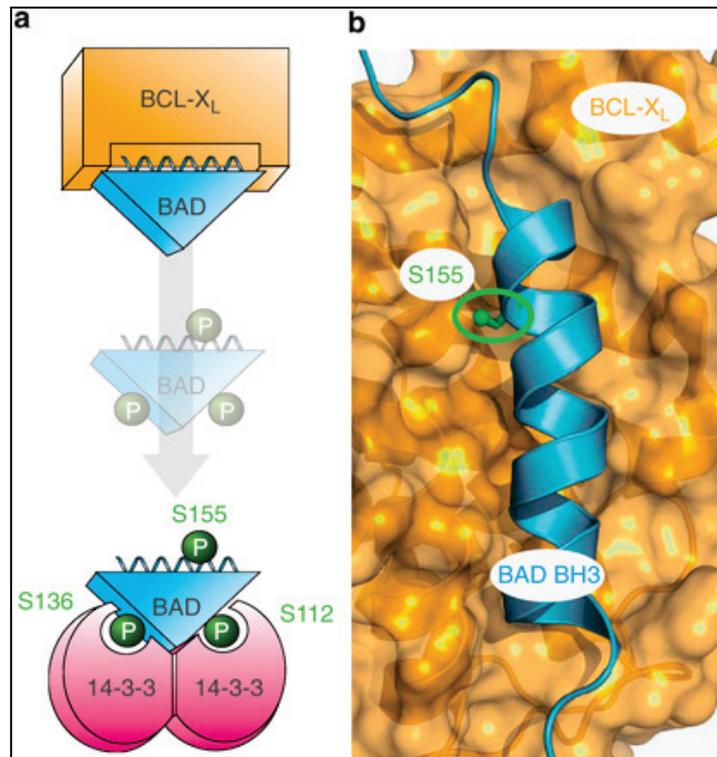
Trois sites de phosphorylation ont été identifiés comme sites prédominants *in vivo*, la sérine 112, la sérine 136 et la sérine 155. Cependant, des sites additionnels ont été découverts incluant les sérines 170 et 128 et des résidus thréonine. La phosphorylation de la Ser170 inhibe la fonction pro-apoptotique de Bad alors que celle de la Ser128 produit au contraire une stimulation de cette activité (Dramsi et al. 2002; Hashimoto et al. 2005). Cette numérotation correspond à la protéine de souris (mBad). En effet, la plupart des travaux sur la phosphorylation de Bad ont été réalisés chez la souris (Datta et al. 1997) mais des données très récentes ont été apportées sur les sites de phosphorylation de la molécule Bad humaine (hBad) (Polzien et al. 2009; Polzien et al. 2010). Ces études ont confirmé notamment les 3 sites majeurs préalablement établis chez la souris et correspondant chez l'homme aux sérines 75, 99 et 118.

**Introduction bibliographique:**  
**De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B**

---

En présence de facteurs de croissance/cytokines, Bad est phosphorylée sur ces résidus sérines, Bad est ainsi inactivée et séquestrée dans le cytosol par la protéine « chaperonne » 14-3-3 (Zha et al. 1996; Scheid et al. 1999). Lors d'un stress cellulaire ou en l'absence de facteurs de croissance/cytokines, Bad est déphosphorylée, révélant sa forme active pro-apoptotique. Bad se dissocie de la protéine 14-3-3 et est « transloquée » à la membrane externe mitochondriale où elle interagit avec les protéines Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub> ce qui a pour effet d'inhiber leur action anti-apoptotique (Yang et al. 1995; Zha et al. 1996; Otilie et al. 1997).

La phosphorylation de Bad se fait de façon hiérarchique et chacune des sérines a son rôle à jouer. La sérine 136 apparaît comme l'évènement le plus en amont et indépendant du statut de phosphorylation des Ser112 et Ser155. Une fois phosphorylée, la Ser136 est le site de recrutement à la protéine 14-3-3 et pour qu'il y ait liaison complète, la sérine 112 doit également être phosphorylée. La sérine 155 se trouve dans le domaine BH3 qui est le site d'interaction avec Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>. La charge négative de cette sérine phosphorylée rend improbable, car énergétiquement défavorable, l'interaction entre l'hélice du domaine BH3 de Bad et la poche hydrophobe des molécules anti-apoptotiques Bcl-2 (Otilie et al. 1997; Zha et al. 1996; Datta et al. 2000; Petros et al. 2000; Danial) (Figure 12).



**Figure 12: Régulation de Bad par phosphorylation.**  
a) La phosphorylation de Bad régule les interactions de celle-ci avec son partenaire anti-apoptotique, exemple Bcl-X<sub>L</sub>. b) L'interaction de l'hélice amphipatique (bleue) avec le sillon hydrophobe (orange) de Bcl-X<sub>L</sub>. (Danial 2008)

La liaison entre la protéine 14-3-3 et la Ser136 phosphorylée induit un changement conformationnel qui rendrait accessible la Ser155 pour des kinases au niveau du domaine BH3 de Bad et ainsi abolirait son interaction avec Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub>. En effet, des études de mutagenèse dirigée montrent que la substitution de la Ser136 en alanine interfère avec la phosphorylation de la Ser155 (Datta et al. 2000). Cependant, le complexe ternaire contenant Bad phosphorylée sur la Ser136, Bcl-2/X<sub>L</sub> et la protéine 14-3-3 prédictif d'un état

**Introduction bibliographique:**  
**De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B**

---

intermédiaire dans le modèle séquentiel de phosphorylation n'a pas été mis en évidence. Il est aussi possible que ce complexe soit transitoire, *in vivo* (Zha et al. 1996; Datta et al. 2000). Les modèles expérimentaux d'activation de Bad basés sur la phosphorylation (souris *Bad*<sup>3SA/3SA</sup> présentant des formes mutées non-phosphorylables de Bad) proposent que la modification d'au moins 2 résidus sérine soit nécessaire pour neutraliser complètement son activité apoptotique. Ainsi, si on empêche la phosphorylation sur les Ser136 ou 155, on altère la protection contre l'apoptose réalisée par des facteurs de croissance, sur des cellules neuronales. De plus, les mutations Ser155D ou Ser155E qui miment une forme constitutivement phosphorylée de Bad permettent une protection contre l'apoptose qui dépend du statut de phosphorylation des sérines 112 et 136, suggérant que la phosphorylation de la sérine 155 est peut-être l'étape limitante nécessaire à la neutralisation de la fonction apoptotique de Bad (Datta et al. 2000; Danial 2008).

À l'inverse, quand Bad est séquestrée dans le cytosol par la protéine 14-3-3, c'est la sérine 112 phosphorylée qui semble la plus importante. Cette sérine est la première à être déphosphorylée par la phosphatase PP2A dans des conditions de croissance difficiles. Cette déphosphorylation de la sérine 112 est nécessaire pour mener à la déphosphorylation de la sérine 136 par de multiples phosphatases et finalement de la 155, et ainsi libérer Bad des protéines 14-3-3 (Chiang et al. 2003).

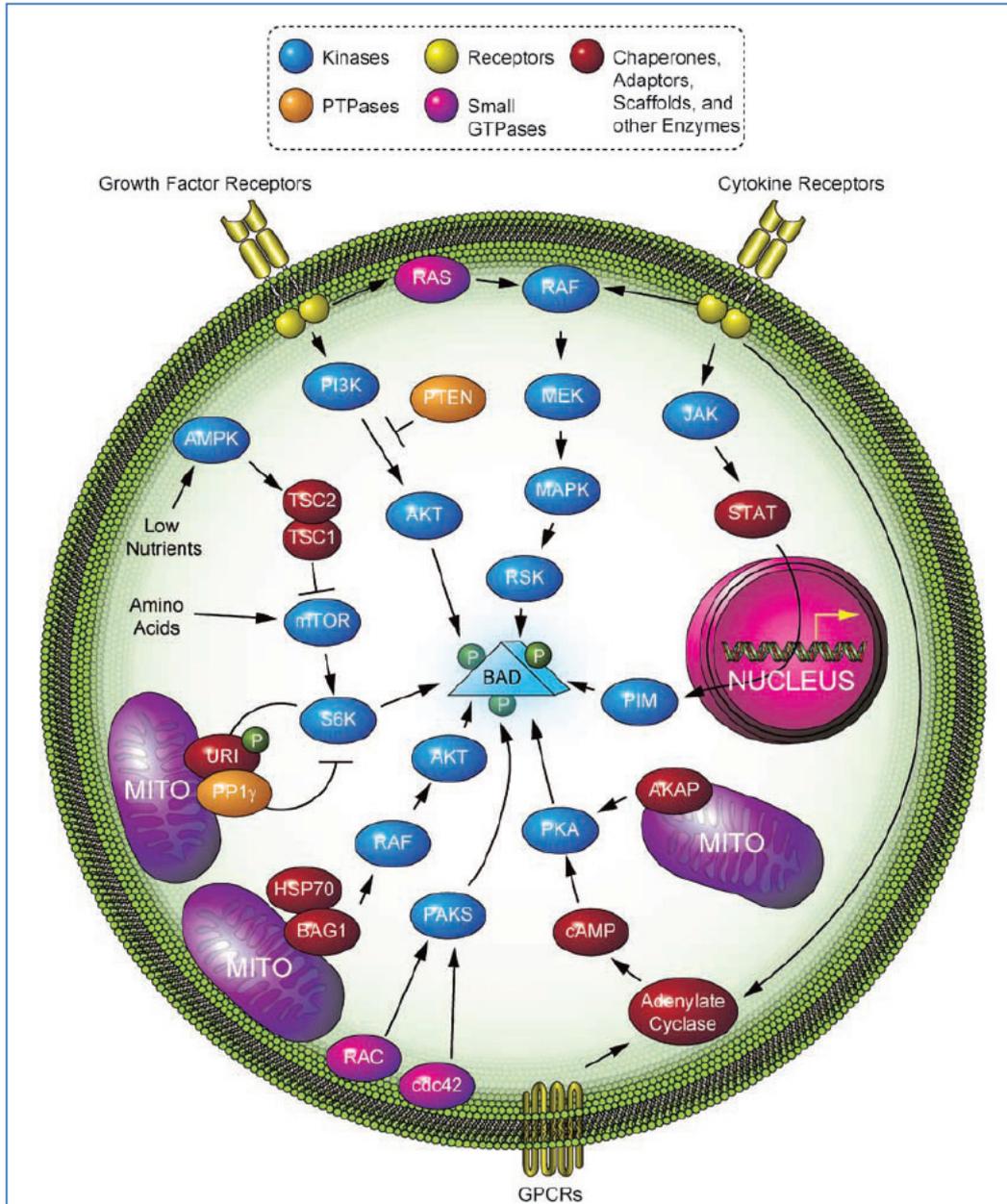
En conclusion, l'état de phosphorylation de Bad sur les 3 principales sérines reflète un point de contrôle dans la décision vers la vie ou la mort de la cellule.

### **II.2.2. Les kinases et phosphatases de Bad (Figure 13)**

La phosphorylation de Bad est sous le contrôle de plusieurs protéines kinases qui ciblent de multiples sites. La phosphorylation de la sérine 112 est sous contrôle de la PKA, la p90RSK, Pim-1, Pim-2, PAK1, PAK5 et ERK1/2 (Datta et al. 1997; Tan et al. 1999; Schurmann et al. 2000; Yan et al. 2003; Aho et al. 2004; Jin et al. 2005). Celle de la sérine 136 est sous le contrôle d'Akt, de p70S6K, PAK1 et Pim-3 (Datta et al. 1997; Schurmann et al. 2000; Harada et al. 2001; Macdonald et al. 2006). Finalement, la sérine 155 est sous le contrôle de PKA, RSK et Pim-3 (Tan et al. 2000; Virdee et al. 2000; Zhou et al. 2000; Macdonald et al. 2006). De plus, des études ont identifié plusieurs autres sites de phosphorylation de Bad. La phosphorylation sur la sérine 170 est induite en réponse aux cytokines et inactive Bad (Dramsi et al. 2002). La MAP kinase JNK phosphoryle Bad sur la thréonine 201 et cela mène également à une inactivation de Bad, en empêchant sa liaison avec Bcl-X<sub>L</sub> (Yu et al. 2004). Une autre thréonine, la 117, est la cible de la CKII, par contre, aucun effet dans la cellule n'a été démontré (Klumpp et al. 2004). Finalement, un site de phosphorylation, qui favorise l'activité pro-apoptotique de Bad a également été découvert. Il s'agit de la sérine 128. Jusqu'à maintenant, elle est la cible de deux protéines kinases : JNK et Cdc2 (Donovan et al. 2002; Konishi et al. 2002). La phosphorylation sur la sérine 128 empêche la liaison de Bad avec la protéine 14-3-3 même si la sérine 136 est phosphorylée. L'activation de Bad par JNK et Cdc2 couple donc les voies de stress cellulaire et de régulation du cycle cellulaire à la machinerie apoptotique. Bien que la kinase c-Raf soit la première kinase de Bad qui ait été décrite (Wang et al. 1999), ses sites cibles ne sont pas clairement définis. Cependant, de plus en plus d'arguments expérimentaux *in vivo* et *in vitro* montrent une participation directe des kinases Raf dans la régulation de l'apoptose via Bad (Jin et al. 2005; Kebache et al. 2007). De plus, dernièrement, grâce à la spectrométrie de masse, les équivalents des 3 sérines de mBad sur la protéine humaine (Serine 75, 99 et 118) ont été établis comme sites de phosphorylation *in vivo*, sous le contrôle des kinases RAF

**Introduction bibliographique:**  
**De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B**

(notamment les isoformes B et C) en plus des kinases PKA, PAK, Akt/PKB (Wang et al. 1996; Jin et al. 2005; Polzien et al. 2009). Ces kinases phosphorylent Bad sur les 3 sites majeurs de hBad, régulant comme pour la protéine murine, la liaison avec la protéine 14-3-3 et l'association avec Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> (Polzien et al. 2009). Ces travaux très récents sur la protéine humaine ont aussi permis d'identifier, comme pour mBad, l'existence de nouveaux sites de phosphorylation *in vivo* à côté des 3 principaux (sérines 25, 32/34, 97 et 124). Il est intéressant de noter que la phosphorylation de la Ser75 de la protéine Bad humaine par C-RAF peut favoriser sa poly-ubiquitynilation, permettant un « turn over » de Bad par sa dégradation via le protéasome (Fueller et al. 2008).



**Figure 13 :** Voies de signalisation impliquées dans la phosphorylation de Bad. La protéine Bad peut être phosphorylée sur différentes sérines par de nombreuses kinases cellulaires (Danial 2008).

La déphosphorylation de Bad et donc son activation fait intervenir plusieurs protéines phosphatases cellulaires (Klumpff and Krieglstein 2002; Garcia et al. 2003). Plus précisément, la protéine phosphatase PP1 $\alpha$  est activée lors de la privation cytokinique (Ayllon et al. 2000) ;

**Introduction bibliographique:  
De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B**

---

la protéine phosphatase PP2A déphosphoryle Bad en réponse à la privation en sérum et polyamines des milieux de culture (Chiang et al. 2003; Ray et al. 2005), et la phosphatase calcineurine (PP2B) déphosphoryle Bad en réponse à un flux calcique (Wang et al. 1999).

Des travaux réalisés sur des lignées T murines dépendantes de la présence de cytokines ont montré que la privation cytokinique aboutissait, *via* l'activation de la GTPase Ras, à l'activation de PP1 $\alpha$ , principale sous-unité catalytique des PP1. Cette activation s'accompagne de la déphosphorylation de Bad sur ses deux sérines 112 et 136 et provoque l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des cellules (Ayllon et al. 2000). Il est aussi suggéré qu'en plus de cibler spécifiquement les résidus sérine de Bad, les phosphatases de Bad pourraient inactiver des kinases de survie (Danial 2008). De plus, la phosphatase PP1 $\alpha$  interagit aussi avec la protéine Bcl-2 qui jouerait alors le rôle de sous-unité régulatrice de PP1 $\alpha$ , constituant une nouvelle holoenzyme de PP1, avec une activité phosphatase que le groupe de Garcia a appelée « Bad phosphatase » (Garcia et al. 2003). Cette holoenzyme Bcl-2/ PP1 $\alpha$  peut former un complexe tri-moléculaire avec Bad, Bad et Bcl-2 étant probablement phosphorylés. En effet, des études structurales ont permis de mettre en évidence la présence, au sein du domaine BH1 des protéines Bcl-2, d'un motif consensus d'interaction avec PP1 $\alpha$ . Ce motif est nécessaire à l'interaction et au ciblage de PP1 $\alpha$  avec ses substrats comme Bad (Ayllon et al. 2001). Ainsi, Bcl-2, en plus de contrôler l'activité enzymatique de la phosphatase, amènerait Bad à PP1 $\alpha$ . Lors d'un signal de mort comme celui associé à la déprivation cytokinique, l'activité phosphatase de PP1 $\alpha$  déterminerait la déphosphorylation de Bad. PP2A participerait également à ce signal en interagissant avec Bcl-2 puis en le déphosphorylant, ce qui favoriserait l'activité de la « Bad phosphatase » (Garcia et al. 2003).

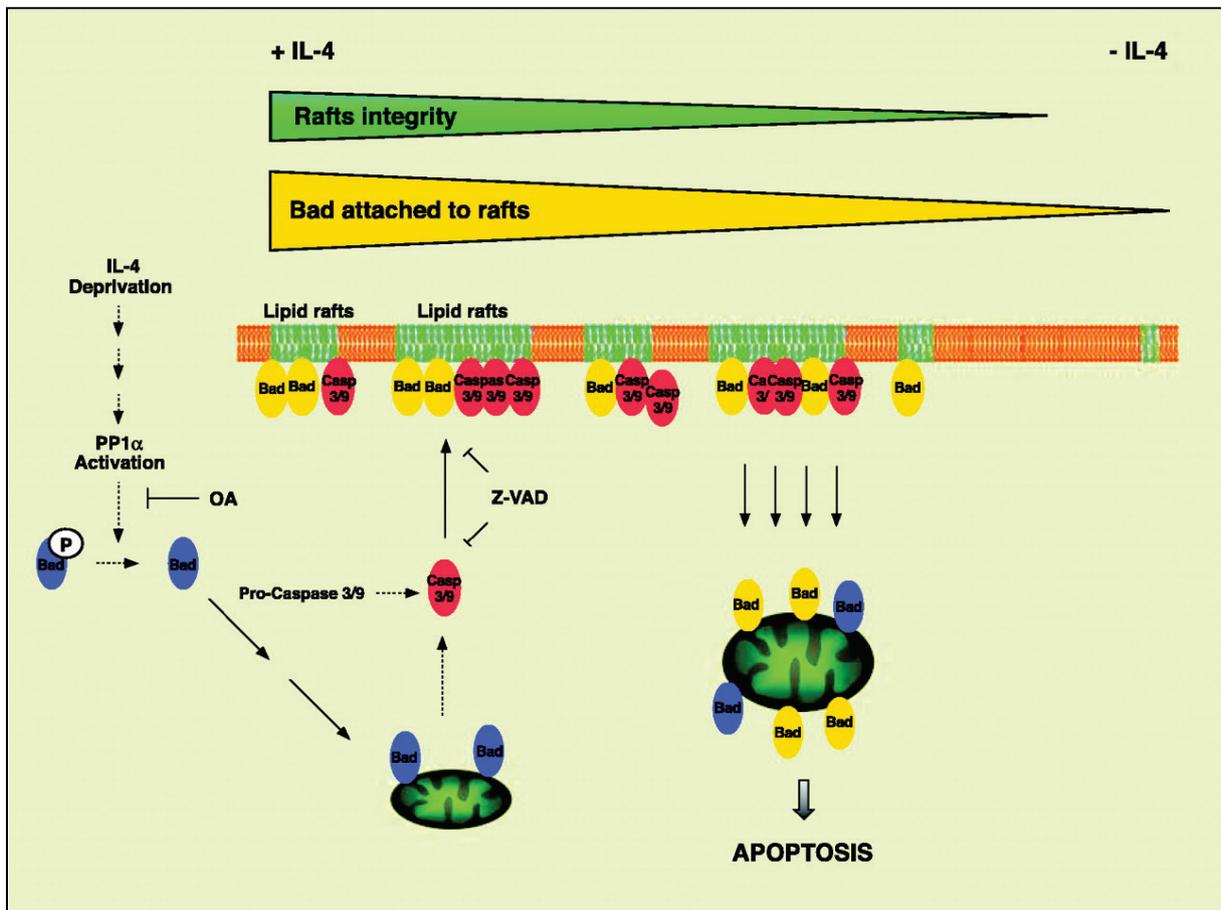
**II.3. Les interactions lipidiques: un élément important du trafic intracellulaire de Bad**

Les études initiales avaient suggéré que la localisation sub-cellulaire de Bad était déterminée par son statut de phosphorylation, la déphosphorylation de Bad le dissociant des protéines 14-3-3 et le délocalisant du cytosol à la mitochondrie pour interagir avec Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>. Cependant, les mécanismes régulateurs responsables de la localisation cellulaire de Bad sont apparus plus complexes. Par exemple, dans les cellules saines, une portion de Bad phosphorylée peut résider à la mitochondrie (Danial et al. 2003). Des données récentes ont apportées des éclaircissements importants sur les associations de Bad avec les membranes cellulaires.

La plupart des membres de la famille Bcl-2 possède un domaine hydrophobique transmembranaire au niveau de leur extrémité C-terminale, indiquant que ces protéines peuvent s'insérer à des membranes cellulaires. La protéine Bad n'en possède pas et pour expliquer sa translocation à la mitochondrie, il était proposé que l'association de Bad aux membranes mitochondriales soit réalisée *via* la formation de complexes avec Bcl-2 ou BclX<sub>L</sub>. Or, les travaux de Hekman et collaborateurs ont démontré, de façon inattendue, l'association de Bad avec des mitochondries déplétées en protéines, de façon équivalente aux mitochondries non traitées (Hekman et al. 2006). Les résultats de cette étude ont mis à jour la capacité de Bad à interagir avec des lipides avec une haute affinité, et de façon prédominante avec des phospholipides chargés négativement comme les phosphatidylsérines, acides phosphatidiques, et cardiolipides, de même que les liposomes enrichis en cholestérol (Hekman et al. 2006). L'interaction de Bad avec des domaines membranaires a été suggérée dès 2002 par les travaux d'Ayllon et collaborateurs, révélant que les microdomaines membranaires spécialisés dans la transduction de signaux ou radeaux lipidiques ou « Rafts »

**Introduction bibliographique:**  
**De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B**

étaient un nouveau compartiment de séquestration de formes actives de Bad (déphosphorylées), dont la ségrégation était induite lors de la réponse apoptotique (Ayllon et al. 2002). Cette démonstration a été faite sur une lignée lymphocytaire T murine dépendante de la présence d'interleukine-4, et dont l'apoptose est déclenchée par la privation cytokinique, mais ils proposaient une généralisation du concept sous forme du modèle schématisé dans la Figure 14 dans lequel Bad interagit de façon dynamique et caspases dépendantes avec les rafts (Fleischer et al. 2004). D'autres études ont depuis confirmé l'interaction de Bad avec les radeaux lipidiques membranaires, y compris dans notre équipe où la localisation de Bad a été confirmée au niveau des rafts des lymphocytes B murins. Plus précisément, un pool non négligeable de Bad est retrouvé dans les rafts des cellules B matures contrairement aux cellules B immatures, suggérant un rôle de cette ségrégation différentielle dans la plus grande sensibilité à l'apoptose des lymphocytes B immatures comparativement aux cellules matures (Malissein et al. 2006).

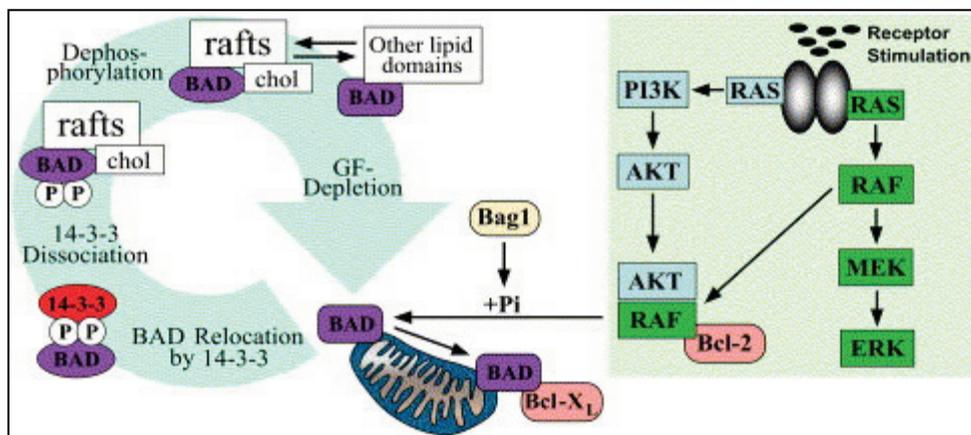


**Figure 14 : Modèle de l'amplification des effets de la déphosphorylation cytoplasmique de Bad.**  
La privation en interleukine-4 (IL-4) induit l'activation de la phosphatase PP1α, qui déphosphoryle à son tour Bad cytoplasmique. Bad déphosphorylée est transloquée vers la mitochondrie et une activation des caspase-9 et -3 s'en suit. Les protéases migrent vers les radeaux entraînant son altération, et, par conséquent, le « pool » de Bad attaché aux rafts est transloqué vers la mitochondrie, amplifiant ainsi la réponse apoptotique. La conséquence finale est la mort de la cellule par apoptose. (Fleischer et al. 2004)

**Introduction bibliographique:**  
**De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B**

---

Finalement, deux domaines de liaison lipidique, LBD1 et LBD2, ont maintenant été identifiés dans la région C-terminale de la protéine Bad. LBD1 englobe la partie C-terminale de l'hélice BH3, et LBD2 est à proximité de l'hélice 5. Les cellules exprimant des mutants de Bad ne pouvant plus interagir avec les lipides par le biais de ces motifs sont résistantes à l'apoptose. Ces motifs sont donc nécessaires à l'activité pro-apoptotique de Bad. Alors que le domaine LBD1 se lie essentiellement aux liposomes riches en cholestérol mimant la structure des rafts, LBD2 se lie préférentiellement à des liposomes chargés négativement reproduisant la structure des membranes mitochondriales (Hekman et al. 2006). Cette interaction avec les phospholipides membranaires ne serait pas dépendante du statut de phosphorylation de Bad et ne nécessiterait pas l'intervention d'autres protéines. Cependant, lorsque Bad est phosphorylée et associée à la protéine 14-3-3, ce complexe n'est pas capable de se lier aux lipides mitochondriaux, alors que sa liaison aux lipides enrichis en cholestérol n'est pas affectée. Cette interaction préférentielle des complexes Bad/14-3-3 avec des domaines enrichis en cholestérol a suggéré un nouveau modèle de régulation du trafic intracellulaire de Bad, qui serait contrôlé par une exposition différentielle des domaines LBD1 et LBD2. Ce modèle a été proposé pour la régulation de Bad impliquant sa phosphorylation par les kinases Raf, mais peut se généraliser. La stimulation des cellules par des facteurs de croissance augmente la phosphorylation de Bad sur les sérines 112, 136 et 155 (nomenclature de mBad). Des isoformes spécifiques de la 14-3-3 se lient à Bad phosphorylée permettant une séquestration temporaire de Bad dans le cytosol, sous forme de complexes Bad/14-3-3. Ces complexes se lieraient préférentiellement aux membranes enrichies en cholestérol (rafts), puis se dissocieraient rapidement, libérant Bad de la 14-3-3, ce qui rendrait Bad plus accessible à des phosphatases comme la calcineurine. Après la déphosphorylation, Bad ne serait plus confinée aux rafts et pourrait diffuser dans la membrane plasmique où elle s'accumulerait. Lors d'un signal d'apoptose, Bad serait à nouveau transloquée à la mitochondrie pour neutraliser la fonction de Bcl-2/BclX<sub>L</sub> (Figure 15) (Hekman et al. 2006; Rapp et al. 2007).



**Figure 15 : Modèle de régulation de Bad par phosphorylation et ses conséquences sur son trafic intracellulaire.** La protéine Bad possède une forte affinité pour les membranes. Phosphorylée, la protéine est complexée à la 14-3-3 et ne peut pas interagir avec la mitochondrie, mais elle peut s'associer sélectivement avec des domaines membranaires riches en cholestérol. Ceci entraîne l'abolition des fonctions pro-apoptotiques de Bad en l'empêchant d'interagir avec Bcl-2 à la membrane externe mitochondriale. (Rapp et al. 2007)

#### **II.4. Le double rôle de Bad: de l'homéostasie cellulaire à l'homéostasie glucidique**

En dehors de la régulation de la balance survie/apoptose au cœur de l'homéostasie cellulaire, plusieurs travaux ont identifié d'autres fonctions pour Bad, comme c'est le cas pour la plupart des molécules de la famille Bcl-2. Ces protéines sont en effet impliquées dans la

**Introduction bibliographique:**  
**De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B**

---

régulation du cycle cellulaire (Zinkel et al. 2006) ou d'autres processus homéostatiques comme celui du  $Ca^{2+}$  (Pinton and Rizzuto 2006) ou l'autophagie (Levine et al. 2008). Ainsi, il a été progressivement suggéré que les membres de la famille Bcl-2 réalisent en permanence des fonctions cellulaires importantes, indépendantes de leur capacité à réguler l'apoptose (Danial and Korsmeyer 2004).

Longtemps considérée comme une molécule apoptotique latente dans les cellules saines, de récentes études démontrent que Bad est en fait une protéine pro-survie avant d'être une protéine pro-apoptotique, un peu comme le cytochrome c, qui est une protéine essentielle dans la mitochondrie, mais qui devient toxique quand elle est larguée dans le cytosol. En effet, le groupe de Korsmeyer a identifié en 2003 un rôle critique pour Bad dans le métabolisme glucidique, qui a bouleversé l'interprétation des fonctions cellulaires de Bad. Le lien entre Bad et le métabolisme glucidique est apparu pour la première fois par l'analyse protéomique de mitochondries hépatiques révélant Bad dans un complexe multiprotéique contenant la protéine kinase PKA, sa protéine d'ancrage WAVE, la phosphatase PP1 et la glucokinase (GK, hexokinase IV), une enzyme clef dans le métabolisme glucidique (Danial et al. 2003). Les résultats de ces travaux ont montré que Bad était nécessaire à l'assemblage du complexe, permettant ainsi l'utilisation du glucose par les cellules, et lui attribuant un rôle clé dans le métabolisme glucidique. Ces données ont été confirmées par l'étude des souris déficientes en Bad dont les mitochondries sont dépourvues de ce complexe et qui présentent une altération du métabolisme respiratoire en réponse au glucose au niveau des cellules hépatiques et des cellules  $\beta$  pancréatiques. Cette nouvelle fonction de Bad est dépendante spécifiquement de sa phosphorylation sur la sérine 155 au niveau du domaine BH3 (Danial et al. 2003). Au niveau de la cellule  $\beta$  pancréatique, la dualité fonctionnelle de Bad s'exprime dans le contrôle de la survie de ces cellules et la réponse insulinique en réponse au glucose. Cette dualité est sous le contrôle du domaine BH3 de Bad. Quand Bad est déphosphorylée, elle met en jeu son domaine BH3 dans une interaction avec Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>, et engage son rôle apoptotique. Lorsque Bad est phosphorylée sur sa sérine 155, Bad engage son domaine BH3 dans une liaison avec la GK ce qui l'active et permet à Bad d'adopter un rôle métabolique (Danial 2008). Ces données créent un lien entre le métabolisme glucidique et la mort cellulaire et soulignent le fort potentiel de Bad dans un ciblage thérapeutique pour le traitement de pathologies allant du diabète aux cancers.

### **II.5. Bad : une sentinelle de la balance survie / apoptose : Bad et lymphomes B.**

Bien que les études *in vitro* aient montré que la surexpression des molécules « BH3-only » dans des types cellulaires variés induit l'apoptose, les modèles animaux de délétion des gènes n'ont pas permis d'obtenir un phénotype universel de défaut d'apoptose. Cela peut s'expliquer en partie par la redondance fonctionnelle entre ces protéines pro-apoptotiques, dont le degré peut varier selon le type cellulaire ou le signal de mort étudié.

En général, Bad a été impliquée dans l'apoptose induite par une privation en facteurs de croissance dans plusieurs types cellulaires, particulièrement les neurones et les cellules du système immunitaire, mais également dans l'apoptose induite par le cisplatine (Hayakawa et al. 2000). La disponibilité des souris surexprimant Bad ou exprimant des mutants constitutivement actifs, non phosphorylables (souris known-in *Bad*<sup>3SA</sup> résultant de la mutation des Ser112, 136 et 155 en alanine) ont permis d'explorer, dans un système *in vivo*, le rôle de la dérégulation de la signalisation de Bad et l'importance de sa phosphorylation dans la balance survie/apoptose.

**Introduction bibliographique:**  
**De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B**

---

De façon intéressante, les souris *Bad*<sup>3SA</sup> sont viables mais présentent des défauts sélectifs dans le développement des lymphocytes B et T marqués par une altération de la survie IL-7-dépendante des pro-B et pro-cellules T et une importante diminution de la cellularité du thymus et la moelle osseuse. La phosphorylation de Bad semble être une composante importante de la survie des cellules T IL7-dépendante (Datta et al. 2002).

Conformément à ces résultats, des souris transgéniques surexprimant Bad dans les cellules T, présentent des anomalies dans le développement et l'apoptose de ces cellules, avec une réduction significative de la cellularité thymique et de la maturation des lymphocytes T (Mok et al. 1999). Ces thymocytes transgéniques sont nettement plus sensibles à l'apoptose induite par une irradiation, la dexaméthasone et des anticorps anti-Fas (Mok et al. 1999). Bien que ces modèles de gain de fonction pointent le rôle physiologique de la protéine Bad dans le développement des cellules T et de l'apoptose, la perte de fonction pro-apoptotique de Bad chez la souris (*Bad*<sup>-/-</sup>) n'est pas associée à des défauts de survie et de développement des thymocytes (Ranger et al. 2003). Ces résultats inattendus peuvent refléter la redondance fonctionnelle entre certaines protéines de la famille « BH3-only » et notamment avec Bim, au cours du développement lymphocytaire (Strasser 2005).

L'ensemble des données obtenues sur les modèles de souris déficientes en Bad ou d'activation constitutive de Bad (souris knock-in *Bad*<sup>3SA</sup>) montrent que la phosphorylation de Bad est un mécanisme majeur, mais pas le seul, par lequel les facteurs de croissance inactivent la machinerie apoptotique. Ainsi, l'état de phosphorylation de Bad réglerait, au niveau de la mitochondrie, le seuil de sensibilité des cellules à l'apoptose (Datta et al. 2002). En plus de ce rôle essentiel, Bad est aussi une sentinelle importante dans la mort induite suite à un phénomène d'hypoxie (Ness et al. 2006).

## **II-5.1 Bad et Cancers**

Alors que les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont considérées comme des proto-oncogènes, réciproquement les membres pro-apoptotiques pourraient fonctionner comme des suppresseurs tumoraux, leur perte de fonction pouvant alors contribuer aux cancers (Egle et al. 2004). Dans ce contexte, les molécules BH3 et notamment Bad, représentent une cible attractive pour des approches thérapeutiques visant à moduler l'apoptose dans ces pathologies (Fernandez-Luna 2008). Ainsi, des modèles animaux de perte de fonction de plusieurs protéines BH3-only ont été associés à une incidence accrue de tumeurs (Labi et al. 2006).

Les lymphocytes T et B des souris *Bad*<sup>3SA</sup> présentent une sensibilisation exacerbée à l'apoptose. À la lumière de ces résultats, on pouvait s'attendre à ce que les souris *Bad*<sup>3SA</sup> soient résistantes au développement de tumeurs (Datta et al. 2002).

Contrairement aux modèles murins, suggérant fortement un rôle de Bad en tant que suppresseur tumoral, peu d'études ont pu relier, chez l'homme, la présence de mutations somatiques dans le gène de Bad avec des cancers. L'une d'entre elles a cependant permis d'identifier 2 mutations importantes de *BAD*, à partir de biopsies de patients atteints d'adénocarcinomes du colon (Lee et al. 2004). Ces 2 mutations non-sens présentes dans 4,3% des cas ont été localisées dans l'exon 2 du gène *BAD* et génèrent des mutations dans le domaine BH3 de Bad. Des études fonctionnelles ont alors été réalisées par transfection de cellules HEK293T avec des plasmides codant pour les protéines sauvages et mutées. Elles montrent que les protéines mutées de Bad sont moins efficaces à induire l'apoptose et

**Introduction bibliographique:**  
**De la protéine Bad aux lymphomes diffus à grandes cellules B**

---

déficientes dans leur capacité à former des hétéro-dimères avec Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>. Leur lien physiologique cependant avec le cancer du colon reste à préciser.

La dérégulation de la signalisation de Bad a été associée à des cancers variés de l'homme comme ceux de l'estomac, du colon, foie, cerveau et système lymphoïde. Ainsi des niveaux élevés des formes phosphorylées de Bad ont été identifiés dans certains cancers comme celui du colon, du cerveau et du sein (Khor et al. 2004; Cannings et al. 2007; Kim et al. 2007). Plus particulièrement une phosphorylation accrue sur les résidus Ser112 et Ser136 a été observée en relation avec une activation constitutive des voies Erk et PI3K/Akt dans la survie cellulaire des cellules tumorales (Samuels and Velculescu 2004). L'inhibition de ces phosphorylations restaure la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose (She et al. 2005). Ainsi, la déphosphorylation de Bad dans les cellules tumorales pourrait contribuer aux effets pro-apoptotiques de certains suppresseurs tumoraux ou de drogues cytotoxiques (Danial 2008). Une étude récente montre clairement que les patientes atteintes d'un cancer du sein dont les cellules tumorales sont caractérisées par une forte expression de Bad ont une meilleure survie suite au traitement par le tamoxifène que celles ayant une expression plus faible de Bad (Cannings et al. 2007). Globalement, ces résultats suggèrent que Bad pourrait jouer un rôle dans certains cancers chez l'homme, soit dans leur développement soit dans leur traitement.

Un ciblage thérapeutique de Bad est finalement de plus en plus envisagé. Pour exemple, les effets sensibilisateurs de Bad à l'apoptose dans les cellules tumorales peuvent être mimés par de petites molécules qui engagent la boucle hydrophobique de Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> et Bcl-w de façon analogue au domaine BH3 de Bad. Ces molécules mimétiques du domaine BH3 de Bad s'annoncent prometteuses dans des effets antitumoraux pour traiter des lymphomes, leucémies et certains carcinomes (Oltersdorf et al. 2005; Deng et al. 2007; Danial 2008).

## **II-5.2 Apport des modèles de souris déficientes : Bad et DLBCL**

La disponibilité des souris déficientes en Bad a permis de rechercher aussi un lien entre la perte de fonction de Bad et l'incidence des tumeurs. L'analyse de ces souris montre une diminution sensible de leur espérance de vie (80% d'animaux vivants à 18 mois) qui a été finalement corrélée à l'apparition de tumeurs. L'analyse histologique a indiqué que les tumeurs malignes les plus importantes dans ces souris sont les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL, Diffuse large B-cell lymphomas) principalement d'origine « centre germinatif » (Ranger et al. 2003). Des tumeurs solides ont également été observées dans ces souris. Le temps de latence du développement tumoral suggère une accumulation de mutations ou d'anomalies secondaires à la délétion de Bad.

Chez l'homme de rares travaux faisaient un lien entre les lymphomes B et notamment les DLBCL, et Bad lors du démarrage de notre thèse. De plus, un examen génétique des altérations de Bad dans les tumeurs malignes humaines n'avait pas permis de mettre en évidence de mutations somatiques de Bad dans ces lymphomes B (Schmitz et al. 2006). Cependant, et de façon paradoxale aux données apportées chez la souris, une forte expression de Bad était observée chez des patients atteints de DLBCL comparativement à d'autres lymphomes non-hodgkiniens (Xerri et al. 1999).

Ces données, bien que parfois contradictoires, font clairement un lien entre Bad et les lymphomes diffus à grandes cellules B, et semblent suggérer que la fonction/présence de Bad pourrait avoir un rôle dans le développement et/ou l'évolution clinique des DLBCL.

### **III- Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL)**

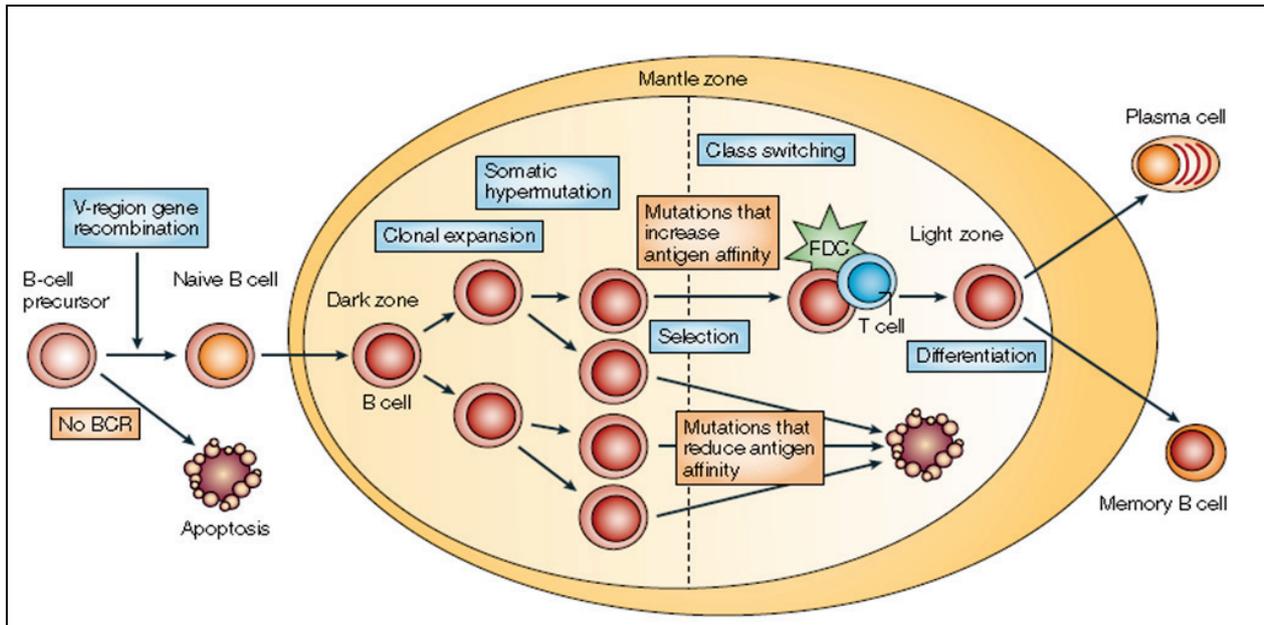
---

D'une façon générale, les lymphomes tendent à être classés en fonction de leur équivalent non tumoral chaque fois que cela est possible. La plupart des lymphomes B dérivent ainsi d'une cellule B normale qui suite à son activation au niveau des organes lymphoïdes périphériques, entame sa différenciation terminale au sein de structures spécialisées appelées centres germinatifs. Cependant, tous les lymphomes ne répondent pas à cette règle et dans ces cas, leurs équivalents non tumoraux n'ont pu être identifiés.

#### **III-1 Rappels sur la formation des centres germinatifs au cours de l'activation des lymphocytes B**

Les lymphocytes B matures naïfs ( $IgM^+/IgD^+$ ) ont une demi-vie de 3 jours. Leur survie passe nécessairement par la rencontre de l'antigène reconnu spécifiquement par leur récepteur à l'Ag ou BCR. Le lymphocyte B circule donc à travers les vaisseaux lymphatiques et sanguins, dans la rate, les ganglions, les tissus lymphoïdes des muqueuses, à la recherche de son « élu » antigénique. L'avenir du lymphocyte B à court terme (48-72 heures) est le suivant : mort cellulaire en l'absence de rencontre de l'antigène, activation lymphocytaire B «T-indépendante», ou réponse «T-dépendante» qui est la forme la plus fréquente d'activation des lymphocytes B (Niuro and Clark 2002). Lorsque cette rencontre a lieu, et que la cellule B reçoit des signaux complémentaires issus de lymphocytes T auxiliaires (phénomène appelé coopération T-B ou activation T-dépendante), les cellules B prolifèrent au sein de follicules secondaires dans les tissus lymphoïdes périphériques comme les ganglions lymphatiques. Ils déterminent alors, après plusieurs jours d'intense prolifération la formation de zones spécialisées, appelées centres germinatifs ou GCs. Les cellules naïves qui constituaient le follicule primaire sont remplacées par des cellules B proliférantes dites de stade GC et le restant des cellules naïves se retrouve déplacé en dehors des GCs, au niveau d'une zone périphérique appelée « le manteau ». Deux zones se différencient au sein des GCs : une zone claire et une zone sombre. La zone sombre est constituée presque exclusivement de cellules B proliférantes (dites centroblastes), et la zone claire est constituée de petites cellules ne se divisant plus (les centrocytes) enchâssées dans un maillage de cellules folliculaires dendritiques (FDC, *Follicular Dendritic Cells*). C'est au niveau de la zone sombre que se produit la fin du processus de maturation des lymphocytes B appelée « maturation d'affinité ». Ce processus est caractérisé par des hypermutations somatiques et aboutit à l'introduction de nombreuses mutations ponctuelles au niveau des régions variables des immunoglobulines (Ig) permettant *in fine* l'augmentation d'affinité de liaison à l'Ag des anticorps sécrétés par les cellules B. Cependant, la plupart des mutations sont désavantageuses pour les cellules B, comme celles qui aboutissent à une baisse d'affinité, celles qui créent une auto-réactivité ou qui génèrent une nouvelle spécificité antigénique. Ainsi plus de 95% des lymphocytes B pénétrant dans un centre germinatif vont mourir (apoptose). Cette forte réponse apoptotique est facilitée par l'absence d'expression de molécules anti-apoptotiques, comme Bcl-2, et la forte expression de facteurs pro-apoptotiques. Seuls les lymphocytes B des GCs, ayant acquis des mutations dans leur BCR augmentant l'affinité pour l'Ag, vont survivre car ils subissent une « sélection positive ». Ce processus de sélection a lieu dans la zone claire, où les cellules B (alors au stade de centrocytes) sont en contact intimes avec des lymphocytes T  $CD4^+$  et des FDC qui leur présentent l'Ag sous forme de complexe immun. Cette sélection positive s'accompagne de

l'émission de signaux de survie (activation de la voie NF- $\kappa$ B, expression de molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2...) émis par le BCR couplés aux signaux de co-stimulation transmis par les cellules T (Martinez-Valdez et al. 1996; Klein et al. 2003; Klein and Dalla-Favera 2008). Une fraction des lymphocytes B ainsi sélectionnés subissent alors la commutation isotypique, permettant la modification de la classe de l'Ig. Finalement, les centrocytes se différencient en cellules B mémoires et en plasmocytes sécréteurs d'Ig et quittent le microenvironnement des GC (Figure 16).

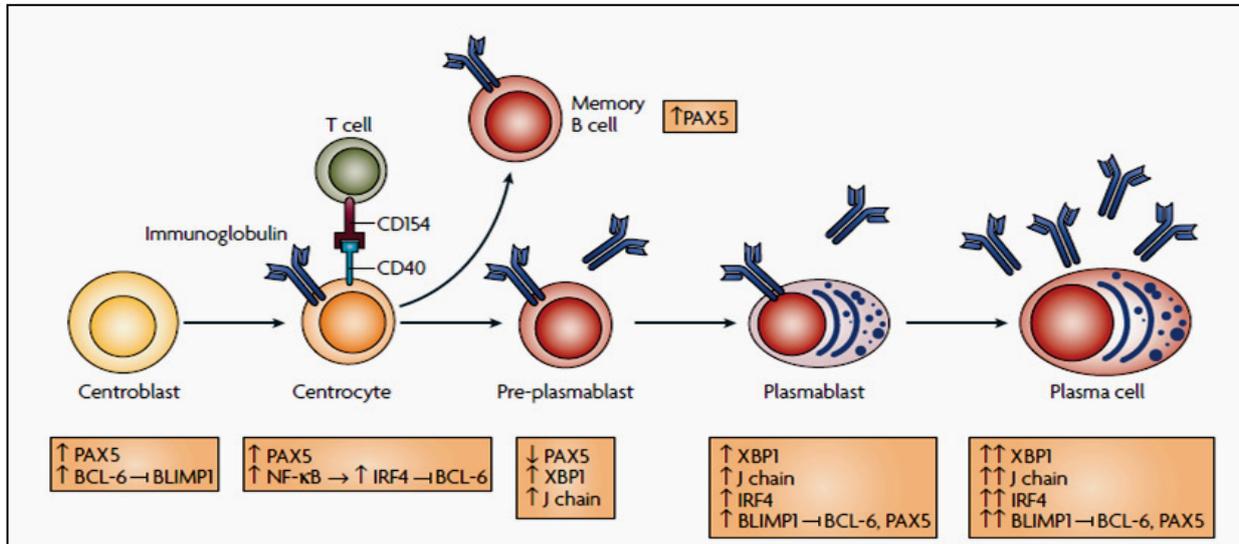


**Figure 16 : Différenciation et activation des cellules B dans le centre germinatif.** Les cellules B matures (naïves) activées par l'antigène subissent, dans la zone sombre du centre germinatif une expansion clonale. Au cours de cette prolifération, les cellules subissent des hypermutations somatiques qui induisent des mutations qui diminuent ou augmentent l'affinité du BCR à l'antigène et migrent dans la zone claire. Cette sélection des cellules s'effectue par l'intermédiaire de la présentation de l'antigène par un réseau de cellules FDC (cellules dendritiques folliculaires) et de cellules Th (cellules T helper). Les cellules avec une affinité réduite pour l'antigène rentrent en apoptose. Les autres subissent une commutation de classe puis se différencient en cellules B mémoires et plasmocytes. (Küppers, 2005)

Les signaux qui induisent la transition depuis le centroblaste soit en cellule plasmocytaire soit en cellule B mémoire sont à ce jour mal connus. Cependant, de nombreux facteurs de transcription ont été identifiés comme des régulateurs importants de certaines étapes avec notamment (figure 17) :

- Bcl-6 : dont le gène a été identifié de par sa translocation dans les lymphomes diffus à grandes cellules, est un répresseur transcriptionnel qui, au stade centroblaste, inhibe les gènes impliqués dans l'activation de la cellule B (CD69, STAT1, CD80), la différenciation plasmocytaire (PRDM1/Blimp-1) et la différenciation en cellules B mémoires (Klein and Dalla-Favera 2008).
- Blimp-1, IRF-4 et XBP1 sont des facteurs indispensables à la différenciation plasmocytaire terminale (Reimold et al. 2001; Klein et al. 2006).

- Pax-5 : semble être un facteur de transcription décisif dans l'orientation vers la différenciation de cellules B mémoires (Klein and Dalla-Favera 2008).



**Figure 17 : Programme transcriptionnel du développement des cellules B du centre germinatif et des cellules post-germinatives.** Ce programme est culminant au niveau de la différenciation des centroblastes. Le centrocyte, à travers la stimulation du CD40 via les cellules T, induit une répression du facteur de transcription BCL6 contrôlé par l'IRF4. Ce stade représenterait un précurseur commun aux cellules B mémoires et aux plasmocytes. (Klein and Dalla-Favera 2008)

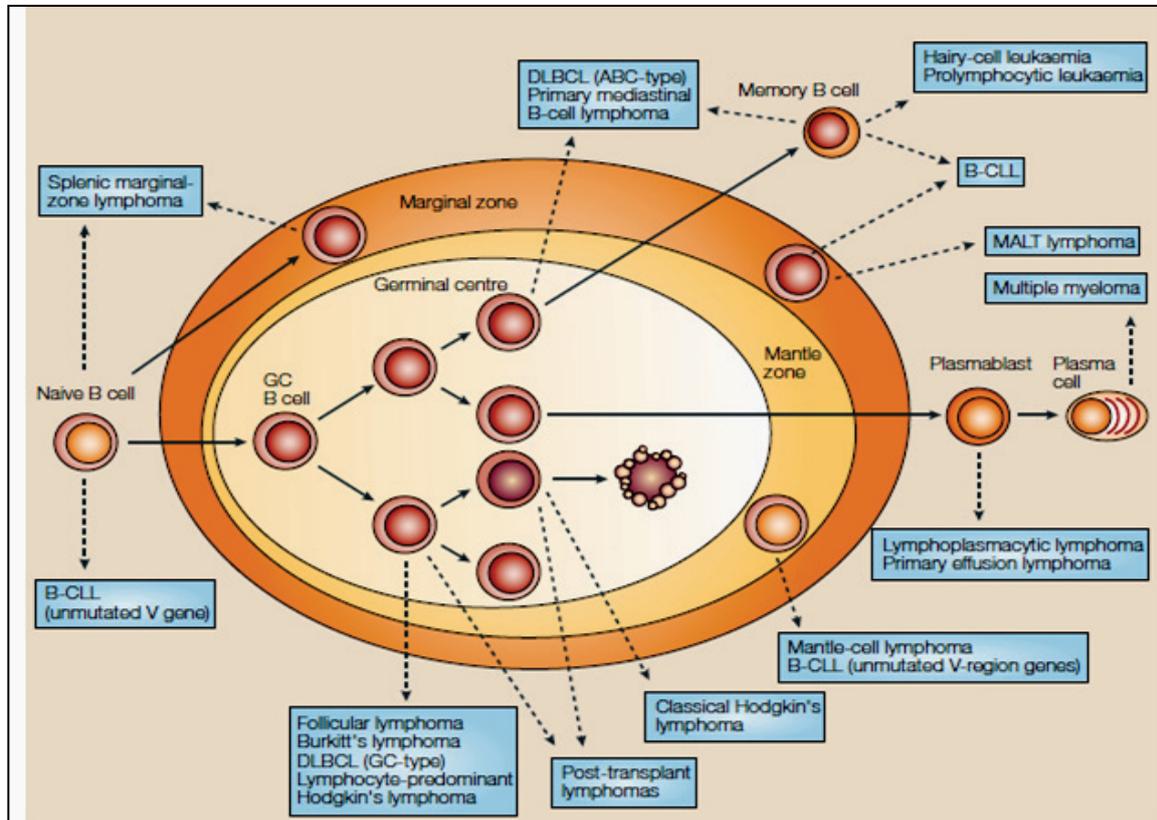
## **III-2. Origine cellulaire et classification des Lymphomes B**

### **III-2.1. Historique sur la classification des lymphomes**

La classification des lymphomes a largement évolué au cours des années. La première classification que l'on doit à Rappaport *et al* était exclusivement basée sur l'architecture et la morphologie des cellules. L'émergence des connaissances de la « biologie des lymphocytes » a laissé la place au système de Kiel et Lukes-Collins en 1974 et à la formulation de travail pour usage clinique (WF) en 1982 (National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project 1982). La classification WF des tumeurs était basée sur la taille des cellules, les caractéristiques ganglionnaires et la morphologie permettant d'assigner un grade de malignité. La classification révisée Européenne – Américaine des lymphomes (REAL) est publiée en 1994. Elle ajoute les caractéristiques génétiques et immunophénotypiques, et intègre aussi les données issues des cas cliniques et des traitements (Harris et al. 1994). Puis en 2001, REAL a laissé la place à la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou WHO – *World Health Organization*), qui en a repris les principes en l'étendant à l'ensemble des cancers hématologiques, et publia le premier livre de la classification des hémopathies malignes (Harris and Isaacson 1999). Cette classification a été mise à jour en 2008 (Jaffe et al. 2008). Parmi les lymphomes diagnostiqués, 90 % sont d'origine B, les autres dérivant d'une cellule T ou NK.

### III-2.2. Classification des lymphomes B

Le principe de la classification des lymphomes B repose sur l'observation que les cellules B tumorales dérivent d'un stade particulier de la différenciation normale des lymphocytes B. De ces observations, a émergé le concept que la plupart des lymphomes B dérivent d'une cellule B du centre germinatif (GC) ou post-centre germinatif (post-GC) (Kuppers et al. 1999; Stevenson et al. 2001; Kuppers et al.).



**Figure 18 : Origine cellulaire des cellules B des différentes classes de lymphomes.** DLBCL: Diffuse large B cell lymphoma. ABC: Activated B cells. B-CLL: B cell chronic lymphocytic leukemia. MALT: Extranodal mucosa-associated lymphoid tissue. GC: germinal center. (Küppers, 2005).

Les principaux types de lymphomes B sont répertoriés dans la figure 18 qui relie le type de lymphome à sa contrepartie non-tumorale. Plus de 15 types de lymphomes B sont actuellement répertoriés par la classification de l'organisation mondiale de la santé des tumeurs de tissus hématopoïétiques et lymphoïdes (Swerdlow et al. 2008). Les entités les plus fréquentes sont les lymphomes diffus à grandes cellules B, les lymphomes folliculaires, les lymphomes diffus lymphocytiques de type leucémie lymphoïde chronique (LLC), les lymphomes de la zone marginale de type MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) et les lymphomes du manteau. La plupart des LNH B (les lymphomes folliculaires, les lymphomes diffus à grandes cellules B, les lymphomes de la zone marginale de type MALT, et les lymphomes lymphoplasmocytaires) présentent des mutations somatiques et sont dérivés de cellules du centre germinatif ou de cellules B mémoires (post-centre germinatif). Les autres correspondent aux lymphomes du manteau et à certains LNH de type LLC qui, dépourvus de mutations des gènes d'Ig, apparaissent dérivés de cellules naïves prégerminatives (Kuppers et al.; Kuppers 2005).

### **III-3. Présentation générale des lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL)**

Les DLBCL sont les plus communs des lymphomes à travers le monde, représentant 40% des 55000 nouveaux cas détectés chaque année. Ils sont aussi les plus fréquents des LNH, les cinquièmes cancers les plus détectés. Ils représentent 30% de tous les LNH de l'adulte. L'âge moyen au diagnostic est de 70 ans mais ce lymphome peut survenir chez l'adulte jeune et même chez l'enfant.

Les DLBCL sont très hétérogènes, biologiquement et cliniquement. Il s'agit de prolifération diffuse de grandes cellules B survenant *de novo* ou dans un contexte de lymphomes de faible grade histologique de malignité. Les DLBCL sont ainsi nommés car les lymphocytes B tumoraux diffusent et effacent l'architecture des ganglions lymphoïdes. Les formes à présentation extraganglionnaire (digestive, amygdalienne, cérébrale, cutanée...) sont fréquentes. Dans la majorité des cas, les DLBCL surviennent chez des patients sans déficit immunitaire connu ; ils peuvent également être observés dans un contexte d'immunosuppression (patients VIH<sup>+</sup>, traitements immunosuppresseurs).

Dès la classification REAL, les DLBCL ont été répertoriés comme un groupe hétérogène de tumeurs. On observait dans ce groupe plusieurs entités clinicopathologiques avec des caractéristiques morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et cliniques propres. Les cellules sont grandes et ont des morphologies variables (centroblastiques, immunoblastiques, anaplasique, riches en cellules T ou histiocytes) (Harris et al. 1994; Gatter et al. 2002). Cette grande diversité morphologique est encore retrouvée dans la récente mise à jour de la classification WHO en 2008 qui a cependant tenté de clarifier la situation en définissant des entités dans le groupe des DLBCL. Cependant, la très grande majorité des DLBCL reste un groupe hétérogène de lymphomes agressifs qui continuent d'être identifiés sur la base de la taille importante du noyau des cellules B tumorales (Gurbuxani et al. 2009).

### **III-4 Pathogénicité des DLBCL : aspects cytogénétiques**

Tout comme d'autres types de cancers, la pathogenèse du DLBCL est un processus à « multiples étapes ». Elle est due à une accumulation de multiples lésions génétiques et moléculaires qui entraînent la sélection d'un clone malin. De nombreuses anomalies cytogénétiques récurrentes ont été décrites dans le DLBCL. Aucune n'est cependant strictement spécifique. On distingue (figure 19) des translocations chromosomiales, des dérégulations dans les mécanismes d'hypermutation somatique ou toutes autres dérégulations communes retrouvées dans cette sélection (amplification, délétions, mutations de gènes) (Abramson and Shipp 2005; Lossos 2005; Gurbuxani et al. 2009). Toutes ces modifications, qui concernent majoritairement les gènes *BCL-2*, *BCL-6*, et *C-MYC*, contribuent au processus complexe de la pathogenèse moléculaire du DLBCL.

#### **III-4.1 Translocations chromosomiques**

La présence récurrente de translocations chromosomiales impliquant *C-MYC* (Akasaka et al. 2000), *BCL2* (Huang et al. 2002) et *BCL6* (Ye et al. 1993) a été démontrée dans les DLBCL. Ces translocations sont issues de recombinaisons illégitimes au moment du réarrangement du segment VDJ, du switch de classe et du processus d'hypermutation somatique des gènes des Ig.

**BCL-6**: Les translocations chromosomiales, sur le locus 3q27 du gène *BCL6*, sont les plus caractéristiques et communes des anomalies génétiques détectées dans les DLBCL (35 à 40%)

(Lossos 2005). Les partenaires les plus souvent impliqués sont les gènes des Ig sur les régions chromosomiques 14q32, 2p12 et 22q11 mais plus d'une vingtaine d'autres *loci* alternatifs peuvent jouer un rôle. On appelle ce phénomène une « translocation de promiscuité » (Akasaka et al. 2000). La fusion des partenaires est initiée à partir du promoteur hétérologue contenant les exons codant de *BCL-6* intacts. L'expression du gène *BCL6* est finement régulée au cours de la différenciation des cellules B et est restreinte aux cellules B du CG (Klein and Dalla-Favera 2008). La régulation négative de ce gène pourrait être nécessaire à la sortie des cellules B du microenvironnement des centres germinatifs et leur différenciation en cellules B mémoires. Au contraire, dans les DLBCL, sa dérégulation pourrait engendrer un arrêt de la différenciation, favoriser la survie et la prolifération cellulaire, et une instabilité génétique, l'ensemble conduisant finalement à la transformation néoplasique.

***BCL-2***: C'est un proto-oncogène situé en 18q21. La protéine Bcl-2 est anti-apoptotique et joue un rôle important dans le développement normal et la différenciation des cellules B (McDonnell et al. 1989; Strasser et al. 1990; Merino et al. 1994). Sa surexpression dans les lymphocytes B du fait d'une translocation t(14;18), amenant *BCL2* sous le contrôle des promoteurs des gènes des Ig, favorise la survie des cellules B tumorales et entraîne des résistances chimiothérapeutiques. L'expression de *BCL2* est normalement négativement régulée dans les GC, où l'apoptose joue un rôle crucial dans la sélection négative des lymphocytes B visant à éliminer notamment les cellules B auto-réactives produites, suite lors du processus de maturation d'affinité. La dérégulation de *BCL2* est le plus communément associée à une t(14;18) qui est présente dans 13% des cas de DLBCL (Gascoyne 1997; Kramer et al. 1998). Cependant, l'expression de la protéine Bcl-2 peut être détectée dans environ 50% des DLBCL, indépendamment de cette translocation. De manière intéressante, une augmentation de l'expression de la protéine Bcl-2 est associée à un pronostic défavorable, bien que la t(14;18) seule ne soit pas une donnée prédictive (Abramson and Shipp 2005).

***cMYC***: est un facteur de transcription associé au lymphome de Burkitt. Une dérégulation de *cMYC* est approximativement observée dans 15% des cas de DLBCL (Kramer et al. 1998), cependant la plupart de ces cas peuvent représenter des lymphomes de Burkitt, la distinction entre les 2 étant difficile. Cette anomalie est le plus souvent due à une translocation t(8;14) qui amène le gène *cMYC* en position 8q24 sous le contrôle d'un promoteur des gènes d'immunoglobuline. Les effets des réarrangements du gène *cMYC* sur la survie cellulaire ne sont pas encore très clairs (Kramer et al. 1998).

### **III-4.2 Hypermutations somatiques aberrantes**

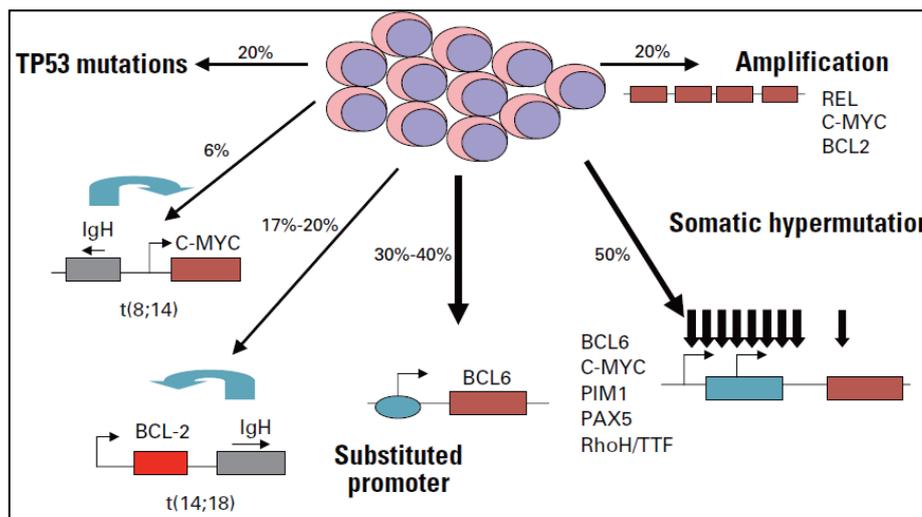
Dans le CG normal, les phénomènes d'hypermutations somatiques ne sont pas restreints aux gènes d'Ig mais touchent aussi les régions 5' d'autres gènes dont *BCL6*, *FAS/CD95* et *CD79*, un composant du complexe de signalisation du BCR (Pasqualucci et al. 1998; Gordon et al. 2003). Bien que les mutations survenues sur les gènes d'Ig permettent une maturation d'affinité des anticorps pour leurs antigènes cibles au moment de la sélection des cellules B, les mutations somatiques dans d'autres gènes des lymphocytes normaux du CG ne sont pas expliquées. Dans 50% des DLBCL, les mécanismes d'hypermutations somatiques fonctionnent mal et pourraient être un rouage additionnel à la pathogénèse du DLBCL (Pasqualucci et al. 2001). Typiquement, des hypermutations somatiques ont été mises en évidence dans les DLBCL (Lossos and Levy 2000; Kuppers 2003) et au niveau des régions 5' d'autres gènes, comme les proto-oncogène *BCL6*, *C-MYC*, *PIMI*, *PAX5*, *RhoH/TTF* qui interviennent au cours de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de la transduction du signal (Pasqualucci et al. 2001; Abramson and Shipp 2005). Des mutations du récepteur de

mort Fas ont été aussi observées dans 20 % des DLCBL, la plupart du temps au niveau du dernier exon qui code pour le domaine de mort. Ces mutations peuvent être considérées comme des dominantes négatives déstabilisant le complexe trimérique formé par le récepteur Fas (Muschen et al. 2002). La perte de Fas engendre un abandon de la maturation d'affinité et l'échec de la sélection des cellules B autoréactives conduisant à des maladies auto-immunes et à la persistance de clones malins. En effet, des souris mutées pour Fas et son ligand développent des lymphomes B (Davidson et al. 1998; Straus et al. 2001; Muschen et al. 2002).

### III-4.3 Autres anomalies cytogénétiques

***P53(TP53)***: Apparue comme un évènement isolé dans les DLCBL, la mutation du gène suppresseur de tumeur *p53*, localisé sur le chromosome 17p, et sa délétion sont associées à de mauvais pronostics. En effet, les mutations de *p53*, dans les modèles animaux sont corrélées avec l'incidence de cancers des cellules B (Ichikawa et al. 1997; Leroy et al. 2002).

Parmi les autres anomalies décrites dans les DLBCL, citons des sites d'amplification dont ceux contenant des proto-oncogènes comme *REL*, *C-MYC* et *BCL2*, ou des délétions / amplifications géniques dont la cible et le lien avec la pathogénicité des DLBCL n'a pas toujours été identifié (Lossos 2005).



**Figure 19: Modélisation de la pathogenèse des lymphomes diffus à grandes cellules B.** Il s'agit d'une représentation schématique des lésions génétiques acquises par les lymphocytes au cours du processus de transformation en DLBCL. Seules les plus communes et leurs fréquences sont représentées. (Lossos 2005)

### III-5 Origine cellulaire, Caractérisation histologique et sous types

#### III-5.1 Origine cellulaire

Les DLBCL proviendraient de cellules B normales activées suite à la rencontre avec un antigène, et qui seraient soit à un stade centre germinatif soit à un stade post-centre germinatif.

La comparaison des caractéristiques biologiques, de marqueurs de surface et du profil d'expression génique d'un type de lymphome, aux différents stades de maturation des lymphocytes B normaux permet de supposer à quel stade la transformation de la cellule B a pu intervenir. La présence de mutations somatiques dans la région variable (V) des gènes des immunoglobulines (Ig) est communément utilisée comme marqueur de transition, au moment du passage de la cellule du centre pré-germinatif au centre germinatif (Stevenson et al. 1998). De plus, l'observation d'une hétérogénéité intraclonale dans les mutations des gènes des Ig est perçue comme un marqueur de mutations somatiques en cours, ce qui se produit presque exclusivement dans les GCs et par conséquent constitue un marqueur de l'origine des GCs (Lossos 2005).

Comme leur versant non-tumoral, les cellules de ces lymphomes expriment les marqueurs classiques des cellules B (CD19, CD20, CD22, CD79a) et souvent des Ig de surface (50% à 70% des cas) (Harris et al. 1994; Gatter et al. 2002). La présence de mutations dans les gènes des Ig a été révélée dans des DLBCL suggérant une pression de sélection par l'antigène dans la majorité des tumeurs (Ottensmeier et al. 1998). L'analyse de l'hétérogénéité intraclonale des gènes des Ig a démontré l'existence de deux sous-groupes de DLBCL, l'un avec, et l'autre sans mutations somatiques en cours. Ces données évoquent une origine cellulaire différente, quant-à la provenance de ces lymphomes, une origine GC et une post-GC (Lossos). Ces données corroborent les études immunohistochimiques précédentes qui avaient relaté une expression hétérogène des marqueurs des centres germinatifs (CD10 et BCL-6) dans les tumeurs de DLBCL (Hans et al. 2004).

### **III-5.2 Aspects immunohistochimiques: profils d'expression génique**

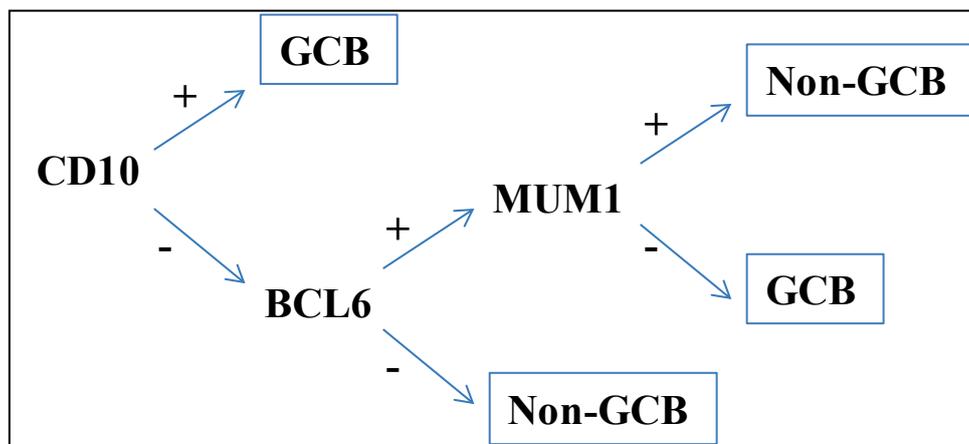
A côté des 4 variantes principales de DLBCL différenciées sur des bases morphologiques (centroblastique, immunoblastique, anaplasique, riche en cellules T ou histiocytes), les analyses réalisées à partir des années 2000 par *microarray* ont permis de stratifier ce groupe de lymphomes en sous-types, de pronostics différents.

#### **III-5.2.1 Signature « ABC/GCB »**

La première étude ayant démontré une hétérogénéité des profils d'expression génique de ces lymphomes est celle d'Alizadeh et collaborateurs publiée en 2000. Cette première approche visant à analyser 40 patients nouvellement diagnostiqués était basée sur l'utilisation de micropuces à ADNc et sur une étude de biostatistique non-supervisée (c'est-à-dire ne tenant pas compte de l'évolution clinique). Elle a permis d'identifier deux formes moléculaires distinctes de DLBCL. Ces 2 sous-groupes étaient caractérisés par des profils d'expressions géniques ou « signatures géniques » distincts indiquant des stades différents de différenciation des cellules B. Le premier correspond à des gènes caractéristiques des cellules B issues du centre germinatif comme CD10 et *BCL6*, la « signature génique » est dite de type centre germinatif ou type GCB (Germinal Center B-like DLBCL). Le second groupe est caractérisé par des gènes qui sont normalement induits, *in vitro*, au cours de l'activation des cellules B périphériques du sang comme MUM1/IRF4; la signature de ce 2<sup>e</sup> groupe est dite de type « cellules B activées » ou type ABC (Activated B-like DLBCL) (Alizadeh et al. 2000). Ces 2 profils d'expression génique semblaient refléter les variations dans les taux de prolifération tumorale, la réponse du patient et l'état de différenciation de la tumeur. Cette nouvelle stratification a été, de plus, corrélée à la survie globale des patients puisque les patients avec un DLBCL de type GCB ont une survie globale significativement meilleure (60%) que les patients de DLBCL de type ABC (30%) (Wright et al. 2003). Ce marqueur de

pronostic est indépendant des facteurs classiques de pronostic clinique (Atkins 1994; Rosenwald et al. 2002). De plus, aucune corrélation n'a été retrouvée entre ces sous-groupes et les différents variants morphologiques listés dans la classification WHO (De Paepe and De Wolf-Peeters 2007).

Une analyse ultérieure sur un plus grand nombre de cas a confirmé l'existence de ces 2 entités principales, tout en isolant un troisième sous-groupe se définissant par un profil d'expression génique hétérogène. Les DLBCL de ce groupe n'expriment pas à haut niveau les gènes caractéristiques retrouvés dans les deux autres groupes. La survie globale des patients de ce 3<sup>e</sup> type est faible, comme le type ABC. Ce groupe n'a pas été davantage étudié (Hans et al. 2004; De Paepe and De Wolf-Peeters 2007). Ces travaux ont abouti au développement d'outils validés par une méthode de référence immunohistochimique. Cette méthode, largement utilisée en routine hospitalière, est la méthode de classification des DLBCL selon Hans (Figure 20) (Hans et al. 2004).



**Figure 20 : Classification des DLBCL selon Hans. (Hans et al. 2004)**

Selon ce modèle, ou « algorithme de Hans », les DLBCL caractérisés par l'expression de CD10 sont classés dans le sous-groupe GCB. De plus, les cas où l'expression du CD10 est négative mais celle de Bcl-6 positive et MUM1/IRF4 négative sont aussi considérés comme des DLBCL de type GCB. Tous les autres cas sont considérés de type non GCB, la grande majorité d'autres eux étant de type ABC et caractérisés par l'expression négative de CD10 en présence d'une expression positive de MUM1/IRF4 (Hans et al. 2004; Muris et al. 2006)

L'expression des gènes définissant les sous groupes de DLBCL ne correspond pas seulement aux différents stades de maturation dont les cellules tumorales dérivent, mais aussi probablement à divers mécanismes de la transformation maligne et de la biologie des cellules tumorales.

Ainsi, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est exprimée dans la très grande majorité des DLBCL (jusqu'à 80% des cas). Bien que les différences d'expression de cette protéine ne soient pas établies clairement entre les 2 groupes GCB/ABC, le mécanisme de cette expression dans ces 2 sous-groupes est distinct. Les DLBCL de type GCB sont fréquemment associés à la translocation t(14 ;18)(q32 ;q21) qui place le gène *BCL2* sous le contrôle des promoteurs des gènes des chaînes lourdes des Ig aboutissant à sa surexpression. Une forte expression de Bcl-2 peut aussi résulter d'une amplification du gène *BCL2*, un phénomène observé dans 30% des DLBCL (Monni et al. 1997), généralement ceux du sous-groupe ABC.

Le sous-type ABC est, contrairement au sous-type GCB, caractérisé par une activation constitutive de la voie de survie NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa B*) (Davis et al. 2001). En effet, une forte expression des gènes cibles du facteur de transcription NF- $\kappa$ B est observée

uniquement dans des lignées cellulaires de types ABC. NF- $\kappa$ B est habituellement retenu, sous forme inactive dans le cytoplasme grâce à sa liaison avec des membres de la famille de la protéine I $\kappa$ B (*Inhibitor kappa B*). En réponse à divers signaux, les membres de la famille I $\kappa$ B sont phosphorylés par la kinase d'I $\kappa$ B (IKK) ce qui aboutit à leur dégradation par le protéasome. On a alors une translocation de NF- $\kappa$ B au noyau et une activation de la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération, de l'apoptose et la survie cellulaire. Les cellules issues du groupe ABC possèdent une activité constitutive d'IKK, ce qui explique l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B. L'inhibition de IKK est cytotoxique pour ces cellules mais pas pour les cellules issues du groupe GCB (Lossos 2005).

PDE4B est une AMP cyclique phosphodiesterase fortement exprimée dans les DLBCL de type ABC (Alizadeh et al. 2000; Smith et al. 2005). Celle-ci inactive l'AMPc, un second messager qui module plusieurs voies de signalisation et induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules B. Les DLBCL exprimant de forts niveaux de PDE4B sont souvent des tumeurs réfractaires aux traitements. Elles seraient notamment résistantes à l'apoptose induite par l'AMPc, ce qui expliquerait en partie leur pronostic moins favorable (Smith et al. 2005).

L'observation de toutes ces différences biologiques et moléculaires, entre les DLBCL de type GCB et ABC peut permettre de comprendre en partie les différences de pronostics existants entre les patients des 2 sous-groupes, après un traitement avec une polychimiothérapie standard.

### **III-5.2.2 Vers une signature « stromale »**

Du fait de la grande hétérogénéité génétique et de la variabilité histologique des DLBCL, un certain nombre de sous-types additionnels restent probablement à définir.

Ainsi, une autre approche de l'hétérogénéité transcriptionnelle des DLBCL a identifié 3 groupes fonctionnels de DLBCL à partir de l'analyse de 33 000 gènes (Monti et al. 2005), le groupe « phosphorylation oxydative », le groupe « BCR /prolifération » et le groupe « réponse de l'hôte ».

- Le groupe « phosphorylation oxydative » définit des DLBCL qui expriment fortement les gènes responsables des fonctions mitochondriales, de la chaîne de transport des électrons, de la phosphorylation oxydative, de la régulation de l'apoptose et de la dégradation via le protéasome. Ce sous-groupe est fréquemment associé à la translocation t(14;18) dérégulant l'expression du gène *BCL2*.
- Le groupe « BCR/prolifération » est caractérisé par les DLBCL avec une expression importante des gènes régulant le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la division cellulaire et les acteurs moléculaires de la voie de signalisation du BCR. Ce sous-groupe est associé aux réarrangements du gène *BCL6*.
- Et enfin, le troisième, « réponse de l'hôte », dont la signature est plus largement déterminée par la réponse inflammatoire du patient que par les cellules B tumorales, regroupe les DLBCL marqués par la surexpression de gènes impliqués dans l'activation du récepteur des cellules T, des cellules NK, la maturation des cellules dendritiques, l'adhésion cellulaire et la chimiotaxie, la cascade d'activation du complément et de cytokines (Monti et al. 2005).

Cette sous-division, bien que n'ayant pas permis de la corréler à des différences de survie des patients, a cependant ouvert un champ nouveau d'investigations pour commencer à comprendre le rôle de la défense immunitaire de l'hôte dans les DLBCL.

L'arrivée des nouveaux traitements a relancé le débat et les recherches. En effet, si l'association du Rituximab (R) à la polychimiothérapie CHOP ou R-CHOP (voir paragraphe « Traitements ») a permis d'augmenter significativement la survie des patients atteints de DLBCL, elle a rendu cependant confuses les corrélations établies entre l'expression des signatures génomiques ABC/GCB avec la survie (Brusamolino et al. 2008). Finalement, une étude récente a exploré le rôle de la nature du microenvironnement tumoral dans la survie des patients (Lenz et al. 2008). Cette étude qui incluait 181 patients ayant reçu uniquement la polychimiothérapie CHOP et 233 patients traités au R-CHOP a permis de mettre en évidence 2 nouvelles signatures, la « stromale-1 » et la « stromale-2 » prédictives de la survie dans les 2 groupes de patients analysés. Ces 2 signatures reflètent les caractéristiques des cellules non tumorales dans le DLBCL.

La signature « stromale-1 » est la plus favorable pour le pronostic ; elle correspond à des gènes exprimés de façon coordonnée dans beaucoup de tissus normaux mésenchymateux, la plupart étant des gènes codant pour des protéines qui constituent ou modifient la matrice extracellulaire (fibronectine, ostéonectine, collagènes et laminines, thrombospondine, MMP, TIMP...) ou des gènes exprimés par des cellules de la lignée monocyttaire (*CEBPA*, *CSF2RA*). Cette première signature reflète ainsi, le remodelage de la matrice extra-cellulaire et l'infiltration histiocyttaire.

Par contre, la signature « stromale-2 » est la plus défavorable pour la survie des patients. Elle est caractérisée par des gènes qui codent pour des marqueurs connus des cellules endothéliales (Willebrand factor, CD31, EGFL7...) ou des régulateurs de l'angiogenèse (KDR, VEGF, GRB10...) ou encore des gènes exclusivement exprimés dans les adipocytes (*ADIPOQ*, *FABP4*...). Cette signature refléterait la densité de la vascularisation tumorale. Ainsi, il a été observé que les DLBCL avec une forte expression de cette signature étaient effectivement associés à une augmentation de la densité des vaisseaux sanguins au niveau de la tumeur et à un pronostic défavorable.

Cette dernière étude a reconnu pour la première fois l'importance du stroma tumoral dans l'invasion tumorale, la progression de la maladie et le devenir clinique des patients atteints de DLBCL. Elle met aussi en avant la nécessité de prendre en compte pour de futures stratégies thérapeutiques le microenvironnement tumoral et les défenses de l'hôte.

### **III- 6. Facteurs de pronostic**

#### **III-6.1 Index pronostique international**

Plusieurs études ont démontré que le devenir des patients atteints de lymphomes, et particulièrement un DLBCL, est associé avec « l'image » clinique au moment du diagnostic. Des facteurs essentiels qui permettent, dans une certaine mesure, de prévoir l'évolution de la maladie et l'efficacité du traitement ont donc été mis en place. Ils témoignent de l'agressivité de la maladie, de son extension et de la capacité du malade à supporter la maladie ou les effets secondaires des traitements. Ils sont étudiés lors du bilan initial de la maladie, les plus pertinents d'entre eux servent à adapter le traitement.

Les index pronostiques sont des combinaisons de facteurs pronostiques qui permettent d'établir un score dont le but est de prévoir l'évolution du lymphome et donc de déterminer le meilleur traitement à entreprendre.

Divers modèles pronostiques ont été proposés mais celui qui a été retenu est l'index pronostique international (, 1993, 1993) établi à partir d'une étude internationale menée par

les plus grands groupes d'étude sur les lymphomes intégrant les données obtenues à partir de plus de 4000 malades (Shipp 1992). En étude multiparamétrique 5 facteurs ont été retenus:

- L'âge (moins de 60 ans / plus de 60 ans)
- Le taux de lactico-déshydrogénase dans le sang (normal / élevé) qui témoigne de la masse de la tumeur et de son agressivité.
- L'état général du malade (ECOG 0-1 / 2-4) au moment du diagnostic témoignant de sa capacité à supporter la maladie. Afin de pouvoir chiffrer l'état général, il a été créé des « échelles de performance ». La plus utilisée est l'échelle ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) qui va de 0 à 4.
- Le stade clinique plus ou moins avancé (I-II / III-IV)
- Le nombre d'atteinte des organes (0 ou 1 / plus de 1)

Pour calculer l'IPI, on additionne le nombre de facteurs défavorables, il varie donc de 0 à 5 avec : des catégories dites de risque faible (0 ou 1 facteur), faible-intermédiaire (2 facteurs), intermédiaire-élevé (3 facteurs) ou élevé (4 ou 5 facteurs). Le taux de rémission complète et la survie à 5 ans sont clairement différents en fonction de ce score. Etant donné l'importance de l'âge, c'est l'IPI adapté à l'âge qui est le plus fréquemment utilisé.

### **III-6.2 Autres facteurs de pronostic**

De nombreuses études ont été réalisées et sont en cours pour rechercher des facteurs biologiques qui permettent de prédire la gravité du lymphome. Comme on l'a évoqué précédemment, le profil d'expression des gènes a permis de catégoriser 2 types de DLBCL, GCB/ABC, dont le diagnostic diffère, même si cela n'est pas admis par tous les auteurs. Parmi les marqueurs de l'apoptose, les molécules anti-apoptotiques ont été les plus étudiées avec les travaux sur Bcl-2 dont on a vu que l'expression avait été corrélée avec la survie chez les patients traités par polychimiothérapie CHOP (Hermine et al. 1996; Iqbal et al. 2006).

Les candidats pour de nouveaux facteurs pronostiques biologiques concernent des anomalies génétiques des cellules lymphomateuses, le dérèglement de certains gènes ou au niveau de facteurs présents dans le sang. Actuellement, aucun de ces facteurs n'est reconnu de manière universelle. On espère également que ces marqueurs permettront de faire découvrir de nouveaux traitements, plus efficaces et plus spécifiques.

Enfin il se peut que les nouveaux traitements viennent abroger la signification péjorative de certains facteurs pronostiques, comme on a pu le constater pour Bcl-2 avec l'arrivée du Rituximab (Mounier et al. 2003; Wilson et al. 2007).

### **III-7. Traitements**

La plupart des traitements anti-cancéreux et notamment les chimiothérapies ciblent notamment l'apoptose dans leurs effets cytotoxiques, et des résistances sont souvent liées à un dysfonctionnement de ce processus au niveau des cellules tumorales (Lowe and Lin 2000; Zhivotovsky and Orrenius 2003).

Environ 2/3 des patients atteints de DLBCL ont une maladie déjà étendue au diagnostic et la nature agressive de ce lymphome fait qu'il est rapidement fatal si les patients ne sont pas traités. Malgré les avancées thérapeutiques récentes (immunothérapie en combinaison avec la chimiothérapie conventionnelle) dans la prise en charge et la survie des

patients, ces traitements ne sont pas applicables à tous, beaucoup meurent encore de cette maladie.

### **III-7.1 Avant l'ère du Rituximab : Polychimiothérapie CHOP**

Les premiers succès de thérapies sur des stades avancés de DLBCL ont été reportés en 1972 (Levitt et al. 1972). La chimiothérapie la plus utilisée est le CHOP, association de cyclophosphamide, de doxorubicine, de vincristine et de prednisone. Elle était considérée comme la thérapie standard basée sur 2 phases d'études dans lesquelles approximativement 35% des patients guérissaient de cette maladie (Elias et al. 1978). Les études multicentriques successives ont montré par la suite que le schéma CHOP permettait de façon reproductible et avec un suivi à très long terme (12 ans) d'obtenir un taux de réponse complète de 45 à 55 %, et un taux de guérison de l'ordre de 35% (Coltman 1986). Par la suite, des protocoles dits de 2<sup>e</sup> et de 3<sup>e</sup> génération ont été développés en augmentant le nombre de médicaments. Bien que plus complexes, ils ont donné lieu à des résultats supérieurs à ceux du CHOP, avec une efficacité 55 à 65 % sur les patients. Hélas, malgré ces résultats encourageants, les études multicentriques et randomisées ne montrent pas d'effets différents sur le taux de réponse complète ou partielle, et sur la survie globale à 3 ans en comparaison avec la polychimiothérapie CHOP (Gordon et al. 1992; Fisher et al. 1994). Celle-ci est alors devenue le traitement standard (« gold-standard ») pour traiter les patients atteints de DLBCL, bien que les résultats soient encore insuffisants (au mieux 40% des patients pouvaient être guéris) et son efficacité parfois discutable, notamment pour les jeunes malades.

Au cours des dix dernières années de nombreux essais cherchent à améliorer le traitement CHOP (Coiffier 2005). Le respect de la dose-intensité étant un élément essentiel du succès thérapeutique dans les lymphomes agressifs, plusieurs améliorations étaient basées sur ce principe (augmentation de la dose, réduction de l'intervalle entre les cures, association de la radiothérapie, chimiothérapie à drogues multiples...). Même si ces traitements n'ont pas pu être largement applicables à tous les patients, ils ont montré leur efficacité dans certains cas. Le développement de tels protocoles, dérivés ou complémentaires au traitement CHOP, dont certains sont en phase II ou III d'essais cliniques, doit être poursuivi notamment pour les patients présentant un risque élevé de lymphomes, les sujets âgés et les malades qui restent insensibles à la thérapie associant le rituximab au CHOP (R-CHOP) (Coiffier 2003; Coiffier and Reyes 2005; Bosly et al. 2008).

### **III-7.2 Le Rituximab**

#### **III-7.2.1 Définition, structure**

Le Rituximab est utilisé entre autre dans le traitement des lymphomes B, son efficacité et sa bonne tolérance ont constitué un vrai tournant dans la prise en charge de ces maladies.

Le rituximab est un anticorps chimérique formé des régions variables d'un anticorps murin anti-CD20 fusionné avec des fragments constants d'une chaîne lourde humaine IgG-1 associé à une chaîne légère Kappa (Maloney et al. 1994). La portion Fc de l'IgG humaine a été sélectionnée pour sa capacité à fixer le complément et à entraîner une cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps. Elle est dirigée contre le CD20, un marqueur de surface des lymphocytes B. En 1997, le rituximab a été le premier anticorps monoclonal approuvé par l'administration américaine de la sécurité alimentaire et pharmaceutique pour le traitement des lymphomes.

Le CD20 humain est un marqueur de surface des lymphocytes pré-B et des lymphocytes B matures (Kehrl et al. 1994). En revanche, il n'est pas exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques, des cellules pro-B ni des plasmocytes, sauf pour un petit contingent ou dans des circonstances pathologiques. De façon beaucoup plus marginale, le CD20 peut être exprimé par les cellules T pour une faible quantité (<5%). Malgré de nombreuses études, le rôle physiologique du CD20 est assez mal connu. En particulier, les souris déficientes en CD20 ne présentent pas d'anomalies immunophénotypiques particulières. Le CD20 est une protéine transmembranaire non glycosylée de 32 KDa qui pourrait participer à la régulation des flux calciques. Elle est composée de 4 domaines transmembranaires. Son activation par des anticorps (dont le rituximab) dirigés contre sa portion extra-membranaire (capables d'induire un « cross-link ») permet la transduction d'un signal aboutissant à l'activation et la différenciation du lymphocyte B, et son expression ne varie pas à la surface des cellules. A noter, le CD20 isolé à partir de cellules B primaires stimulées, de cellules tumorales proliférantes ou de lignées cellulaires B est fortement phosphorylé, contrairement au CD20 détecté dans des cellules B non proliférantes. Cette phosphorylation qui a été associée avec la prolifération des lymphocytes B suggère que la fonction du CD20 est régulée par des kinases cellulaires (Tedder and Schlossman 1988; Jazirehi and Bonavida 2005).

Le CD20 est donc une bonne cible thérapeutique pour 2 raisons importantes (Anderson et al. 1984; Dalle and Dumontet 2007):

- C'est un marqueur présent sur les cellules B normales et tumorales, mais absent des cellules souches hématopoïétiques et de la grande majorité des plasmocytes permettant de maintenir un taux d'immunoglobulines relativement stable et d'éviter potentiellement certaines infections.
- Il est exprimé en assez grande quantité à la surface des cellules notamment tumorales, et ne semble pas être sécrété ou libéré sous formes libres dans la circulation. De même, il n'est pas internalisé après liaison avec son anticorps.

### **III-7.2.2 Mécanismes d'action**

Les mécanismes d'action du rituximab ont été étudiés dans les lymphoproliférations. Une fois la reconnaissance de l'anticorps initiée avec son antigène, elle est suivie d'une agrégation homotypique du CD20 dans des microdomaines de la membrane cellulaire, les radeaux lipidiques ou Rafts (Janas et al. 2005). Il existe trois mécanismes permettant la lyse des cellules B tumorales : la cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante (ADCC), la cytotoxicité complément dépendante (CDC) et l'induction de l'apoptose. *In vivo*, la dominance d'un de ces mécanismes n'a pas été démontrée. Le mécanisme d'action dominant s'avère être variable selon la lignée cellulaire, la nature du tissu ou de la tumeur étudiés (sang, ganglion) (Friedberg 2005). De plus, l'induction de l'apoptose par l'activation du CD20 lors de son engagement par le rituximab dans les cellules B n'est pas encore bien établie. L'apoptose est le mécanisme le moins bien caractérisé lors de l'action du rituximab.

Notre travail ayant porté uniquement sur la réponse apoptotique induite par le Rituximab, nous n'évoquerons que rapidement les 2 autres mécanismes.

### **III-7.2.2.1. Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC)**

Il s'agit d'un des mécanismes d'action du rituximab les plus connus. Une fois que la reconnaissance du rituximab avec son antigène, le CD20, est établie des cellules effectrices sont recrutées par l'intermédiaire de la partie constante du rituximab via les récepteurs Fc (FcR). Ceux-ci (CD16 et CD64, et dans une moindre mesure CD32) possèdent plusieurs fonctions qui affectent la réponse du rituximab dans les cellules B tumorales. Les monocytes et les macrophages tuent les cellules cibles notamment par phagocytose. De plus, les cellules NK interviennent aussi dans la lyse des cellules cancéreuses, à travers la libération de perforine et de granzyme B, ou l'apoptose grâce à l'activation de Fas (Stel et al. 2007).

### **III-7.2.2.2 Activation du complément (CDC)**

La liaison du rituximab aux cellules CD20 positives promeut l'activation du complément, par la voie classique, et le dépôt du fragment C3b entraîne la formation du complexe d'attaque membranaire. En effet, il faut un grand nombre de copies de ce complexe (12 à 16 par cellules) pour induire une perte d'intégrité membranaire et une mort cellulaire rapide par nécrose (Koski et al. 1983; Bellosillo et al. 2001).

Le statut de la tumeur, le type de tumeur, la période de croissance de la tumeur sont autant de facteurs qui peuvent influencer la contribution des réponses CDC et ADCC. Il est admis que ces deux mécanismes agissent en synergie pour affecter les cancers cellulaires notamment à travers l'habileté du complément à promouvoir l'inflammation et à changer le statut d'activation des effecteurs de l'immunité innée (Zhou et al. 2008).

### **III-7.2.2.3 Signalisation par le CD20 et apoptose**

La signalisation du CD20 est liée à son association avec les Rafts. Ainsi, le pontage de plusieurs molécules de CD20 induit une redistribution de ces molécules dans ces domaines lipidiques de la membrane plasmique. Cette accumulation du CD20 dans les rafts a été associée à son effet apoptotique. Il a été montré que l'engagement du CD20 résulte en une augmentation du calcium intracellulaire et que le CD20 interagit avec des Src kinases (Lyn, Lck, Fyn), elles-mêmes ancrées aux rafts. Le CD20, est associé à la phosphoprotéine PAG aussi connue comme Cpb (Csk-binding protéine), protéine localisée exclusivement dans les radeaux lipidiques (Deans et al. 2002). PAG recrute Csk, une kinase présente aussi dans les radeaux lipidiques et maintient par phosphorylation les protéines kinases Src à l'état inactif (Xu et al. 2005). Lors de la stimulation par le rituximab, une redistribution du CD20 est observée dans les radeaux lipidiques et résulte en une inhibition de l'activité des tyrosines kinases (mesurée par les niveaux de phosphorylation de Lyn et Cbp/PAG) sans changements des protéines non phosphorylées (Semac et al. 2003; Jazirehi et al. 2004). En maintenant les kinases Src inactives, le Rituximab s'oppose à la progression des cellules dans le cycle cellulaire et favorise les voies apoptotiques.

Ainsi, la liaison du rituximab au CD20 peut induire un arrêt de la croissance chez les lymphocytes. *In vitro*, l'inhibition directe (Bezombes et al. 2004) de la croissance de la tumeur par le Rituximab a été démontrée dans les cellules Daudi et les cellules RL de lymphomes B. Le rituximab induit une accumulation modérée des cellules tumorales en phase G1 et une perte significative du potentiel clonogénique sans apoptose. Le traitement au rituximab résulte en une rapide et transitoire augmentation de l'activité en acide sphingomyelinase et une génération concomitante de céramide cellulaire dans les

microdomaines des radeaux lipidiques. Ceci suggère une inhibition de la croissance cellulaire induite par le rituximab, qui pourrait être contrôlée par des céramides déclenchant une induction d'inhibiteurs de kinases dépendantes du cycle cellulaire comme p27Kip1 *via* des mécanismes dépendants de la voie des MAPK. Ainsi, le rituximab contrôlerait directement l'arrêt du cycle cellulaire ce qui pourrait contribuer à son activité anti-cancéreuse (Zhou et al. 2008).

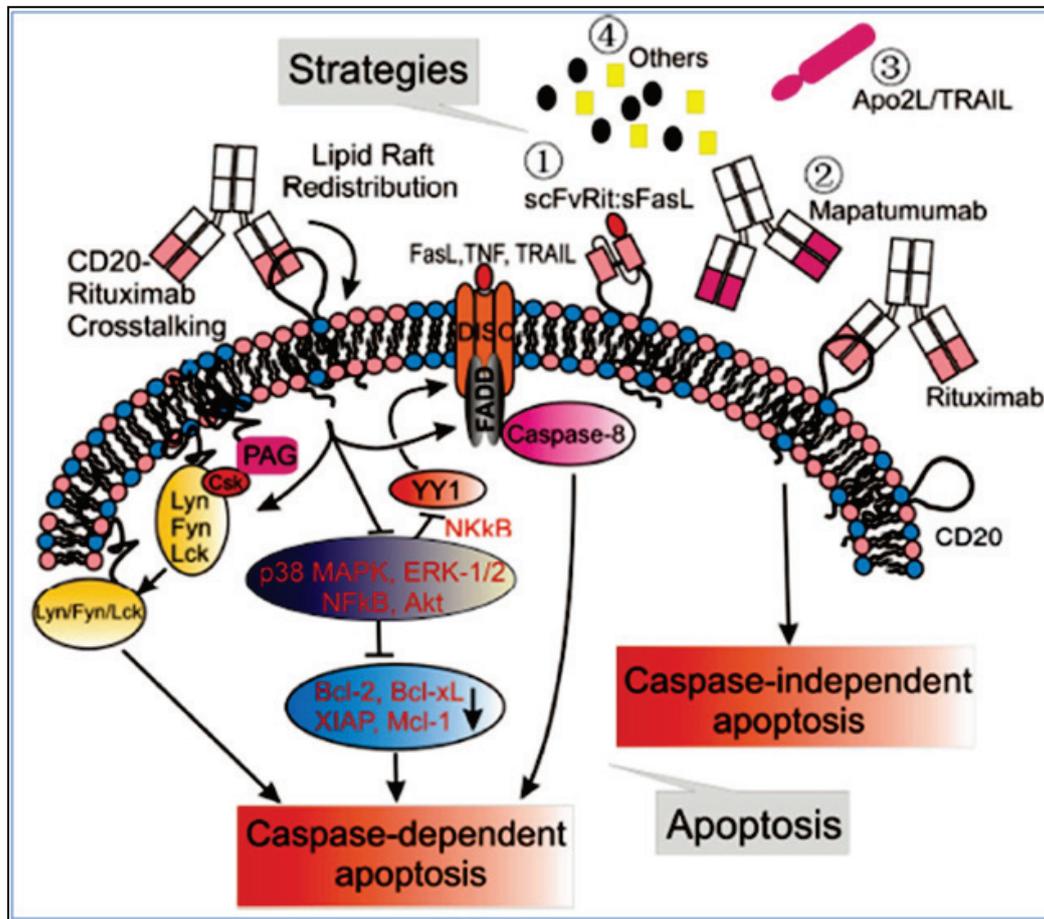
D'autres études ont montré que l'accumulation du CD20 dans les rafts suite à la stimulation par le Rituximab est une étape importante pour l'augmentation du taux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire et l'engagement de la cellule vers la signalisation apoptotique (Janas et al. 2005).

De façon générale, la réponse apoptotique reste modeste, et variable selon les types cellulaires étudiés. Un mécanisme plus probable d'action serait que le Rituximab modifierait un certain nombre de voies de signalisation de la cellule tumorale B qui seraient cruciales pour la réponse clinique. Selon le « modèle fonctionnel complémentaire » proposé par Jazirehi et Bonavida en 2005, la signalisation induite par le Rituximab apporterait un premier signal qui sensibiliserait les cellules tumorales à l'effet des drogues cytotoxiques fournissant le second signal indispensable à l'exécution du programme de mort (Jazirehi and Bonavida 2005).

Ainsi, de nombreuses études réalisées sur des lignées cellulaires issues de patients atteints de lymphomes B dont les DLBCL et traitées au Rituximab ont montré que le rituximab inhibe préférentiellement l'expression de gènes anti-apoptotiques. Plus particulièrement, on observe une inhibition de la synthèse de Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, XIAP et MCL-1 dans les cellules B tumorales *via* la régulation négative des voies de signalisation p38-MAPK, NFκB, ERK1/2 et Akt, principales voies de survie des cellules B. La cellule B cancéreuse est alors sensibilisée à l'apoptose et abaisse le niveau de résistance des cellules B pour les drogues de la chimiothérapie (Pedersen et al. 2002; Jazirehi et al. 2003; Jazirehi et al. 2005; Bonavida 2007; Suzuki et al. 2007).

De façon intéressante, les travaux de *Suzuki et collaborateurs* ont montré que la sensibilisation des cellules B tumorales par le Rituximab aux drogues cytotoxiques utilisées dans le traitement des LNH était liée à l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt. Ces travaux ont permis de relier l'apoptose induite par le Rituximab au rôle sentinelle de la molécule Bad (dont nous avons déjà parlé dans le paragraphe II.5) dans la balance survie/apoptose. Cette voie de survie est constitutivement activée dans les cellules B de ces lymphomes ce qui aboutit à une surexpression de molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, les protégeant de l'apoptose. Le traitement par le rituximab des lignées cellulaires Ramos et Daudi montre une inhibition de la voie PI3K/AKT dès 6h de traitement qui s'accompagne d'une inhibition de la phosphorylation des substrats de cette voie, PDK1, Bad, IKKα/β et Iκ<sub>αβ</sub>, sans agir sur leurs formes non phosphorylées. Ainsi, la diminution de l'état phosphorylé de Bad augmente la formation de complexes Bad/Bcl-X<sub>L</sub> et sensibilise les cellules à l'apoptose. Cet effet s'ajoute à l'inhibition de la voie NFκB, régulée normalement par l'activité d'Akt (phosphorylée), et résulte en une diminution de la synthèse de molécules de survie comme Bcl-X<sub>L</sub>. Il est intéressant de remarquer que l'inhibition de la voie Akt ne s'opère pas grâce à l'inhibiteur de la phosphatase d'Akt, PTEN, suggérant une nouvelle voie de régulation induite par le rituximab (Bonavida 2007; Suzuki et al. 2007). Ainsi, une forte expression d'Akt sous sa forme phosphorylée chez des patients atteints de DLBCL semble associée à un taux de survie plus faible que ceux avec une expression plus faible, de façon indépendante de l'expression de Bcl-2 (Uddin et al. 2006; Hasselblom et al.).

Toutes ces voies menant à l'apoptose conduisent à la voie intrinsèque mitochondriale et selon un processus caspases dépendant. Cependant, le rituximab active aussi l'apoptose par un mécanisme, qui n'est pas encore très clair, indépendant des caspases (van der Kolk et al. 2002; Daniels et al. 2006) (Figure 21). L'utilisation d'un large spectre d'inhibiteurs des caspases ne bloque pas l'apoptose. Celle-ci semble indépendante d'une surexpression de Bcl-2 et d'une résistance de Fas.



**Figure 21 : Mécanismes d'induction de l'apoptose par le Rituximab au cours d'une thérapie.** La fixation d'un anticorps anti-CD20 (Rituximab) à la molécule CD20 de surface de la cellule B induit l'inhibition de voies de survie comme la voie des MAPK ou la voie PI3K/Akt qui conduit à l'activation des voies de signalisation conduisant à l'apoptose dépendante des caspases. De plus, il existe des voies qui induisent l'apoptose indépendamment des caspases, mais les mécanismes sont encore peu connus. Des stratégies pour renforcer l'apoptose induite par le Rituximab ont été mises en place comme 1) scFvRit :sFasL ou 2) le Mapatumumab, anticorps monoclonal humanisé anti-TRAIL-R1, 3) des protéines recombinantes Apo2/TRAIL, qui ciblent les récepteurs de mort ou 4) d'autres molécules qui induisent l'apoptose, comme le Bortezomib, un inhibiteur du protéasome (Zhou et al. 2008).

### III-7.2.3. Application aux DLBCL et résistances au Rituximab

Actuellement, tous les patients atteints de lymphomes B sont traités par rituximab, seul ou en combinaison avec une chimiothérapie. Cependant, en solitaire le rituximab n'a qu'une faible efficacité, un petit nombre de patients étant en rémission complète. Plusieurs études ont démontré que l'addition de rituximab à la chimiothérapie standard améliorerait l'efficacité de celle-ci dans les lymphomes B (taux de réponse plus élevé, progression plus longue, meilleure survie). Elles ont aussi contribué à la mise en place du traitement combiné associant le rituximab à la CHOP (R-CHOP) comme standard (Coiffier et al. 2002; Herold et al. 2004; Feugier et al. 2005; Hiddemann et al. 2005; Marcus et al. 2005). Cependant, parmi les patients

initialement répondeurs un pourcentage significatif devient non répondeur. De plus, il existe des patients avec une résistance intrinsèque à la thérapie initiale. Les mécanismes pouvant permettre d'expliquer l'absence de réponses au traitement ne sont pas encore clairs.

Si le traitement R-CHOP est bénéfique chez les patients à risques faibles, des progrès doivent encore être fait concernant les patients à risques plus élevés. Ainsi plusieurs voies sont testées comme en faisant varier la dose de rituximab ou l'association avec d'autres agents biologiques (Coiffier 2005). De façon intéressante, il a été observé que les paramètres permettant de déterminer le pronostic, comme par exemple ceux de l'IPI devenaient désuets chez les patients traités avec R-CHOP (Sehn et al. 2007). Les nouveaux paramètres décrits au cours des analyses des gènes par microarray, aussi, sont moins importants que l'expression des protéines Bcl-2 ou Bcl-6. Comme nous l'avons déjà signalé, la valeur pronostique de Bcl-2 elle-même semble aussi discutable pour des patients traités au R-CHOP. Cependant, les paramètres qui pourraient être associés avec les risques de rechutes et la mort des patients traités par R-CHOP n'ont pas encore été décrits (Coiffier 2007).

## **IV. Les neurotrophines et leur implication dans la survie des lymphocytes B**

---

### **IV.1. Généralités sur les neurotrophines**

Les neurotrophines sont des facteurs de croissance des cellules du système nerveux central et périphérique, impliqués dans diverses fonctions, telles que la survie, la prolifération, la différenciation, la myélinisation, l'apoptose, la croissance axonale et la plasticité synaptique. L'histoire des neurotrophines débute, il y a 60 ans quand Levi-Montalcini et Hamburger découvrent le « nerve growth factor », le prototype des neurotrophines, nécessaire à la croissance axonale (Levi-Montalcini and Hamburger 1951; Levi-Montalcini 1987; Levi-Montalcini et al. 1995). Quant-aux 3 autres neurotrophines retrouvées chez les mammifères, le BDNF « brain derived neurotrophic factor », NT-3 « neurotrophin-3 » et NT-4 « neurotrophin-4 », elles sont identifiées trois décennies plus tard (Barde et al. 1982; Hohn et al. 1990; Maisonpierre et al. 1990; Ip et al. 1992). Ces neurotrophines activent deux types de récepteurs différents, les récepteurs Trk (tropomyosin-related kinase) et p75<sup>NTR</sup> (p75 neurotrophin receptor). Le p75<sup>NTR</sup> appartient à la superfamille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor) et est le premier récepteur identifié pour le NGF (Chao et al. 1986; Johnson et al. 1986). Le premier récepteur Trk a été originellement découvert comme un gène transformé, ou proto-oncogène, dans un carcinome humain du colon (Martin-Zanca et al. 1986). Ce proto-oncogène est constitué de la séquence d'un gène codant pour un récepteur à tyrosine-kinase, alors encore non identifié, fusionné à la séquence d'un gène codant pour une tropomyosine non musculaire. Caractérisé plus tard dans d'autres cancers, le gène a été appelé *NTRK1* ou *trkA* pour « Tropomyosin-related kinase A ». La protéine TrkA codée par ce gène fut identifiée plus tard comme le récepteur de haute affinité pour le NGF (Kaplan et al. 1991a; Klein et al. 1991b). L'identification de TrkB et TrkC, basée sur leur similitude avec TrkA, a suivi (Klein et al. 1989; Hempstead et al. 1991; Lamballe et al. 1991). Ainsi, chaque neurotrophine active plus ou moins spécifiquement un récepteur de haute affinité Trk : TrkA pour NGF, TrkB pour BDNF et NT-4 et TrkC pour NT-3 (Reichardt 2006).

Pendant longtemps, on pensait que la plupart des effets des neurotrophines sur la différenciation neuronale et la survie s'expliquaient par un système de co-récepteurs p75<sup>NTR</sup>/Trk où le récepteur Trk était la partie signalisatrice et p75<sup>NTR</sup> était l'entité qui régulait (à la hausse ou à la baisse) l'affinité de la liaison spécifique. La découverte surprenante que l'activation du récepteur p75<sup>NTR</sup> par NGF ou BDNF en l'absence de signalisation des Trk induisait l'apoptose des cellules, a bouleversé ce concept. Ces résultats et d'autres ont conduit à l'hypothèse de l'existence d'une dualité fonctionnelle des neurotrophines dans la balance survie/mort des cellules neuronales. Les observations que les pro-neurotrophines étaient capables de se lier sélectivement au récepteur p75<sup>NTR</sup> mais pas aux récepteurs Trk, engageant alors la cellule vers un programme de mort cellulaire ont fourni une première explication à cette dualité (Lee et al. 2001; Ibanez 2002; Teng et al. 2005). Finalement, un 3<sup>e</sup> co-récepteur indépendant a été identifié, la sortiline. Elle reconnaît spécifiquement les pro-neurotrophines pro-NGF et pro-BDNF et forme un co-récepteur de haute affinité sous forme d'un complexe avec p75<sup>NTR</sup>, avec une capacité signalisatrice d'apoptose (Nykjaer et al. 2004; Teng et al. 2005; Willnow et al. 2008). Ainsi, les effets opposés des neurotrophines sur la survie/croissance cellulaire dépendent des formes pro ou matures libérées, et de leur liaison aux récepteurs Trk ou p75<sup>NTR</sup>/sortiline, pour induire finalement des réponses cellulaires distinctes (Reichardt 2006).

Alors que la fonction primordiale de cette famille de neuropeptides reste le maintien de l'homéostasie des tissus cérébraux et nerveux périphériques, leur champ d'action s'est enrichi au cours des 20 dernières années, la présence des neurotrophines et de leurs récepteurs étant ubiquitaire au sein des tissus non-neuronaux où ces facteurs de croissance semblent exercer des fonctions diverses comme notamment au cours du développement cardiaque, la néo-vascularisation, et comme nous allons le détailler plus loin, dans le système immunitaire (Donovan et al. 2000; Lin et al. 2000; Vega et al. 2003; Coppola et al. 2004).

Dans ce travail, nous avons choisi de nous intéresser en particulier à deux neurotrophines, NGF et BDNF, et à leurs récepteurs de haute et basse affinité.

#### **IV-1.1 Structure, production et fonctions neurobiologiques des neurotrophines (NGF, BDNF)**

##### **IV-1.1.1 NGF : du gène à sa sécrétion**

- **Transcription**

Le NGF humain est produit principalement par les glandes salivaires (Aloe et al. 2001) sous la forme d'un polypeptide de haut poids moléculaire, de 130 kDa, formé de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  qui se dissocient à pH 7,4 représentant vraisemblablement la forme de stockage protéique intra-salivaire (Yarski et al. 2000). Ce complexe est généralement présent sous forme de dimères  $\alpha\beta_2\gamma_2$ . Le dimère  $\beta$  est situé au centre de la structure et les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  forment autour une structure en fer à cheval, en s'arrangeant de manière symétrique autour de l'axe central formé par le dimère  $\beta$ . A pH physiologique, la sous-unité  $\beta$  ou  $\beta$ -NGF se présente sous la forme d'un dimère extrêmement stable de 26 kDa et c'est cette sous-unité qui porte l'activité biologique (Gotz and Scharl 1994; Yarski et al. 2000).

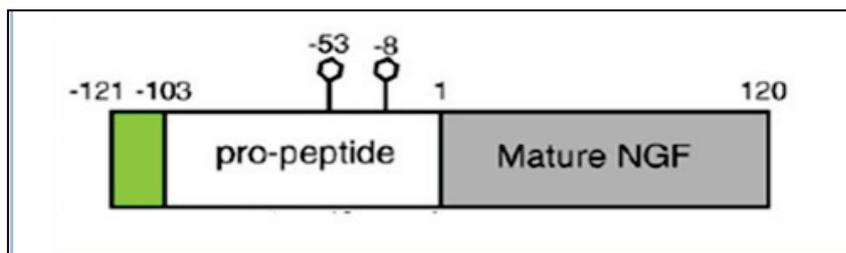
Le gène codant pour la protéine du  $\beta$ -NGF est situé sur le chromosome 3 chez la souris (Zabel et al. 1985), et sur le bras court du chromosome 1 chez l'homme (Francke et al. 1983). La

structure du gène est similaire entre les différentes espèces : il est constitué d'une séquence contenant 6 exons séparés par 4 introns. Seul le dernier exon localisé à l'extrémité 3' du gène possède un site ATG initiateur de la traduction protéique et code pour la protéine du NGF (Hallbook et al. 1988). Une homologie de séquence entre les gènes des différentes espèces a été retrouvée avec, par exemple une homologie de plus de 80% en comparant le gène du  $\beta$ -NGF chez l'homme et chez la souris. Cette homologie peut même dépasser les 90% dans la séquence du dernier exon (Ullrich et al. 1983).

Dans les neurones et astrocytes, de même que dans des cellules non neuronales comme les fibroblastes, la transcription du NGF dépend de l'activation des facteurs de transcription NF $\kappa$ B (« Nuclear factor- $\kappa$  B ») (Heese et al. 2006), AP-1 (Friedman et al. 1992), C/EBP (« CCAAT/enhancer binding protein ») et CREB (« cAMP responsive element binding ») (McCauslin et al. 2006). Plusieurs facteurs peuvent activer la transcription du NGF, comme des cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF- $\alpha$  « Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  » et l'IL-1 $\beta$  « l'interleukine-1 $\beta$  », ainsi que le TGF- $\beta$  « Transforming Growth Factor  $\beta$  » (Friedman et al. 1992; Hattori et al. 1993). La synthèse du NGF survient également suite à des lésions tissulaires, notamment nerveuses périphériques où cette sécrétion est principalement attribuée à des cellules non neuronales de type inflammatoires, et serait un élément crucial dans le succès de la réparation des zones lésées (Heumann et al. 1987). Parmi les autres facteurs de régulation, il faut noter le stress. Ainsi, des situations expérimentales induisant le stress chez la souris, s'accompagnent d'une libération du NGF salivaire, se traduisant par l'augmentation rapide des concentrations sériques, qui est indépendante de l'axe corticotrope (Aloe et al. 1986). Les concentrations sériques de NGF chez l'homme sont également rapidement augmentées par le stress; cette élévation rapide précède la réponse de l'axe corticotrope et l'élévation des taux plasmatiques d'ACTH et de cortisol (Aloe et al. 1994).

La présence de 2 promoteurs ainsi que des mécanismes d'épissage alternatif conduisent à la synthèse de différents ARN messagers (ARNm) du NGF selon les espèces. Chez l'homme, seuls 2 transcrits ont été caractérisés (Edwards et al. 1986). Le rôle de ces différents transcrits n'est toujours pas connu à l'heure actuelle.

- **Traduction et production : le pro-NGF (Figure 22)**



**Figure 22:** Schéma du pre-pro-NGF. La séquence signal est représentée en vert, le pro-peptide en blanc et le peptide mature en gris. (Feng et al. 2010)

La protéine NGF est traduite sous forme de deux pré-pro-NGF de 34 et 27kDa (Fahnestock et al. 2004a) lesquels subissent plusieurs étapes de protéolyses intra et extracellulaires pour donner naissance aux formes matures (117 à 129 acides aminés). Le clivage de la séquence signal dans le réticulum endoplasmique conduit à des molécules de pro-NGF de 32 et 25 kDa (Edwards et al. 1988). Les pro-neurotrophines forment alors des homodimères d'environ 60 kDa qui transitent jusqu'à l'appareil de Golgi. Des furines intracellulaires, mais aussi des

sérines protéases, les convertases neuronales PC1 et PC2, sont capables de réaliser la maturation du NGF sur son extrémité N-terminale (Bresnahan et al. 1990; Seidah et al. 1996; Lessmann et al. 2003). Des sites de glycosylations situés au niveau des pro-domaines interviendraient également dans la régulation du transport et de la sécrétion des neurotrophines. Au niveau extracellulaire, le NGF mature est généré sous l'action de la MMP-7. Ces différentes étapes de protéolyses intra et extracellulaires donnent ainsi naissance, au niveau du SNC, à de nombreuses isoformes de NGF dont les masses moléculaires vont de 14 kDa (NGF mature) à 35 kDa (pro-NGF). Les peptides de taille intermédiaire correspondent vraisemblablement aux différents produits de clivages de furines protéases et de MMP extracellulaires. Par ailleurs, ces différentes isoformes peuvent s'associer au niveau extracellulaire, donnant naissance à des isoformes de haut poids moléculaire de 70 à 90 kDa (Skaper et al. 2001). Ces événements ne sont pas spécifiques au pro-NGF mais concernent les pro-neurotrophines, de façon générale.

Le pro-NGF interagit, par son pro-domaine, avec la sortiline protéine majoritairement intracellulaire. Elle possède une fonction de protéine de transport pour les neurotrophines, fonction dépendante du clivage préalable du pro-peptide N-terminal par des furines protéases (Mazella 2001; Nyborg et al. 2006). Le pro-NGF est transporté de l'appareil de Golgi vers la membrane par cette protéine (Nykjaer et al. 2004; Chen et al. 2005; Teng et al. 2005).

- **Rôle**

Dans le système nerveux central (SNC), le NGF intervient lors de la modulation de la survie et du développement neuronal (Thoenen et al. 1987). Il interagit avec les cellules neuronales et astrocytaires, principalement par l'intermédiaire d'un récepteur à haute affinité, TrkA, qui induit la prolifération et la différenciation cellulaires, la survie par inhibition de l'apoptose, l'augmentation de l'excitabilité neuronale ainsi que la libération des médiateurs synaptiques (Levi-Montalcini et al. 1995; Aloe et al. 1997).

Dans le système nerveux périphérique (SNP), le NGF stimule également la survie et la croissance neuritique des neurones sensitifs ainsi que des neurones sympathiques, l'homéostasie de ces deux populations neuronales étant sous la dépendance principale de cette neurotrophine et de son récepteur TrkA (Barde 1990). Le NGF régule par ailleurs le fonctionnement des neurones sensitifs en induisant la sécrétion des neuropeptides impliqués dans la transmission synaptique (Aloe et al. ).

De plus, comme nous venons de le voir les neurotrophines existent sous forme de pro-neurotrophines. Pendant longtemps, elles ont été considérées comme des formes intermédiaires de synthèse des neurotrophines, sans activité biologique particulière. Cependant, elles sont sécrétées majoritairement par les cellules neuronales et astrocytaires. Elles possèdent également une activité pro-apoptotique. Le pro-domaine des pro-neurotrophines masque les domaines nécessaires à leur fixation au récepteur Trk, mais non au récepteur p75<sup>NTR</sup>. La pro-neurotrophine possède alors une plus grande affinité pour ce récepteur (Lee et al. 2001; Fahnstock et al. 2004; Nykjaer et al. 2004). Ce site de liaison à haute affinité est en réalité formé d'un récepteur hétérodimérique constitué de p75<sup>NTR</sup> et de la sortiline, dont l'autre fonction est le transport intracellulaire des neurotrophines (Nykjaer et al. 2004). Cette dualité d'affinité pourrait être à l'origine de la régulation de l'activité biologique des protéines de la famille des neurotrophines : les pro-neurotrophines induisant préférentiellement l'apoptose, par l'activation sélective du récepteur p75<sup>NTR</sup>/sortiline, et les neurotrophines matures engendrant la survie cellulaire par l'activation sélective des récepteurs Trk (Chao 2003).

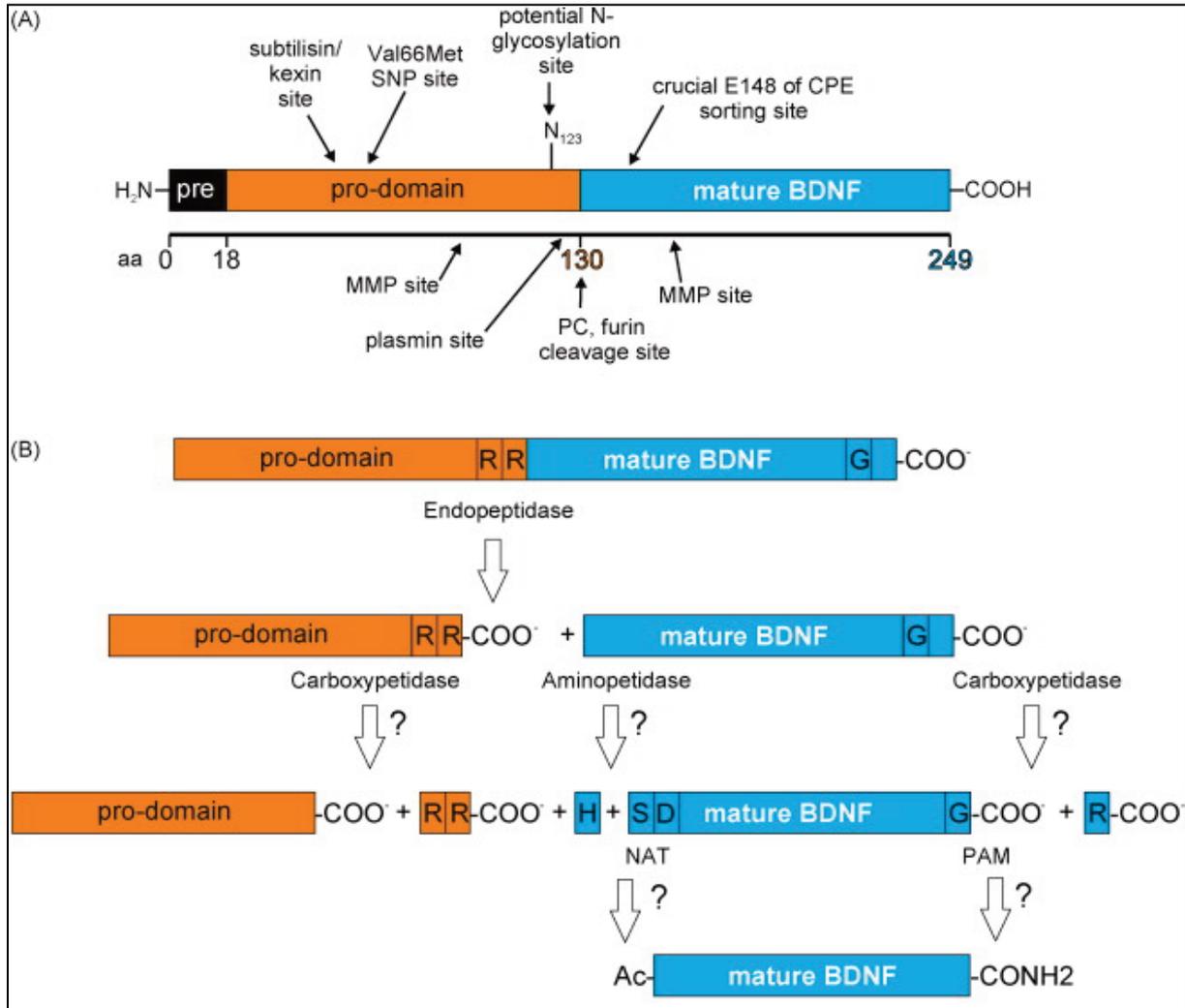
#### IV-1.1.2 BDNF

- **Transcription**

Le BDNF est principalement produit au niveau cérébral par les neurones du cortex et de l'hippocampe. L'expression du gène *BDNF* est contrôlée par de multiples promoteurs. Quatre promoteurs ont déjà été identifiés chez le rat (Timmusk et al. 1995). Plusieurs facteurs de transcription qui contribuent au contrôle de ces promoteurs ont été caractérisés. Parmi ces facteurs, et en plus de NF- $\kappa$ B comme pour NGF, citons CREB (cAMP Response Element Binding protein) (Shieh et al. 1998) et USF1 / 2 (Tabuchi et al. 2002), le facteur de transcription calcium-dépendant (CaRF) (Tao et al. 2002). La transcription du BDNF et sa synthèse neuronale sont augmentées par les antidépresseurs tricycliques, sérotoninergiques ainsi que par les statines (Henkel et al. 2008). De plus, la transcription du BDNF au niveau astrocytaire est amplifiée par les cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) ainsi que par le TGF- $\beta$  alors qu'elle est diminuée par les cytokines Th1 (IL-2, INF- $\gamma$ ) (Lisak et al. 2007). Le remodelage de la chromatine par méthylation de l'ADN et la désacétylation des histones, sous la dépendance du Ca<sup>2+</sup> jouent également un rôle important dans la régulation de l'expression des transcrits BDNF. La présence de 4 promoteurs ainsi que des mécanismes d'épissage alternatif conduisent, comme pour NGF, à la synthèse de différents ARN messagers du BDNF, selon les espèces (Aid et al. 2007).

- **Traduction**

Tout comme NGF, seul le dernier exon, le IX, localisé à l'extrémité 3' du gène possède un site ATG initiateur de la traduction protéique et code pour la protéine BDNF (Timmusk et al. 1993). La protéine BDNF est traduite sous formes de deux pré-pro-BDNF lesquels subissent plusieurs étapes de protéolyses intra et extracellulaires pour donner naissance aux formes matures (112 à 119 acides aminés). Le clivage de la séquence signal dans le réticulum endoplasmique conduit à des molécules de pro-BDNF de 34 et 32 kDa. Tout comme pour NGF, la maturation de la pro-neurotrophine transite jusqu'à l'appareil de Golgi (Lessmann and Brigadski 2009) (Figure 23).



**Figure 23 : Du pré-pro-BDNF au BDNF.** A) Structure du pré-pro-BDNF B) Du pro-BDNF au BDNF mature. Le pro-BDNF peut être clivé dans un premier temps par une endopeptidase (furine ou PC : Protéines convertases) ou par une plasmine extracellulaire. Un clivage intracellulaire peut suivre dans un deuxième temps en C-terminale et/ou N-terminale par des exoprotéases (carboxypeptidases en C-terminale, aminopeptidases en N-terminale). La séquence peptidique clivée (BDNF mature) peut subir certaines modifications par PAM (peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase) qui catalyse une amination en C-terminale et par NAT (N-acetyltransferase) qui catalyse une acétylation en N-terminale (Lessmann and Brigadski 2009)

**• Production**

Les neurotrophines sont généralement clivées intracellulairement. Cependant, le pro-BDNF est la pro-neurotrophine la moins sensible au clivage par des furines protéases mais elle peut être clivée, à un moindre degré, par d'autres convertases. Les capacités d'excrétion du BDNF mature pourraient donc dépendre du répertoire de convertases présentes dans un type cellulaire. Les sites de glycosylations situés au niveau des pro-domaines interviendraient également dans la régulation du transport et de la sécrétion des neurotrophines, par des mécanismes encore méconnus (Lessmann et al. 2003).

Au niveau extracellulaire, le pro-BDNF est clivé par les MMP-3, MMP-7, MMP-9 (Lee et al. 2001). La plasmine peut également cliver le pro-BDNF extracellulaire, le site de clivage étant différent de celui des furines protéases et des MMP, engendrant ainsi un BDNF mature de plus haut poids moléculaire mais biologiquement actif (Gray and Ellis 2008). Ces différentes

étapes de protéolyses intra et extracellulaires génèrent ainsi, comme pour le NGF, au niveau du SNC de nombreuses isoformes de BDNF dont les masses moléculaires vont de 17 kDa (BDNF mature) à 35 kDa (pro-BDNF). Les peptides de taille intermédiaire correspondent vraisemblablement aux différents produits de clivages de furines protéases et de MMP extracellulaires (Lee et al. 2001). Par ailleurs, ces différentes isoformes peuvent aussi s'associer au niveau extracellulaire, donnant naissance à des isoformes de hauts poids moléculaires de 70 à 90 kDa (Skaper et al. 2001).

Le pro-BDNF, interagit, comme le pro-NGF, par son pro-domaine, avec la sortiline qui permet son adressage à la membrane comme nous l'avons vu pour le pro-NGF. Par ailleurs, l'existence d'autres protéines de transport des neurotrophines est suggérée par des modèles de souris SORT<sup>-/-</sup>, ces dernières ayant un développement embryonnaire cérébral sub-normal (Jansen et al. 2007). L'interaction entre le pro-domaine des neurotrophines, et notamment du pro-BDNF, avec la sortiline est stable, et protégerait les pro-neurotrophines du clivage protéolytique extracellulaire par les MMP (Teng et al. 2005; Paiardini and Caputo 2008).

Le BDNF est également produit par de nombreux autres cellules non neuronales normales (fibroblastes, kératinocytes, cellules épithéliales) ou tumorales. Il est ainsi produit par de nombreuses cellules adéno-carcinomeuses humaines (prostatiques, pulmonaires, pancréatiques) (Desmet and Peeper 2006). Il est également produit par les lymphocytes et les mastocytes, sa synthèse étant également sous la dépendance du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Heese et al. 2006).

- **Rôle**

Le BDNF est le deuxième membre de la famille des neurotrophines à avoir été identifié (Barde et al. 1982) et possède un rôle essentiel dans la régulation de la survie et de la différenciation neuronales, tant au niveau du développement du SNC que de son homéostasie chez l'adulte. Le BDNF régule la plasticité et l'organisation neuronale. Il maintient les connexions neuronales au niveau du cerveau embryonnaire et adulte (Huang and Reichardt 2001).

Il interagit préférentiellement avec la cellule nerveuse par l'intermédiaire de son récepteur de haute affinité, TrkB, dans sa forme complète de 145 kDa. La présence extracellulaire de BDNF induit l'homodimérisation du récepteur TrkB-145kDa et la transduction d'un signal intracellulaire, en induisant la phosphorylation des domaines tyrosine kinases (Barker 2007).

La dépression et le stress entraînent une réduction de la synthèse de BDNF au niveau des zones cérébrales impliquées dans la régulation de l'humeur, et ce particulièrement au niveau des zones hippocampiques. Ainsi, la diminution de la synthèse du BDNF et de l'expression de son récepteur à haute affinité TrkB, peut conduire à une altération conjointe de la plasticité synaptique et de la neurogénèse. Les antidépresseurs permettent cependant d'inverser ce processus, l'amélioration des troubles thymiques coïncidant avec la reprise de la synthèse du BDNF et de la neurogénèse au niveau hippocampique et des aires préfrontales (Duman and Monteggia 2006; Kozisek et al. 2008).

Au niveau du SNP, le BDNF produit par les ganglions rachidiens postérieurs en culture constitue un facteur autocrine de survie des cellules (Davies and Wright 1995).

Ainsi, la variation des concentrations du BDNF circulant renvoie à de nombreuses situations physiopathologiques. La maladie asthmatique, la sclérose en plaque, mais également la dépendance (alcool, cannabis) entraînent une augmentation de sa production. Par contre, des

pathologies dégénératives comme la maladie de Parkinson ou la démence de type Alzheimer, de même que la dépression, mais également le syndrome dysmétabolique ou les pathologies coronariennes sont caractérisées par une diminution de la production de cette neurotrophine (Ziegenhorn et al. 2007).

Finalement comme nous l'avons vu pour NGF, le précurseur de BDNF, le pro-BDNF, est biologiquement actif. Il est sécrété majoritairement par les cellules neuronales et astrocytaires et possède également une activité pro-apoptotique. Comme pour le pro-NGF, le pro-BDNF présente aussi une plus grande affinité pour le récepteur p75<sup>NTR</sup> (Lee et al. 2001; Fahnstock et al. 2004b; Nykjaer et al. 2004).

#### **IV-1.2 Les récepteurs aux neurotrophines**

Les neurotrophines forment des homodimères qui activent deux types de récepteurs différents :

- *les récepteurs de la famille Trk (tropomyosin related receptor)* dits de « haute affinité » liant les neurotrophines avec une affinité de l'ordre du picomolaire et comportant une activité tyrosine kinase intrinsèque conduisant la cellule à la survie.
- *le récepteur p75<sup>NTR</sup>*, dit de « basse affinité », membre de la superfamille des récepteurs au TNF, qui interagit avec les neurotrophines avec une affinité de l'ordre du nanomolaire et favorise les signalisations apoptotiques. Ce récepteur possède en revanche une forte affinité pour les pro-neurotrophines.

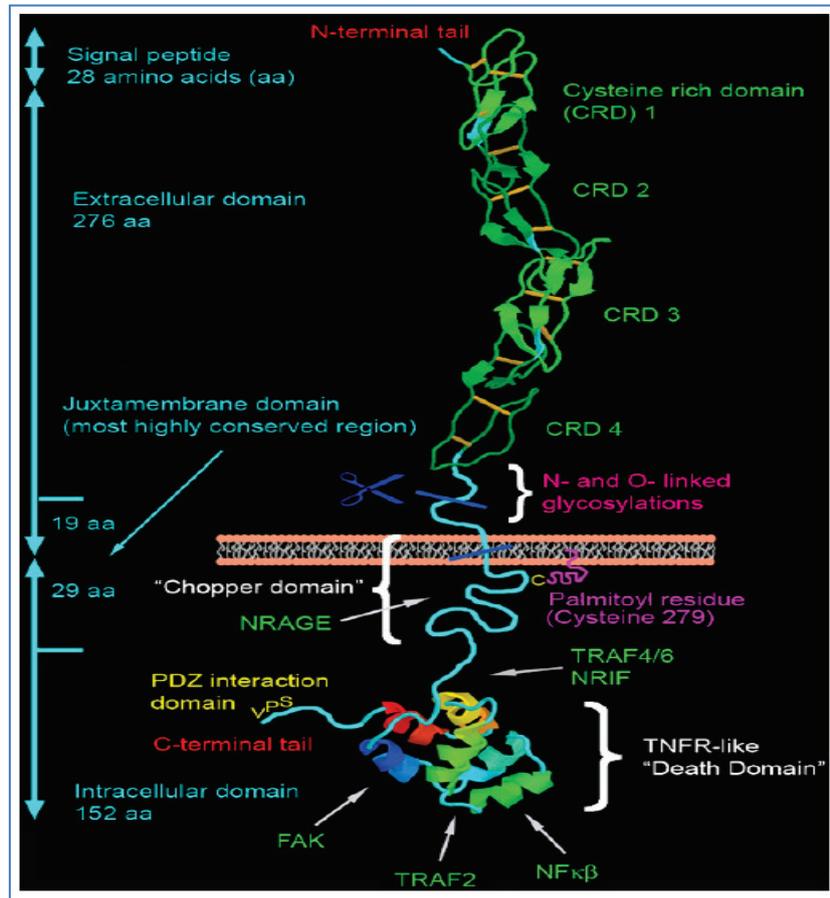
##### **IV-1.2.1 Le récepteurs p75<sup>NTR</sup>**

###### **IV-1.2.1.1 Données génétiques et structurales (figure 24)**

Le récepteur p75<sup>NTR</sup> est un membre de la famille des récepteurs de mort caractérisés par la présence d'un domaine de mort intracellulaire appelé domaine de mort ou DD (Death domain) qui initie un programme de mort cellulaire programmée par apoptose. Cette famille comprend également entre autre, le récepteur Fas (CD95) et les récepteurs au TNF avec lesquels le récepteur p75<sup>NTR</sup> présente une très forte homologie (Chapman and Kuntz 1995). Au contraire, des récepteurs TNF et Fas, p75<sup>NTR</sup> ne forme pas de trimères.

Comme tous les récepteurs au TNF, cette glycoprotéine transmembranaire de 75 kDa contient (Figure 27), dans sa région extracellulaire de 222 acides aminés, quatre domaines riches en cystéines (CRD), chargés négativement et constituant des sites de fixation des neurotrophines et des pro-neurotrophines. Après une seule hélice transmembranaire, le récepteur p75<sup>NTR</sup> comporte un domaine intracellulaire dépourvu d'activité enzymatique intrinsèque et composé de 2 domaines d'interaction avec des protéines adaptatrices : un domaine juxta-membranaire flexible (JM ou domaine chopper) et un domaine de mort de type II (DD). Le domaine « chopper » correspond à une séquence d'environ 150 acides aminés, à proximité de la membrane. Il comprend 4 sites potentiels d'interaction avec des protéines adaptatrices, dont 2 sites de liaison aux TRAF (TNF Receptor Associated Factor), conduisant à l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'apoptose, mais aussi dans la survie cellulaire (Coulson et al. 2004). Le domaine de mort est constitué d'une séquence d'environ 80 acides aminés qui permet l'interaction avec les protéines adaptatrices, entraînant

l'activation des caspases et l'apoptose (Roux and Barker 2002), comme NADE (p75<sup>NTR</sup> Associated Cell Death Executor), RIP2 (Receptor-Interacting Protein-2) et RhoA (Ras homolog gene family, member A). Cette région est agencée en deux ensembles perpendiculaires de 3 hélices  $\alpha$ , formant une structure globulaire (Underwood and Coulson 2008).



**Figure 24 :** Structure du récepteur p75<sup>NTR</sup>. Les neurotrophines se lient au récepteur p75<sup>NTR</sup> par les domaines riches en cystéines. La coupure par les ciseaux bleus indique des sites de clivage RIP. Le domaine Chopper, région flexible, est impliqué dans la signalisation de mort dans les radeaux lipidiques de la membrane. Le domaine intracellulaire du récepteur p75<sup>NTR</sup> est en interaction avec de nombreux partenaires qui induisent la mort cellulaire. Il peut être phosphorylé et le domaine en doigt de zinc en C-terminal permet la reconnaissance de protéines connues pour être associées au trafic cellulaire et complexées au récepteur. CRD : Domaine riche en cystéines (Underwood and Coulson 2008)

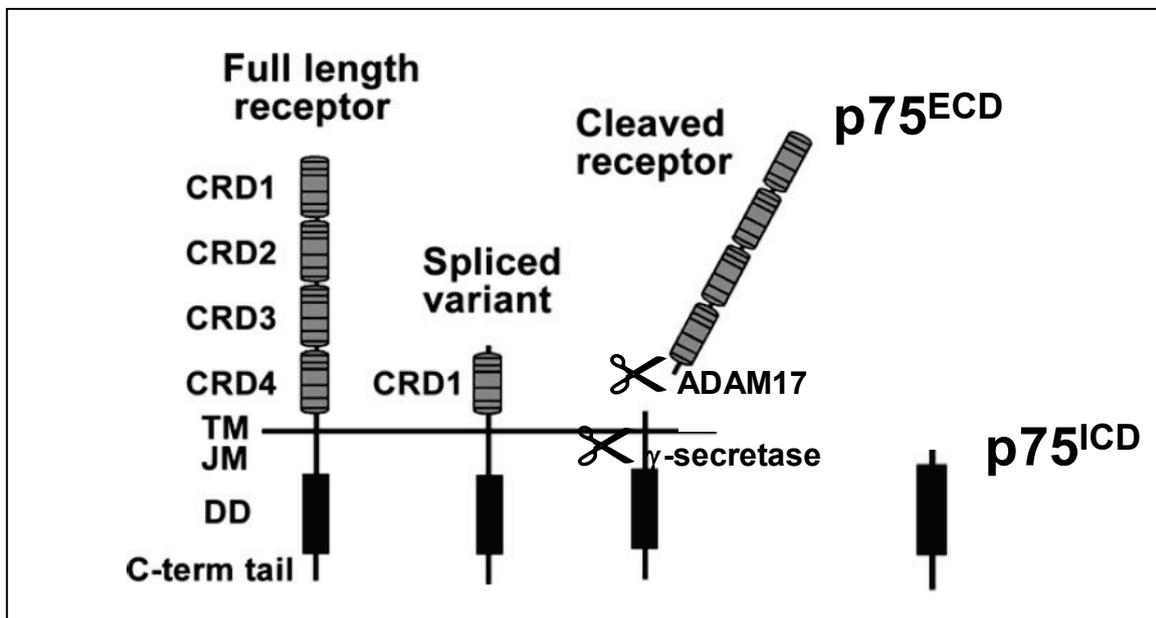
Ce récepteur peut subir des modifications post-traductionnelles, comme des N- et des O-glycosylations et des palmitoylations qui entraîneront des relocalisations membranaires dans les radeaux lipidiques, par exemple (Underwood and Coulson 2008).

#### IV-1.2.1.2 Les différentes formes du récepteur (Figure 25)

Les transcrits du récepteur p75<sup>NTR</sup> peuvent subir un épissage alternatif conduisant à une structure ne contenant pas le domaine CRD4. Ce récepteur est capable de lier les neurotrophines et peut signaler. Cependant, sa fonction est encore méconnue (Roux and Barker 2002).

Sous l'action d'enzymes extra et intracellulaires, ce récepteur peut être clivé.

Une protéolyse régulée au niveau intra-membranaire (ou RIP) peut avoir lieu, comme pour d'autres récepteurs, dans laquelle  $p75^{NTR}$  est clivé d'abord en extracellulaire par une MMP, ADAM17/TACE (*a disintegrin and metalloproteinase17 / TNF $\alpha$  converting enzyme*), libérant son domaine extracellulaire (DiStefano et al. 1993; Kanning et al. 2003). Le fragment C-terminal restant lié à la membrane est alors clivé à l'intérieur du domaine transmembranaire par la préséniline, co-facteur d'un complexe  $\gamma$ -sécrétase, produisant un fragment intracellulaire soluble. On obtient ainsi deux fragments solubles, l'un extracellulaire ( $p75^{ECD}$ ), l'autre intra-cellulaire ( $p75^{ICD}$ ), avec les mêmes propriétés signalisatrices (Jung et al. 2003). Ce clivage est indépendant de la présence extracellulaire de pro-NGF ou de pro-BDNF, mais semble être limité par la co-expression membranaire des récepteurs TrkA ou TrkB (Kanning et al. 2003), l'accessibilité du site aux enzymes et la localisation du récepteur au niveau de radeaux lipidiques (Gil et al. 2007). De plus, il semble sous la dépendance des voies MAPK, notamment la voie p38MAPK (Weskamp et al. 2004). Ce clivage semble survenir préférentiellement lors d'un stress cellulaire qui induit la production d'ADAM17 et le clivage secondaire de  $p75^{NTR}$  dans des modèles neuronaux. Ce clivage de la partie extracellulaire du récepteur, retrouvé en abondance au cours du développement cérébral ainsi qu'à la suite d'une lésion nerveuse périphérique, constitue vraisemblablement un mécanisme de régulation négative de l'activation ligand-récepteur précédemment décrite pour d'autres protéines de la famille des récepteurs au TNF (Roux and Barker 2002; Kanning et al. 2003; Weskamp et al. 2004). Le fragment soluble intracellulaire ( $p75^{ICD}$ ) peut être transloqué au niveau nucléaire. Le rôle intranucléaire de  $p75^{ICD}$  est actuellement mal compris, il pourrait réguler l'expression de certains gènes comme NF- $\kappa$ B (Jung et al. 2003; Kanning et al. 2003; Chao 2003; Bronfman 2007).



**Figure 25:** Les différentes formes du récepteur  $p75^{NTR}$ . Des MMP, et plus particulièrement ADAM10, interviennent dans le clivage des domaines extracellulaires de l'hétérodimère  $p75^{NTR}$ . Le clivage du domaine extracellulaire de  $p75^{NTR}$  permet alors aux  $\gamma$ -sécrétases de cliver la partie intra-cellulaire restante, au niveau de sa zone d'insertion membranaire. (d'après Roux and Barker 2002; Nykjaer et al. 2005)

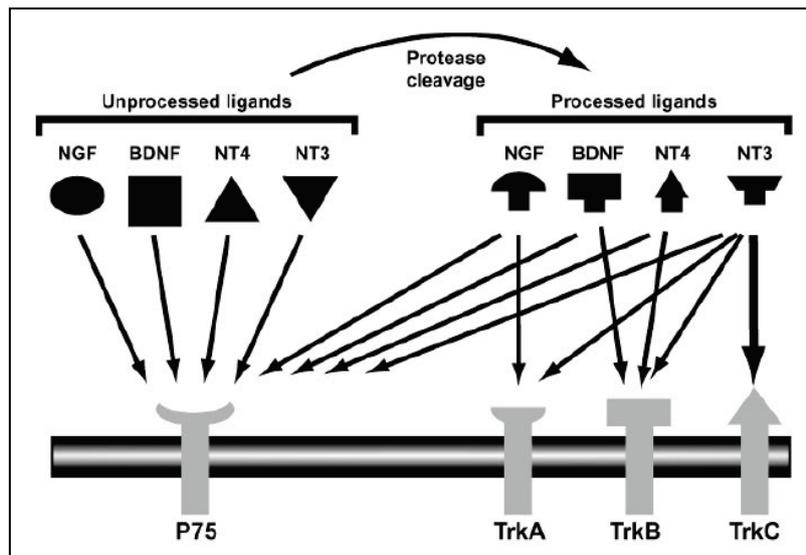
#### IV-1.2.1.3 Ligands et voies de signalisation

Les fonctions du récepteur  $p75^{\text{NTR}}$  sont diverses et souvent contradictoires. Ce récepteur est impliqué à la fois dans la survie cellulaire et dans l'induction de l'apoptose, la différenciation et la prolifération. Il peut aussi jouer un rôle dans les processus de myélinisation (Cosgaya et al. 2002; Du et al. 2006). Il peut être reconnu par toutes les neurotrophines, mais aussi par leurs formes immatures (Chao and Bothwell 2002; Barker 2004) lesquelles sont impliquées, en grande partie, dans la dualité de signalisation du récepteur.

##### IV-1.2.1.3.1 Ligands

Les pro-neurotrophines, comme les neurotrophines, sont un ligand du récepteur  $p75^{\text{NTR}}$ , elles ont une affinité plus importante pour celui-ci en comparaison des neurotrophines matures et conduisent à la mort de la cellule (Lee et al. 2001) (Figure 26).

La liaison de NGF avec  $p75^{\text{NTR}}$  a révélée un rapport stœchiométrique de 2 pour 1 (Aurikko et al. 2005). Ainsi, un dimère de NGF lie une molécule de  $p75^{\text{NTR}}$  induisant un changement conformationnel de la protéine NGF qui empêche l'association avec une seconde molécule  $p75^{\text{NTR}}$ , mais pas le recrutement d'autres récepteurs, comme les récepteurs Trk (Hempstead et al. 1991).



**Figure 26 :** les ligands des récepteurs  $p75^{\text{NTR}}$  et Trk. Les pro-neurotrophines se lient au récepteur  $p75^{\text{NTR}}$ . Elles subissent un clivage par des protéases conduisant aux formes matures, les neurotrophines. Celles-ci se lient aussi aux récepteurs  $p75^{\text{NTR}}$ . NGF se lie au récepteur TrkA, BDNF et NT4 au récepteur TrkB et NT3 au récepteur TrkC. (Segal 2003)

##### IV-1.2.1.3.2 Voies de signalisations conduisant à l'apoptose

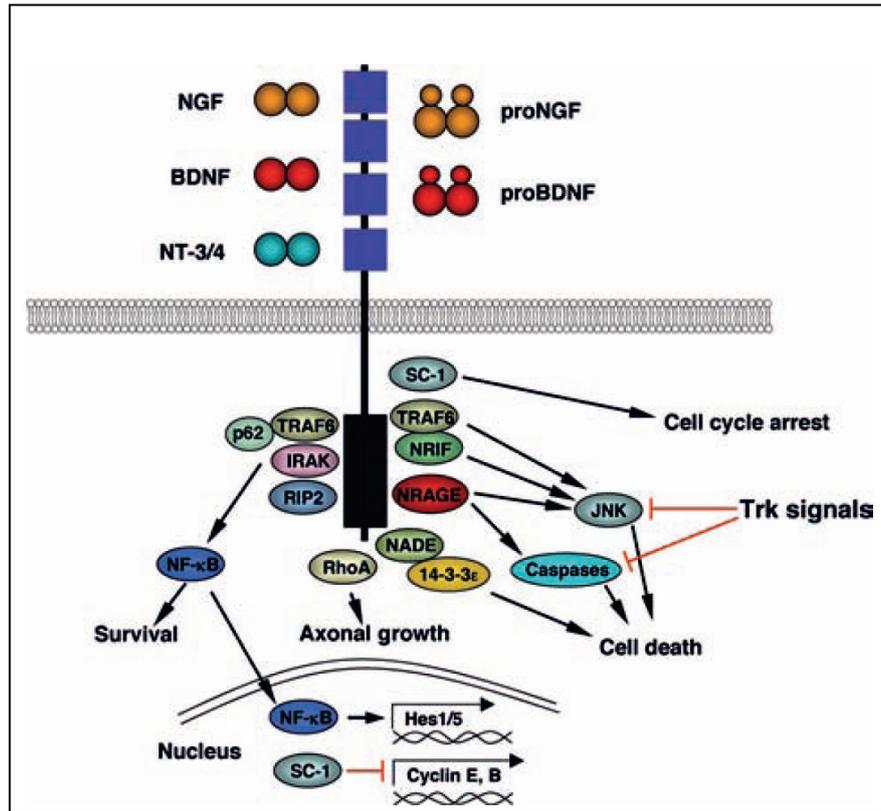
Le manque d'activité catalytique dans le domaine cytoplasmique de  $p75^{\text{NTR}}$  suggère que la signalisation de ce récepteur est portée par une interaction de protéines, soit constitutivement associées ou recrutées par le récepteur en réponse aux neurotrophines. Dans des oligodendrocytes matures, NGF lie  $p75^{\text{NTR}}$  et entraîne l'activation de JNK et l'apoptose qui peut être contrecarrée par TrkA (Casaccia-Bonnet et al. 1996; Yoon et al. 1998), indiquant un signal indépendant des récepteurs Trk. Les voies de signalisation pro-apoptotiques de  $p75^{\text{NTR}}$  diffèrent des voies d'apoptose préférentiellement activées par la famille des récepteurs de mort et ne semblent pas faire intervenir l'activation directe de la

caspase-8 par le domaine de mort (Roux and Barker 2002). En revanche, elles semblent majoritairement mettre en jeu l'activation de la cascade de signalisation des MAPK JNK (Jun N terminal Kinase), résultant notamment dans l'activation de p53, de molécules BH3 comme Bad et Bim, la libération de cytochrome c et l'activation des caspases effectrices. De plus, il a été montré sur les cellules neuronales que l'activation de JNK induit l'expression du ligand de Fas, ce qui permet une amplification de l'apoptose *via* l'activation du récepteur Fas (Bronfman 2007).

L'activation de JNK implique le recrutement de protéines adaptatrices comme TRAF6 qui interagit avec p75<sup>NTR</sup> dans sa région juxta-membranaire (Khursigara et al. 1999; Ye et al. 1999; Yeiser et al. 2004). Mais les effets apoptotiques de p75<sup>NTR</sup> dépendent de l'orchestration de plusieurs molécules en plus de TRAF6, comme NRIF, NRAGE, NADE et SC-1. Celles-ci interagissent avec le récepteur au niveau des hélices  $\alpha$  1, 2, et 5 (Figure 27) (Roux and Barker 2002).

#### *IV-1.2.1.3.3 Voies de signalisations conduisant à la survie*

Selon le contexte cellulaire, le récepteur p75<sup>NTR</sup> peut favoriser les voies de l'apoptose mais aussi les voies de survie sous l'effet des neurotrophines. La survie cellulaire induite par la stimulation du récepteur p75<sup>NTR</sup> par NGF met en jeu principalement l'activation de la voie de survie NF- $\kappa$ B. La survie peut aussi être activée en présence de BDNF ou d'autres neurotrophines (Khursigara et al. 1999). Cette activation requiert un certain nombre de protéines adaptatrices, dont les molécules TRAF et notamment TRAF6 qui active la kinase IRAK (IL-1 receptor associated kinase). Cette kinase recrute et active la PKC atypique iota ( $\alpha$ PKC $\iota$ ) au sein d'un complexe multiprotéique (impliquant TRAF6, IRAK,  $\alpha$ PKC $\iota$ , et p62) qui va permettre la phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ B- $\beta$ , libérant ainsi le facteur de transcription NF- $\kappa$ B actif qui subit alors une translocation au noyau (Khursigara et al. 1999; Kuruvilla et al. 2004; Khursigara et al. 2001; Mamidipudi and Wooten 2002). NF- $\kappa$ B est finalement transloqué au noyau déclenchant l'expression de gènes, comme Hes1/5 qui modulent la croissance dendritique (Salama-Cohen et al. 2005) (Figure 27). Contrairement à l'activation des JNK, cette voie n'est pas inhibée par le récepteur TrkA. Il semble plus probable que cette voie soit activée lors de l'exposition des cellules à un stress (Casaccia-Bonnet et al. 1996; Bhakar et al. 1999). Enfin, cette voie de survie pourrait être activée au cours du clivage de la partie extracellulaire du récepteur p75<sup>NTR</sup> (Ye et al. 1999; Cosgaya et al. 2002).



**Figure 27: Les voies de signalisation activées par  $p75^{NTR}$ .** La liaison des NTs matures ou des pro-NTs induit l'activation de différentes voies de signalisation pouvant conduire à la prolifération, la croissance neuritique, l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. Les protéines adaptatrices NRAGE et NRIF induisent l'activation de la JNK et des caspases, qui conduit à l'apoptose. Le complexe multiprotéique (p62/TRAF6, IRAK, RIP2) induit l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui conduit à la survie de la cellule. (Arevalo and Wu 2006)

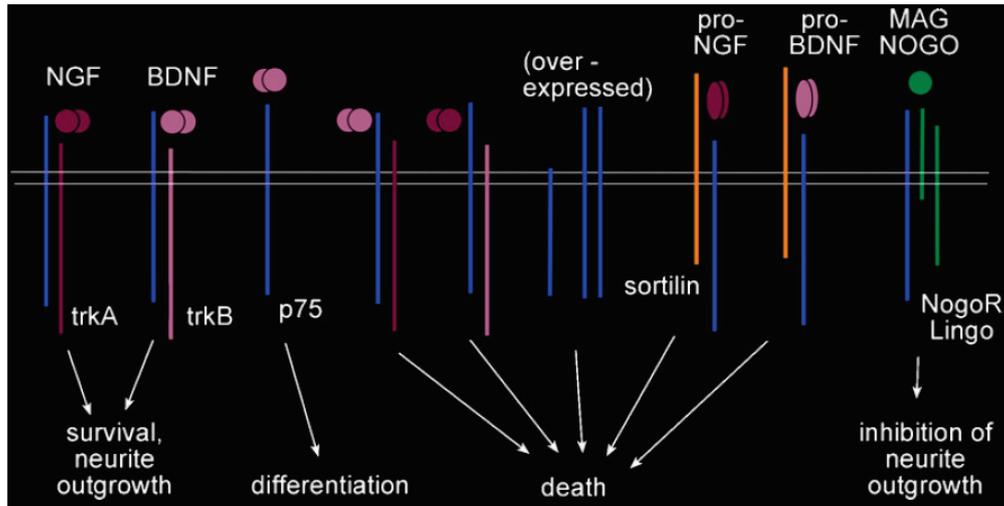
D'autres voies permettent l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules neuronales lors de la signalisation par le récepteur  $p75^{NTR}$ , comme le recrutement d'une autre protéine adaptatrice la protéine RIP-2 (Receptor interacting-protein 2) et l'activation de la voie PI3K/Akt de manière TrkA indépendante (Khursigara et al. 2001; Roux and Barker 2002).

#### IV-1.2.1.4 Les co-récepteurs de $p75^{NTR}$

Les effets induits par l'activation du récepteur  $p75^{NTR}$  sont très divers, notamment comme on vient de le voir, suite au recrutement de molécules adaptatrices conduisant à des effets parfois opposés. L'association de ce récepteur à des co-récepteurs, dont certains ont été récemment découverts, comme la sortiline, contribuent à cette diversité voir l'élargit encore plus (Barker 2004; Teng et al. 2010). Ces co-récepteurs s'associent avec  $p75^{NTR}$  de façon ligand-dépendant. Ainsi, l'apoptose induite par les pro-neurotrophines est contrôlée par l'association de la sortiline à  $p75^{NTR}$ . Au contraire, les neurotrophines matures peuvent se lier aux complexes formés des récepteurs Trk et  $p75^{NTR}$  et ainsi promouvoir la croissance (Figure 28).

Les études structurales des complexes formés avec NGF (He and Garcia 2004) ont effectivement révélé une stoechiométrie de 2 : 1 pour NGF/ $p75^{NTR}$ , autorisant le recrutement d'autres récepteurs (sauf  $p75^{NTR}$ ) pour former des récepteurs complexes multiprotéiques.

Ainsi,  $p75^{NTR}$  peut former des complexes de haute affinité avec les récepteurs Trk, aboutissant à des structures tripartites de type Trk-NGF- $p75^{NTR}$  (Hempstead et al. 1991).



**Figure 28:  $p75^{NTR}$  et ses co-récepteurs.** Le récepteur  $p75^{NTR}$  peut former un hétérodimère avec différents récepteurs. Selon le co-récepteur, les voies de signalisation qui interviennent sont différentes. La formation d'un hétérodimère  $p75^{NTR}/TrkA$  ou  $p75^{NTR}/TrkB$  induit la survie et la croissance neuritique alors qu'un hétérodimère  $p75^{NTR}/sortiline$  induit une mort cellulaire (Underwood and Coulson 2008).

- **Trk** L'association de  $p75^{NTR}$  et Trk active préférentiellement les voies de survies *via* les neurotrophines, par l'intermédiaire d'une cascade de phosphorylation, qui sera décrite ultérieurement. Lorsque ces récepteurs sont co-exprimés,  $p75^{NTR}$  augmente l'affinité des récepteurs Trk pour leur ligand. C'est notamment le cas pour TrkA dont l'affinité pour NGF augmente en présence de  $p75^{NTR}$  et diminue pour NT-3 (Dechant 2001). Les tissus périphériques produisent peu de neurotrophines et le récepteur  $p75^{NTR}$  pourrait ainsi faciliter la réponse des récepteurs Trk à de faibles quantités de neurotrophines (Barker 2004). L'interaction directe entre ces 2 récepteurs a été mise en évidence par des techniques d'immunoprécipitation et de co-localisation (Ross et al. 1998). La formation de ces hétérodimères met en jeu des interactions entre les domaines extracellulaires et intracellulaires des récepteurs  $p75^{NTR}$  et TrkA. La présence du domaine kinase de TrkA est également nécessaire, mais, les mécanismes menant à la formation de ce complexe sont encore méconnus (Wehrman et al. 2007).
- **La sortiline** La sortiline, membre de la famille des récepteurs à domaine Vsp10p, lie les pro-neurotrophines et fonctionne comme un co-récepteur avec  $p75^{NTR}$  induisant l'apoptose (Nykjaer et al. 2004). La présence ou l'absence de la sortiline à la surface de la cellule initie ou empêche, respectivement, la réponse apoptotique des cellules au pro-neurotrophines *via*  $p75^{NTR}$  (Nykjaer et al. 2004; Teng et al. 2005). La sortiline est une protéine de transport de 95 kDa appartenant à la famille des protéines de transport à domaine Vps10p (Vacuolar carboxy-Peptidase Sorting receptor-10). Ces protéines participent chez les mammifères, aux transferts protéiques à travers le réseau de l'appareil de Golgi, pour exprimer les protéines à la membrane plasmique, mais également au transfert inverse, de la membrane plasmique vers les endosomes ou les lysosomes (Nielsen et al. 2001). La sortiline est largement présente au niveau du SNC, et notamment dans le cortex, l'hippocampe et le gyrus dentelé

(Hermans-Borgmeyer et al. 1999). Elle est aussi retrouvée dans le cerveau au cours de l'embryogenèse avec une colocalisation du NGF (Hermans-Borgmeyer et al. 1999).

L'ensemble des protéines de transport Vps10p-D partage une structure commune composée d'un court peptide-signal, d'un pro-peptide N-terminal, d'un domaine extracellulaire riche en cystéines, d'une hélice transmembranaire et d'une courte portion intracellulaire dépourvue de fonction adaptatrice (Nyborg et al. 2006). L'absence de fonction catalytique dans sa portion C-terminale intracellulaire implique que l'activité « récepteur » de la sortiline ne peut fonctionner que par l'association avec d'autres protéines membranaires.

L'affinité de la sortiline pour le NGF mature est faible ( $K_d \sim 90$  nM) comparée à celle du pro-NGF ( $K_d \sim 5$  nM). Le pro-NGF semble donc être le ligand préférentiel de la sortiline, avec une affinité supérieure à celle de  $p75^{NTR}$  ( $K_d \sim 15$  nM). (Nykjaer et al. 2004). Le coefficient d'affinité de l'hétérodimère  $p75^{NTR}$ /sortiline pour le pro-NGF reste le plus élevé ( $K_d \sim 1$  nM) suggérant que la majorité du pro-NGF extracellulaire se lie préférentiellement au récepteur hétérodimérique initiant ainsi la cascade signalitique pro-apoptotique dans les cellules neuronales (Lee et al. 2001; Nykjaer et al. 2004). L'interaction du pro-NGF avec le récepteur  $p75^{NTR}$ /sortiline ne transmet pas seulement un signal pro-apoptotique au niveau neuronal, mais est aussi impliquée *in vitro* dans la migration de clones mélanocytaires humains, la surexpression de  $p75^{NTR}$  ayant été parallèlement définie *in vivo* comme facteur de dissémination métastatique cérébrale (Marchetti et al. 2004; Truzzi et al. 2008).

Le pro-BDNF lie la sortiline avec une affinité de 0.4 nM et  $p75^{NTR}$  de 15 nM. (Teng et al. 2005). Le complexe pro-BDNF/sortiline, remarquablement stable, protège le pro-BDNF du clivage protéolytique induit par les MMP ou par la plasmine exogène. De façon similaire au pro-NGF, le pro-BDNF est capable d'induire l'apoptose au niveau de cellules neuronales par son interaction avec l'hétérodimère  $p75^{NTR}$ /sortiline (Teng et al. 2005). Cette interaction pro-apoptotique entre l'hétérodimère et le pro-BDNF est également bloquée par des anticorps antagonistes de la sortiline ou de  $p75^{NTR}$  (Volosin et al. 2006). La sortiline soluble semble également réguler l'apoptose induite par le pro-BDNF. En effet, l'ajout de sortiline soluble dans le surnageant de culture permet de diminuer l'apoptose induite par le pro-BDNF en le neutralisant (Teng et al. 2005).

L'apoptose induite par l'interaction des pro-neurotrophines et de l'hétérodimère  $p75^{NTR}$ /sortiline est limitée par l'internalisation du récepteur hétérodimérique, la cinétique et les facteurs déclenchant cette endocytose étant actuellement incompris (Nielsen et al. 2001; Nykjaer et al. 2004). De même, les voies de signalisation intracellulaires mises en jeu par la liaison des pro-NT à l'hétérodimère  $p75^{NTR}$ /sortiline sont assez mal connues. Elles impliqueraient la phosphorylation de JNK avec un clivage secondaire des caspases 9, 6 et 3, ainsi que la libération du fragment  $p75^{ICD}$  généré par les  $\gamma$ -sécrétases, entraînant secondairement la translocation nucléaire de NRIF (Kenchappa et al. 2006; Volosin et al. 2006). Ainsi, par cette capacité à induire l'apoptose lors de la liaison aux pro-neurotrophines, la sortiline est vraisemblablement impliquée dans les dégénérescences neuronales, notamment lors de lésions corticales ou périphériques d'origine traumatique ou ischémique, caractérisées par la surexpression membranaire de  $p75^{NTR}$  (Wei et al. 2007; Provenzano et al. 2008)

**Autres co-récepteurs :** Le récepteur  $p75^{NTR}$ , outre les Trk et la sortiline, peut interagir avec une liste de co-récepteurs de plus en plus nombreuse, comme NogoR, Lingo ou NRH2. Ces

interactions peuvent être probablement régulées différemment selon les modifications post-traductionnelles de p75<sup>NTR</sup>, la localisation cellulaire, l'état de différenciation de la cellule ou encore les seconds messagers par lesquels p75<sup>NTR</sup> module les fonctions cellulaires (Barker 2004).

#### **IV-1.2.1.5 Internalisation, dégradation, recyclage du récepteur**

D'une façon générale, les travaux ont montré que les effets des neurotrophines sur la survie et la différenciation neuronales nécessitent l'internalisation des complexes ligand/récepteur et le transport rétrograde de ces complexes en direction du corps cellulaire des neurones (Reynolds et al. 2000). Ces données ont été obtenues à partir des travaux sur l'expression et la signalisation des récepteurs Trk, et plus particulièrement TrkA. Les récepteurs Trk sont présents à la fois sur les terminaisons axonales présynaptiques et sur les dendrites post-synaptiques (Carter et al. 2002; Schinder et al. 2000). Ainsi, les neurotrophines ne fonctionnent pas seulement comme des facteurs promouvant la survie des neurones afférents en développement, mais agissent aussi dans un mode antérograde, libérés par les cellules présynaptiques pour réguler les postsynaptiques. Par conséquent, les neurotrophines, qui activent leurs récepteurs Trk exprimés sur les terminaisons nerveuses et le long des axones des neurones, doivent induire un signal au niveau du corps cellulaire du neurone où se situe le noyau, situé parfois jusqu'à un mètre en amont de l'initiation du signal. Dans ces cas, les effets des neurotrophines sur la transcription de gènes cibles vont être réalisés selon un processus nommé « transport rétrograde » où les complexes NT/Trk vont migrer, après internalisation, dans des endosomes spécialisés, caractérisés par une capacité signalisatrice (endosomes de signalisation) permettant aussi des effets locaux (Heerssen and Segal 2002). Comme cette signalisation endosomiale avec transport rétrograde est spécifique au cas particulier du neurone, en raison de sa structure cellulaire très étendue, nous ne la présentons que succinctement.

Alors que l'internalisation et le transport rétrograde du NGF grâce à son récepteur TrkA sont bien connus dans les neurones, peu d'études se sont intéressées au trafic intracellulaire du récepteur p75<sup>NTR</sup> et les mécanismes de son internalisation et ses mouvements restent mal compris. (Roux and Barker 2002; Butowt and von Bartheld 2003). Le NGF mature induit l'internalisation relativement lente de p75<sup>NTR</sup> par des vésicules recouvertes de clathrines conduisant à la formation d'endosomes précoces. Ces endosomes ne s'acidifient pas et ne conduisent pas à la dégradation protéolytique des récepteurs par fusion avec les lysosomes, mais s'accumulent et se transforment en endosomes de recyclage pour réexprimer ces récepteurs à la surface des cellules PC12 (Saxena et al. 2004). Enfin, l'internalisation du récepteur p75<sup>NTR</sup> induit le recrutement des protéines adaptatrices MAGE et NRAGE au niveau de l'endosome, suggérant comme pour TrkA, la formation d'endosomes de signalisation. Les radeaux lipidiques pourraient réguler l'internalisation de p75<sup>NTR</sup> et son accessibilité à différents complexes avec des co-récepteurs. Étonnamment, la présence de la sortiline permet une internalisation plus rapide des pro-NGF avec p75<sup>NTR</sup> (Nykjaer et al. 2004), bien que la cinétique précise du processus n'ait pas été déterminée.

#### **IV-1.2.2 Récepteurs TrkA et TrkB**

La deuxième famille de récepteurs que reconnaissent les neurotrophines sont des récepteurs de la famille « tropomyosin kinase », les Trk. Ces récepteurs sont des récepteurs typiques à tyrosine kinases dont l'activation est réalisée par transphosphorylation suite à

l'homodimérisation des récepteurs, sous la stimulation des neurotrophines. Ces récepteurs Trk sont activés spécifiquement par les formes matures, et non les formes précurseurs des neurotrophines (Lee et al. 2001; Huang and Reichardt 2003). Ainsi les protéases qui contrôlent la maturation des neurotrophines contrôlent aussi la capacité de réponse des récepteurs Trk.

#### **IV-1.2.2.1 Données génétiques et structurales**

Les récepteurs Trk sont largement exprimés sur les cellules d'origine neuronale. La signalisation de ces récepteurs, suite à leur stimulation par les neurotrophines, est déterminante pour la survie et la différenciation des neurones au cours du développement. Les récepteurs Trk sont aussi indispensables chez l'adulte, pour maintenir la croissance et la fonction des synapses neuronales. L'activation de TrkB par le BDNF est une étape clef dans le développement et la maintenance de la mémoire. De plus, les voies de signalisation induites par la liaison des neurotrophines aux récepteurs Trk fonctionnent comme un système endogène de protection des neurones suite à des altérations biochimiques ou d'origine physique, ou lors d'ischémies transitoires (Huang and Reichardt 2001).

D'un point de vue biochimique, les récepteurs Trk sont des molécules transmembranaires caractérisées (Figure 29) par une structure commune de glycoprotéine de 145 kDa, comportant un domaine extracellulaire composé de 2 domaines riches en cystéines entourant un domaine contenant des séquences répétitives en leucines (LRR, leucine-rich repeat). Le domaine extracellulaire comprend également 2 domaines de type C2 des immunoglobulines (Ig-C2) nécessaires à la liaison des neurotrophines (Ultsch et al. 1999; Wiesmann et al. 1999). En effet, l'utilisation de chimères entre différents récepteurs Trk, la délétion et l'analyse de points de mutation, avec le domaine le plus proche de la région transmembranaire ont montré l'importance du rôle de ces domaines (Arevalo et al. 2000; Arevalo et al. 2001). En plus de la liaison à son ligand, les domaines Ig-C2 peuvent stabiliser la forme monomérique des récepteurs Trk, afin de prévenir la formation spontanée de dimères et leur activation en absence de neurotrophines. Des délétions, des récepteurs chimériques ou des points de mutations qui perturbent la structure du premier ou du second domaine Ig-C2 peuvent entraîner une activation du récepteur, indépendamment du ligand (Arevalo et al. 2000; Arevalo et al. 2001). De plus, il a été montré qu'une isoforme de TrkA, où le premier domaine Ig-C2 est manquant dans la lignée cellulaire SH-SY5Y de neuroblastome possédait un potentiel de signalisation et de transformation des fibroblastes en absence de ligands (Tacconelli et al. 2004). Enfin, la partie extracellulaire du récepteur est très fortement glycosylée (Chao and Hempstead 1995). Ces glycosylations semblent essentielles à la localisation transmembranaire des récepteurs Trk et à leur signalisation. En effet, les récepteurs non glycosylés peuvent former des homodimères, mais ne permettent pas d'induire une réponse cellulaire, comme par exemple la différenciation des cellules neuronales. Ces formes non glycosylées sont principalement cytoplasmiques et incapables d'activer les principales voies de signalisation intracellulaire (Ras-MAP kinase, MEK et Erk). Après une courte hélice transmembranaire, ces récepteurs sont formés d'une séquence intracytoplasmique présentant un domaine à activité tyrosine kinase intrinsèque (Huang and Reichardt 2003).

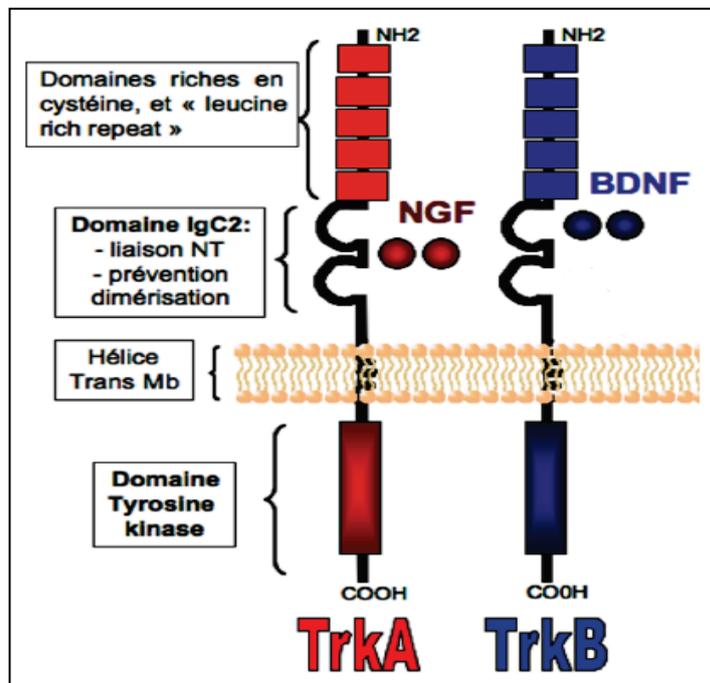
L'affinité des neurotrophines pour leurs récepteurs Trk est modulée par la présence du récepteur p75<sup>NTR</sup> qui renforce la spécificité de leur ligand (Benedetti et al. 1993). La formation de sites de liaison de haute affinité pour le NGF demande la présence des

## ***Introduction bibliographique: Les neurotrophines et leur implication dans la survie des lymphocytes B***

récepteurs dans leurs formes complètes et dans un ratio correct de Trk et p75<sup>NTR</sup> (Mahadeo et al. 1994).

Plusieurs récepteurs ont été identifiés le premier TrkA, le second TrkB. Celui-ci est plus proche de TrkA dans le domaine kinase, qui est à 88% conservé; le domaine extracellulaire a la même structure générale mais n'est conservé qu'à 57% par rapport TrkA (Klein et al. 1989). Plusieurs chercheurs ont identifié TrkA comme un récepteur du NGF (Kaplan et al. 1991a; Kaplan et al. 1991b) et TrkB comme un récepteur du BDNF (Klein et al. 1991).

Enfin, on sait maintenant que le rôle de ces récepteurs dépasse le cadre du SNC et du SNP. En effet, les récepteurs Trk, et notamment TrkA et TrkB, ont été identifiés à la membrane de cellules non neuronales, comme celles du système immunitaire, point qui fera l'objet d'un prochain chapitre, ainsi que des cellules fibroblastiques ou musculaires où leur signalisation contribue à la survie, la différenciation et la prolifération cellulaires (Levi-Montalcini et al. 1995; Melamed et al. 1996; Aloe et al. 1997; Ricci et al. 2004).



**Figure 29:** Structure des récepteurs Trk. Les récepteurs Trk sont constitués d'une partie extracellulaire, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire. Le domaine extracellulaire est constitué de 2 domaines riches en cystéines entourés de domaines riches en leucines et de 2 domaines de type C2 des immunoglobulines qui participent à la liaison du récepteur avec sa neurotrophine. Le domaine intracellulaire est constitué d'un domaine Tyrosine kinase (Arevalo and Wu 2006).

### **IV-1.2.2.2 Les différentes formes**

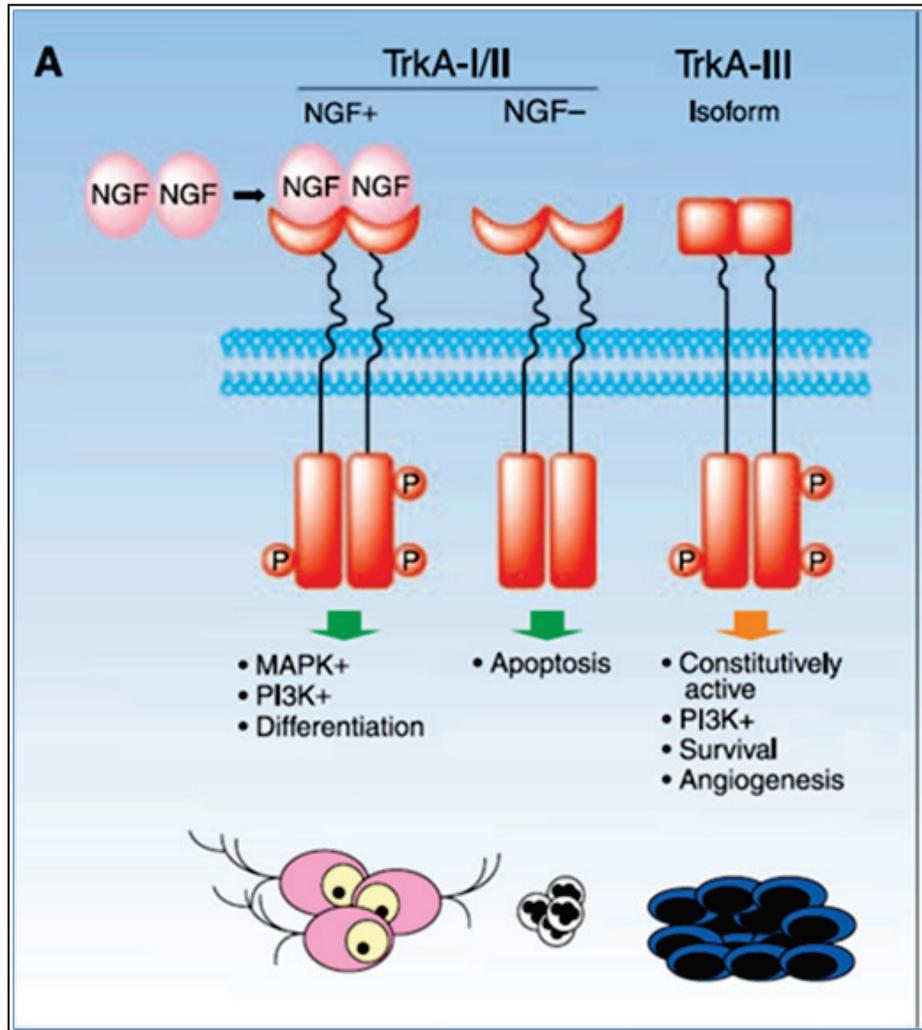
La majorité des isoformes des récepteurs Trk sont le résultat d'épissages alternatifs.

Des isoformes des récepteurs Trk générées suite à des épissages alternatifs des exons codant notamment pour les portions intracellulaires de ces récepteurs ont été décrites. Ces variants participent à la régulation de la signalisation initiée par la liaison des neurotrophines aux récepteurs. Ainsi, l'expression de formes tronquées de TrkB et TrkC, sans domaine tyrosine

kinase au niveau de leur portion intracytoplasmique, a été associée à une inhibition de la dimérisation des récepteurs Trk complets, et de ce fait, de la réponse aux neurotrophines, comme l'activation de la phospholipase C- $\alpha$ 1 (Eide et al. 1996)

Concernant TrkA, deux isoformes du récepteur TrkA ont été initialement identifiées et appelées formes TrkA I, de 790 acides aminés, et TrkA II, de 796 acides aminés (Barker and Shooter 1994). Leur expression diffère dans leur domaine extracellulaire, à proximité de la membrane plasmique. L'analyse de ces isoformes ne révèle pas de différence de liaison au NGF ou d'activité biologique, mais une expression différentielle a pu être mise en évidence. La forme TrkA II est exprimée principalement dans le système nerveux (Clary et al. 1994), alors que la forme TrkA I a une expression plus ubiquitaire, et plus particulièrement, dans les cellules hématopoïétiques et les cellules immunitaires (Barker and Shooter 1994).

D'autres isoformes résultant d'un épissage alternatif ont été identifiées, donnant 2 autres variants de TrkA, TrkA L1 et TrkA L0. Il manque un des trois domaines riches en leucine pour l'isoforme L1 et les trois pour l'isoforme L0 (Dubus et al. 2000). Ces isoformes sont exprimées dans le thymus, les testicules, le poumon et le rein chez le rat, mais pas dans le système nerveux, et sont toujours exprimées en même temps que l'isoforme TrkA I (Dubus et al. 2000). Les caractéristiques de liaison du NGF à ces isoformes ne sont pas encore connues. Un autre variant résultant d'un épissage alternatif a été mis récemment en évidence dans les neuroblastomes au stade précoce, et appelé TrkA III (Tacconelli et al. 2004). Cette isoforme est constitutivement active et favorise la survie cellulaire en activant la voie PI3K/Akt. La liaison du NGF à cette isoforme et son activation conduiraient à bloquer les effets anti-oncogéniques de l'isoforme TrkA II, également exprimée dans ces cancers. (Brodeur et al. 2009) (Figure 30).

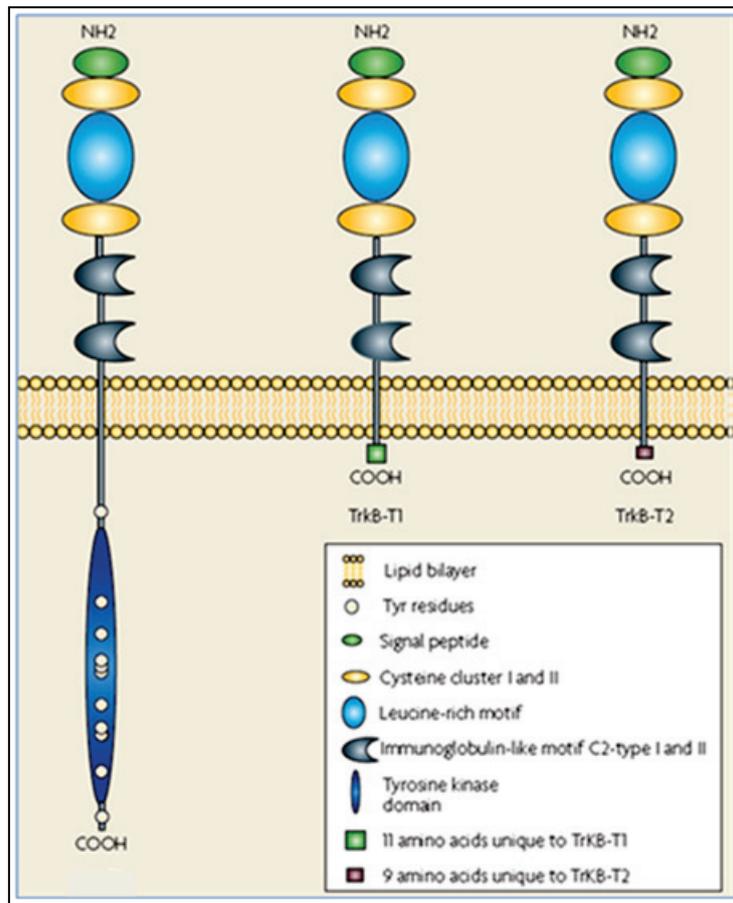


**Figure 30: Isoformes principales du récepteur TrkA.** L'activation des isoformes TrkA-I (neuronal) ou TrkA-II (non-neuronal) par NGF entraîne la survie et la différenciation neuronale. En absence de ligands, une voie alternative est activée conduisant à l'apoptose. L'isoforme TrkA-III est constitutivement active et indépendante du ligand. Elle promeut la survie à travers la voie PI3K/Akt. (Brodeur et al. 2009)

Le récepteur TrkB existe sous la forme de récepteurs tronqués, avec deux variants majeurs de 95kDa, TrkB-T1 et TrkB-T2, résultants d'un épissage alternatif, dépourvus du domaine intracellulaire tyrosine-kinase, mais avec des domaines intracellulaires distincts. Dans certaines conditions, et quand ils sont co-exprimés avec les formes complètes du récepteur, ces récepteurs tronqués pourraient jouer le rôle de « dominants négatifs », atténuant les effets de la liaison des ligands en induisant l'internalisation du récepteur TrkB-145kDa ou en inhibant le signal prolifératif par la formation d'hétérodimères TrkB-145-TrkB95kDa, biologiquement inactifs. Ainsi, la forme tronquée de TrkB-95kDa est capable d'inhiber l'activation intracellulaire de la PLC- $\gamma$ , initiateur de la cascade de signalisation intracellulaire du BDNF (Klein et al. 1989; Eide et al. 1996; Minichiello 2009) (Figure 31). Minoritaires au niveau cérébral, ces récepteurs peuvent tout de même induire un signal d'activation

## *Introduction bibliographique: Les neurotrophines et leur implication dans la survie des lymphocytes B*

intracellulaire, soit par leur partenariat avec d'autres récepteurs (p75<sup>NTR</sup>, TrkB-145 kDa) soit directement, les modalités de signalisation intracellulaire restant inconnues.



**Figure 31:** Les différentes isoformes de TrkB. Il existe deux différentes classes de récepteur TrkB. La première gp145TrkB est hautement glycosylée et contient des domaines tyrosine kinases. La deuxième classe de récepteur TrkB est constituée de deux récepteurs tronqués dus à un épissage alternatif (TrkB-T1 ou gp95TrkB et TrkB-T2). Ces deux isoformes possèdent des domaines extracellulaires et transmembranaires identiques à gp145TrkB mais il leur manque leur région catalytique. (Minichiello 2009)

Au contraire, dans des modèles murins n'exprimant pas le récepteur TrkB-145kDa, la croissance neuritique est induite par l'activation de la forme tronquée du récepteur. La signalisation est alors dépendante de l'activation du domaine intracellulaire de p75<sup>NTR</sup>, ces deux récepteurs formant alors un hétérodimère (Hartmann et al. 2004). Étrangement, en l'absence du récepteur p75<sup>NTR</sup>, le récepteur TrkB tronqué peut induire à bas bruit une croissance neuritique sans que la voie de signalisation intracellulaire ne soit définie à ce jour. Ce récepteur tronqué, activé par le BDNF avec une affinité identique (Strohmaier et al. 1996), peut également induire la survie de cellules non-neuronales, notamment plasmocytaires, les voies de signalisation restant peu étudiées (Pearse et al. 2005; Hu et al. 2006).

Finalement, le récepteur TrkA peut aussi subir un clivage extracellulaire par des métalloprotéases (MMP) à proximité de la membrane, conduisant à la libération de formes solubles de ces récepteurs, mises en évidence au niveau des surnageants de cultures neuronales. Ce clivage, déclenché par des valeurs seuils de neurotrophines extracellulaires, empêche l'activation du récepteur de manière ligand-dépendante et pourrait constituer ainsi, un système de régulation négative de l'activation du récepteur. D'autre part, le clivage du récepteur TrkA conduit à l'activation de son domaine tyrosine-kinase intrinsèque et entraîne

l'activation d'une signalisation intracellulaire NT-indépendante (Cabrera et al. 1996; Diaz-Rodriguez et al. 1999).

#### **IV-1.2.2.3 Ligands et voies de signalisation**

##### *IV-1.2.2.3.1 Ligands*

Les récepteurs Trk sont les récepteurs de haute affinité pour les neurotrophines matures. Ainsi, TrkA liera préférentiellement le NGF et TrkB le BDNF. Cette liaison activera préférentiellement des voies de survie. Cependant, il est tout de même possible que d'autres NT puissent se lier aux Trk. En effet, la neurotrophine NT3 peut se lier à l'un des variants de TrkA. De plus, comme nous l'avons déjà évoqué, la co-expression des récepteurs de haute affinité (Trk) et de basse affinité (p75<sup>NTR</sup>) pour les neurotrophines augmente l'affinité des récepteurs Trk pour leur ligand préférentiel (comme NGF pour TrkA), et diminue la réponse aux autres ligands (comme NT3 pour TrkA) (Dechant 2001). Cette organisation tripartite p75<sup>NTR</sup>-Trk-NGF fournit un mécanisme pour expliquer la collaboration fonctionnelle des 2 types de récepteurs et fait encore l'objet de débats (Barker 2007).

##### *IV-1.2.2.3.2. Voies de signalisation*

Les voies de signalisation activées par les neurotrophines à travers les récepteurs Trk engendrent diverses fonctions neuronales, comme la survie cellulaire, la différenciation, l'arborisation dendritique, la formation synaptique, la plasticité, la croissance et la polarisation axonales. La liaison des neurotrophines aux récepteurs Trk entraîne, contrairement à leur liaison à p75<sup>NTR</sup>, une dimérisation, une transphosphorylation des récepteurs, le recrutement de différents adaptateurs et enzymes, et l'activation de plusieurs voies de signalisation. Ces événements sont communs avec d'autres récepteurs tyrosine kinases, mais la présence de sites spécifiques de liaison aux NT, le recrutement des différents adaptateurs et enzymes, la régulation du trafic des récepteurs en font des réponses spécifiques aux neurotrophines (Arevalo and Wu 2006) (Figure 32).

Deux tyrosines des récepteurs Trk, Y490 et Y785, pour TrkA et leurs tyrosines correspondantes pour TrkB et TrkC, sont phosphorylées en réponse aux neurotrophines et servent au recrutement et à la liaison de protéines adaptatrices et d'enzymes. Y490 et Y785 recrutent tout d'abord, respectivement, la protéine adaptatrice Shc (Src homology-2 containing protein), à domaine d'interaction protéique de type SH2 et la phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) (Stephens et al. 1994). Les tyrosines phosphorylées localisées au niveau des domaines kinases, Y670, Y674 et Y675, peuvent aussi engager des protéines adaptatrices dont SH2B, APS et Grb2 (Qian et al. 1998; MacDonald et al. 2000).

Parmi les voies de signalisation activées par les récepteurs Trk en réponse aux neurotrophines, Shc-Ras-MAPK, Rap-MAPK, PI3K-Akt et PLC- $\gamma$ -protéine kinase C (PKC) sont les voies les plus étudiées. Elles ont été décrites dans des cellules PC12, lignée cellulaire provenant d'un phéochromocytome de rat, qui répond au NGF et ressemble seulement par certains aspects à des neurones sympathiques. Ces voies ont été aussi largement étudiées dans un contexte d'activation NGF / TrkA, puis extrapolées aux autres récepteurs Trk.

- **Ras-MAPK**

Ras est une petite protéine G associée à la membrane de la cellule grâce à une de ses extrémités lipidiques. Ras est induite rapidement et transitoirement par NGF (Qiu and Green 1991). La stimulation des récepteurs TrkA par NGF engage 2 protéines adaptatrices Shc et Grb2 (Growth factor receptor bound protein-2). Grb2 possède un autre domaine d'interaction protéique, le domaine SH3, qui leur permet de recruter un facteur d'échange de nucléotides à guanine (GEF, guanines nucleotide exchange factors), SOS, lequel active Ras en induisant un échange entre le GDP et le GTP (Stephens et al. 1994). L'activation de Raf-1 et B-Raf en aval de Ras déclenche l'activation des MAPK, ERK1/2 (Troppmair et al. 1992). La modulation de la signalisation de Ras peut être arrêtée par « retro-contrôle » négatif, car l'activation des MAPK peut stopper cette voie de signalisation en phosphorylant SOS rompant le complexe Grb2-SOS (Kao et al. 2001). L'activation de Ras en réponse aux neurotrophines a été associée à la signalisation et à la régulation transcriptionnelle impliquées dans la survie neuronale et la différenciation. Ainsi, lors de la micro-injection d'anticorps anti-Ras dans des cellules PC12, après un traitement au NGF, la formation des neurites est inhibée

- **Rap-MAPK**

Les neurotrophines stimulent de 2 façons différentes l'activation de MAPK. Une transitoire, citée ci-dessus, implique Shc-SOS-Ras-B-raf/Raf1-MAPK, et une, prolongeant l'activation des MAPK nécessite l'intervention d'adaptateurs, comme CrkII/CrkL, GEF C3G, et la GTPase Rap1 et B-Raf (York et al. 1998; Wu et al. 2001). Cette voie de signalisation demande l'internalisation du récepteur Trk dans des endosomes (York et al. 2000; Wu et al. 2001). Si le fait que le NGF induise l'activation de Rap1 par C3G est généralement accepté, la façon dont le récepteur TrkA entraîne la signalisation de CrkII/CrkL reste controversée.

La phosphorylation des MAPK engendre en aval l'activation de plusieurs cibles, comme les facteurs de transcriptions, Rsk et MSK1. Ces deux kinases peuvent phosphoryler et activer la protéine CREB qui contrôle l'expression de gènes essentiels à la survie (comme l'expression de molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2) et la différenciation des neurones (Xing et al. 1996). L'expression de BDNF est régulée par CREB et suggère une boucle autocrine positive de potentialisation de l'action des neurotrophines (Finkbeiner et al. 1997).

- **PI3K-Akt**

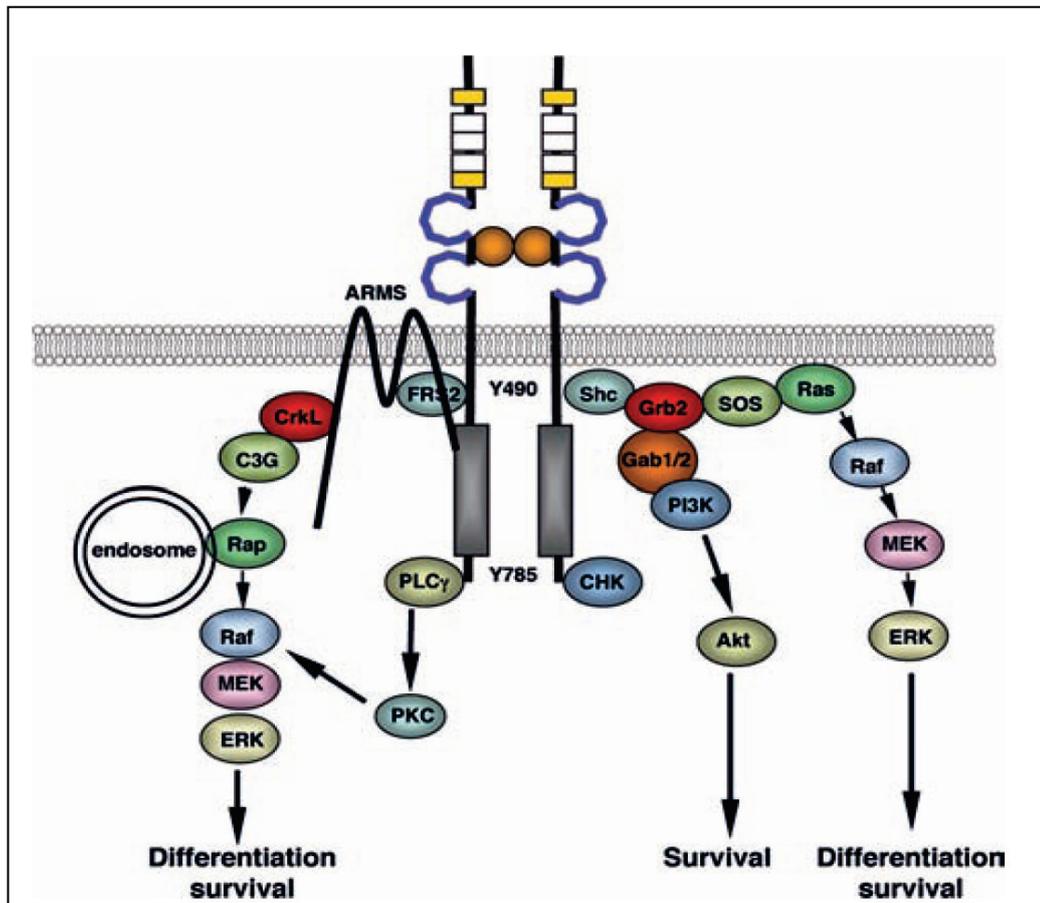
Les neurotrophines jouent un rôle prépondérant dans la survie de plusieurs populations neuronales pendant le développement et la signalisation de la voie PI3K-Akt est critique à cette fonction. Les récepteurs Trk actifs engagent Shc, qui associée avec deux protéines adaptatrices Grb2 et Gab1 (Grb2 associated binder-1) active PI3K et consécutivement Akt. La liaison de PI3K à Gab1 est nécessaire pour l'activation de la PI3K, la rupture de cette association diminue la survie des cellules PC12 dépendante de NGF (Holgado-Madruga et al. 1997). La signalisation de la voie PI3K-Akt et son rôle dans la survie ont été démontrés aussi dans des cultures primaires de neurones et dans une lignée cellulaire de neuroblastome, les SH-SY5Y (Encinas et al. 1999; Atwal et al. 2000).

La régulation de la fonction de plusieurs effecteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques, en aval d'Akt, peut induire la survie sous l'action des neurotrophines. Par exemple, la phosphorylation de Bad par Akt peut permettre des phosphorylations supplémentaires de Bad par d'autres kinases, prévenant ainsi les effets pro-apoptotiques de cette protéine (Datta et al.

## Introduction bibliographique: Les neurotrophines et leur implication dans la survie des lymphocytes B

1997). Pareillement, le facteur de transcription « Forkhead » (FKHRL1), qui régule l'expression de plusieurs protéines pro-apoptotiques (dont le Fas-ligand), est phosphorylé par Akt en réponse aux neurotrophines, limitant son activité transcriptionnelle (Zheng et al. 2002). De plus, la voie de survie NF- $\kappa$ B est activée *via* la phosphorylation par Akt de l'inhibiteur I $\kappa$ B qui sera ensuite dégradé. La voie PI3K-Akt peut aussi exercer un effet positif sur la signalisation rétrograde qui module la survie neuronale (Kuruvilla et al. 2000).

Cette voie de signalisation peut moduler d'autres fonctions autres que la survie, notamment l'activation d'Akt se produit au cours de la croissance axonale (Atwal et al. 2000; Markus et al. 2002)



**Figure 32:** Les voies de signalisations activées par les récepteurs Trk et leurs acteurs. La liaison des neurotrophines matures aux récepteurs Trk entraîne la dimérisation de ces derniers permettant son auto-phosphorylation et l'activation des différentes voies de signalisation. L'activation de la phospholipase  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ), de la protéine kinase C (PKC), ainsi que des protéines Ras et Raf conduisent à l'activation de la voie MAP-kinase ERK (Extracellular-Regulated Kinase). Une autre voie met en jeu la PI3-kinase (PI3-K) entraînant l'activation d'Akt. (Arevalo and Wu 2006).

### • PLC $\gamma$

La phosphorylation de la Y785 des récepteurs Trk conduit au recrutement de la PLC $\gamma$  et son activation résulte d'une phosphorylation de résidus sérine, thréonine et tyrosine, et ce, directement par les récepteurs Trk (Kim et al. 1991; Vetter et al.). L'activation de la PLC $\gamma$  aboutit à une hydrolyse des phosphatidylinositol (4,5) biphosphates (PI(4,5)P $_2$ ) formant de l'inositol triphosphate (IP $_3$ ) et de diacylglycérol (DAG). IP $_3$  et DAG déterminent l'activation de différentes isoformes de la PKC. Les effets de l'IP $_3$  sont modulés par la libération de

calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) à partir de vésicules de stockage intracellulaires, ce qui stimule la protéine kinase calcium dépendante, la calmoduline (CAM kinase). La PKC active les voies de signalisation de MEK1 et Erk1 *via* la phosphorylation de Raf1 (Corbit et al. 1999). Les effecteurs en aval de MEK1 et Erk1/2 contrôlent l'expression et/ou l'activité de nombreuses protéines, dont des canaux ioniques et des facteurs de transcriptions (Reichardt 2006).

#### **IV-1.2.2.4 Internalisation, dégradation, recyclage du récepteur**

Comme nous l'avons évoqué pour  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ , une signalisation spécifique des complexes NT/récepteurs a été décrite pour expliquer la fonctionnalité des récepteurs, parfois situés très loin du corps cellulaire où les facteurs de transcription doivent agir. Cette signalisation très spécifique aux neurones, met en jeu des endosomes dits de signalisation et un transport rétrograde de ces endosomes. Comme pour  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ , nous ne présentons que brièvement le processus dans le cas des récepteurs Trk.

L'hypothèse d'une voie de signalisation endosomale proposée par Mobley et ses collègues (Beattie et al. 1996) postule qu'il existe un mécanisme spécialisé de signalisation rétrograde initiée par les neurotrophines qui stimulent les cellules présynaptiques. Selon cette hypothèse, les neurotrophines se lient à des récepteurs Trk au niveau de terminaisons nerveuses, activent le récepteur, et induisent l'internalisation de celui-ci. Trois mécanismes contribuant à cette internalisation ont été décrits : la voie de la clathrine, la voie des cavéoles et la macropinocytose (Zweifel et al. 2005). Une vésicule d'endocytose, contenant le récepteur activé Trk et son ligand neurotrophinique, est ensuite transportée à partir du « terminal synaptique » vers le corps cellulaire, et cette signalisation endosomale agit comme médiateur d'une réponse biologique. Les récepteurs Trk restent catalytiquement actifs au sein de ces vésicules intracellulaires. Les petites vésicules d'endocytose contenant des récepteurs activés Trk ont été isolées de cellules indifférenciées PC12, après stimulation au NGF, et ces vésicules sont associées à des molécules de signalisation en aval, y compris Shc, petite protéine G, Rap, ERK, et la PLC (Howe et al. 2001; Wu et al. 2001).

#### **IV-1.2.2.5 Interactions entre les signalisations des récepteurs Trk et $\text{p75}^{\text{NTR}}$**

Les interactions entre les récepteurs Trk et  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  ont souvent des effets opposés. Comme nous l'avons expliqué, la liaison aux récepteurs Trk induit la plupart du temps la survie et la différenciation neuronales, alors que l'engagement de  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  aboutit fréquemment à la mort cellulaire par apoptose. Il y a plusieurs mécanismes qui permettent d'expliquer ces communications entre les récepteurs pour aboutir à une réponse biologique adaptée.

Les voies de signalisation des récepteurs Trk contrecarrent à plusieurs niveaux la voie majeure mise en jeu lors de l'activation des récepteurs  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ , la voie de la kinase JNK (Yoon et al. 1998). Ainsi, l'activation de la voie Ras supprime la cascade d'activation de JNK. Cet effet est dépendant de l'activation induite par Ras de la voie PI3K, qui, par ailleurs est capable d'inhiber directement la voie JNK. Finalement, les 2 types de récepteurs activent la voie NF- $\kappa$ B, ce qui permet un effet synergique des 2 signalisations sur la survie cellulaire (Reichardt 2006).

Les interactions entre les signalisations des récepteurs  $\text{P75}^{\text{NTR}}$  et Trk sont aussi facilitées par l'assemblage de ces récepteurs en un complexe multiprotéique. Une protéine nommée

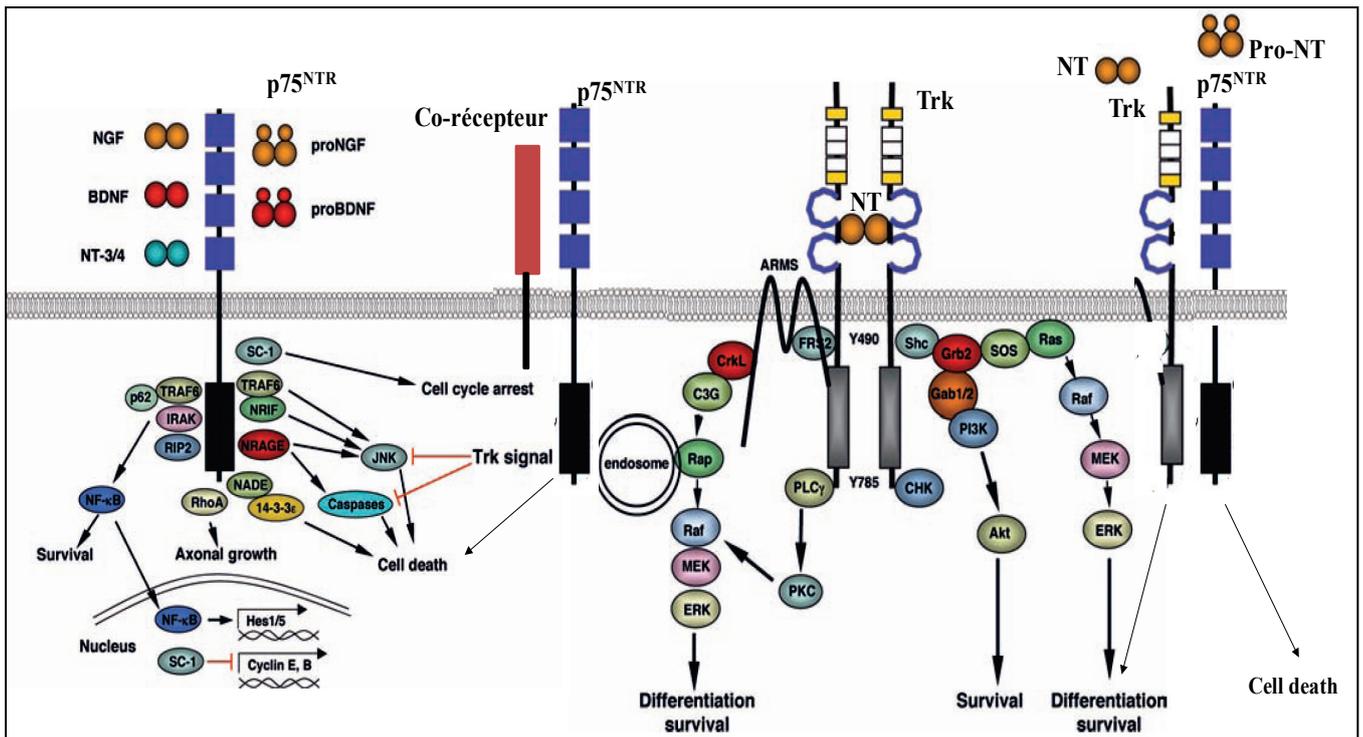
ARMS (ankyrin repeat-rich membrane-spanning) a été identifiée comme pouvant interagir avec les 2 types de récepteurs. Elle est phosphorylée suite à l'activation des Trk (figure 33) fournissant un site d'ancrage pour Crk, qui résulte en une activation prolongée des signalisations Rap et Erk (Arevalo and Wu 2006). Les cavéolines constituent une autre plateforme pour permettre l'interaction entre Trk et p75<sup>NTR</sup> car elles interagissent avec les 2 récepteurs (Bilderback et al. 1999). Finalement, le complexe p62-TRAF6-IRAK décrit dans la signalisation de p75<sup>NTR</sup> apparaît comme un autre moyen d'associer les 2 signalisations, avec la liaison de TRAF6 à p75<sup>NTR</sup> et de p62 à TrkA (Wooten et al. 2001).

L'idée qui se dégage de ces études sur les interactions p75<sup>NTR</sup>-Trk est que les signaux pro-apoptotiques sont largement supprimés suite à la signalisation des Trk.

#### **IV-1.3 Bilan : signalisation des neurotrophines et balance survie/apoptose**

Comme nous venons de le voir, la signalisation des neurotrophines est un phénomène complexe qui fait intervenir de nombreux récepteurs et co-récepteurs qui selon leur taux d'expression et le ligand moduleront la réponse induite, favorisant les voies de survie ou d'apoptose. Dans ce contexte, la protéolyse des pro-neurotrophines est un élément décisif dans la régulation de la spécificité et donc de la réponse induite par les signalisations des 2 familles de récepteurs.

La figure 33 ci-dessous résume toutes les voies et les acteurs impliqués dans les signalisations activées par les neurotrophines.



**Figure 33: Schéma récapitulatif de la signalisation des neurotrophines.** L'interaction des NT matures avec  $p75^{NTR}$  peut conduire soit à une réponse pro-apoptotique, soit à une réponse proliférative et ce en fonction du type cellulaire, de l'environnement en NT ou de degré d'activation cellulaire. La fixation des pro-NT à l'hétéro-dimère  $p75^{NTR}$  /sortiline induit un signal pro-apoptotique.  $p75^{NTR}$ , par son interaction avec les récepteurs Nogo-R et Lingo-1 inhibe la croissance neuronale. La liaison des NT matures au récepteur Trk conduit à une dimérisation et à l'activation de voies de survie. L'interaction Trk /  $p75^{NTR}$  permet en revanche d'augmenter le signal prolifératif et anti-apoptotique délivré par la fixation de la NT mature sur le récepteur Trk. (Arevalo and Wu 2006)

#### **IV-2. Généralités sur la découverte du rôle des neurotrophines dans le système immunitaire**

Historiquement, la relation entre les neurotrophines et le système immunitaire a été découverte, il y a deçà une trentaine d'années par les travaux de l'équipe de Rita Levi-Montalcini sur l'implication du NGF dans la régulation de la fonction de cellules inflammatoires, les mastocytes. L'injection de NGF entraînait en effet, une augmentation de l'infiltration mastocytaire tissulaire chez des rats nouveau-nés (Aloe and Levi-Montalcini 1977). La présence membranaire de récepteurs au NGF dans les mastocytes est identifiée par la suite (Horigome et al. 1993; Kawamoto et al. 1995). NGF peut ainsi engendrer une dégranulation des cellules mastocytaires et augmente leur survie *in vitro*. Ces travaux suggéraient le rôle des NT et notamment de NGF dans la régulation des processus inflammatoires et allergiques, ce qui a été finalement corrélé ensuite à l'augmentation du taux de NGF dans les fluides biologiques, lors de plusieurs maladies allergiques, immunitaires ou inflammatoires. NGF est ainsi considéré par certains chercheurs comme une cytokine-Th2 modulant la réaction inflammatoire allergique et les processus de remodelage et réparation tissulaires (Bonini et al. 2003; Micera et al. 2007).

Les neurotrophines jouent un rôle dans la maturation des lymphocytes. C'est dans les années 1990 que l'équipe de Rita Levi-Montalcini montre pour la première fois une relation

entre la maturation du système immunitaire et les neurotrophines. En effet, elle montre que le NGF semble nécessaire à la maturation de la bourse de Fabricius, organe lymphoïde central chez les oiseaux où se forment les lymphocytes B, grâce à une action anti-apoptotique sur les lymphocytes (Laudiero et al. 1991; Bracci-Laudiero et al. 1993). De plus, une transcription élevée des neurotrophines est également observée dans les tissus spléniques aviaires lesquels expriment constitutivement les récepteurs TrkA, TrkB, TrkC et p75<sup>NTR</sup>, suggérant un rôle de ces neurotrophines dans l'homéostasie de cet organe lymphoïde périphérique (Yamamoto et al. 1996). Dans les tissus humains, les transcrits des neurotrophines et de leurs récepteurs de hautes et basses affinité sont aussi retrouvés dans les tissus médullaires. De nombreuses cellules exprimant les neurotrophines, notamment NGF et BDNF, sont retrouvées dans le stroma médullaire comme les ostéoblastes, les mégacaryocytes, les cellules dendritiques et endothéliales (Labouyrie et al. 1999).

Il est à remarquer que les érythroblastes, les progéniteurs éosinophiles et myélo-monocytaires expriment respectivement TrkA, TrkB et TrkC, mais ils ne semblent pas exprimer p75<sup>NTR</sup> (Labouyrie et al. 1999). Le NGF, produit par les cellules stromales médullaires, exerce un effet anti-apoptotique sur les progéniteurs érythrocytaires médullaires humains par l'intermédiaire de sa liaison au récepteur TrkA. Cet effet anti-apoptotique s'effectue en synergie avec le « Stem Cell Factor » (Auffray et al. 1996). Le NGF est aussi un facteur de survie pour les progéniteurs médullaires myéloïdes murins et humains, et les progéniteurs mastocytaires, par son interaction avec TrkA (Matsuda et al. 1988; Kannan et al. 1993; Chevalier et al. 1994). Les récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup> sont exprimés par les progéniteurs médullaires humains CD34<sup>+</sup>, laissant supposer une implication de NGF dans les premiers stades du développement médullaire (Chevalier et al. 1994). Cependant, l'expression des transcrits de ces mêmes récepteurs est relativement variable au niveau des lignées humaines myéloïdes et érythroblastoides immatures, suggérant une dérégulation des mécanismes anti-apoptotiques sous l'effet du NGF, dans ces modèles cellulaires (Chevalier et al. 1994).

La présence de NGF et BDNF et de leurs récepteurs a été aussi démontrée chez la souris, au niveau du thymus, organe lymphoïde central chez les vertébrés où est réalisée la différenciation des lymphocytes T. De plus, chez les oiseaux, l'expression des récepteurs de haute affinité, notamment TrkA, augmente au cours de la maturation thymique, suggérant une implication des neurotrophines dans le processus de maturation T (Ciriaco et al. 1996). L'implication des neurotrophines dans la survie et la maturation des progéniteurs T a été confirmée par la suite, par les modèles de souris *KO* pour p75<sup>NTR</sup> et TrkA. Ces souris se caractérisent en effet par une diminution de la densité en thymocytes et l'absence de différenciation cortico-médullaire au niveau du thymus (Garcia-Suarez et al. 2001). A noter que les souris TrkA<sup>-/-</sup> présentent aussi, à l'âge adulte, un dysfonctionnement des lymphocytes B, avec une hypergammaglobulinémie polyclonale caractérisée par des taux anormalement élevés d'IgG1, IgG2b et d'IgM sans toucher la production d'IgE et d'IgA. Bien que la réponse humorale à une stimulation antigénique reste normale chez ces souris, il est observé une augmentation plus importante de cellules CD5<sup>+</sup> avec le vieillissement, l'augmentation de ces lymphocytes étant aussi associée à l'incidence de maladies auto-immunes.

Ainsi, les données actuelles sur l'implication des neurotrophines et de leurs récepteurs au cours de la maturation du système immunitaire et de la régulation de la réponse immune sont, depuis les travaux pionniers de Rita Levi-Montalcini, nombreuses. Elles suggèrent l'existence d'une « neuro-immunomodulation » spécifique par cette famille de neuropeptides. Par la suite, nous nous intéresserons tout particulièrement aux productions de neurotrophines, de leurs récepteurs et à leur rôle au niveau des lymphocytes B.

### **IV-3. Neurotrophines et survie des lymphocytes B**

#### **IV-3.1. Production et fonctions biologiques de NGF et BDNF**

##### **IV-3.1.1 Données sur les cellules B normales**

- **Le NGF**

Le NGF est produit par les lymphocytes B humains normaux qui semblent constituer une population majeure dans cette production (Edling et al. 2004). Cette production est augmentée suite à une activation polyclonale (Santambrogio et al. 1994; Torcia et al. 1996a; Torcia et al. 2001). Au contraire, une stimulation des lymphocytes B humains par des anti-IgM associés à l'IL-4 n'engendre pas d'augmentation de NGF, suggérant une capacité différente de sécrétion en fonction du type cellulaire activé, et notamment un comportement différent des cellules B naïves, population cellulaire répondant majoritairement lors de la stimulation par les anti-IgM (Torcia et al. 1996b).

Des résultats globalement similaires sont retrouvés chez la souris où le NGF est aussi détecté dans les lymphocytes B (Edling et al. 2004), sa sécrétion augmentant après une stimulation mitogénique par des lipopolysaccharides ou après une exposition à un agoniste  $\beta$  adrénergique (l'isoproterenol). La production de NGF est augmentée après l'exposition de ces lymphocytes murins à l'IL-4 ou à l'IL-6, en présence de CD40 Ligand (Barouch et al. 2000; Heese et al. 2006). L'augmentation de l'expression des transcrits de NGF, suite à ces différentes stimulations mitogéniques, est dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B. Des souris BDNF<sup>-/-</sup> sont incapables de produire du NGF après stimulation mitogénique, suggérant que le BDNF intervient directement dans l'activation NF- $\kappa$ B nécessaire à l'augmentation de la synthèse du NGF (Heese et al. 2006).

La reconnaissance du NGF exogène avec son récepteur de haute affinité TrkA engendre un effet prolifératif, dose dépendant (Thorpe and Perez-Polo 1987; Otten et al. 1989; Brodie and Gelfand 1992; Torcia et al. 1996a). Celui-ci agit en synergie avec l'effet produit *in vitro* par l'IL-4 et l'IL-2, dont le NGF induit par ailleurs, l'expression des récepteurs (Brodie and Gelfand 1992). Le NGF est un facteur exocrine de survie pour les cellules B humaines et murines également par son interaction avec TrkA, l'adjonction d'Ac antagonistes de p75<sup>NTR</sup> ne modifiant en rien la viabilité de ces lymphocytes (Torcia et al. 1996a). Le NGF est produit par les cellules B mémoires, et sa neutralisation, *in vitro*, par des Ac antagonistes induit la disparition de l'expression intracellulaire de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qui conduit à une augmentation de l'apoptose, affectant plus particulièrement, les cellules B IgG ou IgA positives. Ces résultats suggèrent un rôle de facteur autocrine de survie du NGF pour les cellules B mémoires (Torcia et al. 1996a; Torcia et al. 2001). En revanche, cette neurotrophine ne modifie pas l'apoptose des cellules B matures naïves IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>, alors que ces cellules sécrètent cette neurotrophine en quantité équivalente et présentent à leur surface les récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup> de façon similaire aux cellules B mémoires (Torcia et al. 1996a).

Il favorise aussi la production d'immunoglobulines, *in vitro* chez l'homme (Otten et al. 1989; Kimata et al. 1991; Brodie et al. 1998). Cependant, les données diffèrent selon les auteurs et les résultats sont parfois discordants, vraisemblablement en raison de conditions expérimentales différentes. La stimulation spécifique de la production d'immunoglobulines, IgG, IgA et IgM par le NGF, a été confirmée par les travaux de Torcia. Ainsi, la neutralisation

du NGF, produit de manière autocrine par les lymphocytes B stimulés par le PMW, diminue respectivement de 60, 90 et 20 % la production de ces immunoglobulines. Ces derniers travaux suggèrent une action préférentielle du NGF sur la production d'immunoglobulines émanant des lymphocytes B mémoires (Torcia et al. 1996a). En revanche, le NGF ne semble pas modifier la production d'IgE des lymphocytes B de sujets sains (Melamed et al. 1996). Cependant, d'autres études décrivent des effets variables et même contradictoires du NGF sur la production des IgE qui pourraient dépendre des conditions d'activation des cellules B régulateur (Zhang et al. 1991; Brodie et al. 1998; Gibbs et al. 2005).

Parmi les mécanismes impliqués dans la signalisation du NGF liée à la survie et la prolifération des lymphocytes B, il a été montré que le NGF exogène induit une modification du cytosquelette lymphocytaire B par sa fixation à TrkA, une polymérisation des microfilaments de g-actine en polymères de f-actine (Melamed et al. 1995). De plus, le NGF favorise les flux calciques entre les milieux intracellulaires et extracellulaires des cellules B humaines en culture (Melamed et al. 1996). Les voies de signalisation impliquées dans l'action anti-apoptotique du NGF au niveau lymphocytaire B sont encore peu étudiées. Les travaux ont surtout été réalisés à partir de lignées lymphoblastoïdes B données, que nous détaillerons ensuite. La signalisation semble converger sur des voies de signalisation communes aux récepteurs Trk et à celles du récepteur à l'antigène des cellules B (BCR) avec le partage de protéines adaptatrices comme Grb2 et Shs permettant ainsi l'activation de la protéine Ras (Melamed et al. 1999).

- **BDNF**

Les lymphocytes T et B, les monocytes ainsi que les cellules endothéliales et les plaquettes produisent la forme mature, biologiquement active du BDNF, et peuvent constituer une source de BDNF circulant (Nakahashi et al. 2000; Kerschensteiner et al. 2009).

Le BDNF est produit par les lymphocytes B murins et cette production est augmentée sous diverses stimulations telles que le LPS, le phorbol12-myristate 13-acetate (PMA) (Edling et al. 2004) et par la substance P, un neurotransmetteur détecté au niveau des fibres sensibles intra-spléniques (Barouch et al. 2000). Il apparaît nécessaire à la maturation B. Des souris invalidées pour BDNF sont caractérisées par un arrêt de cette maturation au stade pré-BII. Ces mêmes précurseurs expriment le récepteur TrkB et sont dépourvus de transcrits codant pour le BDNF. Celle-ci, indispensable à leur maturation, et de façon indépendante de l'IL-7, leur est fournie par le stroma médullaire. Comme pour le NGF, l'action du BDNF dans les lymphocytes B murins s'accompagne d'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> (Schuhmann et al. 2005) suggérant l'existence d'une signalisation intracellulaire liée à la fixation du BDNF.

En culture, le BDNF est aussi produit par les lymphocytes B humains matures. Sa sécrétion est augmentée sous l'action d'agents mitogéniques (Kerschensteiner et al. 1999; Edling et al. 2004). Elle est indépendante de l'action de l'IL-6 ou du TNF- $\alpha$ . Au contraire, les lymphocytes B non stimulés circulants n'expriment pas de transcrits codant pour le BDNF suggérant que la transcription de BDNF est faible dans ces cellules à l'état basal (Hu et al. 2006). Chez les sujets allergiques, le BDNF induit une augmentation de la production d'IgE par des lymphocytes B périphériques. Cet effet est en partie bloqué *in vitro*, par l'IFN- $\gamma$  ou par l'IL-12. L'association de ces deux cytokines de type Th1 permet un arrêt total de cette stimulation (Kimata 2005). Ces derniers résultats sont conformes à certaines données obtenues sur NGF et confortent l'hypothèse précédemment évoquée qui postule que les neurotrophines seraient par des effets de type « cytokines-Th2 » des modulateurs des réponses allergiques et inflammatoires.

#### **IV-3.1.2 Apport des lignées cellulaires**

- **NGF**

Le NGF induit la prolifération de diverses lignées B humaines (Kimata et al.; Rosini et al. 2004). Les effets du NGF sur la production d'immunoglobulines varient suivant les lignées étudiées. Il augmente la production d'immunoglobulines, IgG, IgM et IgA, dans des lignées B humaines matures EBV<sup>+</sup> (GM-1500, GM-1056, M-12) (Kimata et al.). Néanmoins, d'autres équipes ont montré que l'ajout de NGF exogène diminuait la production d'IgM et d'IgG au niveau des lignées B (HSCE et Ramos). Cette production d'immunoglobulines est restaurée en culture en présence d'IL-4. Le NGF augmente l'expression membranaire de CD40 mais ne module pas la production d'immunoglobulines induites par CD40L (Brodie and Gelfand 1994).

La liaison du NGF au récepteur TrkA, permet également de limiter l'apoptose induite par un ajout d'anti-IgM au niveau de lignées B EBV<sup>-</sup> (RAMOS). Cet effet est contrôlé par l'activation de protéines adaptatrices Ras et Vav qui conduit à l'activation d'Erk-2 (Rosini et al. 2004; Franklin et al. 1995), de la PI3K et de la PKC $\gamma$ , voie également mise en jeu au niveau lymphocytaire par la stimulation de CD40 (Melamed et al.; Kronfeld et al. 2002). Le NGF protège en partie la lignée B mature Rael de l'apoptose induite par 72 heures de privation sérique (1% SVF) (D'Onofrio et al. 2000).

Les effets anti-apoptotiques du NGF dans les lignées B matures, comme au niveau des lymphocytes B normaux, résultent notamment de l'augmentation de l'expression cellulaire de facteurs de transcriptions impliqués dans la survie, comme c-fos (Melamed et al. 1996). De même, la signalisation anti-apoptotique entraîne la déphosphorylation de la p38MAPK. Cet événement empêche l'inactivation de Bcl-2 par phosphorylation de ses résidus sérine et thréonine, et par là même, l'induction de la voie de mort mitochondriale. Cette inactivation de la p38MAPK fait suite à l'induction par le NGF de la transcription de la phosphatase MPK-1. Celle-ci déphosphoryle la p38MAPK et semble indépendante de la protéine JNK, impliquée dans l'inactivation de Bcl-2 (Rosini et al. 2000; Torcia et al. 2001; Rosini et al. 2004). En effet, l'apoptose, induite par la neutralisation du NGF, produit par les lignées B mémoires et qui conduit à la phosphorylation et la translocation mitochondriale de la p38MAPK, est bloquée par la surexpression de MPK-1 (Rosini et al. 2004). Ces résultats ont été obtenus notamment sur une lignée lymphoblastoïde B IgG<sup>+</sup> (CESS), caractérisée par la présence des récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup> et qui produit spontanément en culture de fortes quantités de NGF, l'utilisant pour sa survie (Torcia et al. 1996a; Rosini et al. 2000). Ils sont applicables aux cellules B normales et notamment les B mémoires (Torcia et al. 2001) et montrent que la fonction de survie exercée par le NGF sur les cellules B consiste à maintenir des taux élevés de MKP-1 pour contrôler l'activation de la p38MAPK.

- **BDNF**

Les lignées B matures EBV<sup>+</sup> produisent du BDNF en culture, la production de BDNF n'ayant pas ou peu été décrite pour les lignées EBV<sup>-</sup> ou des lignées plus immatures. Très récemment, au laboratoire, l'expression de la forme mature de BDNF, mais aussi de NGF a été démontrée dans les cellules de 4 lignées B humaines mimant différents stades de la différenciation (pro-B, pré-B, mature et plasmocytaire). La privation sérique majore la sécrétion de BDNF conjointement à l'expression membranaire des deux récepteurs TrkB et p75<sup>NTR</sup>. De plus, seule la lignée d'origine plasmocytaire exprime la forme immature de BDNF (pro-BDNF) (Fauchais et al. 2008). Ces résultats confirment ceux préalablement publiés sur les lignées

plasmocytaires humaines, qui effectivement peuvent produire du pro-BDNF et du BDNF biologiquement actifs. La sécrétion du BDNF dans le milieu de culture est maximale pour la lignée RPMI 8226 (Pearse et al. 2005; Hu et al. 2006). Ces mêmes lignées produisent aussi des MMP, notamment MMP-7, leurs permettant de cliver le pro-BDNF en BDNF mature (Barille et al. 1999).

Concernant les effets biologiques sur les lignées lymphocytaires B, le BDNF exogène permet de diminuer l'apoptose induite par une privation sérique au niveau de lignées B matures (Rael, Mutu, BL28) qui expriment le récepteur TrkB dans ces conditions bien que l'expression membranaire de celui-ci ne soit pas détectable à l'état basal dans cette étude. Le BDNF n'a aucun effet sur la prolifération de lignées B matures EBV<sup>+</sup> (D'Onofrio et al. 2000). Au laboratoire, les études ont confirmé le rôle anti-apoptotique du BDNF exogène au niveau des lignées plasmocytaires, notamment lors de l'apoptose induite par la voie Fas, mais ont mis également en évidence ce rôle dans des lignées plus immatures. La neutralisation du BDNF mature produit en situation de stress cellulaire augmente l'apoptose basale induite par la privation sérique et l'activation de la voie de Fas au niveau des lignées B matures et plasmocytaires (Fauchais et al. 2008).

Ainsi, la plupart des études ont révélé et analysé les effets des formes matures de NGF et BDNF sur la survie, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, définissant une nouvelle voie autocrine de survie pour ces cellules. Cependant, les travaux récemment publiés par notre équipe sur les fonctions immunitaires du BDNF montrent que cette nouvelle voie repose, comme pour les cellules neuronales, sur une balance entre l'action anti-apoptotique du BDNF mature par sa fixation sur le récepteur TrkB et l'effet pro-apoptotique du pro-BDNF par sa fixation à l'hétérodimère p75<sup>NTR</sup> / sortiline (Fauchais et al. 2009).

#### **IV-3.2 Expression des récepteurs**

- **TrkA**

Le récepteur de haute affinité TrkA est exprimé à la surface des lymphocytes B humains normaux (Otten et al. 1989; Brodie and Gelfand 1992; Aloe et al. 1994; Torcia et al. 1996a; D'Onofrio et al. 2000), le stress induisant une augmentation de son expression membranaire. *In vitro*, la stimulation des lymphocytes B par des mitogènes augmente l'expression membranaire de ce récepteur. Cet effet est aussi observé sous l'action de l'IL-2 (Finkelman et al. 1990; Brodie and Gelfand 1992). L'IL-4 ne paraît pas moduler l'expression de TrkA à la surface des B humains normaux (Brodie and Gelfand 1992).

Les lignées B matures EBV<sup>-</sup> (RAMOS, DG75, BJAB) et d'autres lignées B EBV<sup>+</sup> (RAJI) expriment le récepteur TrkA (Franklin et al. 1995; Melamed et al. 1996; Rosini et al. 2000; Rosini et al. 2004). Cette expression protéique est variable selon les lignées et les conditions de culture. Ainsi, TrkA n'est pas détecté dans la lignée EBV<sup>-</sup> BL41, dans les lignées B matures EBV<sup>+</sup> (Schenone et al. 1996; D'Onofrio et al. 2000). Cependant, les transcrits codant pour TrkA sont détectés dans différentes lignées, du stade pro-B au stade plasmocytaire (Fauchais et al. 2008).

- **TrkB**

Le récepteur TrkB, dans sa forme tronquée, est exprimé par les lymphocytes B humains et murins normaux, après une stimulation mitogénique (Besser and Wank 1999; D'Onofrio et al. 2000; Schuhmann et al. 2005).

Les transcrits codant pour les formes tronquées de TrkB sont aussi exprimés par l'ensemble des lignées B matures EBV<sup>-</sup> étudiées, mais une expression membranaire de ce récepteur n'a pas été détectée, en condition basale de culture (D'Onofrio et al. 2000). De même, ces transcrits sont détectés du stade pro-B au stade plasmocytaire. En revanche, la transcription de la forme complète du récepteur TrkB de 145 kDa n'est détectée que dans les lignées plasmocytaires U266 et RPMI 8226 (Fauchais et al. 2008). Cependant, l'expression de TrkB est variable selon les lignées plasmocytaires. Un ajout de BDNF au milieu de culture de lignées plasmocytaires engendre une phosphorylation du récepteur TrkB (Hu et al. 2006). La formation du complexe BDNF et de son récepteur constitue un facteur anti-apoptotique des lignées plasmocytaires humaines (Pearse et al. 2005; Hu et al. 2006), notamment par la phosphorylation de la protéine Akt et de la p42/44 MAPK (Erk) qui aboutissent à l'activation du facteur de transcription CREB/ATF (« Cyclic AMP Response Element Binding Protein / Activated Transcription Factor »). De plus, cette expression est augmentée sous l'action d'un agent pro-apoptotique, la dexaméthasone (Pearse et al. 2005).

Les transcrits codant pour les 2 formes, à 95 et 145 kDa, de TrkB sont retrouvés dans les lignées EBV<sup>+</sup> (Schenone et al. 1996; Besser and Wank 1999; D'Onofrio et al. 2000). Cependant, seulement 10 à 20 % des cellules de ces lignées expriment le récepteur TrkB à leur membrane alors que l'expression protéique semble plus importante au niveau intracellulaire, suggérant l'existence d'une séquestration intra-cytoplasmique de ce récepteur (Schenone et al. 1996).

- **p75<sup>NTR</sup>**

Le récepteur p75<sup>NTR</sup> est exprimé par les lymphocytes B circulants (Otten et al. 1989; Brodie and Gelfand 1992; Melamed et al. 1995; Torcia et al. 1996a; Fauchais et al. 2008). Son expression membranaire, comme pour TrkA, augmente après un stress (Aloe et al. 1994) ou suite à une stimulation par des agents mitogéniques. Elle semble majoritaire en présence de concentration faible extracellulaire de NGF (Brodie and Gelfand 1992; Franklin et al. 1995; Torcia et al. 1996a).

Une expression constitutive de p75<sup>NTR</sup> a aussi été remarquée dans des lymphocytes B murins. Son expression est augmentée suite à une exposition au NGF. Cette expression ne varie pas sous l'action de l'IL-6 ou du CD40 Ligand (Thorpe and Perez-Polo 1987; Heese et al. 2006). De plus, ce récepteur n'est pas seulement exprimé au stade B mature chez la souris, mais aussi dès le stade pro-B (Schuhmann et al. 2005).

Dans les lignées B humaines, l'expression du récepteur p75<sup>NTR</sup> est décrite de manière variable. Pour certains, il n'est pas détectable (Schenone et al. 1996; D'Onofrio et al. 2000; Hu et al. 2006; Pearse et al. 2005), pour d'autres il est exprimé dans un grand nombre de lignées B, du stade pro-B au stade plasmocytaire (Brodie and Gelfand 1994; Rosini et al. 2000; Fauchais et al. 2008), et majoritairement au niveau des stades pré-B, des B matures et surtout des B mémoires (Brodie and Gelfand 1994; Pica et al. 2000; Rosini et al. 2000; Rosini et al. 2004).

- **La sortiline**

Les travaux de l'équipe ont mis en évidence récemment, et pour la première fois, au niveau lymphocytaire, l'expression (ARNm et protéine) de la sortiline, dans des lignées humaines B et des lymphocytes B périphériques de sujets sains. La neutralisation par siRNA de cette protéine, à la fois de transport et co-récepteur des pro-NT, majore l'apoptose induite par la privation sérique. Finalement, son implication comme pour les cellules neuronales dans l'action pro-apoptotique du pro-BDNF a été confirmée par la neutralisation de la sortiline par des anticorps bloquants et la compétition d'affinité avec un autre ligand de la sortiline, la neurotensine. Ces données confirment l'intérêt potentiel de cette nouvelle voie autocrine de survie dans les lymphomes et le myélome (Fauchais et al. 2008).

### **IV-3.3 Bilan: les neurotrophines facteurs autocrines de survie des lymphocytes B ? Implications physiopathologiques.**

Nous venons de voir que les lymphocytes B normaux peuvent produire et sécréter des neurotrophines dans leurs formes matures et immatures. Ils expriment aussi, selon les cas, leurs récepteurs de haute (Trk) et de basse ( $p75^{NTR}$ ) affinité dont l'expression semble varier en fonction de l'environnement cytokinique. Ces données lymphocytaires, ainsi que les propriétés anti-apoptotiques de ces NT, suggèrent un lien potentiel entre cette classe de neuropeptides et la physiopathologie des maladies auto-immunes, mais aussi des cancers. Aussi, les neurotrophines pourraient être des facteurs autocrines de survie pour les lymphocytes B normaux mais aussi pathologiques.

Effectivement, les neurotrophines et leurs récepteurs sont impliqués dans un certain nombre de processus pathologiques, comme par exemple, des maladies inflammatoires, des maladies auto-immunes ou des cancers (Allen and Dawbarn 2006).

Au cours de maladies inflammatoires, comme la polyarthrite rhumatoïde, les taux sériques de NGF semblent plus élevés chez les patients que chez les sujets contrôles (Dicou et al. 1993). Des taux élevés de NGF ont également été mis en évidence au niveau des tissus synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Aloe et al. 1997). Cette élévation de taux synoviaux de NGF est par ailleurs, retrouvée dans des modèles murins expérimentaux de polyarthrite rhumatoïde (Aloe et al. 1993). On retrouve également une surexpression du BDNF au niveau des tissus synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de spondylarthrite, conjointement avec une surexpression des récepteurs Trk et de  $p75^{NTR}$ . Il existe par ailleurs, une corrélation positive au sein de ces tissus, entre l'intensité des lésions vasculaires et l'expression respective de TrkA et de  $p75^{NTR}$ . L'expression synoviale de TrkA et de  $p75^{NTR}$  décroît progressivement au cours du traitement par anti-TNF (infliximab), suggérant une implication directe du NGF, dans les processus inflammatoires locaux conduisant à la destruction articulaire (Rihl et al. 2005).

Lors des maladies auto-immunes une production sérique élevée des neurotrophines est souvent retrouvée. C'est le cas notamment de pathologies caractérisées par une hyperactivité des lymphocytes B, comme par exemple le lupus érythémateux disséminé et le syndrome de Goujerot Sjögren (Matucci-Cerinic et al. 2001; Fauchais et al. 2009), mais aussi pour d'autres maladies, comme la sclérose en plaque (Riikonen et al. 1998), le diabète de type I (Azar et al. 1999).

L'ensemble des données est en faveur d'une implication des neurotrophines dans la physiopathologie des maladies auto-immunes, le NGF semblant constituer une approche thérapeutique innovante de pathologies inflammatoires ou vasculaires.

Enfin, un certain nombre de données montre que le NGF et son récepteur TrkA sont impliqués dans la croissance et la progression tumorale de nombreux cancers qui ne sont pas neuronaux, comme les carcinomes de la thyroïde (McGregor et al. 1999), du poumon (Ricci et al. 2001), du pancréas (Zhu et al. 1999), de la prostate (Weeraratna et al. 2000), des ovaires (Davidson et al. 2003), du sein (Lagadec et al. 2009) ou encore dans certains lymphomes (Sniderhan et al. 2009).

Peu d'études concernent l'implication des NT dans des cancers d'origine hématopoïétique et encore moins d'origine lymphoïde, du moins au démarrage de notre thèse. Une mutation du gène *TrkA*, pouvant conférer aux cellules un avantage dans la survie, a été associée à la leucémie aiguë myéloïde (Reuther et al. 2000). Des travaux ont aussi été réalisés sur des cellules plasmocytaires malignes issues de patients atteints de myélome multiple ou de lignées cellulaires de ce myélome. Ils ont clairement démontré la production de BDNF et l'expression de TrkB par ces cellules, sans corrélation entre le stade du myélome ou la masse tumorale et l'intensité d'expression de BDNF (Pearse et al. 2005; Hu et al. 2006; Hu et al. 2007).

L'ensemble de ces données est en faveur d'une expression des neurotrophines et de leurs récepteurs Trk dans les cellules B malignes. La signalisation de ces récepteurs, suite à leur activation cible, comme on l'a vu précédemment, notamment la voie de survie PI3K/Akt, menant à l'activation de NF- $\kappa$ B. Or, cette voie est la principale voie de survie, régulant l'homéostasie lymphocytaire B et elle a été impliquée dans le développement et la progression de certains lymphomes B. En effet, NF- $\kappa$ B semble constitutivement activé dans beaucoup de LNH et même certains DLBCL (type ABC), cette activation étant nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules B malignes (Lam et al. 2005; Sniderhan et al. 2009). Par conséquent, l'hypothèse que les cellules B malignes pourraient exploiter la signalisation des neurotrophines pour leur propre survie paraît très probable.

# **SYNOPSIS DE LA THESE**

---



Mon travail de thèse avait pour objectifs d'étudier le rôle de la protéine Bad et des neurotrophines dans les lymphomes diffus à grandes cellules B. Il s'est donc articulé autour de deux axes principaux.

Tout d'abord, j'ai participé à une étude qui découlait de travaux précédents du laboratoire mettant en évidence le rôle central de la molécule Bad dans l'homéostasie lymphocytaire B chez la souris (Malissein et al. 2003). Par ailleurs, l'analyse des données bibliographiques (Xerri et al. 1999; Ranger et al. 2003; Bai et al. 2004; Suzuki et al. 2007) suggérait fortement le rôle de cette molécule dans le développement des lymphomes diffus à grandes cellules B chez la souris comme chez l'homme (DLBCL). Nous avons ainsi poursuivi une analyse rétrospective par immuno-histochimie de biopsies primaires tumorales, réalisées lors du diagnostic et issues de 46 patients atteints de DLBCL. Plus précisément, notre travail s'est inscrit dans l'insertion de la 2<sup>e</sup> cohorte de patients nouvellement diagnostiqués et ayant bénéficié des nouveaux traitements (R-CHOP). L'ensemble des résultats a permis de mettre en évidence une corrélation négative significative entre le niveau d'expression de la protéine Bad et l'agressivité de la tumeur, révélée par les indices de stade clinique des patients (Ann Arbo, IPI), suggérant un rôle suppresseur de tumeur pour cette protéine. Son expression dans les cellules tumorales est par ailleurs significativement corrélée à celle du facteur anti-apoptotique Bcl-2 et de PP1 $\alpha$ , (principale sous-unité catalytique de la phosphatase PP1 impliquée dans l'activation de Bad). Ces données soulignent l'intérêt à cibler les « Bad-phosphatases » dans de nouvelles approches thérapeutiques de cette pathologie. En parallèle de ces travaux, nous montrons pour la première fois que la forte expression d'AIF est prédictive d'une meilleure survie globale des patients traités par chimiothérapie CHOP. Ces derniers résultats suggèrent l'importance de la prise en compte de la mort cellulaire caspase indépendante dans l'effet cytotoxique de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces travaux, réalisés en collaboration avec les services d'Hématologie clinique et d'Anatomie pathologique du CHRU de Limoges, seront présentés dans la première partie du chapitre « Résultats ». Ces résultats ont fait l'objet de la publication d'un premier article (Troutaud et al. 2010).

En parallèle, le 2<sup>e</sup> objectif de notre travail de thèse a consisté à rechercher l'implication de neurotrophines (NGF, BDNF) dans le même contexte pathologique des DLBCL, et plus particulièrement, leur rôle dans balance mort / survie. En effet, un certain nombre de travaux, dont ceux de l'équipe (Fauchais et al. 2008), ont mis en évidence la production de neurotrophines par des cellules du système immunitaire, et notamment leur rôle potentiel dans des circuits autocrines de survie au niveau des lymphocytes B normaux. Nos résultats démontrent la présence et la production de ces NT (matures et immatures) et de leurs récepteurs (au niveau des transcrits et au niveau protéique) dans 2 lignées cellulaires, modèles d'étude du DLBCL, les lignées su-DHL4 et su-DHL6. Une modulation de l'expression de ces NT ainsi que de leurs récepteurs de haute affinité (TrkA et/ou TrkB) a été observée en faisant varier les conditions de culture cellulaire (privation sérique, engagement du récepteur à l'antigène-BCR) et lors de la réponse apoptotique induite par des anti-CD20 (Rituximab). Finalement, l'étude du rôle éventuel de neurotrophines exogènes ou d'un inhibiteur des récepteurs de survie Trk a été initiée sur la viabilité cellulaire, en présence ou non d'un signal de mort. En parallèle, des travaux préliminaires sur des biopsies de patients confirment la forte expression de NT au niveau des cellules B tumorales. L'ensemble des résultats suggère l'implication des neurotrophines dans des circuits autocrines/paracrines de régulation de la survie des cellules B tumorales. Ainsi, ces facteurs pourraient, en modulant notamment l'activation de Bad, participer aux mécanismes de sensibilité/résistance aux traitements. Ces travaux seront présentés dans la deuxième partie du chapitre « résultats » et font l'objet d'un 2<sup>e</sup> article prochainement soumis.



# **RESULTATS**

---

*Resultats : Partie I*  
*Rôle de Bad dans l'hétérogénéité clinique des DLBCL*

---

## **I -Rôle de Bad dans l'hétérogénéité clinique des patients**

---

### **I.1. Synopsis**

#### **Contexte scientifique**

Le contrôle de la balance mort / survie régulant l'homéostasie lymphocytaire B, est au cœur du processus tumoral B dans ses mécanismes et son approche thérapeutique, en ciblant notamment le rôle des membres de la famille Bcl-2. Parmi ces régulateurs de la voie mitochondriale de l'apoptose, un certain nombre de travaux récents a souligné le rôle important des facteurs de la sous-famille BH3, notamment dans l'homéostasie lymphocytaire B. Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à l'un des membres de cette sous-famille, la molécule Bad. Bad semble fonctionner comme un véritable « rhéostat » de la sensibilité à l'apoptose des lymphocytes B, suite à son activation possible par déphosphorylation, déclenchant alors sa translocation à la mitochondrie et la formation d'hétérodimères avec Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub> (paragraphe II de l'introduction bibliographique). Les travaux précédents du laboratoire avaient permis de montrer chez la souris (*in vitro* et *in vivo*) que la régulation du statut de phosphorylation de Bad, et donc sa fonction, était impliquée dans les événements de sensibilisation à l'apoptose induits par l'engagement du BCR au cours du développement lymphocytaire B et lors du vieillissement (Malissein et al. 2003; Verdier et al. 2006). La question soulevée par ces données était de rechercher un rôle éventuel de Bad dans un dysfonctionnement de l'homéostasie lymphocytaire B, conduisant à un processus tumoral, comme les lymphomes. De façon intéressante, bien que les souris déficientes en Bad présentent peu de modifications visibles du développement ou du fonctionnement du système immunitaire, elles sont caractérisées par la forte incidence au cours de leur vieillissement de tumeurs lymphoïdes et principalement des lymphomes diffus à grandes cellules B (Ranger et al. 2003). De façon paradoxale, les études chez l'homme ont montré une forte expression de Bad chez des patients atteints de DLBCL comparativement à d'autres lymphomes non-hodgkiniens (Xerri et al, 1999). De plus, chez l'homme, si la dérégulation du processus apoptotique est une des multiples causes invoquées des DLBCL (expression de Bcl-2 dans 50% des DLBCL, indépendamment de la t(14 ;18), mutations de Fas) la plupart des travaux concernent le rôle de régulations anti-apoptotiques (Bcl-2, c-Flip, XIAP), dans l'état de résistance aux traitements thérapeutiques (Abramson and Shipp 2005; Lossos 2005; Coiffier 2005; Muris et al. 2005; Muris et al.). Ainsi, l'implication de facteurs pro-apoptotiques de la voie mitochondriale comme Bad et leur utilisation potentielle en tant que «suppresseurs tumoraux» restent à préciser, notamment dans les DLBCL et peuvent ouvrir de nouvelles voies de recherche thérapeutique.

Parmi les protéines apoptogènes libérées par la mitochondrie, certains agissent indépendamment des caspases. Alors que la mort cellulaire caspase-dépendante est la voie de signalisation la plus étudiée et la plus ciblée dans les approches thérapeutiques anti-cancéreuses, un intérêt croissant est apparu ces dernières années dans le ciblage de mécanismes de mort caspase-indépendants, notamment pour trouver une alternative à certaines résistances thérapeutiques (Constantinou et al. 2009). L'AIF est une NADH oxydase mitochondriale, associée à la membrane interne de la mitochondrie. Au cours de l'apoptose, AIF peut être libérée et transloquée vers le noyau, où cette protéine participe à la condensation de la chromatine et à la fragmentation de l'ADN (Joza et al. 2009). Aujourd'hui, AIF apparaît comme une enzyme essentielle au métabolisme cellulaire. Elle jouerait un rôle critique dans le processus tumoral alors que sa fonction pro-apoptotique pourrait contribuer à

la mise à mort des cellules cancéreuses induite par certaines drogues (Porter and Urbano 2006). Ainsi, son niveau d'expression mitochondrial a été associé au pouvoir tumorigène de divers types cellulaires de carcinomes (Urbano et al. 2005).

### **Hypothèses et objectifs**

Cette étude visait à préciser dans un premier temps le rôle de la molécule Bad dans les DLBCL. Plus précisément, notre hypothèse de travail était que des différences d'expression de Bad, pouvaient, en relation avec son rôle sensibilisateur de l'apoptose, expliquer en partie l'hétérogénéité clinique de ces lymphomes. Nous avons donc recherché des arguments expérimentaux en faveur d'un rôle éventuel de type « suppresseur tumoral » de Bad, en analysant son expression, en fonction de l'état clinique des patients, et en parallèle de celle de divers acteurs moléculaires impliqués dans son activation (PP1 $\alpha$ ) ou son action (Bcl-2). De plus la molécule AIF exprimant une dualité fonctionnelle, étant à la fois un effecteur de mort de l'apoptose notamment déclenchée par Bad et un facteur de survie associé à la tumorigénicité de certaines cellules malignes, notre deuxième objectif visait à préciser quelle fonction de l'AIF pouvait être impliquée dans les DLBCL.

### **Méthodologie**

Dans cette étude rétrospective, nous avons étudié par immunohistochimie l'expression de Bad, en relation avec celle de Bcl-2, PP1 $\alpha$  ou d'AIF, dans 46 biopsies de patients atteints de DLBCL, dont 30 traités uniquement par polychimiothérapie (CHOP) et 16 traités en plus par du rituximab (R-CHOP). Des ganglions réactionnels sains ont été utilisés comme tissus contrôles. Des analyses statistiques ont été réalisées pour comparer les résultats et rechercher d'éventuelles corrélations avec les stades cliniques des patients. Enfin, la méthode de Kaplan-Meier a été utilisée pour analyser les courbes de survie en fonction de différents critères biologiques.

### **Résultats et conclusions**

Les résultats obtenus sur les 46 patients montrent que, contrairement aux cellules B des centres germinatifs de ganglions réactionnels sains, une expression souvent forte de la protéine Bad est observée dans les cellules B tumorales de la plupart des biopsies. De plus, une corrélation négative significative a été trouvée entre l'expression de Bad et le stade clinique des patients. Ainsi, une faible expression de Bad est associée à un stade clinique avancé et inversement une forte expression de Bad est associée à un stade clinique de meilleur pronostic. De plus, l'expression de Bad est corrélée de façon significative à celle de Bcl-2 et de la sous unité catalytique PP1 $\alpha$ , phosphatase impliquée dans l'activation de Bad. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence le rôle de la protéine Bad dans l'hétérogénéité clinique des DLBCL et nos résultats suggèrent fortement son rôle suppresseur tumoral en tant que molécule BH3 facilitatrice. De plus ces données soulignent l'intérêt à cibler les « Bad-phosphatases » dans de futures stratégies thérapeutiques de ces lymphomes.

Enfin cette étude montre pour la première fois que la forte expression de l'AIF dans ces tumeurs est prédictive d'une meilleure survie des patients traités par polychimiothérapie CHOP. Cette valeur pronostique de l'AIF n'est pas retrouvée cependant pour les patients traités au rituximab. Ces derniers résultats sont en faveur du rôle apoptotique de l'AIF dans les traitements de ces lymphomes. De plus, ils ouvrent la voie à l'importance potentielle de la prise en compte de la mort apoptotique indépendante des caspases dans la sensibilisation des cellules tumorales aux drogues cytotoxiques des traitements.

**I.2. Article 1: Prognostic Significance of BAD and AIF Apoptotic Pathways in Diffuse Large B-Cell Lymphoma.**

Danielle Troutaud, Barbara Petit, Cynthia Bellanger, Benoît Marin, Marie-Pierre Gourin-Chaury, Daniel Petit, Agnès Olivrie, Jean Feuillard, Marie-Odile Jauberteau, Dominique Bordessoule.

Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, Vol. 10, No. 2, 118-124, 2010.

Keywords: BCL-2, CHOP, Clinical stages, Non-Hodgkin lymphoma, PP1 $\alpha$ .

### **I.3. Données complémentaires sur le statut de phosphorylation de Bad dans les DLBCL**

Dans l'étude précédente, nous avons montré que 83% des DLBCL exprimaient la protéine Bad et souvent à des niveaux élevés. Ce niveau élevé d'expression, corrélé significativement à celui de Bcl-2 dans les cellules tumorales, pourrait être associé à la fonction de sensibilisation à l'apoptose des protéines « BH3-only facilitatrices ». Ces molécules capturent les protéines anti-apoptotiques (ex: Bcl-2), en formant des hétérodimères facilitant l'activation des molécules pro-apoptotiques, comme Bax. Ainsi, parmi les LNH, les cellules des DLBCL semblent avoir effectivement une susceptibilité particulière à l'apoptose spontanée (Xerri et al. 1999). La forte expression de cette molécule pro-apoptotique dans des cellules tumorales proliférantes suggérait fortement que Bad soit, comme c'est le cas dans la plupart des cellules normales, en grande partie sous une forme inactive, et donc phosphorylée. En effet, les cellules exposées à des facteurs de survie élèveraient leur seuil apoptotique en phosphorylant Bad, l'inactivant et restaurant l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 (Ranger et al. 2003). De plus, la sous-unité catalytique PP1 $\alpha$ , impliquée majoritairement dans la déphosphorylation et donc l'activation de Bad (Ayllon et al. 2000), est également exprimée à des niveaux élevés dans les cellules de DLBCL. Son expression et celle de Bad sont positivement corrélées, ce qui soulève la question d'un lien possible entre cette sous-unité catalytique enzymatique et son substrat. Ainsi, il était intéressant d'étudier l'état d'activation de la protéine Bad dans les cellules tumorales de ces lymphomes, et donc son statut de phosphorylation sur les trois principaux sites (équivalents aux Ser112, Ser136 et Ser155).

#### **I.3.1. Matériels et méthodes**

##### ***Immunohistochimie***

Cette étude a été réalisée à partir des biopsies sélectionnées dans le cadre de l'analyse de l'expression de Bad et donc sur la même cohorte de patients. Le protocole expérimental est identique à celui effectué dans l'article précédent ce travail (kit « LSAB+ system HRP, Dako Cytomation). Les anticorps primaires utilisés pour révéler les formes phosphorylées et la forme totale de Bad sont récapitulés dans le tableau 2. Ceux-ci ont été préalablement validés comme pour Bad, sur des tissus humains de référence pour l'expression de cette protéine pro-apoptotique (trompe utérine) (Kitada et al. 1998) qui nous ont été fournis aussi par le service d'anatomie pathologique du CHRU de Limoges. Des contrôles isotypiques, récapitulés dans le tableau 2, ont été systématiquement effectués. Les lames ont été analysées à l'aide d'un microscope Leica DMRX.

**Resultats : Partie I**  
**Rôle de Bad dans l'hétérogénéité clinique des DLBCL**

Anticorps utilisés	Hôtes	Isotypes	Epitopes humains reconnus	références	fournisseurs	Concentration (µg/mL)
Bad	Souris	Monoclonal (IgG1)	Forme endogène, séquence aa 1-168	(C7)sc-8044	santaCruz Biotechnology	4 µg/mL
Phospho-Bad-Ser112	souris	Monoclonal (IgG1)	Courte séquence contenant le site de phosphorylation	9296S	Cell signaling	
Phospho-Bad-Ser136	Lapin	Polyclonal (IgG)	Courte séquence contenant le site de phosphorylation	9295S	Cell signaling	
Phospho-Bad-Ser155	Lapin	Polyclonal (IgG)	Courte séquence contenant le site de phosphorylation	9297	Cell signaling	
<b>Contrôles isotypiques</b>						
Immunoglobulines de lapin	-	-	-	18765	Sigma Aldrich	4 µg/mL
Immunoglobulines de souris	-	-	-	18140	Sigma Aldrich	

**Tableau 2 : Principales caractéristiques des anticorps utilisés en immunohistochimie**

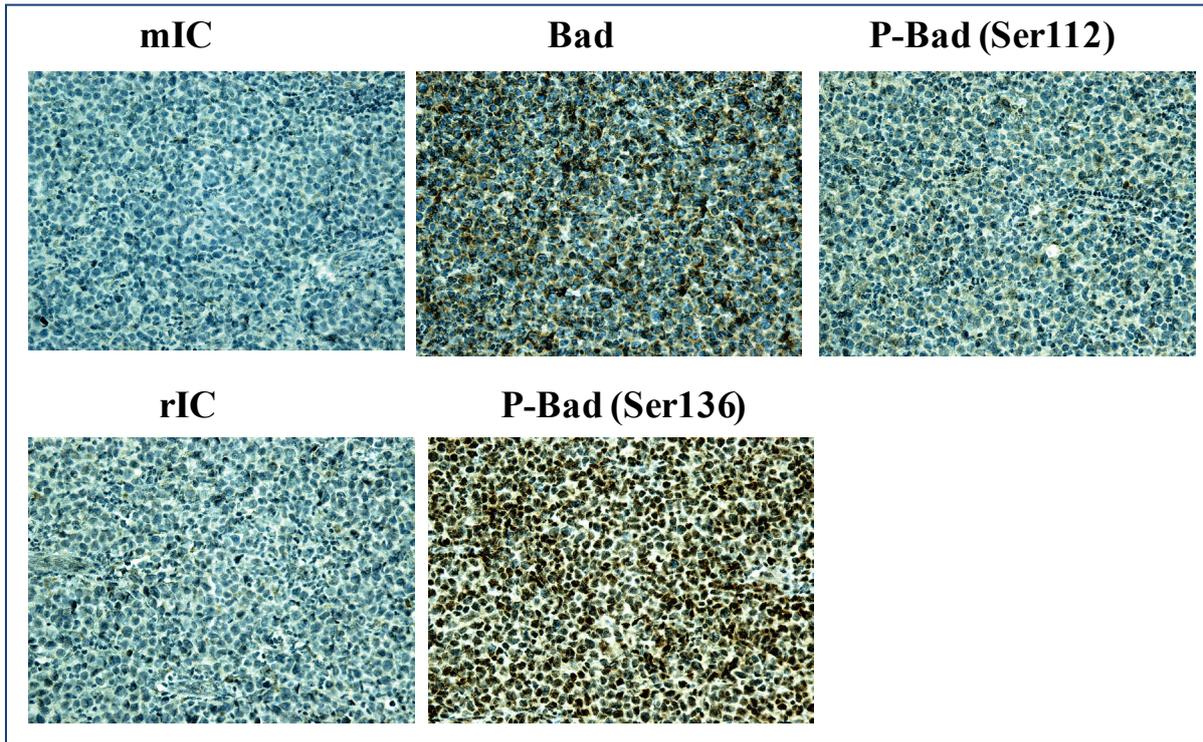
A noter que la nomenclature utilisée est celle de la protéine murine bien qu'il s'agisse ici de la protéine humaine, car les anticorps choisis reconnaissent les équivalents humains de ces sites murins.

### I.3.2. Résultats

Les données obtenues par immunohistochimie concernent 5 biopsies issues de la précédente étude (Troutaud et al. 2010) et dont l'expression de Bad, préalablement étudiée, nous a servi de contrôle positif pour cette étude complémentaire. Globalement, les résultats montrent que l'expression des différentes formes phosphorylées de Bad varie beaucoup entre les patients et en fonction des résidus sérine concernés. Cependant, et comme le montre la figure 34, une expression souvent faible de la forme phosphorylée de Bad sur sa sérine 112 est observée alors que l'on note, au contraire, une expression souvent importante de la protéine Bad phosphorylée sur la sérine 136.

L'expression de la forme phosphorylée de la sérine 155 de Bad n'a pu être analysée correctement. Les marquages effectués en immunohistochimie n'étaient pas exploitables. L'observation de l'expression de cette forme phosphorylée semblait être commune à toutes les cellules des biopsies et sa localisation paraissait être nucléaire (résultats non présentés).

Cependant, ces résultats restent préliminaires et une analyse approfondie de l'état de phosphorylation de Bad qui pourrait être corrélée à l'agressivité de la tumeur reste nécessaire.



**Figure 34 :** *Etude du statut de phosphorylation de la protéine Bad dans des biopsies de patients atteints de DLBCL. Exemple de marquage immunohistochimique illustrant les résultats obtenus sur 5 patients et révélant une forte immunoréactivité pour Bad, et sa forme phosphorylée sur le résidu sérine 136, ainsi qu'une faible immunoréactivité pour la forme phosphorylée de Bad sur la sérine 112. Grossissement X400, mIC : Contrôle isotypique de souris (Bad et P-Bad-Ser112), rIC : Contrôle isotypique de lapin (P-Bad-Ser136).*

### **I.3. Discussion / Conclusion**

Les résultats obtenus au cours de cette étude complémentaire, bien que parcellaires, montrent que la forte expression de la protéine pro-apoptotique Bad dans les cellules tumorales des patients est associée, comme on pouvait s'y attendre, pour partie à l'existence d'un « pool » inactif de Bad, car phosphorylé. Cela concerne notamment, la sérine 136 de Bad, et à un degré moindre, la sérine 112. Cependant, la technique utilisée afin de déterminer l'état de phosphorylation de Bad, et plus particulièrement ses différentes formes, n'est pas suffisamment sensible. Ainsi, le traitement des prélèvements (déparaffinage ; démasquage des sites antigéniques...) inhérent à la technique d'immunohistochimie sous-estime sans doute le niveau de phosphorylation des protéines et introduit parfois des faux-positifs, ou des marquages aberrants, comme on l'a constaté pour la recherche de Bad phosphorylée sur la sérine 155. Afin de déterminer plus spécifiquement le niveau d'expression de ces formes, une analyse par western blot pourrait être envisagée. Celle-ci ne se ferait pas en remplacement de l'immunohistochimie mais en complément, l'analyse en western blot ne permettant pas de discriminer les cellules qui expriment la protéine Bad.

Au cours de cette étude, nous avons donc observé une expression essentiellement de la forme phosphorylée de la sérine 136 de la protéine Bad. La phosphorylation sur cette sérine, et donc l'état d'activation / d'inactivation de la protéine Bad, est régulée préférentiellement par la principale voie de survie des lymphocytes B, la voie PI3K/Akt (Datta et al. 2000). Cette voie est par ailleurs, activée constitutivement dans ce type de lymphome (Uddin et al. 2006), ce qui

**Resultats : Partie I**  
**Rôle de Bad dans l'hétérogénéité clinique des DLBCL**

---

permet d'expliquer ainsi le fort taux de phosphorylation que nous retrouvons, ici, sur la sérine 136 de Bad. Ces résultats sont en concordance avec des données concernant des tumeurs solides comme le glioblastome, le cancer de la prostate ou du sein. Ces cancers, qui sont effectivement caractérisés aussi par une activation constitutionnelle des voies PI3K/Akt et MAPK, sont aussi associés à un niveau élevé de phosphorylation de Bad sur les résidus sérine 112 et 136 (Li et al. 1997a; Samuels and Velculescu 2004). De façon intéressante, l'inhibition de ces phosphorylations permet de sensibiliser les cellules tumorales à l'apoptose (She et al. 2005).

Nous avons vu que le rituximab, utilisé comme traitement standard actuellement des DLBCL en association avec la polychimiothérapie (R-CHOP) contribue à sensibiliser la cellule tumorale à l'apoptose en inhibant les voies de survie constitutivement activées, comme PI3K/Akt et la voie MAPK (Suzuki et al. 2007). De plus, nous avons pu observer dans l'étude sur Bad une corrélation positive entre le niveau d'expression de la protéine Bad et de la sous-unité catalytique de sa phosphatase PP1 $\alpha$ . Nous confirmons dans ce travail complémentaire la réalité d'un fort niveau de phosphorylation de Bad. L'ensemble de ces données soulignent fortement l'intérêt à cibler et à développer des « Bad phosphatases » pour de futures stratégies thérapeutiques de ce lymphome. En effet, si on pouvait cibler de manière spécifique la déphosphorylation de la protéine Bad, celle-ci pourrait faciliter les mécanismes d'apoptose mis en jeu au cours des traitements.

## **II. Les neurotrophines dans les DLBCL : Implication dans les circuits autocrines de survie ?**

---

### **II.1. Synopsis**

#### **Contexte scientifique**

La survie et le développement des cellules tumorales sont liés à leur capacité à échapper aux cellules cytotoxiques de la défense anti-tumorale de l'hôte et/ou aux agents cytotoxiques présents notamment dans les chimiothérapies. Comme on l'a évoqué précédemment, la plupart du temps, il s'agit d'une mise à mort par apoptose ou nécrose. C'est aussi le cas pour les effets des anti-CD20, comme le Rituximab, dont l'ajout au traitement conventionnel des DLBCL par polychimiothérapie, CHOP, a permis d'améliorer sensiblement la survie des patients.

Alors que l'apoptose induite par le Rituximab est modérée et variée selon les lignées cellulaires, les travaux de Suzuki et collaborateurs ont clairement montré qu'il s'agit plutôt d'une sensibilisation à l'apoptose que d'une réelle réponse apoptotique. Cette sensibilisation donnerait un premier signal permettant de faciliter l'efficacité d'un 2<sup>e</sup> signal cytotoxique, comme celui produit par les drogues présentes dans la chimiothérapie (Jazirehi and Bonavida 2005; Suzuki et al. 2007). Ainsi, selon ce modèle, la signalisation par le Rituximab interférerait avec les signalisations intracellulaires des cellules tumorales de ces lymphomes, levant l'inhibition des signalisations d'apoptose, abaissant ainsi le seuil de réponse des cellules à un signal de mort. Effectivement, des voies de signalisation sont constitutivement activées dans les cellules de DLBCL (ex: NF- $\kappa$ B et/ou PI3K/Akt et/ou Erk1/2). Ces voies confèrent aux cellules tumorales un avantage dans la survie en induisant notamment la sur-expression des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) (Houldsworth et al. 2004; Lam et al. 2005; Smith et al. 2005; Uddin et al. 2008). Les travaux de Suzuki et collaborateurs ont complété cette compréhension des mécanismes induits par le Rituximab en démontrant un effet inhibiteur sur la voie PI3K/Akt et aboutissant à une diminution à la fois de l'expression mais aussi de la fonction de Bcl-X<sub>L</sub>. Ainsi, cette inhibition des voies de survie détermine une forte sensibilisation à l'apoptose, au centre de laquelle on retrouve notamment une activation de Bad par défaut de phosphorylation. En effet, suite au traitement des cellules par le rituximab, la disparition des formes phosphorylées de Bad est suivie de la détection progressive d'hétérodimères Bad /Bcl-X<sub>L</sub>. Il faut préciser que les modèles cellulaires utilisées dans ces études n'exprimaient pas Bcl-2, ce qui explique que les hétérodimères Bad/Bcl-2 n'aient pas pu être détectés.

Des travaux récents au laboratoire ont mis en évidence la production de neurotrophines et l'expression de leurs récepteurs (Trk/p75<sup>NTR</sup>/sortiline) au niveau de lignées B humaines et de lymphocytes B normaux du sang périphérique. Ces facteurs de croissance ont été décrits initialement pour leur rôle dans l'homéostasie des cellules neuronales. Leurs signalisations de survie convergent sur les mêmes voies constitutivement activées dans la plupart des cellules B tumorales. Plus précisément, cette sécrétion endogène (BDNF) permettrait la mise en place de boucles autocrines de survie lors d'un stress cellulaire induit *in vitro* par la privation en facteurs trophiques ou l'activation de la voie apoptotique Fas (Fauchais et al. 2008). Ainsi, ces neuropeptides pouvaient ouvrir une nouvelle voie de recherche pour appréhender les mécanismes de la survie des cellules tumorales des DLBCL et de certaines résistances thérapeutiques, comme celles liées au Rituximab.

## **Hypothèses et objectifs**

La production de neurotrophines et l'expression des récepteurs de basse ( $p75^{\text{NTR}}$ ) et haute affinité (Trk) ayant été démontrée notamment au niveau de cellules B normales activées, dont sont issus la plupart des lymphomes B, nous avons émis l'hypothèse de leur expression par des cellules tumorales issues des DLBCL. De plus, les signalisations de survie de ces facteurs de croissance convergeant sur les principales voies activées constitutivement par ces cellules B tumorales, et ciblées dans les effets apoptotiques des anti-CD20 (Rituximab) la possibilité d'une implication des neurotrophines dans des mécanismes de résistance thérapeutique semblait envisageable. Dans cette étude, nous avons donc recherché la production de neurotrophines (NGF, BDNF) et de leurs récepteurs dans des lignées de cellules tumorales de DLBCL. Notre objectif était en particulier d'apporter des arguments expérimentaux en faveur de boucles autocrines de régulation de la survie cellulaire. Ainsi, nous avons analysé ensuite ces expressions en fonction de différentes conditions expérimentales modulant la balance survie/apoptose, et notamment lors de la réponse apoptotique induite par le rituximab.

## **Méthodologie**

L'étude de l'expression de NGF, BDNF et leurs récepteurs ( $p75^{\text{NTR}}$ , sortiline, TrkA et TrkB) a été réalisée au niveau des transcrits par RT-PCR, et au niveau des protéines par western-Blot, cytométrie en flux et immunofluorescence indirecte sur 2 lignées cellulaires de DLBCL (lignées SUDHL). La capacité des cellules à sécréter ces neurotrophines a été par ailleurs recherchée par immunoprécipitation puis western blot et par dosage ELISA. Ces expressions ont été analysées en condition basale de culture (10% d'SVF) puis dans différentes situations de régulation de la balance survie/mort (privation sérique, engagement du BCR, réponse apoptotique induite par le Rituximab). La viabilité des cellules a été évaluée par un test XTT. L'apoptose a été étudiée par cytométrie en flux par l'analyse de la translocation des phosphatidylsérines à la membrane externe des cellules (test Annexine V / IP) et par l'analyse du cycle cellulaire (pic sub-G1). Enfin, la fonctionnalité des neurotrophines dans les cellules tumorales de ces lymphomes a été abordée par l'effet de l'ajout de neurotrophines exogènes sur la survie des cellules des 2 lignées et l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk (K-252a). En parallèle, une analyse par immunohistochimie de l'expression des neurotrophines (NGF) dans des biopsies de patients atteints de DLBCL a été initiée.

## **Résultats et conclusions**

Nous montrons une expression des neurotrophines NGF et BDNF, sous leur forme matures et immatures, et de leur récepteurs de basse affinité ( $p75^{\text{NTR}}$  et son co-récepteur, la sortiline) ainsi que le récepteur de haute affinité TrkB, mais uniquement dans sa forme tronquée. De plus ces cellules sécrètent les deux formes de la neurotrophine BDNF. La production de ces neurotrophines et l'expression de leurs récepteurs varient en fonction des conditions de cultures cellulaires en association avec une modification de la balance survie/mort. Ainsi, la sécrétion de BDNF diminue lors d'un stress cellulaire induit par une privation sérique et inversement augmente lors de l'activation des cellules B tumorales par l'engagement du BCR. Alors qu'elle n'est pas détectable en condition basale, la sécrétion d'NGF est par ailleurs induite lors de l'exposition des cellules au rituximab. De façon intéressante, cette production de NGF semble alors associée à la synthèse du récepteur de haute affinité TrkA, suggérant la possibilité d'un circuit autocrine de survie pouvant interférer avec l'effet apoptotique du rituximab. En parallèle, les premiers résultats sur les biopsies de patients atteints de DLBCL ont montré une forte expression de NGF. Les données préliminaires sur l'effet des

## *Resultats : Partie II*

### ***Les neurotrophines dans les DLBCL : Implication dans des circuits autocrines de survie ?***

---

neurotrophines exogènes sur la viabilité cellulaire ne permettent pas de conclure actuellement. Cependant, l'inhibition pharmacologique des récepteurs de survie Trk, bien que devant être approfondie et complétée, révèle un fort effet cytotoxique de l'inhibiteur K-252a. L'ensemble de nos résultats montre que les neurotrophines pourraient être impliquées dans des boucles de régulation autocrines/paracrines de la survie cellulaire dans les DLBCL.

#### **II.2. Article 2 : A neurotrophin axis in diffuse large B-cell lymphoma: involvement in cell survival pathway and sensitivity to rituximab- induced apoptosis.**

Cynthia Bellanger, Marie-Claude Lise, Anne-Laure Fauchais, Dominique Bordessoule, Marie-Odile Jauberteau and Danielle Troutaud.

A soumettre prochainement.

***Resultats : Partie II***  
***Les neurotrophines dans les DLBCL : Implication dans des circuits autocrine de survie ?***

---

***A neurotrophin axis in diffuse large B-cell lymphoma: involvement in cell survival pathway and sensitivity to rituximab- induced apoptosis.***

*Cynthia Bellanger<sup>1</sup>, Marie-Claude Lise<sup>1</sup>, Anne-Laure Fauchais<sup>1</sup>, Dominique Bordessoule<sup>2,3,4</sup>, Marie-Odile Jauberteau<sup>1</sup> and Danielle Troutaud<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>EA3842, Université de Limoges, France; <sup>2</sup>UMR CNRS 6101, Université de Limoges, France; <sup>3</sup>Structure Régionale de Référence des Lymphomes du Limousin, CHU Limoges, France; <sup>4</sup>Service d'Hématologie Clinique, CHU Limoges, France, Université de Limoges, France

**Funding :** This work and C.B. were supported by Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité Départemental de La Haute-Vienne) and CORC (Comité d'Orientation Recherche Cancer en Limousin).

**Running title :** Neurotrophins and cell survival in DLBCL

**Correspondence:** Danielle Troutaud, EA 3842, Faculté des Sciences & Techniques, Université de Limoges, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cédex, France. tel : 33 555 457 218 - E-mail: danielle.troutaud@unilim.fr

### **II.3. Données complémentaires : Effet de l'ajout de neurotrophines exogènes et de l'inhibition des récepteurs Trk sur la survie des cellules B tumorales de DLBCL.**

Dans la précédente étude, nous avons montré que les lignées cellulaires issues de DLBCL sécrètent en condition basale de culture les neurotrophines (notamment BDNF) dans leurs formes matures et immatures et expriment les récepteurs de mort (p75<sup>NTR</sup>/sortiline) et de survie Trk (TrkB). Ces résultats confirment des données préliminaires obtenues récemment par une autre équipe sur d'autres lignées humaines de DLBCL (Sniderhan et al. 2009), soulignant ainsi l'intérêt de notre hypothèse de travail lors du démarrage de notre thèse. De plus, nous démontrons pour la première fois que ces sécrétions peuvent être modulées (BDNF) ou apparaître (Hiddemann et al. 2005) en fonction des conditions de culture (privation en sérum) ou d'activation des cellules B tumorales (engagement du BCR, traitement au rituximab), en association étroite avec une modification de la balance survie/mort. Ainsi, la sécrétion de NGF, par exemple, devient détectable par ELISA lorsqu'on expose les cellules SUDHL au rituximab, lors de la réponse apoptotique, et fait intéressant, cet événement s'accompagne de l'augmentation d'expression du récepteur de survie TrkA dans la lignée la plus résistante à ce traitement, SUDHL-4. Comme les données obtenues en immunofluorescence ont permis de visualiser la co-expression de neurotrophine (BDNF) et leurs récepteurs (p75<sup>NTR</sup>, TrkB) au niveau d'une même cellule, l'ensemble de nos résultats suggèrent la mise en place de circuits autocrines mais aussi paracrines de signalisation impliquant les neurotrophines et leurs récepteurs de mort ou de survie.

Ainsi, la suite de notre travail concerne la question de la fonctionnalité de ces expressions dans les cellules tumorales de ce lymphome. Notre première démarche pour aborder ce questionnement a été d'étudier l'effet de l'ajout de neurotrophines exogènes sur la survie des cellules des 2 lignées. En parallèle, une analyse de l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk a été initiée, en utilisant un inhibiteur des tyrosine kinases des récepteurs Trk, le K-252a (Kase et al. 1987). Ces données restent préliminaires car ne concernent dans un premier temps qu'une estimation indirecte de la viabilité cellulaire.

#### **II.3.1. Matériels et méthodes**

##### ***Conditions de culture des lignées SUDHL***

Les cellules SUDHL-4 et SUDHL-6 sont cultivées en condition basale (RPMI complet avec 10 % de SVF) ou dans un milieu dépourvu de SVF (0 % de SVF) ou encore en présence de 20µg/mL de rituximab.

La stimulation par des neurotrophines exogènes est réalisée sur une cinétique de 24, 48 et 72 heures de culture en présence de 1, 10 et 100 ng/mL de protéines recombinantes humaines NGF et BDNF humains (Alomone Labs, Jerusalem, Israël).

L'inhibition des récepteurs de haute affinité Trk est réalisée sur la même cinétique en présence de 50, 100, 200, 500 et 1000 nM de K-252a (Alomone Labs, Jerusalem, Israël). Des contrôles DMSO sont réalisés en parallèle pour évaluer la toxicité du DMSO présent dans la solution de K-252a aux différentes concentrations testées. Le pourcentage final de DMSO est inférieur ou égal à 1%.

**Resultats : Partie II**  
***Les neurotrophines dans les DLBCL : Implication dans des circuits autocrine de survie ?***

---

***Evaluation de la viabilité cellulaire par le test XTT***

Ce test colorimétrique déjà utilisé dans l'article précédent cette étude, permet de mesurer la viabilité cellulaire en déterminant l'activité des déshydrogénases mitochondriales. Le test est basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium (XTT) par les déshydrogénases mitochondriales, libérant alors un sel coloré, le formazan.

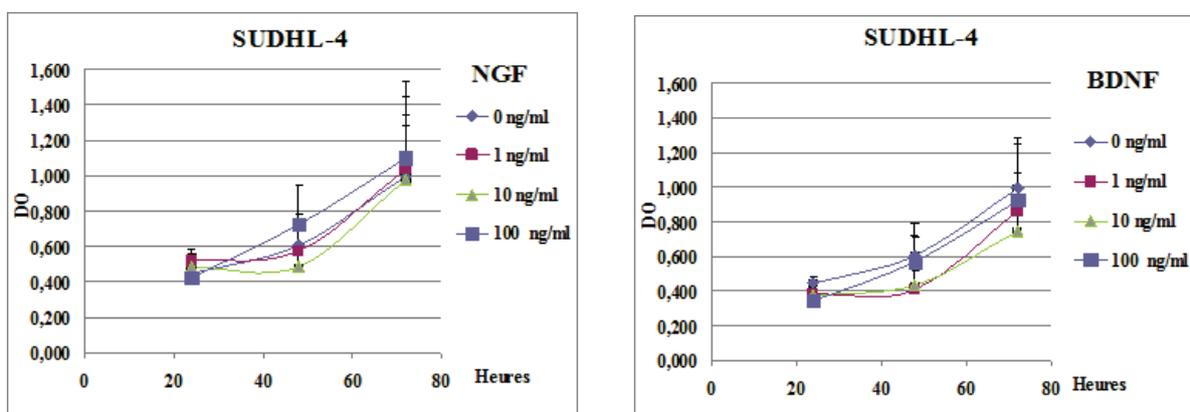
Les cellules sont déposées à la densité de  $5 \cdot 10^4$  cellules / puits en plaque 96 puits, et cultivées dans 200  $\mu$ L de RPMI dépourvu de rouge de phénol (Gibco). A la fin des cultures, cinquante  $\mu$ L de substrat colorimétrique (Cell Proliferation Xit II, XTT Roche) sont ajoutés dans chaque puit et laissés en contact avec les cellules pendant 3 heures. L'intensité de la réaction colorimétrique est mesurée à 450 nm par spectrophotométrie (Multiskan FC).

***Analyse statistique***

Une analyse de variance à 1, 2 ou 3 facteurs a été réalisée, selon les cas, à partir des données expérimentales pour comparer l'effet des neurotrophines ou de l'inhibiteur des Trk sur les différentes conditions de cultures des cellules. Une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme significative.

### II.3.2. Résultats

Le rôle des neurotrophines exogènes, NGF et BDNF, a été analysé dans un premier temps, au cours du temps et en fonction de leur concentration, sur la viabilité cellulaire des su-DHL4 mises en condition basale de culture (10 % SVF). Les résultats présentés sur la figure 35 montrent que les effets sur la viabilité cellulaire semblent varier en fonction de la concentration des neurotrophines. Ainsi, pour de fortes concentrations en NGF comme BDNF (100 ng/ml), nous n'observons pas de variation de la viabilité des cellules SUDHL-4 par rapport aux cultures contrôles en l'absence des neurotrophines, et ce, sur l'ensemble de la cinétique étudiée. Au contraire, les concentrations plus faibles et notamment la concentration de 10 ng/ml de NGF ou BDNF semblent déterminer plutôt une diminution de l'activité métabolique des cellules, pouvant refléter soit un effet cytotoxique soit une baisse de l'activité proliférative. Cet effet semble plus marqué pour BDNF avec par exemple, en moyenne 30% d'inhibition de l'activité métabolique cellulaire à la dose de 10 ng/ml de BDNF, après 48h de culture, comparativement au contrôle correspondant (sans BDNF), contre 20% d'inhibition en moyenne pour la même dose de NGF. Cette tendance à inhiber l'activité métabolique des cellules de BDNF est confirmée par les données issues de l'analyse de variance à 2 facteurs qui montre un effet significatif toutes doses confondues de BDNF par rapport à NGF à 24h ( $p = 0.01$ ).



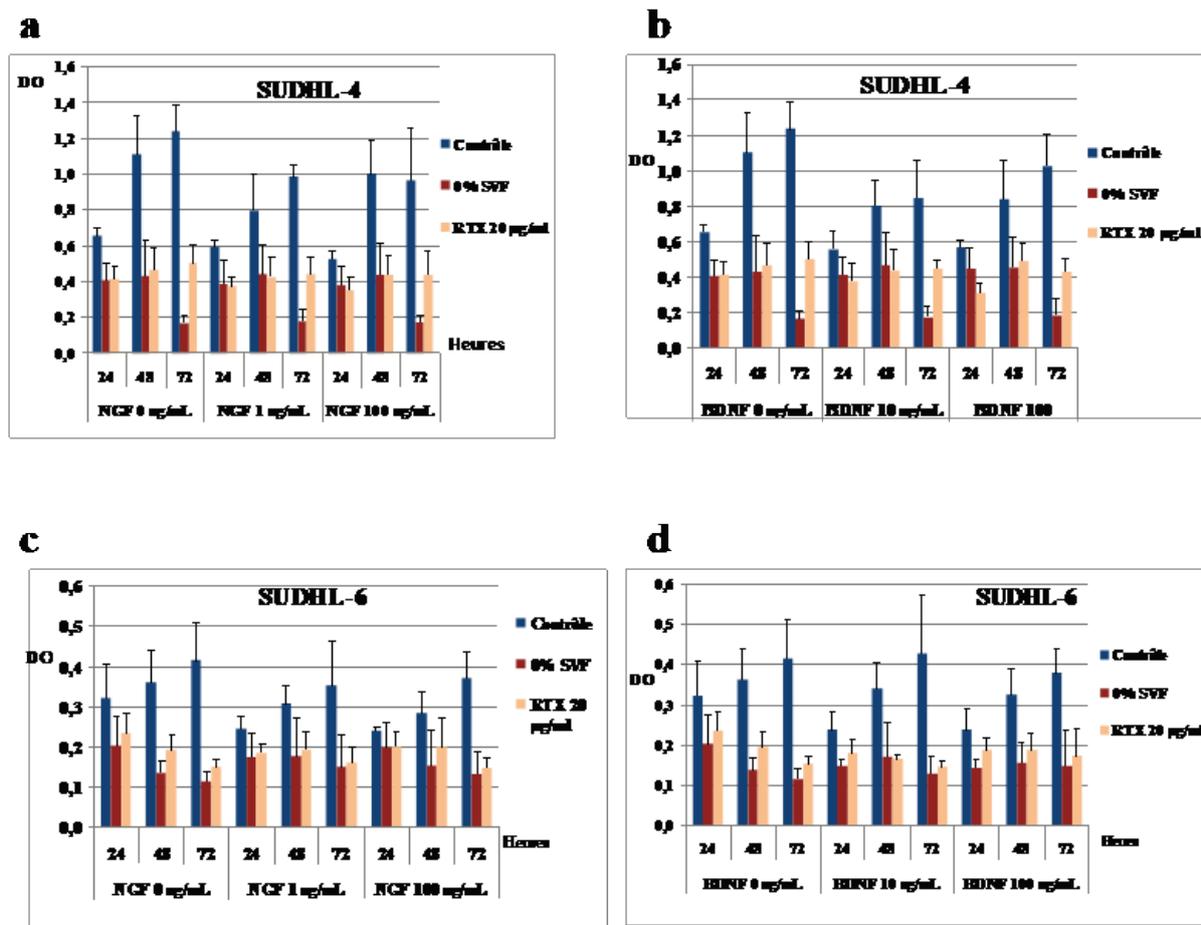
**Figure 35:** *Effet des neurotrophines NGF et BDNF exogènes sur la viabilité cellulaire des cellules SUDHL-4. Les cellules SUDHL-4 ont été mises en culture pendant 24, 48 et 72 heures en présence ou non de doses croissantes des protéines recombinantes humaines NGF et BDNF. L'estimation de la viabilité cellulaire est mesurée à l'aide d'un test métabolique au XTT. Les résultats correspondent aux moyennes ± SD obtenues à partir de 3 expérimentations indépendantes*

Afin d'essayer de préciser le contexte de l'implication des neurotrophines, nous avons poursuivi cette étude en faisant varier les conditions de culture. Ainsi et comparativement aux effets de NGF et BDNF en condition basale, nous avons analysé l'influence de ces neurotrophines en condition de stress, après privation sérique, et suite à l'exposition au rituximab. Pour cette étude, nous avons choisi 2 concentrations pour chaque neurotrophine, l'une faible (1 ng/ml ou 10 ng/ml pour NGF et BDNF respectivement) et l'autre forte (100 ng/ml pour NGF et BDNF). Les données issues de 3 expérimentations indépendantes sont présentées dans la figure 36. Les résultats obtenus nous permettent d'observer tout d'abord la même tendance que précédemment, à savoir un effet inhibiteur, bien que non significatif en raison sans doute du nombre trop limité d'expérimentations (3), de la viabilité cellulaire pour les faibles doses de NGF et BDNF (respectivement 1 et 10 ng/ml), après 48h de culture. De

## Resultats : Partie II

### Les neurotrophines dans les DLBCL : Implication dans des circuits autocrines de survie ?

façon intéressante, cet effet semble moins marqué sur la lignée SUDHL-6, dont on sait maintenant (article précédent) que certaines cellules expriment le récepteur de survie TrkB. Les conditions de stress cellulaire s'accompagnent, comme on pouvait s'y attendre, à une diminution significative de la viabilité des cellules dès 48h et pour les 2 conditions étudiées, privation sérique et exposition au rituximab. En effet, les résultats de l'analyse de variance à 3 facteurs montrent un effet « milieu » très significatif (avec  $p < 0.001$ ). Cependant, l'ajout des neurotrophines matures ne semble pas avoir d'influence notable sur cette chute de viabilité induite par ces conditions de culture et ce, pour les 2 lignées étudiées.



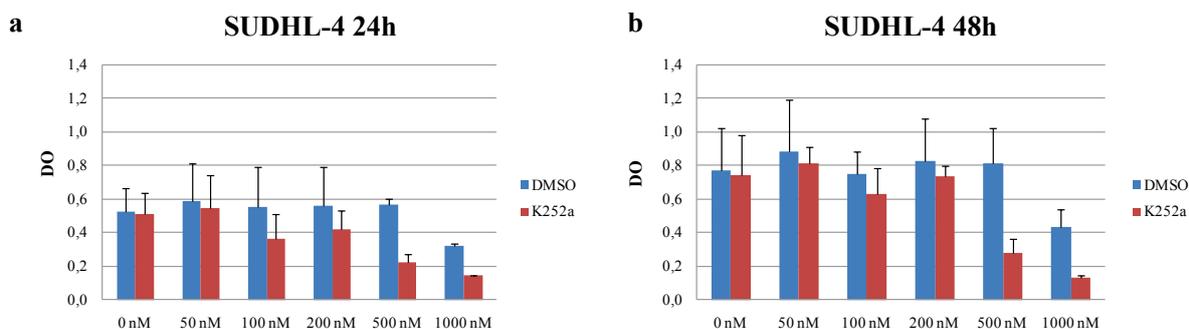
**Figure 36:** Effet des neurotrophines exogènes sur la mort cellulaire des lignées de DLBCL induite par la privation sérique et le traitement au rituximab. Les cellules SUDHL-4 (a et b) et SUDHL-6 (c et d) sont mises en présence ou en absence de différentes concentrations de NGF et BDNF, et incubées soit en milieu standard (10% SVF, contrôle), en milieu dépourvu de SVF (0%,) ou en association avec un traitement au rituximab. Au bout de 24, 48 et 72 heures la viabilité cellulaire est évaluée par un test XTT. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SD obtenues à partir de 3 ou 4 expérimentations indépendantes.

Afin de cibler plus spécifiquement les neurotrophines endogènes et leur éventuelle signalisation, nous avons finalement démarré une étude visant à inhiber dans un premier temps les récepteurs de survie. Ainsi, nous avons choisi d'inhiber pharmacologiquement les récepteurs Trk (TrkA et notamment TrkB) en incubant les cellules SUDHL-4 et SUDHL-6 en présence de l'inhibiteur K-252a et d'étudier la viabilité cellulaire, toujours à l'aide du test au XTT. Les premiers résultats obtenus sur 3 expérimentations indépendantes sont présentés sur la figure 37. Ils nous permettent de visualiser un effet « dose » significatif de la molécule K-252a sur l'inhibition de l'activité métabolique des cellules, que nous supposons associée à une

## Resultats : Partie II

### Les neurotrophines dans les DLBCL : Implication dans des circuits autocrines de survie ?

forte baisse de la viabilité cellulaire compte tenu des observations faites au microscope inversé lors du suivi des cultures. Ainsi, l'analyse de variance à 2 facteurs révèle un effet significatif de K-252a comparativement aux cultures témoins DMSO à 24h ( $p=0.04$ ). Cet effet semble se produire pour les cellules SUDHL-4 notamment à 500 nM de K-252a, et dès 24h de culture. Cette action est retrouvée à la dose de 1000 nM mais nous observons aussi à cette dose un effet inhérent au % de DMSO présent dans les cultures, ce qui n'est pas le cas de la dose 500 nM.



**Figure 37 : Effet de l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk sur la viabilité cellulaire des cellules SUDHL-4.** Les cellules SUDHL-4 sont traitées avec des doses croissantes (50-1000 nM) d'un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase des récepteurs Trk, le K-252a, pendant 24h (a) et 48h (b). Des cultures contrôles en présence de taux équivalents en DMSO sont réalisées en parallèle. La viabilité cellulaire est estimée à l'aide d'un test XTT. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SD obtenues à partir de 3 expérimentations indépendantes.

### II.3.3. Discussion / Conclusion

Bien que préliminaire et n'abordant la viabilité cellulaire que par une évaluation métabolique, cette étude montre un probable effet inhibiteur de la protéine mature BDNF exogène sur la viabilité cellulaire des cellules tumorales des lignées de DLBCL. De façon intéressante, cet effet semble surtout concerner la lignée SUDHL-4, et moins la lignée SUDHL-6. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait qu'en condition basale de culture nous avons montré dans l'article précédent cette étude que les SUDHL-4 n'exprimaient pas le récepteur TrkB, contrairement à la lignée SUDHL-6 où l'on retrouve l'expression membranaire de TrkB dans environ 20% des cellules. A noter que les 2 lignées expriment les protéines p75<sup>NTR</sup> et sortiline, récepteurs impliqués dans les voies de mort cellulaire induites par les neurotrophines ainsi que les pro-neurotrophines. Ainsi, la prévalence des récepteurs de mort en condition basale sensibiliserait plutôt les cellules à l'apoptose lors de l'ajout de neurotrophines exogènes, tendance observée pour les 2 neurotrophines sur les cellules SUDHL-4 bien que souvent non significative, sans doute du fait de la faiblesse de notre échantillonnage. La présence de TrkB dans la lignée SUDHL-6 pourrait expliquer, par la mise en jeu de la signalisation BDNF/TrkB ou BDNF/TrkB/p75<sup>NTR</sup>, que la balance tende alors plutôt vers les voies de survie, conformément aux données issues du test XTT.

Concernant l'influence des neurotrophines sur la réponse des cellules SUDHL exposées à un stress, nos premiers résultats ne permettent pas de conclure sur un effet particulier. Ces expériences doivent être répétées et complétées notamment par des situations intermédiaires de stress des cellules, telles que des doses plus faibles de rituximab ou des privations incomplètes en SVF. Par ailleurs, il serait intéressant de rechercher l'effet de l'ajout des pro-

## **Resultats : Partie II**

### ***Les neurotrophines dans les DLBCL : Implication dans des circuits autocrine de survie ?***

---

neurotrophines afin de voir si on privilégie les voies de mort comme on pourrait le penser compte tenu de la présence constitutive des récepteurs p75<sup>NTR</sup> et sortiline.

Finalement nos premiers résultats sur l'inhibition des récepteurs Trk réalisée sur les cellules SUDHL-4 sont assez prometteurs et confirment les données publiées très récemment suggérant l'intérêt thérapeutique à utiliser des inhibiteurs de la signalisation Trk/neurotrophines dans les lymphomes non-hodgkiniens et notamment les DLBCL (Renne et al. 2008; Sniderhan et al. 2009). En effet, l'inhibition des récepteurs Trk par le K-252a s'accompagne d'une baisse sensible de la viabilité qu'il nous faudra confirmer notamment par une étude de l'apoptose et du cycle cellulaire. Cet effet est observé à partir de 500 nM d'inhibiteur et semble-t-il pas à 200 nM. Ces résultats montrant une relative résistance des cellules de 2 lignées de type GCB sont à rapprocher des données obtenues précédemment sur d'autres lignées de DLBCL (Sniderhan et al. 2009). En effet, une différence de comportement a été observée en fonction des lignées de DLBCL, avec un effet apoptotique induit par K-252a dès 200 nM pour une lignée de type ABC (OCI-LY3) alors que la lignée de type GCB (OCI-LT19) ne présentait pas de réponse apoptotique, mais seulement une diminution de la prolifération. Ces effets différentiels sont à corrélérer avec les différences d'expression des récepteurs Trk et notamment l'absence d'expression constitutive de TrkA sur les lignées de type GCB, comme nos résultats l'ont confirmés, dans l'article présenté avant cette étude complémentaire. Bien que le spectre d'action de l'inhibiteur K-252a ne soit pas spécifique aux seuls récepteurs TrkA et TrkB, mais s'étende notamment à fortes concentrations à d'autres récepteurs Tyrosine kinases (Kase et al. 1987), les données préliminaires présentées ici suggèrent l'existence de récepteurs Trk fonctionnels dans les lignées de DLBCL.

Ainsi, l'ensemble des premiers résultats de cette étude sur la fonctionnalité des neurotrophines, bien que provisoires et à confirmer par de nouvelles expérimentations, donnent du crédit à notre hypothèse concernant l'implication possible d'une signalisation des neurotrophines dans le contrôle de la survie des cellules B tumorales de DLBCL.

**DISCUSSION GENERALE  
CONCLUSION / PERSPECTIVES**

---

*Conclusion générale / Perspectives*

---

---

## **Discussion générale / Conclusion / Perspectives**

---

La thématique générale de notre thèse concerne la compréhension des mécanismes de survie des cellules B tumorales avec comme modèle d'étude, les lymphomes diffus à grandes cellules B. L'objectif de ces recherches visait à identifier des processus biologiques permettant une sensibilisation à la mort par apoptose des lymphocytes B malins, pouvant déboucher notamment sur de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans la première partie de nos travaux nous montrons pour la première fois que l'expression de la protéine pro-apoptotique Bad est corrélée négativement au stade clinique des patients atteints de DLBCL, suggérant fortement son rôle de suppresseur tumoral dans cette maladie. Nos résultats sont conformes aux travaux chez la souris qui montraient que la déficience en Bad produisait chez les animaux au cours du temps une forte prévalence de tumeurs lymphoïdes et tout particulièrement des DLBCL (Ranger et al. 2003), ce qui avait orienté en partie notre choix sur ce modèle pathologique. Ainsi, nos résultats chez l'homme confirment le rôle central des molécules « BH3 », comme Bad, qui déterminent par leur statut de phosphorylation et leur interaction avec les protéines protectrices de l'apoptose (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>), le seuil de sensibilisation à la mort par apoptose des cellules. Nous avons confirmé (étude complémentaire à l'article 1) la présence d'un pool inactivé de Bad, phosphorylé, dans les cellules B tumorales de DLBCL, bien que la technique utilisée (IHC) soit peu adaptée à cette identification. Ce statut de phosphorylation concerne au moins les sérines 112 et 136, en cohérence avec les voies kinases activées constitutivement (PI3K/Akt et MAPK) dans ce lymphome, suggérant une inactivation partielle de Bad dans le cytosol sous forme complexée avec la protéine 14-3-3. Cependant, l'état de phosphorylation de la sérine 155, décisif dans la formation d'hétérodimères avec Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub> (Datta et al. 2000) reste à déterminer de même que la présence éventuelle de complexes Bad/Bcl-2 ou Bad/Bcl-X<sub>L</sub>.

En conclusion, à l'issue de l'ensemble de ces résultats nous pouvons supposer qu'une partie de Bad est présente sous forme active (non phosphorylée) ce qui facilite, par l'inhibition des acteurs anti-apoptotiques, les effets cytotoxiques soit intrinsèques liés aux défenses anti-tumorales de l'hôte, soit extrinsèques en rapport aux traitements (CHOP, R-CHOP). Ainsi nous avons vu que les patients qui avaient une très forte expression de Bad dans les cellules B tumorales présentaient aussi un stade clinique de meilleur pronostic et inversement. Un autre pool de Bad est présent sous forme inactif (phosphorylé) dans les cellules, bien que la proportion des 2 formes reste à analyser et à préciser. Nous avons montré également que la principale sous-unité catalytique d'une Bad-phosphatase (PP1 $\alpha$ ) était aussi exprimée et que son expression était corrélée significativement avec celle de Bad dans les cellules tumorales des patients. Ainsi, tous les éléments nécessaires à une activation de Bad par déphosphorylation sont en place, et nos travaux ouvrent la voie sur l'intérêt à cibler cette déphosphorylation de Bad, notamment par l'activation de phosphatases de Bad, afin d'amplifier la sensibilisation à l'apoptose dans de futures stratégies thérapeutiques de ces lymphomes. De telles stratégies sont actuellement ciblées pour développer de nouvelles molécules à propriétés anti-tumorales. Ainsi la technologie DPT (Phosphatase-derived drug technology) mise au point à l'Institut Pasteur (Guergnon et al, 2006) est basée notamment sur le concept d'une « signature PP1 » caractérisée par la présence de 2 motifs consensus d'interaction avec la sous-unité catalytique des PP1 (PP1c) et présents dans la plupart des protéines interagissant avec les PP1 (R/Kx<sub>(0,1)</sub>V/IxF et FxxR/KxR/K) (Garcia et al, 2004). De façon intéressante, cette « signature PP1 » est aussi retrouvée dans certaines molécules impliquées dans la régulation de la survie cellulaire comme des membres de la famille Bcl-2, notamment Bad (au niveau des domaines BH1 et BH3), et l'AIF. Cette DPT a permis la synthèse de peptides notamment à partir des séquences consensus déduites de Bad (DPT-7) et de la molécule AIF (DPT-AIF1) capables de pénétrer dans les cellules et possédant des

propriétés apoptotiques par leur capacité à interagir avec PP1c (Guernon et al, 2006 ; Godet et al, 2010).

Nos résultats permettent aussi d'envisager de tester dans le cas des DLBCL le ciblage thérapeutique de Bad à partir d'une autre stratégie utilisant des molécules mimétiques du domaine BH3 de Bad mimant l'activation de Bad. De façon intéressante une première approche utilisant un peptide « BH3 » (ABT-737) a été réalisée récemment sur des lignées cellulaires humaines de DLBCL, et notamment sur les lignées que nous avons utilisées dans la 2<sup>e</sup> partie de notre travail, SUDHL-4 et SUDHL-6. Les données obtenues montrent que ces lignées présentent un profil d'expression de molécules BH3 plutôt de type sensibilisatrices (Bad, Bik, Noxa, Puma) qui prédisait une sensibilité à ce type de stratégie BH3. En effet, ces cellules se sont avérées fortement répondeuses au traitement par le peptide testé, aboutissant à une forte réponse apoptotique lors de l'exposition au peptide (Deng et al, 2007). De même ces lignées, caractérisées par une forte expression de protéines BH3 sensibilisatrices à l'apoptose, s'avèrent être celles qui répondent le plus aux agents chimiotoxiques utilisés dans le traitement conventionnel CHOP. Ainsi, le profil d'expression de Bad et des autres membres de cette sous famille BH3 peut constituer un élément important de prédiction (favorable si fort, défavorable si faible/absent) de la réponse thérapeutique. Il était intéressant de rechercher une telle corrélation entre la survie globale et l'expression de Bad dans la cohorte de patients sélectionnés pour notre étude. Cette analyse a été réalisée en différenciant les cas « Bad négatifs » des « Bad positifs », et la tendance semblait aller dans le sens de ce facteur pronostic (voir Figure 2 de l'article 1). En effet, les patients « Bad négatifs » semblaient être caractérisés par une survie globale plus faible que ceux exprimant Bad, mais ces résultats n'étaient pas significatifs, notre échantillonnage (43 patients) étant insuffisant. Il serait par conséquent très intéressant de poursuivre cette étude sur un plus grand nombre de cas, et notamment de patients traités par immunothérapie en plus de la chimiothérapie (R-CHOP) afin de confirmer si l'expression de Bad peut aussi être un facteur de pronostic dans la réponse thérapeutique impliquant le rituximab.

En plus de suggérer ce rôle pour Bad, cette première partie de nos travaux sur les DLBCL a permis d'identifier pour la première fois que l'expression d'AIF dans les cellules tumorales des patients traités par CHOP est prédictive de la survie globale. Ainsi, lorsque les cellules tumorales présentent une forte expression d'AIF, les patients ont une survie globale à 5 ans significativement supérieure (71 %) par rapport aux patients caractérisés par une faible expression d'AIF où la survie à 5 ans n'est plus que de 25%. Cette valeur prédictive de l'expression d'AIF n'est pas retrouvée lorsqu'on associe le rituximab à la chimiothérapie (R-CHOP). Ces résultats soulignent l'intérêt à évaluer et cibler le rôle de l'AIF, et plus généralement de l'apoptose caspase-indépendante, dans de nouvelles stratégies thérapeutiques de ces lymphomes. Cette stratégie pourrait être notamment une alternative pour les cas d'échappement aux traitements, caractérisés par des mécanismes de résistance à l'induction de mort caspase dépendante mise en jeu dans la plupart des effets des drogues cytotoxiques (Constantinou et al. 2009). Dans le prolongement de ces résultats sur l'AIF, nous avons démarré un travail dans le cadre d'une collaboration avec l'UMR CNRS 7200 (Laboratoire d'innovation pharmaceutique, Université de Strasbourg, Dr L Désaubry). Cette étude a pour objectif de tester, dans un premier temps sur des lignées cellulaires de DLBCL, les propriétés cytostatiques et cytotoxiques de candidats médicaments de la famille des Flavaglines en comparaison et en association avec les traitements conventionnels. Cette équipe fabrique des analogues synthétiques de ces molécules, qui semblent cibler tout particulièrement le relargage de l'AIF de la mitochondrie vers le cytosol. Notre groupe a démarré les analyses et j'ai participé par l'encadrement d'un stage de master 1<sup>ère</sup> année aux premières étapes de ce travail. Finalement comme nous l'avons signalé à propos de la technologie DPT, l'analyse structurale de la séquence de l'AIF a montré que la portion C terminale de la molécule

humaine contenait une séquence d'interaction avec PP1c combinant les 2 motifs consensus de la « signature PP1 » (Godet et al, 2010). Ces données suggèrent que la molécule AIF aurait une capacité potentielle à activer les phosphatases PP1. Ainsi, le ciblage du relargage de l'AIF dans les DLBCL pourrait, en plus d'être une alternative pour les cas d'échappement aux traitements, fournir une stratégie pour amplifier les mécanismes de sensibilisation à l'apoptose *via* PP1 $\alpha$  / Bad.

Dans la deuxième partie de notre travail nous montrons que la survie des cellules B tumorales de DLBCL pourrait aussi dépendre de leur propre capacité à produire des facteurs de croissance, et notamment des neurotrophines comme NGF et BDNF.

En effet, nous montrons, par plusieurs approches expérimentales que les cellules B des 2 lignées SUDHL, choisies comme modèles biologiques dans ce travail, produisent ces neurotrophines. Cette production de NGF et BDNF est démontrée au niveau des transcrits, bien qu'elle soit faible, en particulier pour NGF, en comparaison avec la lignée de neuroblastome IMR32 utilisée comme contrôle positif. Bien que cette faible expression des ARNm de BDNF et NGF soit retrouvée dans toutes les cultures cellulaires testées, il faut noter que le niveau de cette expression est variable non seulement entre les deux lignées cellulaires mais aussi parfois en fonction de la cinétique étudiée. La présence des 2 neurotrophines dans les cellules des 2 lignées est confirmée aussi au niveau de la protéine. Nous avons choisi d'analyser, quand c'était possible, l'expression protéique par différentes méthodes : la cytométrie en flux nous renseignant sur le pourcentage de cellules exprimant NGF et BDNF, l'immunofluorescence apportant en plus la co-localisation cellulaire des neurotrophines et de leurs récepteurs, et le western-blotting révélant éventuellement les formes immatures et matures de ces facteurs de croissance. Cependant et alors que les données de la cytométrie en flux indiquent qu'un fort pourcentage de cellules des 2 lignées SUDHL expriment NGF ( $86 \pm 6 \%$  et  $74 \pm 13 \%$  pour SUDHL-4 et SUDHL-6 respectivement), l'expression protéique de NGF en condition basale est difficilement détectable par western-blotting. Des modifications post-traductionnelles de cette protéine peuvent intervenir et pourraient expliquer nos difficultés en western blot. Des sites de glycosylations situés au niveau des pro-domaines ont été identifiés et pourraient participer à la régulation et à la sécrétion des neurotrophines. De plus, les neurotrophines peuvent subir différents processus de protéolyses intra et extracellulaires donnant naissance, au niveau du SNC, à de nombreuses isoformes de NGF (Skaper et al. 2001). L'expression de la protéine BDNF dans les cellules s'accompagne, contrairement à NGF, de sa sécrétion, en condition basale. Cette sécrétion des formes immature et mature de BDNF reste très faible car uniquement détectée dans les surnageants de culture après immunoprécipitation suivie d'un western blot, le dosage ELISA ne permettant pas de la quantifier. Cette production, ainsi que celle de NGF, avait été montrée dans les cellules B matures (Edling et al. 2004; Pearse et al. 2005).

La production de NGF et BDNF par les cellules SUDHL-4 et SUDHL-6 est associée à l'expression par ailleurs à l'état basal des récepteurs de mort p75<sup>NTR</sup> et son co-récepteur, la sortiline, ainsi que la forme tronquée du récepteurs de survie TrkB. Ces expressions sont confirmées au niveau des transcrits et des protéines. Cependant, l'expression protéique des récepteurs de morts est majoritairement détectée en intracellulaire et notamment par western blot. La détection de ces récepteurs en cytométrie en flux est difficile ; en effet, la partie extracellulaire de récepteur p75<sup>NTR</sup> peut être notamment clivée indépendamment de la présence de neurotrophines (Kanning et al. 2003). Effectivement, les différents anticorps disponibles que nous avons pu tester en cytométrie en flux pour détecter l'expression membranaire de p75<sup>NTR</sup> reconnaissent des épitopes situés soit au niveau des domaines riches en cystéines (CRD) de la partie extracellulaire du récepteur (H-137, Santa-Cruz), soit au niveau de la tige juxta-membranaire située en dessous (Alomone) (voir figure 27 de la partie

Bibliographique). Ces régions sont probablement contenues dans le fragment clivé de p75<sup>NTR</sup> (p75<sup>ECD</sup>, voir figure 25 de la partie Bibliographique), ce qui peut expliquer nos difficultés à détecter cette forme membranaire en cytométrie en flux.

Alors que les ARNm de la forme tronquée (gp95TrkB) et non totale de TrkB (gp145TrkB) sont détectés dans les cellules des 2 lignées, l'expression protéique du récepteur de survie TrkB est majoritairement détectée aussi en intracellulaire, et très faiblement à la membrane sauf pour environ 20 % des cellules SUDHL-6. Les formes tronquées de TrkB avaient déjà été retrouvées au niveau des lymphocytes B humains normaux ainsi que dans de nombreuses lignées B caractérisées aussi souvent, par l'absence de détection membranaire de ce récepteur (Schenone et al. 1996; D'Onofrio et al. 2000; Fauchais et al. 2008). Nos résultats sont donc conformes à ces données et suggèrent une séquestration intra-cytoplasmique des récepteurs qui devra être analysée notamment par microscopie confocale, afin de rechercher d'éventuelles vésicules de signalisation ce qui est le cas dans les modèles neuronaux (Howe et al. 2001). En effet, la présence de telles vésicules pourrait être une des raisons permettant d'expliquer la difficulté que nous avons rencontrée pour détecter un marquage membranaire des récepteurs par cytométrie en flux. En plus de la localisation intracellulaire du récepteur TrkB, son rôle signalisateur devra être précisé notamment par la recherche d'éventuels partenaires comme p75<sup>NTR</sup>. En effet, bien que tronqué de sa portion intracellulaire catalytique, sa capacité signalisatrice et son rôle dans la survie cellulaire semble probable (Minichiello 2009).

L'originalité de nos résultats vient de la mise en évidence que ces expressions et productions sont dépendantes des conditions de culture, c'est-à-dire aussi des conditions d'activation ou de stress des cellules. Ainsi, des ARNm de TrkA apparaissent suite à l'engagement du BCR alors qu'ils sont la plupart du temps indétectables en condition basale de culture. Cependant, certaines données doivent être répétées et confirmées notamment au niveau protéique, comme pour la stimulation du BCR. En effet ces transcrits de TrkA sont détectés après 48h de culture en présence d'anti-Ig mais aussi en leur absence, de façon inattendue. Ces données retrouvées uniquement au temps 48h dans les cultures contrôles pourraient indiquer une régulation de l'expression de TrkA en fonction du cycle cellulaire. De plus, la détection de la production de NGF est observée pour la première fois, par dosage ELISA, dans les surnageants de culture des cellules SUDHL-4 suite au traitement par le rituximab. Cette sécrétion semble transitoire, les taux déclinant après 72h de culture. De façon intéressante, la production de NGF lors de l'exposition au Rituximab, est associée à la synthèse de son récepteur de haute affinité TrkA dans les cellules de lignée SUDHL-4. Cependant, l'expression protéique de TrkA reste faible ; en effet, elle n'est révélée qu'après immunoprécipitation de TrkA et cette expression est difficilement détectable à la membrane en cytométrie. On peut supposer encore la formation d'endosomes de signalisation, comme c'est le cas pour les cellules nerveuses. En effet, l'internalisation des récepteurs Trk fait suite à la liaison des neurotrophines à leurs récepteurs au niveau des terminaisons nerveuses, cette signalisation endosomale agissant comme médiateur d'une réponse biologique (Zweifel et al. 2005).

La production de NGF, associée à la régulation d'expression de son récepteur de survie TrkA, dans une lignée plutôt résistante au rituximab (SUDHL-4), suggère fortement que la signalisation NGF/TrkA pourrait participer à certains mécanismes de résistance aux anti-CD20. Plusieurs études ont porté sur la compréhension des mécanismes de résistance au rituximab. Certaines suggèrent que la modulation de l'expression et / ou la génération de formes circulantes de CD20 pourraient en partie justifier l'apparition de ces résistances (Haidar et al. 2003; Manshoury et al. 2003). Concernant les 2 lignées que nous avons étudiées, nous n'avons observé aucune différence significative dans l'expression membranaire du CD20 permettant d'expliquer en partie la différence de comportement de ces lignées en

présence du rituximab, les cellules SUDHL-6 étant plus sensibles que les SUDHL-4 à cette réponse apoptotique. Pour d'autres auteurs, le développement et / ou l'acquisition de la résistance au rituximab serait du à des altérations des voies de signalisation de la survie des cellules tumorales (Bonavida 2007). Des patients atteints de lymphomes B cutanés et échappant ou réfractaires au rituximab présentent une sur-régulation importante des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 avec les niveaux pré-thérapeutiques mesurés. Cette sur-régulation suggère un rôle clé des protéines de la famille Bcl-2 dans les phénomènes de résistance thérapeutique (Jazirehi et al. 2007; Wobser et al. 2007). De plus, l'analyse de lignées cellulaires B de LNH, résistantes au rituximab, a révélé un faible taux d'expression de CD20 à la surface de ces cellules. Elles présentent une hyper-activation des voies p38-MAPK, NFκB et ERK-1/2 et une surexpression de Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>, ce qui indiquerait une relation entre la résistance et ces voies de signalisation. Ainsi, des études utilisant, entre autre, des inhibiteurs pharmacologiques de ces kinases sur des lignées cellulaires de lymphomes ont montré un retour de la sensibilité des cellules à l'apoptose initiée par le rituximab (Jazirehi et al. 2004; Jazirehi et al. 2005).

Nos résultats suggèrent un lien entre la signalisation du CD20 induite par le rituximab et la régulation d'un « axe NGF/TrkA » dans une lignée plus résistante au Rituximab. Cette interaction NGF/TrkA pourrait contrarier l'inhibition induite par le rituximab sur les voies de survie comme PI3K/Akt ou les MAPK (Jazirehi et Bonavida 2005; Suzuki et al. 2007), ces dernières étant en effet activées lors de la signalisation des récepteurs Trk (Aravelo et Wu 2006). Cependant, les mécanismes moléculaires conduisant à cette régulation restent à définir, de même que l'origine directe ou indirecte de ce lien. Dans ce contexte, une étude cinétique plus précise et plus précoce des effets de l'exposition des cellules SUDHL-4 et SHDHL-6 au rituximab sur la transcription des gènes de NGF et TrkA notamment nous permettrait de mieux cibler l'origine de cette régulation, la production de NGF pouvant aussi déterminer en retour la synthèse du récepteur TrkA (Renne et al. 2008). Par ailleurs, l'ajout d'anti-NGF au milieu de culture, pour neutraliser la production endogène de cette neurotrophine, permettrait sans doute d'apporter aussi des éléments de réponse sur le rôle de cette production dans la résistance à l'apoptose induite par les anti-CD20.

Finalement, la question de la fonctionnalité de ces productions de neurotrophines dans le cas des DLBCL reste ouverte. En effet, bien qu'il s'agisse de résultats très préliminaires, l'apport de neurotrophines exogènes matures aux cultures semble plutôt sensibiliser les cellules à la mort (notamment BDNF), cependant aucun effet synergique n'a été observé lorsqu'on associe ces neurotrophines à des signaux d'apoptose (privation sérique, rituximab). Ces données diffèrent de celles de la littérature qui montrent que la fixation de NGF exogène sur TrkA diminue l'apoptose induite par la privation sérique dans des lignées B matures (Rosini et al. 2004). Ces différences peuvent être liées aux protocoles expérimentaux qui varient au niveau des lignées cellulaires étudiées et des conditions de culture. Cet effet cytotoxique potentiel doit être confirmé par d'autres approches notamment par l'analyse de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. La présence majoritaire de récepteurs de mort p75<sup>NTR</sup> au sein des SUDHL a été confirmée par ce travail. De plus, nous avons montré par western blot après immunoprécipitation que ce récepteur formait un hétérodimère avec son co-récepteur la sortiline en condition basale. Cette prévalence de l'expression des récepteurs de mort pourrait rendre compte d'une prédisposition des cellules à l'apoptose. En effet, les complexes p75<sup>NTR</sup>/sortiline ont été montrés comme des récepteurs de forte affinité pour les pro-neurotrophines et responsables de leurs effets apoptotiques comme c'est le cas dans au niveau neuronal (Teng et al. 2005). Des travaux récents dans notre équipe ont de plus démontré pour la première fois dans des lignées lymphoblastoïdes B l'expression de la sortiline et son rôle pro-apoptotique (Fauchais et al. 2008). Dans ce contexte, il sera intéressant de compléter ce travail avec les neurotrophines exogènes, en réalisant des cultures cellulaires en présence de

pro-neurotrophines. De même la fonction pro-apoptotique de la sortiline devra être étudiée par blocage de la protéine à l'aide d'anticorps antagonistes.

Pour aborder le rôle physiologique des productions endogènes des neurotrophines par les cellules tumorales de DLBCL, nous avons réalisé des expériences préliminaires d'inhibition pharmacologique des récepteurs de survie Trk. Les premiers résultats obtenus avec l'inhibiteur pharmacologique K252a, semblent donner des arguments dans la réalisation de circuits de régulation de la survie mais ces résultats doivent être confirmés. En effet, la diminution de la viabilité cellulaire des SUDHL-4, mesurée par un test XTT, intervient seulement à partir d'une concentration de 500 nM de cet inhibiteur. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude récente montrant un effet cytotoxique de ce « pan » inhibiteur de récepteurs à activité tyrosine kinase sur des lignées cellulaires de DLBCL (Sniderhan et al. 2009). De façon intéressante, les auteurs de ce travail ont observé que les cellules de lignée de type GCB, comme les lignées cellulaires SUDHL que nous avons utilisées (Alizadeh and al, 2000), résistent relativement à des doses jusqu'à 200 nM de K252a, alors que des celles de lignée ABC entrent en apoptose lorsqu'elles ont exposées aux mêmes concentrations de cet inhibiteur (Sniderhan et al. 2009). Nos résultats doivent être complétés par une gamme de concentrations plus basse de K252a, en évaluant en plus de l'activité métabolique cellulaire l'éventuel effet apoptotique induit par l'inhibiteur. De plus, nous étudierons l'effet de cet inhibiteur sur la survie cellulaire dans diverses conditions expérimentales et notamment lors de l'exposition des cellules au rituximab. Enfin, comme l'inhibiteur utilisé n'est pas spécifique de TrkA ni de TrkB, les perspectives immédiates à ces travaux seraient d'inhiber spécifiquement les récepteurs Trk, à l'aide de siRNA, par exemple.

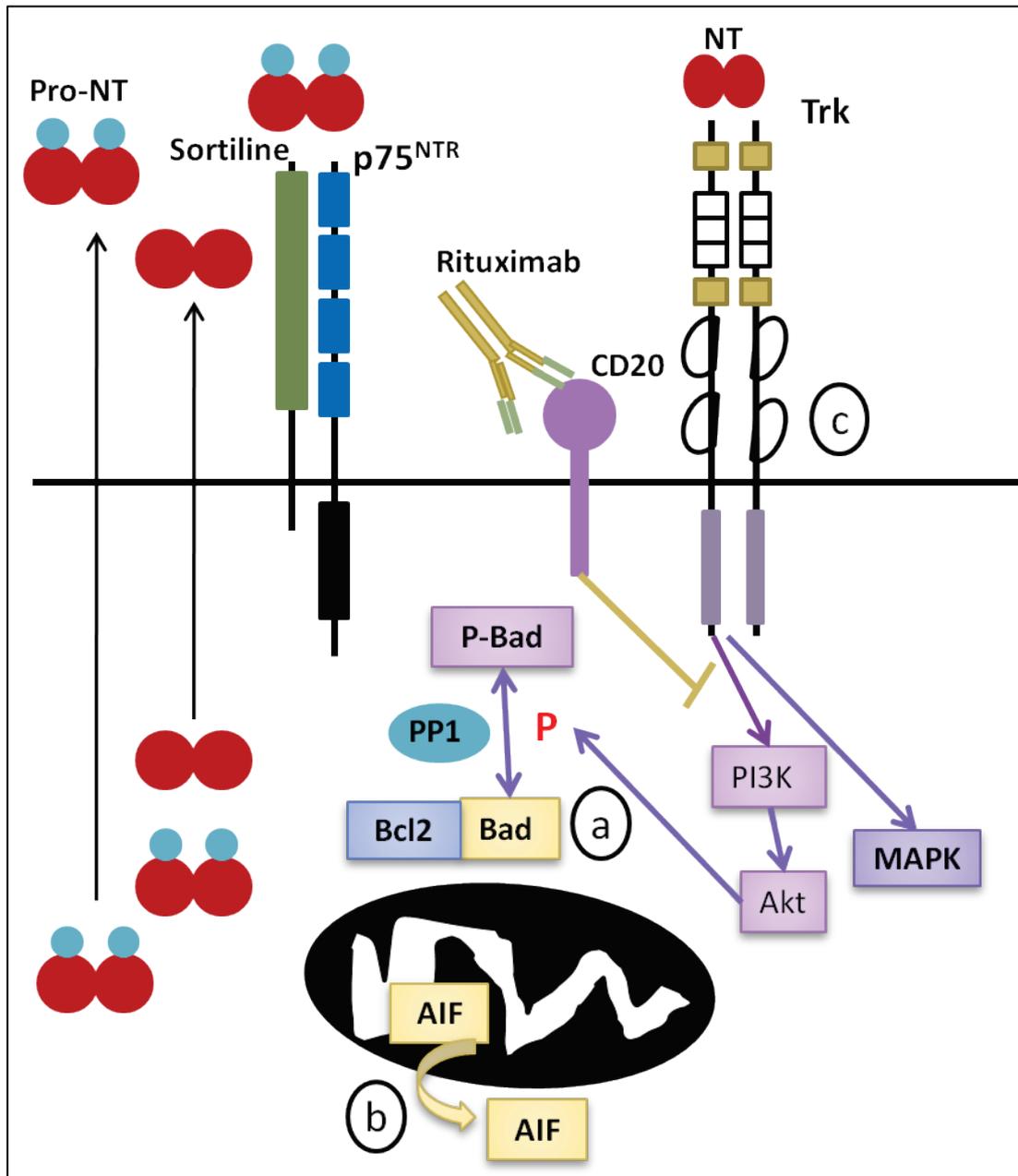
Finalement, l'inhibition ou la neutralisation des productions des neurotrophines endogènes (siRNA, anticorps neutralisants respectivement) nous permettrait sans doute de mieux appréhender le rôle de ces productions sur la survie des cellules B malignes.

Les données obtenues sur des lignées cellulaires doivent être confirmées *in vivo*, chez les patients atteints de DLBCL. Ainsi l'analyse complète par immunohistochimie des 46 biopsies sélectionnées de patients diagnostiqués pour un DLBCL reste à effectuer sur l'expression des neurotrophines (NGF et BDNF) et de leurs récepteurs (p75<sup>NTR</sup>/sortiline, TrkA et TrkB). Une expression différentielle pourrait alors être recherchée en corrélation avec le stade clinique, ou la survie globale des patients. Ces travaux pourraient permettre de déterminer de nouveaux marqueurs de pronostic. De façon surprenante, les premiers résultats obtenus par immunohistochimie sur 15 biopsies révèlent une forte expression de NGF dans les cellules B tumorales des patients, qui semble sur ce faible échantillonnage indépendante de la signature GCB/ABC. Une telle discordance entre les données issues des lignées cellulaires et celles des patients a été récemment décrite pour différents lymphomes non-hodgkiniens dont les DLBCL (Sniderhan et al. 2009). Dans cette étude les auteurs ont analysé différentes lignées correspondant aux 2 types principaux de DLBCL, avec une lignée de type ABC (OCI-LY3) et une lignée de type GCB (OCI-LY19). Ainsi, alors que les lignées étudiées exprimaient, comme dans notre travail, de faibles niveaux de transcrits de NGF et de forts niveaux de BDNF, inversement une forte expression des transcrits de NGF était retrouvée dans les biopsies de patients. De plus, il est intéressant de noter que seul 1 patient parmi 8 exprimait des ARNm de BDNF. De plus, alors que les transcrits de TrkA sont détectés dans la lignée de type ABC, ils sont absents dans la lignée GCB (Sniderhan et al. 2009). Ainsi nos résultats concernant 2 lignées de type GCB (SUDHL-4 et SUDHL-6) et caractérisées par de faibles niveaux d'expression d'ARNm de NGF et l'absence d'expression de transcrits de TrkA en condition basale de culture, sont conformes à ceux de cette étude. Il faut rappeler que le sous-type GCB est associé à un meilleur pronostic, les patients présentant une meilleure survie globale comparativement au type ABC (Wright et al. 2003). L'ensemble de ces

données suggèrent que l'expression et la fonction des neurotrophines pourraient varier en fonction du type de DLBCL et par conséquent pourraient être en lien avec la survie des patients.

Enfin, l'importance de l'environnement cellulaire dans ce type de lymphomes semble de plus en plus évidente, comme le montre les travaux récents ayant établi 2 signatures géniques de pronostic différents reflétant des caractéristiques de cellules non tumorales dans les DLBCL (Lenz et al. 2008). Ainsi, le premier groupe, « signature stromale-1 », avec un pronostic plus favorable, caractérise notamment des gènes reflétant le remodelage de la matrice extracellulaire et l'infiltration de cellules de lignée monocyttaire. Or, ces cellules sont connues pour synthétiser du NGF qui induit par son interaction avec TrkA par ailleurs leur différenciation en macrophages et leur activation (Lambiase et al. 2004). La probabilité de l'implication d'une boucle paracrine de régulation, plutôt qu'autocrine, est aussi fortement suggérée par l'ensemble de nos résultats et notamment le faible effet constaté des neurotrophines exogènes. Ainsi, le rôle pro-inflammatoire de NGF, cytokine Th-2 modulant la réaction inflammatoire et les processus de remodelage et réparation tissulaire (Micera et al. 2007), pourrait être aussi impliqué dans cette signature stromale et par conséquent dans la réponse de l'hôte localisée au niveau du micro-environnement tumoral. Cette hypothèse ouvre la voie à de nouvelles recherches qui aborderaient d'autres aspects du rôle complexe et sans doute parfois contradictoire que pourraient jouer les neurotrophines vis-à-vis de la survie des cellules cancéreuses qui les produiraient.

En conclusion, nous montrons dans ce travail (Figure 38) que la protéine pro-apoptotique Bad, qui joue un rôle clef dans la sensibilisation à l'apoptose des lymphocytes B, pourrait avoir un rôle suppresseur de tumeur dans les DLBCL. Les mécanismes de sensibilisation à l'apoptose du rituximab impliquent une activation de Bad, inhibant sa phosphorylation. Les signalisations de survie des neurotrophines convergent notamment sur la phosphorylation de la molécule pro-apoptotique Bad, l'inactivant. Or, nous suggérons par ce travail qu'une signalisation impliquant des neurotrophines (NGF, BDNF) pourrait aussi participer à la régulation de la survie des cellules B tumorales de DLBCL. Ainsi, ces travaux sur les neurotrophines ouvrent la voie à de nouvelles approches dans la compréhension des mécanismes de résistances thérapeutiques, aux centres desquels la molécule Bad serait déterminante.



**Figure 38: Modélisation des voies de sensibilisation à l'apoptose dans les DLBCL.**

Comme dans la plupart des lymphomes, certaines voies de survie (PI3K/Akt, MAPK) sont constitutivement activées dans les cellules tumorales des DLBCL. Ces mêmes voies sont inhibées par le rituximab (anti-CD20) permettant une sensibilisation des cellules à l'apoptose induite notamment par la chimiothérapie. L'ensemble des résultats de notre thèse permettent d'envisager de nouvelles stratégies pour sensibiliser ces cellules B tumorales à l'apoptose : a/ par le ciblage spécifique de l'activation (déphosphorylation) de la protéine Bad (ex : BH3-mimétiques, Drug Phosphatase Technology) ; b/ en favorisant la voie caspase indépendante via la libération de l'AIF (ex : les flavaglines) ; c/ par l'inhibition des récepteurs (Trk) de haute affinité aux neurotrophines (ex : K252a). En effet, la sécrétion de neurotrophines et la signalisation autocrine de leurs récepteurs de survie par ces cellules B tumorales pourraient être une piste pour expliquer certains mécanismes de résistance aux traitements comme le rituximab.

NT : neurotrophine (neurotrophine mature); Pro-NT : pro-neurotrophines (neurotrophine immature).

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## *Références bibliographiques*

---

---

## Références bibliographiques

- Abramson, J. S., and M. A. Shipp. 2005. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood* 106 (4):1164-1174.
- Aho, T. L., J. Sandholm, K. J. Peltola, H. P. Mankonen, M. Lilly, and P. J. Koskinen. 2004. Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett* 571 (1-3):43-49.
- Aid, T., A. Kazantseva, M. Piirsoo, K. Palm, and T. Timmusk. 2007. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85 (3):525-535.
- Akasaka, T., H. Akasaka, C. Ueda, N. Yonetani, Y. Maesako, A. Shimizu, H. Yamabe, S. Fukuhara, T. Uchiyama, and H. Ohno. 2000. Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC/immunoglobulin heavy-chain fusion gene. *J Clin Oncol* 18 (3):510-518.
- Alas, S., B. Bonavida, and C. Emmanouilides. 2000. Potentiation of fludarabine cytotoxicity on non-Hodgkin's lymphoma by pentoxifylline and rituximab. *Anticancer Res* 20 (5A):2961-2966.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, A. Rosenwald, J. C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J. I. Powell, L. Yang, G. E. Marti, T. Moore, J. Hudson, Jr., L. Lu, D. B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M. R. Grever, J. C. Byrd, D. Botstein, P. O. Brown, and L. M. Staudt. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403 (6769):503-511.
- Allen, S. J., and D. Dawbarn. 2006. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci (Lond)* 110 (2):175-191.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, and J. Yuan. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87 (2):171.
- Aloe, L., E. Alleva, A. Bohm, and R. Levi-Montalcini. 1986. Aggressive behavior induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (16):6184-6187.
- Aloe, L., L. Bracci-Laudiero, E. Alleva, A. Lambiase, A. Micera, and P. Tirassa. 1994. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (22):10440-10444.
- Aloe, L., L. Bracci-Laudiero, S. Bonini, and L. Manni. 1997. The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* 52 (9):883-894.
- Aloe, L., and R. Levi-Montalcini. 1977. Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res* 133 (2):358-366.
- Aloe, L., L. Probert, G. Kollias, L. Bracci-Laudiero, M. G. Spillantini, and R. Levi-Montalcini. 1993. The synovium of transgenic arthritic mice expressing human tumor necrosis factor contains a high level of nerve growth factor. *Growth Factors* 9 (2):149-155.
- Aloe, L., P. Tirassa, and L. Bracci-Laudiero. 2001. Nerve growth factor in neurological and non-neurological diseases: basic findings and emerging pharmacological perspectives. *Curr Pharm Des* 7 (2):113-123.
- Ameisen, J. C. 1999. La sculpture du vivant. Le suicide cellulaire ou la mort créatrice. Ed Seuil.
- Ameisen, J. C., T. Idziorek, O. Billaut-Mulot, M. Loyens, J. P. Tissier, A. Potentier, and A. Ouaiissi. 1995. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ* 2 (4):285-300.
- Anderson, K. C., M. P. Bates, B. Slaughenhaupt, S. F. Schlossman, and L. M. Nadler. 1984. A monoclonal antibody with reactivity restricted to normal and neoplastic plasma cells. *J Immunol* 132 (6):3172-3179.
- Antignani, A., and R. J. Youle. 2006. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* 18 (6):685-689.
- Arevalo, J. C., B. Conde, B. I. Hempstead, M. V. Chao, D. Martin-Zanca, and P. Perez. 2001. A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. *Oncogene* 20 (10):1229-1234.

- Arevalo, J. C., B. Conde, B. L. Hempstead, M. V. Chao, D. Martin-Zanca, and P. Perez. 2000. TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* 20 (16):5908-5916.
- Arevalo, J. C., and S. H. Wu. 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63 (13):1523-1537.
- Arnoult, D., N. Rismanchi, A. Grodet, R. G. Roberts, D. P. Seeburg, J. Estaquier, M. Sheng, and C. Blackstone. 2005. Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* 15 (23):2112-2118.
- Atkins, C. D. 1994. A predictive model for non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 330 (8):574; author reply 574-575.
- Atwal, J. K., B. Massie, F. D. Miller, and D. R. Kaplan. 2000. The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 27 (2):265-277.
- Auffray, I., S. Chevalier, J. Froger, B. Izac, W. Vainchenker, H. Gascan, and L. Coulombel. 1996. Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bone marrow--derived stromal cells of the factor-dependent human cell line UT-7. *Blood* 88 (5):1608-1618.
- Aurikko, J. P., B. T. Ruotolo, J. G. Grossmann, M. C. Moncrieffe, E. Stephens, V. M. Leppanen, C. V. Robinson, M. Saarma, R. A. Bradshaw, and T. L. Blundell. 2005. Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR. *J Biol Chem* 280 (39):33453-33460.
- Ayllon, V., X. Cayla, A. Garcia, F. Roncal, R. Fernandez, J. P. Albar, C. Martinez, and A. Rebollo. 2001. Bcl-2 targets protein phosphatase 1 alpha to Bad. *J Immunol* 166 (12):7345-7352.
- Ayllon, V., A. Fleischer, X. Cayla, A. Garcia, and A. Rebollo. 2002. Segregation of Bad from lipid rafts is implicated in the induction of apoptosis. *J Immunol* 168 (7):3387-3393.
- Ayllon, V., A. C. Martinez, A. Garcia, X. Cayla, and A. Rebollo. 2000. Protein phosphatase 1alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *EMBO J* 19 (10):2237-2246.
- Azar, S. T., S. C. Major, and B. Safieh-Garabedian. 1999. Altered plasma levels of nerve growth factor and transforming growth factor-beta2 in type-1 diabetes mellitus. *Brain Behav Immun* 13 (4):361-366.
- Bai, M., A. Skyrilas, N. J. Agnantis, S. Kamina, E. Tsanou, C. Grepí, V. Galani, and P. Kanavaros. 2004. Diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell-like differentiation immunophenotypic profile are associated with high apoptotic index, high expression of the proapoptotic proteins bax, bak and bid and low expression of the antiapoptotic protein bcl-xl. *Mod Pathol* 17 (7):847-856.
- Bakhshi, A., J. P. Jensen, P. Goldman, J. J. Wright, O. W. McBride, A. L. Epstein, and S. J. Korsmeyer. 1985. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41 (3):899-906.
- Barde, Y. A. 1990. The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res* 2 (4):237-248.
- Barde, Y. A., D. Edgar, and H. Thoenen. 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1 (5):549-553.
- Barille, S., R. Bataille, M. J. Rapp, J. L. Harousseau, and M. Amiot. 1999. Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol* 163 (10):5723-5728.
- Barker, P. A. 2004. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42 (4):529-533.
- Barker, P. 2007. High affinity not in the vicinity? *Neuron* 53 (1):1-4.
- Barker, P. A., and E. M. Shooter. 1994. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 13 (1):203-215.
- Barouch, R., E. Appel, G. Kazimirsky, A. Braun, H. Renz, and C. Brodie. 2000. Differential regulation of neurotrophin expression by mitogens and neurotransmitters in mouse lymphocytes. *J Neuroimmunol* 103 (2):112-121.
- Barrett, G. L., U. Greferath, P. A. Barker, J. Trieu, and A. Bennie. 2005. Co-expression of the P75 neurotrophin receptor and neurotrophin receptor-interacting melanoma antigen homolog in the mature rat brain. *Neuroscience* 133 (2):381-392.

- Beattie, E. C., J. Zhou, M. L. Grimes, N. W. Bunnett, C. L. Howe, and W. C. Mobley. 1996. A signaling endosome hypothesis to explain NGF actions: potential implications for neurodegeneration. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:389-406.
- Bellosillo, B., N. Villamor, A. Lopez-Guillermo, S. Marce, J. Esteve, E. Campo, D. Colomer, and E. Montserrat. 2001. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 98 (9):2771-2777.
- Benedetti, M., A. Levi, and M. V. Chao. 1993. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (16):7859-7863.
- Besser, M., and R. Wank. 1999. Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J Immunol* 162 (11):6303-6306.
- Bezombes, C., S. Grazide, C. Garret, C. Fabre, A. Quillet-Mary, S. Muller, J. P. Jaffrezou, and G. Laurent. 2004. Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood* 104 (4):1166-1173.
- Bhakar, A. L., P. P. Roux, C. Lachance, D. Kryl, C. Zeindler, and P. A. Barker. 1999. The p75 neurotrophin receptor (p75NTR) alters tumor necrosis factor-mediated NF-kappaB activity under physiological conditions, but direct p75NTR-mediated NF-kappaB activation requires cell stress. *J Biol Chem* 274 (30):21443-21449.
- Bibel, M., and Y. A. Barde. 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14 (23):2919-2937.
- Bilderback, T. R., V. R. Gazula, M. P. Lisanti, and R. T. Dobrowsky. 1999. Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* 274 (1):257-263.
- Bischoff, S. C., and C. A. Dahinden. 1992. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood* 79 (10):2662-2669.
- Bohen, S. P., O. G. Troyanskaya, O. Alter, R. Warnke, D. Botstein, P. O. Brown, and R. Levy. 2003. Variation in gene expression patterns in follicular lymphoma and the response to rituximab. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (4):1926-1930.
- Bonavida, B. 2007. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunoresistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene* 26 (25):3629-3636.
- Bonini, S., G. Rasi, M. L. Bracci-Laudiero, A. Procoli, and L. Aloe. 2003. Nerve growth factor: neurotrophin or cytokine? *Int Arch Allergy Immunol* 131 (2):80-84.
- Bosly, A., D. Bron, A. Van Hoof, R. De Bock, Z. Berneman, A. Ferrant, L. Kaufman, M. Dauwe, and G. Verhoef. 2008. Achievement of optimal average relative dose intensity and correlation with survival in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with CHOP. *Ann Hematol* 87 (4):277-283.
- Bouillet, P., and L. A. O'Reilly. 2009. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 9 (7):514-519.
- Bracci-Laudiero, L., E. Vigneti, C. Iannicola, and L. Aloe. 1993. NGF retards apoptosis in chick embryo bursal cell in vitro. *Differentiation* 53 (2):61-66.
- Bresnahan, P. A., R. Leduc, L. Thomas, J. Thorner, H. L. Gibson, A. J. Brake, P. J. Barr, and G. Thomas. 1990. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* 111 (6 Pt 2):2851-2859.
- Brodeur, G. M., J. E. Minturn, R. Ho, A. M. Simpson, R. Iyer, C. R. Varela, J. E. Light, V. Kolla, and A. E. Evans. 2009. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 15 (10):3244-3250.
- Brodie, C., and E. W. Gelfand. 1992. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J Immunol* 148 (11):3492-3497.
- Brodie, C., and E. W. Gelfand. 1994. Regulation of immunoglobulin production by nerve growth factor: comparison with anti-CD40. *J Neuroimmunol* 52 (1):87-96.
- Brodie, C., N. Goldreich, T. Haiman, and G. Kazimirsky. 1998. Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. *J Neuroimmunol* 81 (1-2):20-30.

- Bronfman, F. C. 2007. Metalloproteases and gamma-secretase: new membrane partners regulating p75 neurotrophin receptor signaling? *J Neurochem* 103 Suppl 1:91-100.
- Brusamolino, E., M. Maffioli, M. Bonfichi, and U. Vitolo. 2008. Front-line therapy for nonlocalized diffuse large B-cell lymphoma: what has been demonstrated and what is yet to be established. *Future Oncol* 4 (2):199-210.
- Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, and X. Wang. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:269-290.
- Burz, C., I. Berindan-Neagoe, O. Balacescu, and A. Irimie. 2009. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 48 (6):811-821.
- Butowt, R., and C. S. von Bartheld. 2003. Connecting the dots: trafficking of neurotrophins, lectins and diverse pathogens by binding to the neurotrophin receptor p75NTR. *Eur J Neurosci* 17 (4):673-680.
- Byrd, J. C., S. Kitada, I. W. Flinn, J. L. Aron, M. Pearson, D. Lucas, and J. C. Reed. 2002. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 99 (3):1038-1043.
- Cabrera, N., E. Diaz-Rodriguez, E. Becker, D. Martin-Zanca, and A. Pandiella. 1996. TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment. *J Cell Biol* 132 (3):427-436.
- Cannings, E., T. Kirkegaard, S. M. Tovey, B. Dunne, T. G. Cooke, and J. M. Bartlett. 2007. Bad expression predicts outcome in patients treated with tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 102 (2):173-179.
- Carnahan, J., R. Stein, Z. Qu, K. Hess, A. Cesano, H. J. Hansen, and D. M. Goldenberg. 2007. Epratuzumab, a CD22-targeting recombinant humanized antibody with a different mode of action from rituximab. *Mol Immunol* 44 (6):1331-1341.
- Carter, A. R., C. Chen, P. M. Schwartz, and R. A. Segal. 2002. Brain-derived neurotrophic factor modulates cerebellar plasticity and synaptic ultrastructure. *J Neurosci* 22 (4):1316-1327.
- Casaccia-Bonnet, P., B. D. Carter, R. T. Dobrowsky, and M. V. Chao. 1996. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383 (6602):716-719.
- Casademunt, E., B. D. Carter, I. Benzel, J. M. Frade, G. Dechant, and Y. A. Barde. 1999. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J* 18 (21):6050-6061.
- Casha, S., W. R. Yu, and M. G. Fehlings. 2001. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 103 (1):203-218.
- Chao, M. V. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4 (4):299-309.
- Chao, M. V., and M. Bothwell. 2002. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 33 (1):9-12.
- Chao, M. V., M. A. Bothwell, A. H. Ross, H. Koprowski, A. A. Lanahan, C. R. Buck, and A. Sehgal. 1986. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232 (4749):518-521.
- Chao, M. V., and B. L. Hempstead. 1995. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* 18 (7):321-326.
- Chapman, B. S., and I. D. Kuntz. 1995. Modeled structure of the 75-kDa neurotrophin receptor. *Protein Sci* 4 (9):1696-1707.
- Chen, L., S. N. Willis, A. Wei, B. J. Smith, J. I. Fletcher, M. G. Hinds, P. M. Colman, C. L. Day, J. M. Adams, and D. C. Huang. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17 (3):393-403.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten, and S. J. Korsmeyer. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8 (3):705-711.
- Chevalier, S., V. Praloran, C. Smith, D. MacGrogan, N. Y. Ip, G. D. Yancopoulos, P. Brachet, A. Pouplard, and H. Gascan. 1994. Expression and functionality of the trkA proto-oncogene product/NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells. *Blood* 83 (6):1479-1485.

- Chiang, C. W., C. Kanies, K. W. Kim, W. B. Fang, C. Parkhurst, M. Xie, T. Henry, and E. Yang. 2003. Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 23 (18):6350-6362.
- Chipuk, J. E., and D. R. Green. 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18 (4):157-164.
- Chittka, A., J. C. Arevalo, M. Rodriguez-Guzman, P. Perez, M. V. Chao, and M. Sendtner. 2004. The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol* 164 (7):985-996.
- Chittka, A., and M. V. Chao. 1999. Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (19):10705-10710.
- Chowdhury, I., B. Tharakan, and G. K. Bhat. 2008. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151 (1):10-27.
- Ciriaco, E., C. Dall'Aglio, J. Hannestad, J. J. Huerta, R. Laura, G. Germana, and J. A. Vega. 1996. Localization of Trk neurotrophin receptor-like proteins in avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *J Neuroimmunol* 69 (1-2):73-83.
- Clary, D. O., G. Weskamp, L. R. Austin, and L. F. Reichardt. 1994. TrkA cross-linking mimics neuronal responses to nerve growth factor. *Mol Biol Cell* 5 (5):549-563.
- A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. 1997. *Blood* 89 (11):3909-3918.
- Clohessy, J. G., J. Zhuang, J. de Boer, G. Gil-Gomez, and H. J. Brady. 2006. Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 281 (9):5750-5759.
- Coiffier, B. 2003. Monoclonal antibodies in the management of newly diagnosed, aggressive B-cell lymphoma. *Curr Hematol Rep* 2 (1):23-29.
- Coiffier, B. 2005. Treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Hematol Rep* 4 (1):7-14.
- Coiffier, B. 2006. Monoclonal antibody as therapy for malignant lymphomas. *C R Biol* 329 (4):241-254.
- Coiffier, B. 2007. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 26 (25):3603-3613.
- Coiffier, B., M. Pfreundschuh, R. Stahel, J. Vose, and P. L. Zinzani. 2002. Aggressive lymphoma: improving treatment outcome with rituximab. *Anticancer Drugs* 13 Suppl 2:S43-50.
- Coiffier, B., and F. Reyes. 2005. Best treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a French perspective. *Oncology (Williston Park)* 19 (4 Suppl 1):7-15.
- Coltman, C. A., Jr. 1986. Diffuse large-cell lymphoma: more CHOP-Bleo is not better. *J Clin Oncol* 4 (10):1439-1440.
- Conradt, B., and H. R. Horvitz. 1998. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93 (4):519-529.
- Constantinou, C., K. A. Papas, and A. I. Constantinou. 2009. Caspase-independent pathways of programmed cell death: the unraveling of new targets of cancer therapy? *Curr Cancer Drug Targets* 9 (6):717-728.
- Coppola, V., C. A. Barrick, E. A. Southon, A. Celeste, K. Wang, B. Chen, B. Haddad el, J. Yin, A. Nussenzweig, A. Subramaniam, and L. Tessarollo. 2004. Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development* 131 (20):5185-5195.
- Corbit, K. C., D. A. Foster, and M. R. Rosner. 1999. Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 19 (6):4209-4218.
- Cory, S., and J. M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2 (9):647-656.
- Cosgaya, J. M., J. R. Chan, and E. M. Shooter. 2002. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science* 298 (5596):1245-1248.
- Coulson, E. J., K. Reid, K. M. Shipham, S. Morley, T. J. Kilpatrick, and P. F. Bartlett. 2004. The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res* 146:41-62.
- Couzinet, A., Herincs, Z. and Hueber, A;O.2002. Régulation de la mort cellulaire programmée: vers une conception plus dynamique. *Medecine / Sciences*. (18) 841-52.

- Creagh, E. M., B. M. Murphy, P. J. Duriez, C. S. Duckett, and S. J. Martin. 2004. Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 279 (26):26906-26914.
- Criddle, D. N., J. V. Gerasimenko, H. K. Baumgartner, M. Jaffar, S. Voronina, R. Sutton, O. H. Petersen, and O. V. Gerasimenko. 2007. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ* 14 (7):1285-1294.
- Cruz, R. I., F. J. Hernandez-Ilizaliturri, S. Olejniczak, G. Deeb, J. Knight, P. Wallace, B. L. Thurberg, W. Kennedy, and M. S. Czuczman. 2007. CD52 over-expression affects rituximab-associated complement-mediated cytotoxicity but not antibody-dependent cellular cytotoxicity: preclinical evidence that targeting CD52 with alemtuzumab may reverse acquired resistance to rituximab in non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 48 (12):2424-2436.
- D'Onofrio, M., U. de Grazia, S. Morrone, L. Cuomo, P. Spinsanti, L. Frati, A. Gulino, and G. Ragona. 2000. Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 11 (2):283-291.
- Dalle, S., and C. Dumontet. 2007. [Rituximab: mechanism of action and resistance]. *Bull Cancer* 94 (2):198-202.
- Danial, N. N. 2008. BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene* 27 Suppl 1:S53-70.
- Danial, N. N., C. F. Gramm, L. Scorrano, C. Y. Zhang, S. Krauss, A. M. Ranger, S. R. Datta, M. E. Greenberg, L. J. Licklider, B. B. Lowell, S. P. Gygi, and S. J. Korsmeyer. 2003. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424 (6951):952-956.
- Danial, N. N., and S. J. Korsmeyer. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116 (2):205-219.
- Daniels, I., A. M. Abulayha, B. J. Thomson, and A. P. Haynes. 2006. Caspase-independent killing of Burkitt lymphoma cell lines by rituximab. *Apoptosis* 11 (6):1013-1023.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M. E. Greenberg. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91 (2):231-241.
- Datta, S. R., A. Katsov, L. Hu, A. Petros, S. W. Fesik, M. B. Yaffe, and M. E. Greenberg. 2000. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6 (1):41-51.
- Datta, S. R., A. M. Ranger, M. Z. Lin, J. F. Sturgill, Y. C. Ma, C. W. Cowan, P. Dikkes, S. J. Korsmeyer, and M. E. Greenberg. 2002. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev Cell* 3 (5):631-643.
- Davidson, B., R. Reich, P. Lazarovici, J. M. Nesland, M. Skrede, B. Risberg, C. G. Trope, and V. A. Florenes. 2003. Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 9 (6):2248-2259.
- Davidson, W. F., T. Giese, and T. N. Fredrickson. 1998. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med* 187 (11):1825-1838.
- Davies, A. M., and E. M. Wright. 1995. Neurotrophic factors. Neurotrophin autocrine loops. *Curr Biol* 5 (7):723-726.
- Davis, R. E., K. D. Brown, U. Siebenlist, and L. M. Staudt. 2001. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194 (12):1861-1874.
- De Paepe, P., and C. De Wolf-Peeters. 2007. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia* 21 (1):37-43.
- Deans, J. P., H. Li, and M. J. Polyak. 2002. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology* 107 (2):176-182.
- Dechant, G. 2001. Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell Tissue Res* 305 (2):229-238.
- DeNardo, G. L., E. Tobin, K. Chan, B. M. Bradt, and S. J. DeNardo. 2005. Direct antilymphoma effects on human lymphoma cells of monotherapy and combination therapy with CD20 and HLA-DR antibodies and 90Y-labeled HLA-DR antibodies. *Clin Cancer Res* 11 (19 Pt 2):7075s-7079s.

- Deng, J., N. Carlson, K. Takeyama, P. Dal Cin, M. Shipp, and A. Letai. 2007. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* 12 (2):171-185.
- Desagher, S., and J. C. Martinou. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10 (9):369-377.
- Desmet, C. J., and D. S. Peeper. 2006. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 63 (7-8):755-759.
- Deveraux, Q. L., N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17 (8):2215-2223.
- Di Gaetano, N., Y. Xiao, E. Erba, R. Bassan, A. Rambaldi, J. Golay, and M. Introna. 2001. Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *Br J Haematol* 114 (4):800-809.
- Diaz-Rodriguez, E., N. Cabrera, A. Esparis-Ogando, J. C. Montero, and A. Pandiella. 1999. Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci* 11 (4):1421-1430.
- Dicou, E., C. Masson, W. Jabbour, and V. Nerriere. 1993. Increased frequency of NGF in sera of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Neuroreport* 5 (3):321-324.
- Dimmeler, S., K. Breitschopf, J. Haendeler, and A. M. Zeiher. 1999. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* 189 (11):1815-1822.
- DiStefano, P. S., D. M. Chelsea, C. M. Schick, and J. F. McKelvy. 1993. Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo. *J Neurosci* 13 (6):2405-2414.
- Donovan, M. J., M. I. Lin, P. Wiegand, T. Ringstedt, R. Kraemer, R. Hahn, S. Wang, C. F. Ibanez, S. Rafii, and B. L. Hempstead. 2000. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 127 (21):4531-4540.
- Donovan, N., E. B. Becker, Y. Konishi, and A. Bonni. 2002. JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem* 277 (43):40944-40949.
- Dramsfi, S., M. P. Scheid, A. Maiti, P. Hojabrpour, X. Chen, K. Schubert, D. R. Goodlett, R. Aebbersold, and V. Duronio. 2002. Identification of a novel phosphorylation site, Ser-170, as a regulator of bad pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* 277 (8):6399-6405.
- Du, Y., T. Z. Fischer, P. Clinton-Luke, L. D. Lercher, and C. F. Dreyfus. 2006. Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 31 (2):366-375.
- Dubus, P., M. Parrens, Y. El-Mokhtari, J. Ferrer, A. Groppi, and J. P. Merlio. 2000. Identification of novel trkA variants with deletions in leucine-rich motifs of the extracellular domain. *J Neuroimmunol* 107 (1):42-49.
- Duman, R. S., and L. M. Monteggia. 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59 (12):1116-1127.
- Duvall, E., A. H. Wyllie, and R. G. Morris. 1985. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 56 (2):351-358.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, and S. H. Kaufmann. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.
- Edling, A. E., T. Nanavati, J. M. Johnson, and V. K. Tuohy. 2004. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J Neurosci Res* 77 (5):709-717.
- Edwards, R. H., M. J. Selby, P. D. Garcia, and W. J. Rutter. 1988. Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor. *J Biol Chem* 263 (14):6810-6815.
- Edwards, R. H., M. J. Selby, and W. J. Rutter. 1986. Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors. *Nature* 319 (6056):784-787.
- Egle, A., A. W. Harris, P. Bouillet, and S. Cory. 2004. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (16):6164-6169.

- Eide, F. F., E. R. Vining, B. L. Eide, K. Zang, X. Y. Wang, and L. F. Reichardt. 1996. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 16 (10):3123-3129.
- Elias, L., C. S. Portlock, and S. A. Rosenberg. 1978. Combination chemotherapy of diffuse histiocytic lymphoma with cyclophosphamide, adriamycin, vincristine and prednisone (CHOP). *Cancer* 42 (4):1705-1710.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35 (4):495-516.
- Encinas, M., M. Iglesias, N. Llecha, and J. X. Comella. 1999. Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurochem* 73 (4):1409-1421.
- Estaquier, J., and D. Arnoult. 2007. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* 14 (6):1086-1094.
- Fahnestock, M., G. Yu, and M. D. Coughlin. 2004a. ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Prog Brain Res* 146:101-110.
- Fahnestock, M., G. Yu, B. Michalski, S. Mathew, A. Colquhoun, G. M. Ross, and M. D. Coughlin. 2004b. The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem* 89 (3):581-592.
- Fauchais, A. L., A. Boumediene, F. Lalloue, G. Gondran, V. Loustaud-Ratti, E. Vidal, and M. O. Jauberteau. 2009. Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor correlate with T-cell activation in primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 38 (1):50-57.
- Fauchais, A. L., F. Lalloue, M. C. Lise, A. Boumediene, J. L. Preud'homme, E. Vidal, and M. O. Jauberteau. 2008. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol* 181 (5):3027-3038.
- Feng, D., T. Kim, E. Ozkan, M. Light, R. Torkin, K. K. Teng, B. L. Hempstead, and K. C. Garcia. Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75NTR and sortilin. *J Mol Biol* 396 (4):967-984.
- Fernandez-Luna, J. L. 2008. Regulation of pro-apoptotic BH3-only proteins and its contribution to cancer progression and chemoresistance. *Cell Signal* 20 (11):1921-1926.
- Ferri, K. F., and G. Kroemer. 2001. Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays* 23 (2):111-115.
- Feugier, P., A. Van Hoof, C. Sebban, P. Solal-Celigny, R. Bouabdallah, C. Ferme, B. Christian, E. Lepage, H. Tilly, F. Morschhauser, P. Gaulard, G. Salles, A. Bosly, C. Gisselbrecht, F. Reyes, and B. Coiffier. 2005. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 23 (18):4117-4126.
- Finkbeiner, S., S. F. Tavazoie, A. Maloratsky, K. M. Jacobs, K. M. Harris, and M. E. Greenberg. 1997. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19 (5):1031-1047.
- Finkelman, F. D., J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban, Jr., M. P. Beckmann, L. S. Park, K. A. Schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and W. E. Paul. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 8:303-333.
- Fishelson, Z., N. Donin, S. Zell, S. Schultz, and M. Kirschfink. 2003. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol* 40 (2-4):109-123.
- Fisher, R. I. 2003. Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment. *Semin Oncol* 30 (2 Suppl 4):3-9.
- Fisher, R. I., E. R. Gaynor, S. Dahlberg, M. M. Oken, T. M. Grogan, E. M. Mize, J. H. Glick, C. A. Coltman, Jr., and T. P. Miller. 1994. A phase III comparison of CHOP vs. m-BACOD vs. ProMACE-CytaBOM vs. MACOP-B in patients with intermediate- or high-grade non-Hodgkin's lymphoma: results of SWOG-8516 (Intergroup 0067), the National High-Priority Lymphoma Study. *Ann Oncol* 5 Suppl 2:91-95.
- Fleischer, A., A. Ghadiri, F. Dessauge, M. Duhamel, X. Cayla, A. Garcia, and A. Rebollo. 2004. Bad-dependent rafts alteration is a consequence of an early intracellular signal triggered by interleukin-4 deprivation. *Mol Cancer Res* 2 (12):674-684.
- Francke, U., B. de Martinville, L. Coussens, and A. Ullrich. 1983. The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1. *Science* 222 (4629):1248-1251.

- Frank, S., B. Gaume, E. S. Bergmann-Leitner, W. W. Leitner, E. G. Robert, F. Catez, C. L. Smith, and R. J. Youle. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1 (4):515-525.
- Franklin, R. A., C. Brodie, I. Melamed, N. Terada, J. J. Lucas, and E. W. Gelfand. 1995. Nerve growth factor induces activation of MAP-kinase and p90<sup>orsk</sup> in human B lymphocytes. *J Immunol* 154 (10):4965-4972.
- Friedberg, J. W. 2005. Unique toxicities and resistance mechanisms associated with monoclonal antibody therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:329-334.
- Friedman, W. J., N. Altiok, B. B. Fredholm, and H. Persson. 1992. Mechanisms of nerve growth factor mRNA regulation by interleukin-1 beta in hippocampal cultures: role of second messengers. *J Neurosci Res* 33 (1):37-46.
- Fueller, J., M. Becker, A. R. Sienerth, A. Fischer, C. Hotz, and A. Galmiche. 2008. C-RAF activation promotes BAD poly-ubiquitylation and turn-over by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 370 (4):552-556.
- Gallenne, T., F. Gautier, L. Oliver, E. Hervouet, B. Noel, J. A. Hickman, O. Geneste, P. F. Cartron, F. M. Vallette, S. Manon, and P. Juin. 2009. Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol* 185 (2):279-290.
- Garaci, E., M. C. Caroleo, L. Aloe, S. Aquaro, M. Piacentini, N. Costa, A. Amendola, A. Micera, R. Calio, C. F. Perno, and R. Levi-Montalcini. 1999. Nerve growth factor is an autocrine factor essential for the survival of macrophages infected with HIV. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (24):14013-14018.
- Garcia-Suarez, O., A. Germana, J. Hannestad, E. Ciriaco, I. Silos-Santiago, G. Germana, and J. A. Vega. 2001. Involvement of the NGF receptors (Trka and p75<sup>Ngfr</sup>) in the development and maintenance of the thymus. *Ital J Anat Embryol* 106 (2 Suppl 1):279-285.
- Garcia, A., X. Cayla, J. Guergnon, F. Dessauge, V. Hospital, M. P. Rebollo, A. Fleischer, and A. Rebollo. 2003. Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie* 85 (8):721-726.
- Gardai, S. J., D. A. Hildeman, S. K. Frankel, B. B. Whitlock, S. C. Frasch, N. Borregaard, P. Marrack, D. L. Bratton, and P. M. Henson. 2004. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem* 279 (20):21085-21095.
- Garrido, C., and G. Kroemer. 2004. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 16 (6):639-646.
- Gascoyne, R. D. 1997. Pathologic prognostic factors in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 11 (5):847-862.
- Gatter, K. M., A. Rader, and R. M. Brazier. 2002. Fine-needle aspiration biopsy of anaplastic large cell lymphoma, small cell variant with prominent plasmacytoid features: case report. *Diagn Cytopathol* 26 (2):113-116.
- Geetha, T., R. S. Kenchappa, M. W. Wooten, and B. D. Carter. 2005. TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J* 24 (22):3859-3868.
- Ghetie, M. A., H. Bright, and E. S. Vitetta. 2001. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood* 97 (5):1392-1398.
- Gibbs, B. F., D. Zillikens, and J. Grabbe. 2005. Nerve growth factor influences IgE-mediated human basophil activation: functional properties and intracellular mechanisms compared with IL-3. *Int Immunopharmacol* 5 (4):735-747.
- Gil, C., R. Cubi, and J. Aguilera. 2007. Shedding of the p75<sup>NTR</sup> neurotrophin receptor is modulated by lipid rafts. *FEBS Lett* 581 (9):1851-1858.
- Gisselbrecht, C. 2008. Use of rituximab in diffuse large B-cell lymphoma in the salvage setting. *Br J Haematol* 143 (5):607-621.
- Gordon, L. I., D. Harrington, J. Andersen, J. Colgan, J. Glick, R. Neiman, R. Mann, G. D. Resnick, M. Barcos, A. Gottlieb, and et al. 1992. Comparison of a second-generation combination chemotherapeutic regimen (m-BACOD) with a standard regimen (CHOP) for advanced diffuse non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 327 (19):1342-1349.

- Gordon, M. S., C. M. Kanegai, J. R. Doerr, and R. Wall. 2003. Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Igbeta, CD79b) and mb1 (Igalpha, CD79a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (7):4126-4131.
- Gotz, R., and M. Scharfl. 1994. The conservation of neurotrophic factors during vertebrate evolution. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol* 108 (1):1-10.
- Gougeon, M. L. 2003. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol* 3 (5):392-404.
- Gray, K., and V. Ellis. 2008. Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin. *FEBS Lett* 582 (6):907-910.
- Green, D. R., and J. E. Chipuk. 2008. Apoptosis: Stabbed in the BAX. *Nature* 455 (7216):1047-1049.
- Green, D. R., and G. Kroemer. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305 (5684):626-629.
- Grimes, M. L., J. Zhou, E. C. Beattie, E. C. Yuen, D. E. Hall, J. S. Valletta, K. S. Topp, J. H. LaVail, N. W. Bunnell, and W. C. Mobley. 1996. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* 16 (24):7950-7964.
- Grinberg, M., R. Sarig, Y. Zaltsman, D. Frumkin, N. Grammatikakis, E. Reuveny, and A. Gross. 2002. tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 277 (14):12237-12245.
- Guicciardi, M. E., and G. J. Gores. 2009. Life and death by death receptors. *FASEB J* 23 (6):1625-1637.
- Gurbuxani, S., J. Anastasi, and E. Hyjek. 2009. Diffuse large B-cell lymphoma--more than a diffuse collection of large B cells: an entity in search of a meaningful classification. *Arch Pathol Lab Med* 133 (7):1121-1134.
- Habermann, T. M., E. A. Weller, V. A. Morrison, R. D. Gascoyne, P. A. Cassileth, J. B. Cohn, S. R. Dakhil, B. Woda, R. I. Fisher, B. A. Peterson, and S. J. Horning. 2006. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 24 (19):3121-3127.
- Hagag, N., S. Halegoua, and M. Viola. 1986. Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. *Nature* 319 (6055):680-682.
- Haidar, J. H., A. Shamseddine, Z. Salem, Y. A. Mrad, M. R. Nasr, G. Zaatari, and A. Bazarbachi. 2003. Loss of CD20 expression in relapsed lymphomas after rituximab therapy. *Eur J Haematol* 70 (5):330-332.
- Hallbook, F., T. Ebendal, and H. Persson. 1988. Production and characterization of biologically active recombinant beta nerve growth factor. *Mol Cell Biol* 8 (1):452-456.
- Hamner, S., U. Arumae, Y. Li-Ying, Y. F. Sun, M. Saarma, and D. Lindholm. 2001. Functional characterization of two splice variants of rat bad and their interaction with Bcl-w in sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 17 (1):97-106.
- Hanahan, D., and J. Folkman. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86 (3):353-364.
- Hans, C. P., D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, R. D. Gascoyne, J. Delabie, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, E. Campo, R. M. Braziel, E. S. Jaffe, Z. Pan, P. Farinha, L. M. Smith, B. Falini, A. H. Banham, A. Rosenwald, L. M. Staudt, J. M. Connors, J. O. Armitage, and W. C. Chan. 2004. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103 (1):275-282.
- Harada, H., J. S. Andersen, M. Mann, N. Terada, and S. J. Korsmeyer. 2001. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (17):9666-9670.
- Harris, M. H., and C. B. Thompson. 2000. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 7 (12):1182-1191.
- Harris, N. L., and P. G. Isaacson. 1999. What are the criteria for distinguishing MALT from non-MALT lymphoma at extranodal sites? *Am J Clin Pathol* 111 (1 Suppl 1):S126-132.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, H. Stein, P. M. Banks, J. K. Chan, M. L. Cleary, G. Delsol, C. De Wolf-Peters, B. Falini, K. C. Gatter, and et al. 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84 (5):1361-1392.

- Hartmann, M., T. Brigadski, K. S. Erdmann, B. Holtmann, M. Sendtner, F. Narz, and V. Lessmann. 2004. Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci* 117 (Pt 24):5803-5814.
- Hashimoto, A., K. Hirose, and M. Iino. 2005. BAD detects coincidence of G2/M phase and growth factor deprivation to regulate apoptosis. *J Biol Chem* 280 (28):26225-26232.
- Hasselblom, S., U. Hansson, M. Olsson, L. Toren, A. Bergstrom, H. Nilsson-Ehle, and P. O. Andersson. High immunohistochemical expression of p-AKT predicts inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Br J Haematol* 149 (4):560-568.
- Hattori, A., S. Iwasaki, K. Murase, M. Tsujimoto, M. Sato, K. Hayashi, and M. Kohno. 1994. Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *FEBS Lett* 340 (3):177-180.
- Hattori, A., E. Tanaka, K. Murase, N. Ishida, Y. Chatani, M. Tsujimoto, K. Hayashi, and M. Kohno. 1993. Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J Biol Chem* 268 (4):2577-2582.
- Hayakawa, J., M. Ohmichi, H. Kurachi, Y. Kanda, K. Hisamoto, Y. Nishio, K. Adachi, K. Tasaka, T. Kanzaki, and Y. Murata. 2000. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res* 60 (21):5988-5994.
- He, X. L., and K. C. Garcia. 2004. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304 (5672):870-875.
- Heerssen, H. M., and R. A. Segal. 2002. Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci* 25 (3):160-165.
- Heese, K., N. Inoue, and T. Sawada. 2006. NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. *Cell Mol Immunol* 3 (1):63-66.
- Hekman, M., S. Albert, A. Galmiche, U. E. Rennefahrt, J. Fueller, A. Fischer, D. Puehringer, S. Wiese, and U. R. Rapp. 2006. Reversible membrane interaction of BAD requires two C-terminal lipid binding domains in conjunction with 14-3-3 protein binding. *J Biol Chem* 281 (25):17321-17336.
- Hempstead, B. L., D. Martin-Zanca, D. R. Kaplan, L. F. Parada, and M. V. Chao. 1991. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350 (6320):678-683.
- Henderson, C. J., E. Aleo, A. Fontanini, R. Maestro, G. Paroni, and C. Brancolini. 2005. Caspase activation and apoptosis in response to proteasome inhibitors. *Cell Death Differ* 12 (9):1240-1254.
- Hengartner, M. O., and H. R. Horvitz. 1994. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4 (4):581-586.
- Henkel, A. W., W. Sperling, A. Rotter, U. Reulbach, C. Reichardt, D. Bonsch, J. M. Maler, J. Kornhuber, and J. Wiltfang. 2008. Antidepressant drugs modulate growth factors in cultured cells. *BMC Pharmacol* 8:6.
- Hermans-Borgmeyer, I., G. Hermey, A. Nykjaer, and C. Schaller. 1999. Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain Res Mol Brain Res* 65 (2):216-219.
- Hermine, O., C. Haioun, E. Lepage, M. F. d'Agay, J. Briere, C. Lavignac, G. Fillet, G. Salles, J. P. Marolleau, J. Diebold, F. Reyas, and P. Gaulard. 1996. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 87 (1):265-272.
- Herold, R., A. von Stackelberg, R. Hartmann, B. Eisenreich, and G. Henze. 2004. Acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group (ALL-REZ BFM) experience: early treatment intensity makes the difference. *J Clin Oncol* 22 (3):569-570; author reply 570-561.
- Heumann, R., D. Lindholm, C. Bandtlow, M. Meyer, M. J. Radeke, T. P. Misko, E. Shooter, and H. Thoenen. 1987. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (23):8735-8739.

- Hiddemann, W., M. Kneba, M. Dreyling, N. Schmitz, E. Lengfelder, R. Schmits, M. Reiser, B. Metzner, H. Harder, S. Hegewisch-Becker, T. Fischer, M. Kropff, H. E. Reis, M. Freund, B. Wormann, R. Fuchs, M. Planker, J. Schimke, H. Eimermacher, L. Trumper, A. Aldaoud, R. Parwaresch, and M. Unterhalt. 2005. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 106 (12):3725-3732.
- Hill, M. E., K. A. MacLennan, D. C. Cunningham, B. Vaughan Hudson, M. Burke, P. Clarke, F. Di Stefano, L. Anderson, G. Vaughan Hudson, D. Mason, P. Selby, and D. C. Linch. 1996. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 88 (3):1046-1051.
- Hill, M. M., C. Adrain, P. J. Duriez, E. M. Creagh, and S. J. Martin. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* 23 (10):2134-2145.
- Hohn, A., J. Leibrock, K. Bailey, and Y. A. Barde. 1990. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344 (6264):339-341.
- Holgado-Madruga, M., D. K. Moscatello, D. R. Emler, R. Dieterich, and A. J. Wong. 1997. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (23):12419-12424.
- Horigome, K., J. C. Pryor, E. D. Bullock, and E. M. Johnson, Jr. 1993. Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. *J Biol Chem* 268 (20):14881-14887.
- Houldsworth, J., A. B. Olshen, G. Cattoretti, G. B. Donnelly, J. Teruya-Feldstein, J. Qin, N. Palanisamy, Y. Shen, K. Dyomina, M. Petlakh, Q. Pan, A. D. Zelenetz, R. Dalla-Favera, and R. S. Chaganti. 2004. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 103 (5):1862-1868.
- Howe, C. L., J. S. Valletta, A. S. Rusnak, and W. C. Mobley. 2001. NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32 (5):801-814.
- Hu, Y., C. Y. Sun, H. F. Wang, T. Guo, W. N. Wei, Y. D. Wang, W. J. He, T. Wu, H. Tan, and T. C. Wu. 2006. Brain-derived neurotrophic factor promotes growth and migration of multiple myeloma cells. *Cancer Genet Cytogenet* 169 (1):12-20.
- Hu, Y., Y. D. Wang, T. Guo, W. N. Wei, C. Y. Sun, L. Zhang, and J. Huang. 2007. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel angiogenic protein in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 178 (1):1-10.
- Huang, E. J., and L. F. Reichardt. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Huang, E. J., and L. F. Reichardt. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Huang, J. Z., W. G. Sanger, T. C. Greiner, L. M. Staudt, D. D. Weisenburger, D. L. Pickering, J. C. Lynch, J. O. Armitage, R. A. Warnke, A. A. Alizadeh, I. S. Lossos, R. Levy, and W. C. Chan. 2002. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 99 (7):2285-2290.
- Ibanez, C. F. 2002. Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci* 25 (6):284-286.
- Ichikawa, A., T. Kinoshita, T. Watanabe, H. Kato, H. Nagai, K. Tsushita, H. Saito, and T. Hotta. 1997. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 337 (8):529-534.
- Ip, N. Y., C. F. Ibanez, S. H. Nye, J. McClain, P. F. Jones, D. R. Gies, L. Belluscio, M. M. Le Beau, R. Espinosa, 3rd, S. P. Squinto, and et al. 1992. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (7):3060-3064.
- Iqbal, J., V. T. Neppalli, G. Wright, B. J. Dave, D. E. Horsman, A. Rosenwald, J. Lynch, C. P. Hans, D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, R. D. Gascoyne, E. Campo, G. Ott, H. K. Muller-

- Hermelink, J. Delabie, E. S. Jaffe, T. M. Grogan, J. M. Connors, J. M. Vose, J. O. Armitage, L. M. Staudt, and W. C. Chan. 2006. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 24 (6):961-968.
- Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388 (6638):190-195.
- Jaffe, E. S., N. L. Harris, H. Stein, and P. G. Isaacson. 2008. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 112 (12):4384-4399.
- Janas, E., R. Priest, J. I. Wilde, J. H. White, and R. Malhotra. 2005. Rituxan (anti-CD20 antibody)-induced translocation of CD20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis. *Clin Exp Immunol* 139 (3):439-446.
- Jansen, P., K. Giehl, J. R. Nyengaard, K. Teng, O. Lioubinski, S. S. Sjoegaard, T. Breiderhoff, M. Gotthardt, F. Lin, A. Eilers, C. M. Petersen, G. R. Lewin, B. L. Hempstead, T. E. Willnow, and A. Nykjaer. 2007. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci* 10 (11):1449-1457.
- Janssen, H. L., H. Higuchi, A. Abdulkarim, and G. J. Gores. 2003. Hepatitis B virus enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cytotoxicity by increasing TRAIL-R1/death receptor 4 expression. *J Hepatol* 39 (3):414-420.
- Jazirehi, A. R., and B. Bonavida. 2005. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene* 24 (13):2121-2143.
- Jazirehi, A. R., M. I. Vega, and B. Bonavida. 2007. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res* 67 (3):1270-1281.
- Jazirehi, A. R., M. I. Vega, D. Chatterjee, L. Goodglick, and B. Bonavida. 2004. Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res* 64 (19):7117-7126.
- Jin, S., Y. Zhuo, W. Guo, and J. Field. 2005. p21-activated Kinase 1 (Pak1)-dependent phosphorylation of Raf-1 regulates its mitochondrial localization, phosphorylation of BAD, and Bcl-2 association. *J Biol Chem* 280 (26):24698-24705.
- Jin, Z., and W. S. El-Deiry. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4 (2):139-163.
- Johnson, D., A. Lanahan, C. R. Buck, A. Sehgal, C. Morgan, E. Mercer, M. Bothwell, and M. Chao. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47 (4):545-554.
- Johnstone, R. W., A. A. Ruefli, and S. W. Lowe. 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108 (2):153-164.
- Jourdain, A., and J. C. Martinou. 2009. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (10):1884-1889.
- Joza, N., J. A. Pospisilik, E. Hangen, T. Hanada, N. Modjtahedi, J. M. Penninger, and G. Kroemer. 2009. AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann NY Acad Sci* 1171:2-11.
- Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, W. L. Stanford, S. K. Cho, C. Y. Li, T. Sasaki, A. J. Elia, H. Y. Cheng, L. Ravagnan, K. F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y. Y. Kong, T. W. Mak, J. C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer, and J. M. Penninger. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410 (6828):549-554.
- Jung, K. M., S. Tan, N. Landman, K. Petrova, S. Murray, R. Lewis, P. K. Kim, D. S. Kim, S. H. Ryu, M. V. Chao, and T. W. Kim. 2003. Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J Biol Chem* 278 (43):42161-42169.
- Kannan, Y., H. Matsuda, H. Ushio, K. Kawamoto, and Y. Shimada. 1993. Murine granulocyte-macrophage and mast cell colony formation promoted by nerve growth factor. *Int Arch Allergy Immunol* 102 (4):362-367.
- Kanning, K. C., M. Hudson, P. S. Amieux, J. C. Wiley, M. Bothwell, and L. C. Schecterson. 2003. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* 23 (13):5425-5436.

- Kao, S., R. K. Jaiswal, W. Kolch, and G. E. Landreth. 2001. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 276 (21):18169-18177.
- Kaplan, D. R., B. L. Hempstead, D. Martin-Zanca, M. V. Chao, and L. F. Parada. 1991a. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252 (5005):554-558.
- Kaplan, D. R., D. Martin-Zanca, and L. F. Parada. 1991b. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350 (6314):158-160.
- Kaplan, D. R., and F. D. Miller. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10 (3):381-391.
- Karin, M., and A. Lin. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3 (3):221-227.
- Kase, H., K. Iwahashi, S. Nakanishi, Y. Matsuda, K. Yamada, M. Takahashi, C. Murakata, A. Sato, and M. Kaneko. 1987. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 142 (2):436-440.
- Kaufman, R. J. 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110 (10):1389-1398.
- Kawamoto, K., T. Okada, Y. Kannan, H. Ushio, M. Matsumoto, and H. Matsuda. 1995. Nerve growth factor prevents apoptosis of rat peritoneal mast cells through the trk proto-oncogene receptor. *Blood* 86 (12):4638-4644.
- Kebache, S., J. Ash, M. G. Annis, J. Hagan, M. Huber, J. Hassard, C. L. Stewart, M. Whiteway, and A. Nantel. 2007. Grb10 and active Raf-1 kinase promote Bad-dependent cell survival. *J Biol Chem* 282 (30):21873-21883.
- Kehrl, J. H., A. Riva, G. L. Wilson, and C. Thevenin. 1994. Molecular mechanisms regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression. *Immunol Today* 15 (9):432-436.
- Kenchappa, R. S., N. Zampieri, M. V. Chao, P. A. Barker, H. K. Teng, B. L. Hempstead, and B. D. Carter. 2006. Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* 50 (2):219-232.
- Kendall, S. E., D. E. Goldhawk, C. Kubu, P. A. Barker, and J. M. Verdi. 2002. Expression analysis of a novel p75(NTR) signaling protein, which regulates cell cycle progression and apoptosis. *Mech Dev* 117 (1-2):187-200.
- Kerr, J. F. 1972. Shrinkage necrosis of adrenal cortical cells. *J Pathol* 107 (3):217-219.
- Kerschensteiner, M., E. Gallmeier, L. Behrens, V. V. Leal, T. Misgeld, W. E. Klinkert, R. Kolbeck, E. Hoppe, R. L. Oropeza-Wekerle, I. Bartke, C. Stadelmann, H. Lassmann, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 1999. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 189 (5):865-870.
- Kerschensteiner, M., E. Meinl, and R. Hohlfeld. 2009. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience* 158 (3):1122-1132.
- Khor, T. O., Y. A. Gul, H. Ithnin, and H. F. Seow. 2004. Positive correlation between overexpression of phospho-BAD with phosphorylated Akt at serine 473 but not threonine 308 in colorectal carcinoma. *Cancer Lett* 210 (2):139-150.
- Khursigara, G., J. Bertin, H. Yano, H. Moffett, P. S. DiStefano, and M. V. Chao. 2001. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* 21 (16):5854-5863.
- Khursigara, G., J. R. Orlinick, and M. V. Chao. 1999. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* 274 (5):2597-2600.
- Kim, M. R., E. G. Jeong, B. Chae, J. W. Lee, Y. H. Soung, S. W. Nam, J. Y. Lee, N. J. Yoo, and S. H. Lee. 2007. Pro-apoptotic PUMA and anti-apoptotic phospho-BAD are highly expressed in colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci* 52 (10):2751-2756.
- Kim, R., M. Emi, K. Tanabe, S. Murakami, Y. Uchida, and K. Arihiro. 2006. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* 208 (3):319-326.
- Kim, T., and B. L. Hempstead. 2009. NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death. *EMBO J* 28 (11):1612-1623.

- Kim, U. H., D. Fink, Jr., H. S. Kim, D. J. Park, M. L. Contreras, G. Guroff, and S. G. Rhee. 1991. Nerve growth factor stimulates phosphorylation of phospholipase C-gamma in PC12 cells. *J Biol Chem* 266 (3):1359-1362.
- Kimata, H. 2005. Brain-derived neurotrophic factor selectively enhances allergen-specific IgE production. *Neuropeptides* 39 (4):379-383.
- Kimata, H., A. Yoshida, C. Ishioka, T. Kusunoki, S. Hosoi, and H. Mikawa. 1991. Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production. *Eur J Immunol* 21 (1):137-141.
- Kitada, S., M. Krajewska, X. Zhang, D. Scudiero, J. M. Zapata, H. G. Wang, A. Shabaik, G. Tudor, S. Krajewski, T. G. Myers, G. S. Johnson, E. A. Sausville, and J. C. Reed. 1998. Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines. *Am J Pathol* 152 (1):51-61.
- Klein, R., S. Q. Jing, V. Nanduri, E. O'Rourke, and M. Barbacid. 1991a. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65 (1):189-197.
- Klein, R., V. Nanduri, S. A. Jing, F. Lamballe, P. Tapley, S. Bryant, C. Cordon-Cardo, K. R. Jones, L. F. Reichardt, and M. Barbacid. 1991b. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66 (2):395-403.
- Klein, R., L. F. Parada, F. Coulier, and M. Barbacid. 1989. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J* 8 (12):3701-3709.
- Klein, U., S. Casola, G. Cattoretti, Q. Shen, M. Lia, T. Mo, T. Ludwig, K. Rajewsky, and R. Dalla-Favera. 2006. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 7 (7):773-782.
- Klein, U., and R. Dalla-Favera. 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8 (1):22-33.
- Klein, U., Y. Tu, G. A. Stolovitzky, J. L. Keller, J. Haddad, Jr., V. Miljkovic, G. Cattoretti, A. Califano, and R. Dalla-Favera. 2003. Gene expression dynamics during germinal center transit in B cells. *Ann NY Acad Sci* 987:166-172.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green, and D. D. Newmeyer. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275 (5303):1132-1136.
- Klumpp, S., and J. Krieglstein. 2002. Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Curr Opin Pharmacol* 2 (4):458-462.
- Klumpp, S., A. Maurer, Y. Zhu, D. Aichele, L. A. Pinna, and J. Krieglstein. 2004. Protein kinase CK2 phosphorylates BAD at threonine-117. *Neurochem Int* 45 (5):747-752.
- Konishi, Y., M. Lehtinen, N. Donovan, and A. Bonni. 2002. Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol Cell* 9 (5):1005-1016.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh, and P. H. Schlesinger. 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7 (12):1166-1173.
- Koski, C. L., L. E. Ramm, C. H. Hammer, M. M. Mayer, and M. L. Shin. 1983. Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (12):3816-3820.
- Kozisek, M. E., D. Middlemas, and D. B. Bylund. 2008. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol Ther* 117 (1):30-51.
- Krajewski, S., S. Tanaka, S. Takayama, M. J. Schibler, W. Fenton, and J. C. Reed. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53 (19):4701-4714.
- Kramer, M. H., J. Hermans, E. Wijburg, K. Philippo, E. Geelen, J. H. van Krieken, D. de Jong, E. Maartense, E. Schuurung, and P. M. Kluin. 1998. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 92 (9):3152-3162.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16 (1):3-11.

- Kronfeld, I., G. Kazimirsky, E. W. Gelfand, and C. Brodie. 2002. NGF rescues human B lymphocytes from anti-IgM induced apoptosis by activation of PKCzeta. *Eur J Immunol* 32 (1):136-143.
- Krueger, A., S. Baumann, P. H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2001. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 21 (24):8247-8254.
- Kumar, S. 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14 (1):32-43.
- Kuppers, R. 2003. Somatic hypermutation and B cell receptor selection in normal and transformed human B cells. *Ann N Y Acad Sci* 987:173-179.
- Kuppers, R. 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5 (4):251-262.
- Kuppers, R., U. Klein, M. L. Hansmann, and K. Rajewsky. 1999. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341 (20):1520-1529.
- Kuruvilla, R., H. Ye, and D. D. Ginty. 2000. Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons. *Neuron* 27 (3):499-512.
- Kuruvilla, R., L. S. Zweifel, N. O. Glebova, B. E. Lonze, G. Valdez, H. Ye, and D. D. Ginty. 2004. A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* 118 (2):243-255.
- Kuwako, K., A. Hosokawa, I. Nishimura, T. Uetsuki, M. Yamada, S. Nada, M. Okada, and K. Yoshikawa. 2005. Disruption of the paternal necdin gene diminishes TrkA signaling for sensory neuron survival. *J Neurosci* 25 (30):7090-7099.
- Labi, V., M. Erlacher, S. Kiessling, and A. Villunger. 2006. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ* 13 (8):1325-1338.
- Labouyrie, E., P. Dubus, A. Groppi, F. X. Mahon, J. Ferrer, M. Parrens, J. Reiffers, A. de Mascarel, and J. P. Merlio. 1999. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol* 154 (2):405-415.
- Lagadec, C., S. Meignan, E. Adriaenssens, B. Foveau, E. Vanhecke, R. Romon, R. A. Toillon, B. Oxombre, H. Hondermarck, and X. Le Bourhis. 2009. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 28 (18):1960-1970.
- Lam, L. T., R. E. Davis, J. Pierce, M. Hepperle, Y. Xu, M. Hottelet, Y. Nong, D. Wen, J. Adams, L. Dang, and L. M. Staudt. 2005. Small molecule inhibitors of I $\kappa$ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 11 (1):28-40.
- Lamballe, F., R. Klein, and M. Barbacid. 1991. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66 (5):967-979.
- Lambiase, A., L. Bracci-Laudiero, S. Bonini, G. Starace, M. M. D'Elis, M. De Carli, and L. Aloe. 1997. Human CD4<sup>+</sup> T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol* 100 (3):408-414.
- Lambiase, A., A. Micera, R. Sgrulletta, and S. Bonini. 2004. Nerve growth factor and the immune system: old and new concepts in the cross-talk between immune and resident cells during pathophysiological conditions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4 (5):425-430.
- Lamkanfi, M., N. Festjens, W. Declercq, T. Vanden Berghe, and P. Vandennebeele. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14 (1):44-55.
- Laudiero, L. B., E. Vigneti, and L. Aloe. 1991. In vivo and in vitro effect of NGF on bursa of Fabricius cells during chick embryo development. *Int J Neurosci* 59 (1-3):189-198.
- Lavrik, I., A. Golks, and P. H. Krammer. 2005. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118 (Pt 2):265-267.
- Lee, J. W., Y. H. Soung, S. Y. Kim, S. W. Nam, C. J. Kim, Y. G. Cho, J. H. Lee, H. S. Kim, W. S. Park, S. H. Kim, J. Y. Lee, N. J. Yoo, and S. H. Lee. 2004. Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers. *Carcinogenesis* 25 (8):1371-1376.
- Lee, R., P. Kermani, K. K. Teng, and B. L. Hempstead. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294 (5548):1945-1948.
- Lenz, G., G. Wright, S. S. Dave, W. Xiao, J. Powell, H. Zhao, W. Xu, B. Tan, N. Goldschmidt, J. Iqbal, J. Vose, M. Bast, K. Fu, D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, J. O. Armitage, A. Kyle, L. May, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, G. Troen, H. Holte, S. Kvaloy, D. Dierickx, G. Verhoef, J. Delabie, E. B. Smeland, P. Jares, A. Martinez, A. Lopez-Guillermo, E. Montserrat, E. Campo, R. M. Braziel, T. P. Miller, L. M. Rimsza, J. R. Cook, B. Pohlman, J. Sweetenham, R. R. Tubbs, R. I. Fisher, E. Hartmann, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, D.

- Wrench, T. A. Lister, E. S. Jaffe, W. H. Wilson, W. C. Chan, and L. M. Staudt. 2008. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 359 (22):2313-2323.
- Leonard, J. P., P. Martin, J. Ruan, R. Elstrom, J. Barrientos, M. Coleman, and R. R. Furman. 2008. New monoclonal antibodies for non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 19 Suppl 4:iv60-62.
- Leroy, K., C. Haioun, E. Lepage, N. Le Metayer, F. Berger, E. Labouyrie, V. Meignin, B. Petit, C. Bastard, G. Salles, C. Gisselbrecht, F. Reyes, and P. Gaulard. 2002. p53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 13 (7):1108-1115.
- Lessmann, V., and T. Brigadski. 2009. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res* 65 (1):11-22.
- Lessmann, V., K. Gottmann, and M. Malsangio. 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 69 (5):341-374.
- Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler, and S. J. Korsmeyer. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2 (3):183-192.
- Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237 (4819):1154-1162.
- Levi-Montalcini, R., R. Dal Toso, F. della Valle, S. D. Skaper, and A. Leon. 1995. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci* 130 (2):119-127.
- Levi-Montalcini, R., and V. Hamburger. 1951. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 116 (2):321-361.
- Levi-Montalcini, R., S. D. Skaper, R. Dal Toso, L. Petrelli, and A. Leon. 1996. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci* 19 (11):514-520.
- Levine, B., S. Sinha, and G. Kroemer. 2008. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 4 (5):600-606.
- Levitt, M., J. C. Marsh, R. C. DeConti, M. S. Mitchell, R. T. Skeel, L. R. Farber, and J. R. Bertino. 1972. Combination sequential chemotherapy in advanced reticulum cell sarcoma. *Cancer* 29 (3):630-636.
- Lewin, G. R., and Y. A. Barde. 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19:289-317.
- Li, H., L. L. Zhao, J. W. Funder, and J. P. Liu. 1997a. Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 272 (27):16729-16732.
- Li, L. Y., X. Luo, and X. Wang. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412 (6842):95-99.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang. 1997b. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 (4):479-489.
- Lin, M. I., I. Das, G. M. Schwartz, P. Tsoulfas, T. Mikawa, and B. L. Hempstead. 2000. Trk C receptor signaling regulates cardiac myocyte proliferation during early heart development in vivo. *Dev Biol* 226 (2):180-191.
- Linseman, D. A., B. D. Butts, T. A. Precht, R. A. Phelps, S. S. Le, T. A. Laessig, R. J. Bouchard, M. L. Florez-McClure, and K. A. Heidenreich. 2004. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci* 24 (44):9993-10002.
- Lisak, R. P., J. A. Benjamins, B. Bealmear, L. Nedelkoska, B. Yao, S. Land, and D. Studzinski. 2007. Differential effects of Th1, monocyte/macrophage and Th2 cytokine mixtures on early gene expression for glial and neural-related molecules in central nervous system mixed glial cell cultures: neurotrophins, growth factors and structural proteins. *J Neuroinflammation* 4:30.
- Lomonosova, E., and G. Chinnadurai. 2008. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27 Suppl 1:S2-19.
- Lossos, I. S. 2005. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 23 (26):6351-6357.
- Lossos, I. S., C. D. Jones, R. Warnke, Y. Natkunam, H. Kaizer, J. L. Zehnder, R. Tibshirani, and R. Levy. 2001. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 98 (4):945-951.

- Lossos, I. S., and R. Levy. 2000. Mutation analysis of the 5' noncoding regulatory region of the BCL-6 gene in non-Hodgkin lymphoma: evidence for recurrent mutations and intraclonal heterogeneity. *Blood* 95 (4):1400-1405.
- Lowe, S. W., and A. W. Lin. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21 (3):485-495.
- Lu, X., H. Nechushtan, F. Ding, M. F. Rosado, R. Singal, A. A. Alizadeh, and I. S. Lossos. 2005. Distinct IL-4-induced gene expression, proliferation, and intracellular signaling in germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large-cell lymphomas. *Blood* 105 (7):2924-2932.
- Macdonald, A., D. G. Campbell, R. Toth, H. McLauchlan, C. J. Hastie, and J. S. Arthur. 2006. Pim kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-XL. *BMC Cell Biol* 7:1.
- MacDonald, J. I., E. A. Gryz, C. J. Kubu, J. M. Verdi, and S. O. Meakin. 2000. Direct binding of the signaling adapter protein Grb2 to the activation loop tyrosines on the nerve growth factor receptor tyrosine kinase, TrkA. *J Biol Chem* 275 (24):18225-18233.
- Mahadeo, D., L. Kaplan, M. V. Chao, and B. L. Hempstead. 1994. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* 269 (9):6884-6891.
- Maisonpierre, P. C., L. Belluscio, S. Squinto, N. Y. Ip, M. E. Furth, R. M. Lindsay, and G. D. Yancopoulos. 1990. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247 (4949 Pt 1):1446-1451.
- Malissein, E., M. Verdier, M. H. Ratinaud, and D. Troutaud. 2003. Changes in bad phosphorylation are correlated with BCR-induced apoptosis of WEHI-231 immature B cells. *Biochimie* 85 (8):733-740.
- Malissein, E., M. Verdier, M. H. Ratinaud, and D. Troutaud. 2006. Activation of Bad trafficking is involved in the BCR-mediated apoptosis of immature B cells. *Apoptosis* 11 (6):1003-1012.
- Maloney, D. G., T. M. Liles, D. K. Czerwinski, C. Waldichuk, J. Rosenberg, A. Grillo-Lopez, and R. Levy. 1994. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 84 (8):2457-2466.
- Mamidipudi, V., and M. W. Wooten. 2002. Dual role for p75(NTR) signaling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation? *J Neurosci Res* 68 (4):373-384.
- Manshouri, T., K. A. Do, X. Wang, F. J. Giles, S. M. O'Brien, H. Saffer, D. Thomas, I. Jilani, H. M. Kantarjian, M. J. Keating, and M. Albitar. 2003. Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood* 101 (7):2507-2513.
- Marchetti, D., R. Aucoin, J. Blust, B. Murry, and A. Greiter-Wilke. 2004. p75 neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J Cell Biochem* 91 (1):206-215.
- Marchetti, P., S. A. Susin, D. Decaudin, S. Gamen, M. Castedo, T. Hirsch, N. Zamzami, J. Naval, A. Senik, and G. Kroemer. 1996. Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA. *Cancer Res* 56 (9):2033-2038.
- Marcus, R., K. Imrie, A. Belch, D. Cunningham, E. Flores, J. Catalano, P. Solal-Celigny, F. Offner, J. Walewski, J. Raposo, A. Jack, and P. Smith. 2005. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 105 (4):1417-1423.
- Margalit, O., H. Amram, N. Amariglio, A. J. Simon, S. Shaklai, G. Granot, N. Minsky, A. Shimoni, A. Harmelin, D. Givol, M. Shohat, M. Oren, and G. Rechavi. 2006. BCL6 is regulated by p53 through a response element frequently disrupted in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107 (4):1599-1607.
- Markus, A., J. Zhong, and W. D. Snider. 2002. Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* 35 (1):65-76.
- Martin-Zanca, D., G. Mitra, L. K. Long, and M. Barbacid. 1986. Molecular characterization of the human trk oncogene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 2:983-992.
- Martinez-Valdez, H., C. Guret, O. de Bouteiller, I. Fugier, J. Banchereau, and Y. J. Liu. 1996. Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *J Exp Med* 183 (3):971-977.

- Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, S. A. Susin, G. Beutner, D. Brdiczka, R. Remy, Z. H. Xie, J. C. Reed, and G. Kroemer. 1998. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187 (8):1261-1271.
- Mathas, S., A. Rickers, K. Bommert, B. Dorken, and M. Y. Mapara. 2000. Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer Res* 60 (24):7170-7176.
- Matsuda, H., M. D. Coughlin, J. Bienenstock, and J. A. Denburg. 1988. Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (17):6508-6512.
- Matucci-Cerinic, M., R. Giacomelli, A. Pignone, M. L. Cagnoni, S. Generini, R. Casale, P. Cipriani, A. Del Rosso, P. Tirassa, Y. T. Kontinen, B. M. Kahaleh, P. S. Fan, M. Paoletti, C. Marchesi, M. Cagnoni, and L. Aloe. 2001. Nerve growth factor and neuropeptides circulating levels in systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Rheum Dis* 60 (5):487-494.
- Maurer, U., C. Charvet, A. S. Wagman, E. Dejardin, and D. R. Green. 2006. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 21 (6):749-760.
- May, W. S., P. G. Tyler, T. Ito, D. K. Armstrong, K. A. Qatsha, and N. E. Davidson. 1994. Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 269 (43):26865-26870.
- Mazella, J. 2001. Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 13 (1):1-6.
- McCauslin, C. S., V. Heath, A. M. Colangelo, R. Malik, S. Lee, A. Mallei, I. Mochetti, and P. F. Johnson. 2006. CAAT/enhancer-binding protein delta and cAMP-response element-binding protein mediate inducible expression of the nerve growth factor gene in the central nervous system. *J Biol Chem* 281 (26):17681-17688.
- McDonnell, T. J., N. Deane, F. M. Platt, G. Nunez, U. Jaeger, J. P. McKearn, and S. J. Korsmeyer. 1989. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57 (1):79-88.
- McGregor, L. M., B. K. McCune, J. R. Graff, P. R. McDowell, K. E. Romans, G. D. Yancopoulos, D. W. Ball, S. B. Baylin, and B. D. Nelkin. 1999. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (8):4540-4545.
- Melamed, I., C. A. Kelleher, R. A. Franklin, C. Brodie, B. Hempstead, D. Kaplan, and E. W. Gelfand. 1996. Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocytes is mediated by gp140trk. *Eur J Immunol* 26 (9):1985-1992.
- Melamed, I., H. Patel, C. Brodie, and E. W. Gelfand. 1999. Activation of Vav and Ras through the nerve growth factor and B cell receptors by different kinases. *Cell Immunol* 191 (2):83-89.
- Melamed, I., C. E. Turner, K. Aktories, D. R. Kaplan, and E. W. Gelfand. 1995. Nerve growth factor triggers microfilament assembly and paxillin phosphorylation in human B lymphocytes. *J Exp Med* 181 (3):1071-1079.
- Merino, D., M. Giam, P. D. Hughes, O. M. Siggs, K. Heger, L. A. O'Reilly, J. M. Adams, A. Strasser, E. F. Lee, W. D. Fairlie, and P. Bouillet. 2009. The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J Cell Biol* 186 (3):355-362.
- Merino, R., L. Ding, D. J. Veis, S. J. Korsmeyer, and G. Nunez. 1994. Developmental regulation of the Bcl-2 protein and susceptibility to cell death in B lymphocytes. *EMBO J* 13 (3):683-691.
- Metzstein, M. M., G. M. Stanfield, and H. R. Horvitz. 1998. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* 14 (10):410-416.
- Mi, S., X. Lee, Z. Shao, G. Thill, B. Ji, J. Relton, M. Levesque, N. Allaire, S. Perrin, B. Sands, T. Crowell, R. L. Cate, J. M. McCoy, and R. B. Pepinsky. 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 7 (3):221-228.
- Micera, A., A. Lambiase, B. Stampachiachiere, S. Bonini, and F. Levi-Schaffer. 2007. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate. *Cytokine Growth Factor Rev* 18 (3-4):245-256.
- Minichiello, L. 2009. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* 10 (12):850-860.

- Mok, C. L., G. Gil-Gomez, O. Williams, M. Coles, S. Taga, M. Tolaini, T. Norton, D. Kioussis, and H. J. Brady. 1999. Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. *J Exp Med* 189 (3):575-586.
- Monni, O., H. Joensuu, K. Franssila, J. Klefstrom, K. Alitalo, and S. Knuutila. 1997. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 90 (3):1168-1174.
- Monti, S., K. J. Savage, J. L. Kutok, F. Feuerhake, P. Kurtin, M. Mihm, B. Wu, L. Pasqualucci, D. Neuberg, R. C. Aguiar, P. Dal Cin, C. Ladd, G. S. Pinkus, G. Salles, N. L. Harris, R. Dalla-Favera, T. M. Habermann, J. C. Aster, T. R. Golub, and M. A. Shipp. 2005. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 105 (5):1851-1861.
- Mounier, N., J. Briere, C. Gisselbrecht, J. F. Emile, P. Lederlin, C. Sebban, F. Berger, A. Bosly, P. Morel, H. Tilly, R. Bouabdallah, F. Reyes, P. Gaulard, and B. Coiffier. 2003. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 101 (11):4279-4284.
- Mukai, J., T. Hachiya, S. Shoji-Hoshino, M. T. Kimura, D. Nadano, P. Suvanto, T. Hanaoka, Y. Li, S. Irie, L. A. Greene, and T. A. Sato. 2000. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* 275 (23):17566-17570.
- Muris, J. J., S. A. Cillessen, W. Vos, I. S. van Houdt, J. A. Kummer, J. H. van Krieken, N. M. Jiwa, P. M. Jansen, H. C. Kluin-Nelemans, G. J. Ossenkoppele, C. Gundy, C. J. Meijer, and J. J. Oudejans. 2005. Immunohistochemical profiling of caspase signaling pathways predicts clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 105 (7):2916-2923.
- Muris, J. J., C. J. Meijer, W. Vos, J. H. van Krieken, N. M. Jiwa, G. J. Ossenkoppele, and J. J. Oudejans. 2006. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol* 208 (5):714-723.
- Murray, S. S., P. Perez, R. Lee, B. L. Hempstead, and M. V. Chao. 2004. A novel p75 neurotrophin receptor-related protein, NRH2, regulates nerve growth factor binding to the TrkA receptor. *J Neurosci* 24 (11):2742-2749.
- Muschen, M., K. Rajewsky, M. Kronke, and R. Kuppers. 2002. The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. *Trends Immunol* 23 (2):75-80.
- Nakahashi, T., H. Fujimura, C. A. Altar, J. Li, J. Kambayashi, N. N. Tandon, and B. Sun. 2000. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 470 (2):113-117.
- National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. 1982. *Cancer* 49 (10):2112-2135.
- Ness, J. M., C. A. Harvey, A. Strasser, P. Bouillet, B. J. Klocke, and K. A. Roth. 2006. Selective involvement of BH3-only Bcl-2 family members Bim and Bad in neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res* 1099 (1):150-159.
- Nielsen, M. S., P. Madsen, E. I. Christensen, A. Nykjaer, J. Gliemann, D. Kasper, R. Pohlmann, and C. M. Petersen. 2001. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J* 20 (9):2180-2190.
- Niuro, H., and E. A. Clark. 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2 (12):945-956.
- Novikova, L. N., L. N. Novikov, and J. O. Kellerth. 2002. Differential effects of neurotrophins on neuronal survival and axonal regeneration after spinal cord injury in adult rats. *J Comp Neurol* 452 (3):255-263.
- Nyborg, A. C., T. B. Ladd, C. W. Zwizinski, J. J. Lah, and T. E. Golde. 2006. Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Mol Neurodegener* 1:3.
- Nykjaer, A., R. Lee, K. K. Teng, P. Jansen, P. Madsen, M. S. Nielsen, C. Jacobsen, M. Kliemannel, E. Schwarz, T. E. Willnow, B. L. Hempstead, and C. M. Petersen. 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427 (6977):843-848.

- Nykjaer, A., T. E. Willnow, and C. M. Petersen. 2005. p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 15 (1):49-57.
- Okada, H., and T. W. Mak. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4 (8):592-603.
- Oltersdorf, T., S. W. Elmore, A. R. Shoemaker, R. C. Armstrong, D. J. Augeri, B. A. Belli, M. Bruncko, T. L. Deckwerth, J. Dinges, P. J. Hajduk, M. K. Joseph, S. Kitada, S. J. Korsmeyer, A. R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M. J. Mitten, D. G. Nettesheim, S. Ng, P. M. Nimmer, J. M. O'Connor, A. Oleksijew, A. M. Petros, J. C. Reed, W. Shen, S. K. Tahir, C. B. Thompson, K. J. Tomaselli, B. Wang, M. D. Wendt, H. Zhang, S. W. Fesik, and S. H. Rosenberg. 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435 (7042):677-681.
- Opferman, J. T., and S. J. Korsmeyer. 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 4 (5):410-415.
- Otten, U., P. Ehrhard, and R. Peck. 1989. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (24):10059-10063.
- Ottensmeier, C. H., A. R. Thompsett, D. Zhu, B. S. Wilkins, J. W. Sweetenham, and F. K. Stevenson. 1998. Analysis of VH genes in follicular and diffuse lymphoma shows ongoing somatic mutation and multiple isotype transcripts in early disease with changes during disease progression. *Blood* 91 (11):4292-4299.
- Ottlie, S., J. L. Diaz, W. Horne, J. Chang, Y. Wang, G. Wilson, S. Chang, S. Weeks, L. C. Fritz, and T. Oltersdorf. 1997. Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins. *J Biol Chem* 272 (49):30866-30872.
- Ozoren, N., and W. S. El-Deiry. 2002. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* 4 (6):551-557.
- Paiardini, A., and V. Caputo. 2008. Insights into the interaction of sortilin with proneurotrophins: a computational approach. *Neuropeptides* 42 (2):205-214.
- Palmada, M., S. Kanwal, N. J. Rutkoski, C. Gustafson-Brown, R. S. Johnson, R. Wisdom, and B. D. Carter. 2002. c-jun is essential for sympathetic neuronal death induced by NGF withdrawal but not by p75 activation. *J Cell Biol* 158 (3):453-461.
- Pasqualucci, L., A. Migliazza, N. Fracchiolla, C. William, A. Neri, L. Baldini, R. S. Chaganti, U. Klein, R. Kuppers, K. Rajewsky, and R. Dalla-Favera. 1998. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (20):11816-11821.
- Pasqualucci, L., P. Neumeister, T. Goossens, G. Nanjangud, R. S. Chaganti, R. Kuppers, and R. Dalla-Favera. 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412 (6844):341-346.
- Pastorino, J. G., M. Tafani, R. J. Rothman, A. Marcinkeviciute, J. B. Hoek, and J. L. Farber. 1999. Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 274 (44):31734-31739.
- Pearse, R. N., S. L. Swendeman, Y. Li, D. Rafii, and B. L. Hempstead. 2005. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* 105 (11):4429-4436.
- Pedersen, I. M., A. M. Buhl, P. Klausen, C. H. Geisler, and J. Jurlander. 2002. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood* 99 (4):1314-1319.
- Peter, M. E., and P. H. Krammer. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10 (1):26-35.
- Petros, A. M., D. G. Nettesheim, Y. Wang, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, J. Mack, K. Swift, E. D. Matayoshi, H. Zhang, C. B. Thompson, and S. W. Fesik. 2000. Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci* 9 (12):2528-2534.
- Petros, A. M., E. T. Olejniczak, and S. W. Fesik. 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1644 (2-3):83-94.
- Pfreundschuh, M., L. Trumper, A. Osterborg, R. Pettengell, M. Trneny, K. Imrie, D. Ma, D. Gill, J. Walewski, P. L. Zinzani, R. Stahel, S. Kvaloy, O. Shpilberg, U. Jaeger, M. Hansen, T.

- Lehtinen, A. Lopez-Guillermo, C. Corrado, A. Scheliga, N. Milpied, M. Mendila, M. Rashford, E. Kuhnt, and M. Loeffler. 2006. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 7 (5):379-391.
- Pica, F., A. Volpi, A. Serafino, M. Frascchetti, O. Franzese, and E. Garaci. 2000. Autocrine nerve growth factor is essential for cell survival and viral maturation in HHV-8-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* 95 (9):2905-2912.
- Pinton, P., and R. Rizzuto. 2006. Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ* 13 (8):1409-1418.
- Platt, N., R. P. da Silva, and S. Gordon. 1998. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 8 (9):365-372.
- Polzien, L., A. Baljuls, U. E. Rennefahrt, A. Fischer, W. Schmitz, R. P. Zahedi, A. Sickmann, R. Metz, S. Albert, R. Benz, M. Hekman, and U. R. Rapp. 2009. Identification of novel in vivo phosphorylation sites of the human proapoptotic protein BAD: pore-forming activity of BAD is regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* 284 (41):28004-28020.
- Polzien, L., R. Benz, and U. R. Rapp. Can BAD pores be good? New insights from examining BAD as a target of RAF kinases. *Adv Enzyme Regul* 50 (1):147-159.
- Porter, A. G., and A. G. Urbano. 2006. Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays* 28 (8):834-843.
- Powis, G., N. Ihle, and D. L. Kirkpatrick. 2006. Practicalities of drugging the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt cell survival signaling pathway. *Clin Cancer Res* 12 (10):2964-2966.
- Provenzano, M. J., N. Xu, M. R. Ver Meer, J. J. Clark, and M. R. Hansen. 2008. p75NTR and sortilin increase after facial nerve injury. *Laryngoscope* 118 (1):87-93.
- Qian, X., A. Riccio, Y. Zhang, and D. D. Ginty. 1998. Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron* 21 (5):1017-1029.
- Qiu, M. S., and S. H. Green. 1991. NGF and EGF rapidly activate p21ras in PC12 cells by distinct, convergent pathways involving tyrosine phosphorylation. *Neuron* 7 (6):937-946.
- Ranger, A. M., J. Zha, H. Harada, S. R. Datta, N. N. Danial, A. P. Gilmore, J. L. Kutok, M. M. Le Beau, M. E. Greenberg, and S. J. Korsmeyer. 2003. Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (16):9324-9329.
- Rapp, U. R., A. Fischer, U. E. Rennefahrt, M. Hekman, and S. Albert. 2007. BAD association with membranes is regulated by Raf kinases and association with 14-3-3 proteins. *Adv Enzyme Regul* 47:281-285.
- Ray, R. M., S. Bhattacharya, and L. R. Johnson. 2005. Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 280 (35):31091-31100.
- Reff, M. E., K. Carner, K. S. Chambers, P. C. Chinn, J. E. Leonard, R. Raab, R. A. Newman, N. Hanna, and D. R. Anderson. 1994. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83 (2):435-445.
- Reichardt, L. F. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361 (1473):1545-1564.
- Reimold, A. M., N. N. Iwakoshi, J. Manis, P. Vallabhajosyula, E. Szomolanyi-Tsuda, E. M. Gravallese, D. Friend, M. J. Grusby, F. Alt, and L. H. Glimcher. 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412 (6844):300-307.
- Renne, C., M. L. Hansmann, and A. Brauninger. 2009. [Receptor tyrosine kinases in Hodgkin lymphoma as possible therapeutic targets]. *Pathologe* 30 (5):393-400.
- Renne, C., S. Minner, R. Kuppers, M. L. Hansmann, and A. Brauninger. 2008. Autocrine NGFbeta/TRKA signalling is an important survival factor for Hodgkin lymphoma derived cell lines. *Leuk Res* 32 (1):163-167.
- Reuther, G. W., Q. T. Lambert, M. A. Caligiuri, and C. J. Der. 2000. Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 20 (23):8655-8666.
- Reynolds, A. J., S. E. Bartlett, and I. A. Hendry. 2000. Molecular mechanisms regulating the retrograde axonal transport of neurotrophins. *Brain Res Brain Res Rev* 33 (2-3):169-178.

- Ricci, A., L. Felici, S. Mariotta, F. Mannino, G. Schmid, C. Terzano, G. Cardillo, F. Amenta, and E. Bronzetti. 2004. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30 (1):12-19.
- Ricci, A., S. Greco, S. Mariotta, L. Felici, E. Bronzetti, A. Cavazzana, G. Cardillo, F. Amenta, A. Bisetti, and G. Barbolini. 2001. Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25 (4):439-446.
- Rihl, M., E. Kruithof, C. Barthel, F. De Keyser, E. M. Veys, H. Zeidler, D. T. Yu, J. G. Kuipers, and D. Baeten. 2005. Involvement of neurotrophins and their receptors in spondyloarthritis synovitis: relation to inflammation and response to treatment. *Ann Rheum Dis* 64 (11):1542-1549.
- Riikonen, R. S., S. Soderstrom, L. T. Korhonen, and D. B. Lindholm. 1998. Overstimulation of nerve growth factors in postinfectious and autoimmune diseases. *Pediatr Neurol* 18 (3):231-235.
- Robinet Pauline. 2010. Thèse: La mitogalagine, protéine de la mort cellulaire programmée: Localisation nucléaire, conséquences de modifications post-traductionnelles potentielles et interaction fonctionnelle avec Mcl-1.
- Rose, C. R., R. Blum, B. Pichler, A. Lepier, K. W. Kafitz, and A. Konnerth. 2003. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426 (6962):74-78.
- Rosenwald, A., G. Wright, W. C. Chan, J. M. Connors, E. Campo, R. I. Fisher, R. D. Gascoyne, H. K. Muller-Hermelink, E. B. Smeland, J. M. Giltman, E. M. Hurt, H. Zhao, L. Averett, L. Yang, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, R. Simon, R. D. Klausner, J. Powell, P. L. Duffey, D. L. Longo, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, W. G. Sanger, B. J. Dave, J. C. Lynch, J. Vose, J. O. Armitage, E. Montserrat, A. Lopez-Guillermo, T. M. Grogan, T. P. Miller, M. LeBlanc, G. Ott, S. Kvaloy, J. Delabie, H. Holte, P. Krajci, T. Stokke, and L. M. Staudt. 2002. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346 (25):1937-1947.
- Rosini, P., G. De Chiara, P. Bonini, M. Lucibello, M. E. Marcocci, E. Garaci, F. Cozzolino, and M. Torcia. 2004. Nerve growth factor-dependent survival of CESS B cell line is mediated by increased expression and decreased degradation of MAPK phosphatase 1. *J Biol Chem* 279 (14):14016-14023.
- Rosini, P., G. De Chiara, M. Lucibello, E. Garaci, F. Cozzolino, and M. Torcia. 2000. NGF withdrawal induces apoptosis in CESS B cell line through p38 MAPK activation and Bcl-2 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 278 (3):753-759.
- Ross, G. M., I. L. Shamovsky, G. Lawrance, M. Solc, S. M. Dostaler, D. F. Weaver, and R. J. Riopelle. 1998. Reciprocal modulation of TrkA and p75NTR affinity states is mediated by direct receptor interactions. *Eur J Neurosci* 10 (3):890-898.
- Rotonda, J., D. W. Nicholson, K. M. Fazil, M. Gallant, Y. Gareau, M. Labelle, E. P. Peterson, D. M. Rasper, R. Ruel, J. P. Vaillancourt, N. A. Thornberry, and J. W. Becker. 1996. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3 (7):619-625.
- Roux, P. P., and P. A. Barker. 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67 (3):203-233.
- Roux, P. P., M. A. Colicos, P. A. Barker, and T. E. Kennedy. 1999. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J Neurosci* 19 (16):6887-6896.
- Rudner, J., A. Lepple-Wienhues, W. Budach, J. Berschauer, B. Friedrich, S. Wesselborg, K. Schulze-Osthoff, and C. Belka. 2001. Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. *J Cell Sci* 114 (Pt 23):4161-4172.
- Ruvolo, P. P., X. Deng, and W. S. May. 2001. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* 15 (4):515-522.
- Salama-Cohen, P., M. A. Arevalo, J. Meier, R. Grantyn, and A. Rodriguez-Tebar. 2005. NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75NTR and modulating the cellular targets of Notch. *Mol Biol Cell* 16 (1):339-347.
- Salehi, A., J. D. Delcroix, and W. C. Mobley. 2003. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci* 26 (2):73-80.
- Samuels, Y., and V. E. Velculescu. 2004. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* 3 (10):1221-1224.

- Santambrogio, L., M. Benedetti, M. V. Chao, R. Muzaffar, K. Kulig, N. Gabellini, and G. Hochwald. 1994. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol* 153 (10):4488-4495.
- Sattler, M., H. Liang, D. Nettesheim, R. P. Meadows, J. E. Harlan, M. Eberstadt, H. S. Yoon, S. B. Shuker, B. S. Chang, A. J. Minn, C. B. Thompson, and S. W. Fesik. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275 (5302):983-986.
- Savill, J. 2000. Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney Blood Press Res* 23 (3-5):173-174.
- Saxena, S., C. L. Howe, J. M. Cosgaya, M. Hu, J. Weis, and A. Kruttgen. 2004. Differences in the surface binding and endocytosis of neurotrophins by p75NTR. *Mol Cell Neurosci* 26 (2):292-307.
- Scheid, M. P., K. M. Schubert, and V. Duronio. 1999. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem* 274 (43):31108-31113.
- Schenone, A., J. S. Gill, D. A. Zacharias, and A. J. Windebank. 1996. Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes. *J Neuroimmunol* 64 (2):141-149.
- Schinder, A. F., B. Berninger, and M. Poo. 2000. Postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation. *Neuron* 25 (1):151-163.
- Schinzel, A., T. Kaufmann, and C. Borner. 2004. Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim Biophys Acta* 1644 (2-3):95-105.
- Schmitt, C. A., and S. W. Lowe. 2001. Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary E(mu)-myc lymphomas in vivo. *Blood Cells Mol Dis* 27 (1):206-216.
- Schmitz, R., R. K. Thomas, A. C. Harttrampf, C. Wickenhauser, J. L. Schultze, M. L. Hansmann, J. Wolf, and R. Kuppers. 2006. The major subtypes of human B-cell lymphomas lack mutations in BCL-2 family member BAD. *Int J Cancer* 119 (7):1738-1740.
- Schuhmann, B., A. Dietrich, S. Sel, C. Hahn, M. Klingenspor, M. Lommatzsch, T. Gudermann, A. Braun, H. Renz, and W. A. Nockher. 2005. A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol* 163 (1-2):15-23.
- Schurmann, A., A. F. Mooney, L. C. Sanders, M. A. Sells, H. G. Wang, J. C. Reed, and G. M. Bokoch. 2000. p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol* 20 (2):453-461.
- Scorrano, L., S. A. Oakes, J. T. Opferman, E. H. Cheng, M. D. Sorcinelli, T. Pozzan, and S. J. Korsmeyer. 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* 300 (5616):135-139.
- Segal, R. A. 2003. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci* 26:299-330.
- Sehn, L. H., B. Berry, M. Chhanabhai, C. Fitzgerald, K. Gill, P. Hoskins, R. Klasa, K. J. Savage, T. Shenkier, J. Sutherland, R. D. Gascoyne, and J. M. Connors. 2007. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 109 (5):1857-1861.
- Seidah, N. G., S. Benjannet, S. Pareek, D. Savaria, J. Hamelin, B. Goulet, J. Laliberte, C. Lazure, M. Chretien, and R. A. Murphy. 1996. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* 314 ( Pt 3):951-960.
- Semac, I., C. Palomba, K. Kulangara, N. Klages, G. van Echten-Deckert, B. Borisch, and D. C. Hoessli. 2003. Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells. *Cancer Res* 63 (2):534-540.
- She, Q. B., D. B. Solit, Q. Ye, K. E. O'Reilly, J. Lobo, and N. Rosen. 2005. The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell* 8 (4):287-297.
- Shieh, P. B., S. C. Hu, K. Bobb, T. Timmusk, and A. Ghosh. 1998. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20 (4):727-740.
- Shipp, M. 1992. Prognostic factors in non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Oncol* 4 (5):856-862.
- Skaper, S. D., M. Pollock, and L. Facci. 2001. Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins. *Brain Res Mol Brain Res* 97 (2):177-185.

- Smith, P. G., F. Wang, K. N. Wilkinson, K. J. Savage, U. Klein, D. S. Neubergh, G. Bollag, M. A. Shipp, and R. C. Aguiar. 2005. The phosphodiesterase PDE4B limits cAMP-associated PI3K/AKT-dependent apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 105 (1):308-316.
- Sniderhan, L. F., T. M. Garcia-Bates, M. Burgart, S. H. Bernstein, R. P. Phipps, and S. B. Maggirwar. 2009. Neurotrophin signaling through tropomyosin receptor kinases contributes to survival and proliferation of non-Hodgkin lymphoma. *Exp Hematol* 37 (11):1295-1309.
- Stanglmaier, M., M. Faltin, P. Ruf, A. Bodenhausen, P. Schroder, and H. Lindhofer. 2008. Bi20 (fBTA05), a novel trifunctional bispecific antibody (anti-CD20 x anti-CD3), mediates efficient killing of B-cell lymphoma cells even with very low CD20 expression levels. *Int J Cancer* 123 (5):1181-1189.
- Stein, R., Z. Qu, S. Chen, A. Rosario, V. Shi, M. Hayes, I. D. Horak, H. J. Hansen, and D. M. Goldenberg. 2004. Characterization of a new humanized anti-CD20 monoclonal antibody, IMMU-106, and Its use in combination with the humanized anti-CD22 antibody, epratuzumab, for the therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 10 (8):2868-2878.
- Stel, A. J., B. Ten Cate, S. Jacobs, J. W. Kok, D. C. Spierings, M. Dondorff, W. Helfrich, H. C. Kluin-Nelemans, L. F. de Leij, S. Withoff, and B. J. Kroesen. 2007. Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis. *J Immunol* 178 (4):2287-2295.
- Stephens, R. M., D. M. Loeb, T. D. Copeland, T. Pawson, L. A. Greene, and D. R. Kaplan. 1994. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 12 (3):691-705.
- Stevenson, F., S. Sahota, D. Zhu, C. Ottensmeier, C. Chapman, D. Oscier, and T. Hamblin. 1998. Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev* 162:247-259.
- Stevenson, F. K., S. S. Sahota, C. H. Ottensmeier, D. Zhu, F. Forconi, and T. J. Hamblin. 2001. The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. *Adv Cancer Res* 83:81-116.
- Strasser, A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5 (3):189-200.
- Strasser, A., A. W. Harris, M. L. Bath, and S. Cory. 1990. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348 (6299):331-333.
- Straus, S. E., E. S. Jaffe, J. M. Puck, J. K. Dale, K. B. Elkon, A. Rosen-Wolff, A. M. Peters, M. C. Sneller, C. W. Hallahan, J. Wang, R. E. Fischer, C. M. Jackson, A. Y. Lin, C. Baumler, E. Siegert, A. Marx, A. K. Vaishnav, T. Grodzicky, T. A. Fleisher, and M. J. Lenardo. 2001. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98 (1):194-200.
- Strohmaier, C., B. D. Carter, R. Urfer, Y. A. Barde, and G. Dechant. 1996. A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 15 (13):3332-3337.
- Susin, S. A., E. Dugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, M. C. Prevost, G. Brothers, T. W. Mak, J. Penninger, W. C. Earnshaw, and G. Kroemer. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192 (4):571-580.
- Suzuki, E., K. Umezawa, and B. Bonavida. 2007. Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene* 26 (42):6184-6193.
- Swerdlow, A. J., M. J. Schoemaker, C. D. Higgins, A. F. Wright, and P. A. Jacobs. 2008. Cancer risk in patients with constitutional chromosome deletions: a nationwide British cohort study. *Br J Cancer* 98 (12):1929-1933.
- Tabuchi, A., H. Sakaya, T. Kisukeda, H. Fushiki, and M. Tsuda. 2002. Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *J Biol Chem* 277 (39):35920-35931.
- Tacconelli, A., A. R. Farina, L. Cappabianca, G. Desantis, A. Tessitore, A. Vetuschi, R. Sferri, N. Rucci, B. Argenti, I. Screpanti, A. Gulino, and A. R. Mackay. 2004. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 6 (4):347-360.

- Tait, S. W., and D. R. Green. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (9):621-632.
- Tan, Y., M. R. Demeter, H. Ruan, and M. J. Comb. 2000. BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival. *J Biol Chem* 275 (33):25865-25869.
- Tan, Y., H. Ruan, M. R. Demeter, and M. J. Comb. 1999. p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 274 (49):34859-34867.
- Tao, X., A. E. West, W. G. Chen, G. Corfas, and M. E. Greenberg. 2002. A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron* 33 (3):383-395.
- Taub, D. D. 2008. Novel connections between the neuroendocrine and immune systems: the ghrelin immunoregulatory network. *Vitam Horm* 77:325-346.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen, and S. J. Martin. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (3):231-241.
- Tcherpakov, M., F. C. Bronfman, S. G. Conticello, A. Vaskovsky, Z. Levy, M. Niinobe, K. Yoshikawa, E. Arenas, and M. Fainzilber. 2002. The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. *J Biol Chem* 277 (51):49101-49104.
- Tedder, T. F., and S. F. Schlossman. 1988. Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes. *J Biol Chem* 263 (20):10009-10015.
- Teng, H. K., K. K. Teng, R. Lee, S. Wright, S. Tevar, R. D. Almeida, P. Kermani, R. Torkin, Z. Y. Chen, F. S. Lee, R. T. Kraemer, A. Nykjaer, and B. L. Hempstead. 2005. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25 (22):5455-5463.
- Tervonen, T. A., F. Ajamian, J. De Wit, J. Verhaagen, E. Castren, and M. Castren. 2006. Overexpression of a truncated TrkB isoform increases the proliferation of neural progenitors. *Eur J Neurosci* 24 (5):1277-1285.
- Tessarollo, L. 1998. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev* 9 (2):125-137.
- Thoenen, H., C. Bandtlow, and R. Heumann. 1987. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 109:145-178.
- Thompson, S. J., L. T. Loftus, M. D. Ashley, and R. Meller. 2008. Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate. *Curr Opin Pharmacol* 8 (1):90-95.
- Thorpe, L. W., and J. R. Perez-Polo. 1987. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J Neurosci Res* 18 (1):134-139.
- Timmusk, T., U. Lendahl, H. Funakoshi, E. Arenas, H. Persson, and M. Metsis. 1995. Identification of brain-derived neurotrophic factor promoter regions mediating tissue-specific, axotomy-, and neuronal activity-induced expression in transgenic mice. *J Cell Biol* 128 (1-2):185-199.
- Timmusk, T., K. Palm, M. Metsis, T. Reintam, V. Paalme, M. Saarma, and H. Persson. 1993. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10 (3):475-489.
- Toma, J. G., D. Rogers, D. L. Senger, R. B. Campenot, and F. D. Miller. 1997. Spatial regulation of neuronal gene expression in response to nerve growth factor. *Dev Biol* 184 (1):1-9.
- Torcia, M., L. Bracci-Laudiero, M. Lucibello, L. Nencioni, D. Labardi, A. Rubartelli, F. Cozzolino, L. Aloe, and E. Garaci. 1996a. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85 (3):345-356.
- Torcia, M., G. De Chiara, L. Nencioni, S. Ammendola, D. Labardi, M. Lucibello, P. Rosini, L. N. Marlier, P. Bonini, P. Dello Sbarba, A. T. Palamara, N. Zambrano, T. Russo, E. Garaci, and F. Cozzolino. 2001. Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release. *J Biol Chem* 276 (42):39027-39036.
- Torcia, M., M. Lucibello, E. Vannier, S. Fabiani, A. Milianni, G. Guidi, O. Spada, S. K. Dower, J. E. Sims, A. R. Shaw, C. A. Dinarello, E. Garaci, and F. Cozzolino. 1996b. Modulation of osteoclast-activating factor activity of multiple myeloma bone marrow cells by different interleukin-1 inhibitors. *Exp Hematol* 24 (8):868-874.
- Troppmair, J., J. T. Bruder, H. App, H. Cai, L. Liptak, J. Szeberenyi, G. M. Cooper, and U. R. Rapp. 1992. Ras controls coupling of growth factor receptors and protein kinase C in the membrane to Raf-1 and B-Raf protein serine kinases in the cytosol. *Oncogene* 7 (9):1867-1873.

- Troutaud, D., B. Petit, C. Bellanger, B. Marin, M. P. Gourin-Chaury, D. Petit, A. Olivrie, J. Feuillard, M. O. Jauberteau, and D. Bordessoule. Prognostic significance of BAD and AIF apoptotic pathways in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 10 (2):118-124.
- Truzzi, F., A. Marconi, R. Lotti, K. Dallaglio, L. E. French, B. L. Hempstead, and C. Pincelli. 2008. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 128 (8):2031-2040.
- Uddin, S., A. Hussain, M. Ahmed, A. Belgaumi, F. Al-Dayel, D. Ajarim, P. Bavi, and K. S. Al-Kuraya. 2008. S-phase kinase protein 2 is an attractive therapeutic target in a subset of diffuse large B-cell lymphoma. *J Pathol* 216 (4):483-494.
- Uddin, S., A. R. Hussain, A. K. Siraj, P. S. Manogaran, N. A. Al-Jomah, A. Moorji, V. Atizado, F. Al-Dayel, A. Belgaumi, H. El-Solh, A. Ezzat, P. Bavi, and K. S. Al-Kuraya. 2006. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* 108 (13):4178-4186.
- Ullrich, A., A. Gray, C. Berman, and T. J. Dull. 1983. Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* 303 (5920):821-825.
- Ultsch, M. H., C. Wiesmann, L. C. Simmons, J. Henrich, M. Yang, D. Reilly, S. H. Bass, and A. M. de Vos. 1999. Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol* 290 (1):149-159.
- Underwood, C. K., and E. J. Coulson. 2008. The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 40 (9):1664-1668.
- Urbano, A., U. Lakshmanan, P. H. Choo, J. C. Kwan, P. Y. Ng, K. Guo, S. Dhakshinamoorthy, and A. Porter. 2005. AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. *EMBO J* 24 (15):2815-2826.
- van der Kolk, L. E., L. M. Evers, C. Omene, S. M. Lens, S. Lederman, R. A. van Lier, M. H. van Oers, and E. Eldering. 2002. CD20-induced B cell death can bypass mitochondria and caspase activation. *Leukemia* 16 (9):1735-1744.
- Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, D. V. Krysko, N. Festjens, and P. Vandenabeele. 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med* 8 (3):207-220.
- Vaux, D. L., S. Cory, and J. M. Adams. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335 (6189):440-442.
- Vega, J. A., O. Garcia-Suarez, J. Hannestad, M. Perez-Perez, and A. Germana. 2003. Neurotrophins and the immune system. *J Anat* 203 (1):1-19.
- Verdier, M., E. Malissein, E. Munteanu, C. Jayat-Vignoles, M. H. Ratinaud, and D. Troutaud. 2006. Aged mice exhibit distinct peripheral B-cell phenotypes differing in apoptotic susceptibility: an ex vivo analysis. *Cytometry A* 69 (9):999-1009.
- Vetter, M. L., D. Martin-Zanca, L. F. Parada, J. M. Bishop, and D. R. Kaplan. 1991. Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (13):5650-5654.
- Virdee, K., P. A. Parone, and A. M. Tolkovsky. 2000. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155, a novel site, contributes to cell survival. *Curr Biol* 10 (23):R883.
- Vogel, K. S., M. El-Afandi, and L. F. Parada. 2000. Neurofibromin negatively regulates neurotrophin signaling through p21ras in embryonic sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 15 (4):398-407.
- Volosin, M., W. Song, R. D. Almeida, D. R. Kaplan, B. L. Hempstead, and W. J. Friedman. 2006. Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci* 26 (29):7756-7766.
- Wang, H. G., N. Pathan, I. M. Ethell, S. Krajewski, Y. Yamaguchi, F. Shibasaki, F. McKeon, T. Bobo, T. F. Franke, and J. C. Reed. 1999. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284 (5412):339-343.
- Wang, H. G., U. R. Rapp, and J. C. Reed. 1996. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 87 (4):629-638.
- Wang, X., J. H. Bauer, Y. Li, Z. Shao, F. S. Zetoune, E. Cattaneo, and C. Vincenz. 2001. Characterization of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem* 276 (36):33812-33820.

- Watson, F. L., H. M. Heerssen, A. Bhattacharyya, L. Klesse, M. Z. Lin, and R. A. Segal. 2001. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* 4 (10):981-988.
- Watson, F. L., H. M. Heerssen, D. B. Moheban, M. Z. Lin, C. M. Sauvageot, A. Bhattacharyya, S. L. Pomeroy, and R. A. Segal. 1999. Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J Neurosci* 19 (18):7889-7900.
- Weeraratna, A. T., J. T. Arnold, D. J. George, A. DeMarzo, and J. T. Isaacs. 2000. Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer. *Prostate* 45 (2):140-148.
- Wehrman, T., X. He, B. Raab, A. Dukipatti, H. Blau, and K. C. Garcia. 2007. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* 53 (1):25-38.
- Wei, Y., N. Wang, Q. Lu, N. Zhang, D. Zheng, and J. Li. 2007. Enhanced protein expressions of sortilin and p75NTR in retina of rat following elevated intraocular pressure-induced retinal ischemia. *Neurosci Lett* 429 (2-3):169-174.
- Weskamp, G., J. Schlondorff, L. Lum, J. D. Becherer, T. W. Kim, P. Saftig, D. Hartmann, G. Murphy, and C. P. Blobel. 2004. Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J Biol Chem* 279 (6):4241-4249.
- White, E. 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 10 (1):1-15.
- Wiesmann, C., M. H. Ultsch, S. H. Bass, and A. M. de Vos. 1999. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 401 (6749):184-188.
- Willis, S. N., J. I. Fletcher, T. Kaufmann, M. F. van Delft, L. Chen, P. E. Czabotar, H. Ierino, E. F. Lee, W. D. Fairlie, P. Bouillet, A. Strasser, R. M. Kluck, J. M. Adams, and D. C. Huang. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315 (5813):856-859.
- Willnow, T. E., C. M. Petersen, and A. Nykjaer. 2008. VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci* 9 (12):899-909.
- Wilson, K. P., J. A. Black, J. A. Thomson, E. E. Kim, J. P. Griffith, M. A. Navia, M. A. Murcko, S. P. Chambers, R. A. Aldape, S. A. Raybuck, and et al. 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370 (6487):270-275.
- Wilson, K. S., L. H. Sehn, B. Berry, M. Chhanabhai, C. A. Fitzgerald, K. K. Gill, R. Klasa, B. Skinnider, J. Sutherland, J. M. Connors, and R. D. Gascoyne. 2007. CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of BCL-2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 48 (6):1102-1109.
- Wobser, M., H. Voigt, A. O. Eggert, R. Houben, C. S. Kauczok, E. B. Brocker, and J. C. Becker. 2007. Bcl-2 expression in rituximab refractory cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Cancer* 96 (10):1540-1543.
- Wooten, M. W., M. L. Seibenhener, V. Mamidipudi, M. T. Diaz-Meco, P. A. Barker, and J. Moscat. 2001. The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J Biol Chem* 276 (11):7709-7712.
- Wright, G., B. Tan, A. Rosenwald, E. H. Hurt, A. Wiestner, and L. M. Staudt. 2003. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (17):9991-9996.
- Wu, C., C. F. Lai, and W. C. Mobley. 2001. Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J Neurosci* 21 (15):5406-5416.
- Wyllie, A. H., R. G. Morris, A. L. Smith, and D. Dunlop. 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142 (1):67-77.
- Xerri, L., E. Devilard, R. Bouabdallah, J. Hassoun, L. Chaperot, F. Birg, and J. Plumas. 1999. Quantitative analysis detects ubiquitous expression of apoptotic regulators in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 13 (10):1548-1553.
- Xing, J., D. D. Ginty, and M. E. Greenberg. 1996. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273 (5277):959-963.
- Xu, Y., K. W. Harder, N. D. Huntington, M. L. Hibbs, and D. M. Tarlinton. 2005. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 22 (1):9-18.

- Yamamoto, M., G. Sobue, K. Yamamoto, S. Terao, and T. Mitsuma. 1996. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res* 21 (8):929-938.
- Yamashita, T., and M. Tohyama. 2003. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6 (5):461-467.
- Yamashita, T., K. L. Tucker, and Y. A. Barde. 1999. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24 (3):585-593.
- Yan, B., M. Zemskova, S. Holder, V. Chin, A. Kraft, P. J. Koskinen, and M. Lilly. 2003. The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *J Biol Chem* 278 (46):45358-45367.
- Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L. H. Boise, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80 (2):285-291.
- Yarski, M. A., B. D. Bax, R. A. Hogue-Angeletti, and R. A. Bradshaw. 2000. Nerve growth factor alpha subunit: effect of site-directed mutations on catalytic activity and 7S NGF complex formation. *Biochim Biophys Acta* 1477 (1-2):253-266.
- Ye, B. H., F. Lista, F. Lo Coco, D. M. Knowles, K. Offit, R. S. Chaganti, and R. Dalla-Favera. 1993. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262 (5134):747-750.
- Ye, X., P. Mehlen, S. Rabizadeh, T. VanArsdale, H. Zhang, H. Shin, J. J. Wang, E. Leo, J. Zapata, C. A. Hauser, J. C. Reed, and D. E. Bredesen. 1999. TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* 274 (42):30202-30208.
- Yeiser, E. C., N. J. Rutkoski, A. Naito, J. Inoue, and B. D. Carter. 2004. Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in *traf6*<sup>-/-</sup> mice. *J Neurosci* 24 (46):10521-10529.
- Yin, X. M., Z. N. Oltvai, and S. J. Korsmeyer. 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369 (6478):321-323.
- Yoon, S. O., P. Casaccia-Bonnel, B. Carter, and M. V. Chao. 1998. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 18 (9):3273-3281.
- York, R. D., D. C. Molliver, S. S. Grewal, P. E. Stenberg, E. W. McCleskey, and P. J. Stork. 2000. Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* 20 (21):8069-8083.
- York, R. D., H. Yao, T. Dillon, C. L. Ellig, S. P. Eckert, E. W. McCleskey, and P. J. Stork. 1998. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392 (6676):622-626.
- Youle, R. J., and A. Strasser. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (1):47-59.
- Yu, C., Y. Minemoto, J. Zhang, J. Liu, F. Tang, T. N. Bui, J. Xiang, and A. Lin. 2004. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 13 (3):329-340.
- Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis, and H. R. Horvitz. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75 (4):641-652.
- Zabel, B. U., R. L. Eddy, P. A. Lalley, J. Scott, G. I. Bell, and T. B. Shows. 1985. Chromosomal locations of the human and mouse genes for precursors of epidermal growth factor and the beta subunit of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (2):469-473.
- Zamzami, N., and G. Kroemer. 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (1):67-71.
- Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, T. Hirsch, S. A. Susin, B. Mace, and G. Kroemer. 1996. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 384 (1):53-57.

- Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel, and S. J. Korsmeyer. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87 (4):619-628.
- Zhang, K., E. A. Clark, and A. Saxon. 1991. CD40 stimulation provides an IFN-gamma-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. *J Immunol* 146 (6):1836-1842.
- Zhang, Y., D. B. Moheban, B. R. Conway, A. Bhattacharyya, and R. A. Segal. 2000. Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* 20 (15):5671-5678.
- Zheng, W. H., S. Kar, and R. Quirion. 2002. FKHL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem* 80 (6):1049-1061.
- Zhivotovsky, B., and S. Orrenius. 2003. Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. *Semin Cancer Biol* 13 (2):125-134.
- Zhou, X., W. Hu, and X. Qin. 2008. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *Oncologist* 13 (9):954-966.
- Zhou, X. M., Y. Liu, G. Payne, R. J. Lutz, and T. Chittenden. 2000. Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on Ser155. *J Biol Chem* 275 (32):25046-25051.
- Zhu, Z., H. Friess, F. F. diMola, A. Zimmermann, H. U. Graber, M. Korc, and M. W. Buchler. 1999. Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 17 (8):2419-2428.
- Ziegenhorn, A. A., O. Schulte-Herbruggen, H. Danker-Hopfe, M. Malbranc, H. D. Hartung, D. Anders, U. E. Lang, E. Steinhagen-Thiessen, R. T. Schaub, and R. Hellweg. 2007. Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging* 28 (9):1436-1445.
- Zimmermann, K. C., and D. R. Green. 2001. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 108 (4 Suppl):S99-103.
- Zinkel, S., A. Gross, and E. Yang. 2006. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 13 (8):1351-1359.
- Zong, W. X., C. Li, G. Hatzivassiliou, T. Lindsten, Q. C. Yu, J. Yuan, and C. B. Thompson. 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 162 (1):59-69.
- Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, and X. Wang. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90 (3):405-413.
- Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang. 1999. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274 (17):11549-11556.
- Zweifel, L. S., R. Kuruvilla, and D. D. Ginty. 2005. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* 6 (8):615-625.

# **ANNEXES**

---



## **ANNEXES**

---

### **2ème Congrès Européen d'Immunologie**

**BERLIN 13-16 Septembre 2009**

**Title:** A role for neurotrophins in DLBCL: implications in cell survival pathways and sensitivity of B-cell lymphoma to apoptosis.

**Author(s):** C. Bellanger<sup>1</sup>, M.-C. Lise<sup>1</sup>, A.-L. Fauchais<sup>1</sup>, M.-O. Jauberteau<sup>1</sup>, D. Troutaud<sup>1</sup>

**Institute(s):** <sup>1</sup> EA3842, Université de Limoges, Faculté de Médecine, LIMOGES, France

**Text:**

The neuronal growth factors, neurotrophins, and their receptors are widely expressed in a variety of non-neuronal tissues including the immune system. Several reports indicate that survival and activation of normal B lymphocytes are regulated by nerve growth factor (Hiddemann et al.) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) autocrine circuits. However, the production and the role of neurotrophins were not evaluated in B lymphoma cells. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a common and often fatal malignancy. Despite major advance in the treatment (R-CHOP protocol) which improves the clinical outcome of patients, a subset of patients does not respond or relapses after the initial treatment; the exact mechanism of such resistance is not entirely clear. We hypothesized that autocrine neurotrophin survival circuits could contribute to the chemoresistance of DLBCL tumor cells. This hypothesis was investigated with DLBCL cell lines (SU-DHL). Thus, we evaluated the ability of SU-DHL cells to produce neurotrophins (NGF, BDNF) and to express their receptors (p75, TrkA and TrkB) in different cell culture conditions. Our preliminary data show for the first time the production of neurotrophins by DLBCL tumoral cells whose level decreased in apoptotic conditions, in association with Bad dephosphorylation suggesting its pro-apoptotic role. Furthermore our results suggest that up-regulation of autocrine circuits (expression of TrkA known to be involved in survival signaling pathways) may contribute to cell survival and thus drug resistances of tumoral B cells.

**Preferred Presentation Type:** Poster Presentation

## A role for neurotrophins in DLBCL: Implications in cell survival pathways and sensitivity of B-cell lymphoma to apoptosis ?

Cynthia BELLANGER, Marie-Claude LISE, Anne-Laure FAUCHAIS, Catherine OUK\*, Marie-Odile JAUBERTEAU and Danielle TROUDAUD

EA 3842 Faculté de Médecine, Université de Limoges, \* Plateforme de Cytométrie en Flux- IFR 145 GEIST, Université de Limoges

**Introduction:** Neurotrophins (NT) among with NGF and BDNF are a family of structurally and functionally related growth factors that control neuron survival and axon growth during nervous system development and repair (1). Furthermore, they are widely expressed in a variety of non neuronal tissues including the immune system (2). Binding of neurotrophins to their common low-affinity receptor (p75<sup>NTR</sup>) signals apoptosis whereas binding to the high-affinity tyrosine kinase receptors TrkA (NGF), TrkB (BDNF) triggers survival (3). Truncated receptors lacking the kinase domain have been described for TrkB but not for TrkA (4). Neurotrophins are synthesized as proneurotrophins and are enzymatically cleaved to yield mature proteins. Both mature neurotrophins and proneurotrophins are secreted as homodimers and are biologically active, with opposite effects on cell proliferation and apoptosis that reflect differing receptor affinities: proneurotrophins display greater affinities for p75<sup>NTR</sup>. Recently the apoptotic effects of proneurotrophins mediated by binding to p75<sup>NTR</sup> has been associated to the presence of a co-receptor, Sortilin (5, 6, 7). Previous studies in our laboratory showed for the first time that in mature B cell lines, an autocrine BDNF production is up-regulated by stress culture conditions and exerts a modulation of apoptosis through the sortilin pathway (8). Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a common and often fatal non-Hodgkin's lymphomas. Although the cause of most DLBCL remains unknown, apoptosis dysregulations are often associated (9). We hypothesized that autocrine neurotrophin survival circuits could contribute to the survival of DLBCL tumor cells. This hypothesis was investigated with human DLBCL cell lines (SU-DHL) (10).

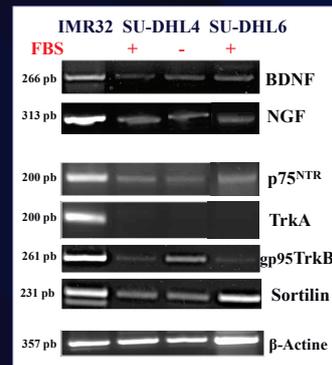
**Design and Methods:** We analyzed the expression of NT (NGF, BDNF) and their related receptors (TrkA, TrkB, p75<sup>NTR</sup> and Sortilin) in DLBCL cell lines (SU-DHL4: IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>-</sup> and SU-DHL6: IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>-</sup>) by RT-PCR from total RNA (as described in 8), flow cytometry and/or western blotting after 0-72h basal culture condition (10% FBS) or serum deprivation (0% FBS). The neuroblastoma cell line IMR32 was used as a positive control. Moreover, cell culture supernatants were concentrated to analyze by immunoprecipitation (IP) and western blotting NT released by cells. Cell viability was determined by trypan blue exclusion. Cell-cycle and apoptosis (DNA fragmentation, sub-G1 peak) were evaluated by flow cytometry after propidium iodide staining. The flow cytometric analysis was performed on a FACS Vantage SE DIVA.

### Results:

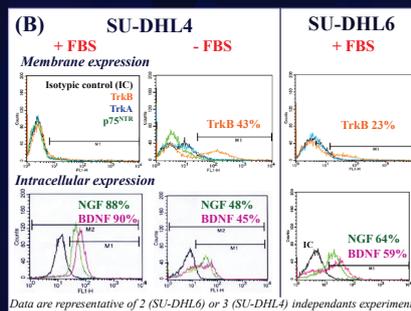
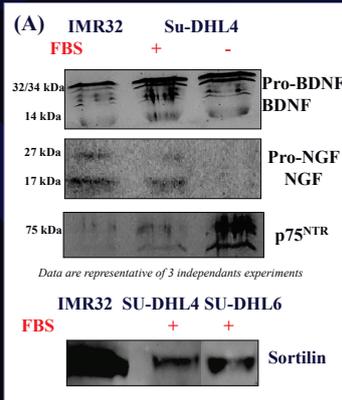
**Expression of neurotrophins and their receptors in human DLBCL cell lines.** Evidence for BDNF and to a lesser extent NGF expression was obtained with both DLBCL cell lines in basal (10% FBS) culture condition at the transcripts level (Fig.1) which was confirmed at the protein level for immature and mature forms of NT (Fig2A, B). Moreover analysis by flow cytometry after cell permeabilization revealed a differential expression between the 2 studied cell lines, the SU-DHL6 cells were less positive for NGF and BDNF expression (65 ± 2 % and 69 ± 13 of positive cells, respectively) than SU-DHL4 (83 ± 7 % and 86 ± 4 of positive cells, respectively) (Fig2 B). Interestingly, preliminary results showed that BDNF (Fig3) was also released in culture supernatants of both cell lines. Furthermore, this NT expression was associated with the identification by WB of the low-affinity common receptor p75<sup>NTR</sup>, and strikingly of its co-receptor sortilin (Fig2A). TrkB transcripts (truncated receptor, gp95Trk) were also detectable in both cell lines, but we could not detect in SU-DHL4 membranous TrkB nor TrkA protein expression in basal culture conditions. However, we found intracellular TrkB expression in SU-DHL4 cells (~ 80% of positive cells, data not shown) and preliminary results suggest that some SU-DHL6 cells express membranous TrkB protein (Fig.2B).

**Modulation of neurotrophin production is induced by serum deprivation** Because NT have been shown to influence B cell survival in lymphocyte development, we investigated NT and their receptors expression in SU-DHL4 cells under apoptotic condition (serum deprivation). After 72h of serum deprivation, we obtained only ~21% of viable cells, as compared ~200% in the FBS culture control. In survival cells of deprived cultures, results showed a reduced intracellular expression of NGF and BDNF at the protein level (Fig2 and Fig3) with a decreased number of positive cells. These regulations were associated with the apoptotic response (27% of sub-G1 cells in deprived condition, as compared to 4% in the FBS control, Fig4) and with an increase of p75<sup>NTR</sup> expression in cell lysates that we need to confirm (Fig.2A, B). Interestingly, enhanced expression of TrkB protein on cell surface was detected in this stress condition, that was also found at the transcript level (Fig.1).

**Fig.1: RT-PCR detection of neurotrophin and their receptor transcripts**



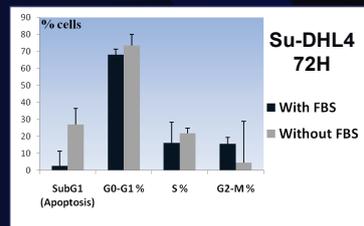
**Fig. 2: Analysis of protein expression by Western Blotting (A) and Flow cytometry (B)**



**Fig3 : Secretion of BDNF in cell supernatants**



**Fig 4: Cell cycle analysis**



**Conclusion:** Our study shows for the first time the spontaneously production of neurotrophins, NGF and BDNF, in human DLBCL B cell lines that seems to be down-regulated under stress condition (serum deprivation). Cellular expression of NT is reduced in the SU-DHL6 cell line, known to be more sensitive to chemocytotoxicity and apoptotic conditions as compared to SU-DHL4 (11). Furthermore, these tumoral B cells express the low (p75<sup>NTR</sup>) and the high (TrkB) BDNF receptors as well as the co-receptor sortilin. These receptors are likely, in the majority, stored in an intracellular pool in standard (10% FBS) cultures, with a membranous relocation following serum deprivation. Collectively, our preliminary data suggest a potential autocrine and/or paracrine role for NT (NGF, BDNF) in the survival of DLBCL cells. Eventhough proteolytic cleavage (p75<sup>NTR</sup>) and truncated isoforms (TrkB) of the receptors were detected, further investigations are necessary to elucidate their biological action and implication in the pathogeny of DLBCL.

### References

- Bibel M, Barde YA (2000). *Genes Dev*, 14: 2919–2937.
- Edling A E, Nanavati T, Johanson J M, Tuohy V K (2004). *J Neurosci Res*, 77: 709–717.
- Arévalo J C, Wu S H (2006). *Cell Mol Life Sci*, 63: 1523–1537.
- Klein R, Conway D, Panda L, Barbacci M (1990). *Cell*, 61: 647–656.
- Lee R, Kemman P, Teng K, Hempstead B (2001). *Science*, 294: 1945–1948.
- Teng H, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida R D et al. (2005). *J Neurosci*, 25: 5455–5463.
- Nykjaer A, Lee R, Teng K K, Jansen P, Madsen P et al. (2004). *Nature*, 427: 843–848.
- Eruchian AL, Lalloué F, Liso ME, Boumédiane A, Piret-Thomme JL, et al. (2008). *J Immunol*, 181: 3027–3038.
- Abramson J S, Shipp M A (2005). *Blood*, 106: 1164–1174.
- Smith P G, Wang F, Wilkinson K N, Savage K J, Klein U et al. (2005). *Blood*, 105: 308–316.
- DeNardo G L, Tobin E, Chan K, Bradt B M, DeNardo S J (2005). *Clin Cancer Res*, 11: 7075–7079.

This work and Cynthia BELLANGER were supported by Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité Départemental de La Haute-Vienne) and CORC (Comité d'Orientation de la Recherche Cancer en Limousin).

**ECDO : European Cell Death Differentiation Organization**

**PARIS Septembre 2009**

**ABSTRACT**

**Prognostic significance of Bad and AIF apoptotic pathways in diffuse large B-cell lymphoma.**

Cynthia BELLANGER, Danielle TROUTAUD, Barbara PETIT, Benoît MARIN, Marie-Pierre GOURIN-CHAURY, Daniel PETIT, Agnès OLIVRIE, Jean FEUILLARD, Marie-Odile JAUBERTEAU, and Dominique BORDESSOULE.

**Background:** To determine whether proapoptotic proteins were associated with the clinicopathological heterogeneity and influenced survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) we evaluated patterns of expression of the Bcl-2 family member Bad, PP1 $\alpha$  (the catalytic sub-unit of PP1 involved in activation of Bad) and Apoptosis-inducing factor (AIF).

**Patients and Methods:** We retrospectively analyzed 46 patients all treated with standard chemotherapy (CHOP-like); of these, 16 received rituximab. Immunohistochemical analyses were performed from biopsy samples of nodal DLBCL which were performed at initial diagnosis. Normal reactive lymph nodes were used as controls.

**Results:** Bad expression was found in 38 of 46 DLBCL cases and, although variable, was often strong. PP1 $\alpha$  and AIF were detected in all tumours tested with a relative strong expression. Lower Bad expression was shown significantly associated with advanced clinical stages (Ann Arbor stage III+IV and IPI intermediate-high to high,  $p = 0.006$  and  $p = 0.0008$  respectively). Moreover, Bad staining was positively correlated with Bcl-2 ( $p = 0.022$ ) and PP1 $\alpha$  ( $p = 0.013$ ) staining. Finally, high AIF expression proved to be predictive of a longer overall survival in non-rituximab treated patients.

**Conclusion:** Our study shows for the first time in DLBCL that differential Bad expression may play a role in the development of the disease, possibly reflecting its function as tumour suppressor. Furthermore, they highlight the interest in targeting Bad phosphatases and AIF-mediated mitochondrial apoptosis for new therapeutic strategies.



## Pronostic significance of Bad and AIF apoptotic pathways in diffuse large B-cell lymphoma



C Bellanger<sup>1</sup>, D Troutaud<sup>1</sup>, B Petit<sup>2,5,6</sup>, B Marin<sup>7,8</sup>, MP Gourin-Chaury<sup>4,6</sup>, A Olivier<sup>4,6</sup>, DPetit<sup>3</sup>, J Feuillard<sup>4,5,6</sup>, MOJ Jauberteau<sup>1</sup> and D Bordessoule<sup>4,5,6</sup>.

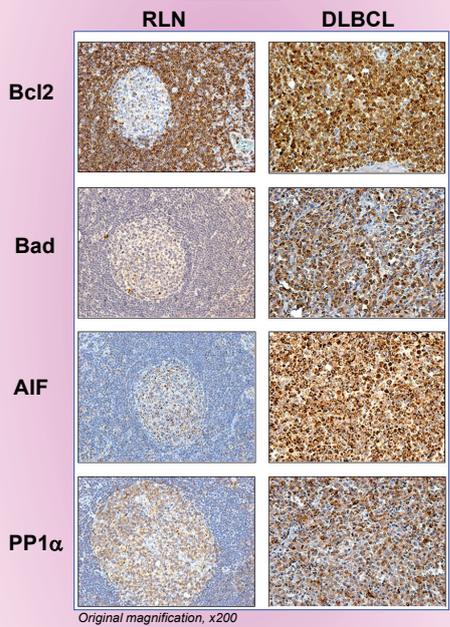
<sup>1</sup>EA 3842 Faculté de Médecine, Université de Limoges; <sup>2</sup>Laboratoire d'Anatomie-Pathologie, CHU Limoges; <sup>3</sup>UMRINRA 1061, Université de Limoges; <sup>4</sup>Service d'Hématologie Clinique, CHU Limoges; <sup>5</sup>UMR CNRS 6101, Université de Limoges; <sup>6</sup>Structure Régionale de Référence des Lymphomes du Limousin, CHU Limoges; <sup>7</sup>Service de l'Information Médicale et de l'Evolution, Unité Fonctionnelle de Recherche Clinique et de Biostatistique, CHU Limoges; <sup>8</sup>Laboratoire de Biostatistique et d'Informatique Médicale, Faculté de Médecine, Université de Limoges.

**Introduction :** Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common lymphoma in adults, accounting for 30% to 40% of cases of non-Hodgkin lymphomas. DLBCL is heterogeneous both clinically and morphologically and includes at least two prognostically important subtypes: germinal center B-cell like (GCB) and activated B-cell like (ABC) DLBCL. Although the cause of most DLBCL remains unknown, apoptosis dysregulations are often associated<sup>1</sup>. The pro-apoptotic Bad protein promotes apoptosis by heterodimerization with the anti-apoptotic Bcl-2 protein but Bad phosphorylation inhibits its function and protects cells<sup>2</sup>. Apoptosis-inducing factor (AIF) is released from mitochondria in response to death stimuli and contributes to DNA fragmentation but may also play a pro-survival role (NADH oxidase) in tumorigenesis<sup>3</sup>. To determine whether pro-apoptotic Bcl2 proteins were correlated with the clinicopathological heterogeneity and influenced survival in patients with DLBCL, we evaluated patterns of expression of Bad, PP1α (the catalytic sub-unit of PP1 involved in dephosphorylation and thus activation of Bad) and AIF.

**Design and Methods :** We retrospectively analyzed 46 patients all treated with standard chemotherapy (CHOP-like) either alone (30 cases) or in combination with Rituximab (16 cases). Immunohistochemical analyses were performed from biopsy samples of nodal DLBCL which were performed at initial diagnosis. Normal reactive lymph nodes (RLN) were used as control. The expression profiles of Bad, PP1α and AIF were studied in relation with clinical stages (Ann Arbor and IPI) and survival outcomes of the patients, as compared to the anti-apoptotic Bcl-2 protein which is classically used as a DLBCL prognosis marker.

### Results

**Fig1: Detection of Bcl2, Bad, AIF and PP1α in DLBCL**



Original magnification, x200

**Table 1: Expression of Bcl2 and Bad according to GCB/ABC profile and clinical stages.**

	Bcl-2		p value*	Bad		p value*
	Negative	Positive		Negative	Positive	
GCB	5	19	0.050	5	19	0.702
ABC	0	22		3	19	
Ann Arbor stage						
I/II	2	18	1.0	0	20	0.006
III/IV	3	23		8	18	
IPI						
≤ 2	3	26	1.0	3	26	0.124
> 2	2	15		5	12	

\* As determined by Fisher's exact test

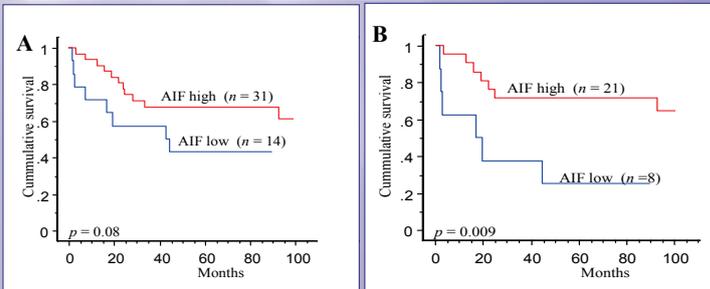
**Table 2: Correlation of combined immunohistochemical scores.**

	Bcl-2 score	PP1α score	AIF score
Bad score			
Correlation coefficient	0.341	0.371	0.210
p-value*	0.022	0.013	0.163

\* As determined by the Spearman rank correlation test.

Bad expression of in DLBCL although variable was often strong in contrast to reactive lympho nodes (Fig1) Lowest Bad expressions were significantly associated with advanced Disease (Ann Arbor III/IV and IPI >2,  $p=0.006$  and  $p=0.0008$  respectively, Mann-Whitney's U test). According to this, Bad negative cases were all found in Ann Arbor stage III or IV (table 1). No difference in Bad expression was observed in respect to the GCB/ABC profile; however Bcl-2 was found associated with the ABC patient subgroup (Table 1) in agreement with the previous reported<sup>4</sup> lower survival of this group. Finally, Bad staining was found correlated with PP1α and Bcl-2 stainings (table 2).

**Fig2: Overall survival (OS) of patients according to AIF expression and treatment (A for all patients, B for patients treated without rituximab)**



As for Bcl-2 and PP1α Bad failed to predict OS of patients (data not shown). However, high AIF expression was a significant predictor of OS in patients who were not treated with rituximab ( $p=0.009$ , Fig2 B)

**Conclusions:** Our study shows for the first time in DLBCL that differential Bad expression may play a role in the development of the disease, possibly reflecting its function as tumor suppressors. Furthermore, they highlight the interest in targeting Bad phosphatases and AIF-mediated mitochondrial apoptosis for new therapeutic strategies. Finally data, on AIF also illustrate the notion that prognostic markers need to be re-evaluated since the inclusion of rituximab in the protocols<sup>5</sup>.

**References**

- 1-Coffier B. Diffuse large cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2001; 13:325-334.
- 2-Datta SR, Ranger AM, Lin MZ, Sturgill JF, Ma YC, Cowan CW, et al. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev Cell* 2002; 3:631-643.
- 3-Moghtadhi N, Gordanetto F, Madoe F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* 2006; 16:264-272.
- 4-Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:961-968.
- 5-Wilson KS, Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald CA, Gill KK, et al. CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of BCL-2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2007; 48:1102-1109.

**Communication orale**

**16ème Journées du Cancéropole Grand Sud Ouest**

**15-16 octobre 2009**

**A role for neurotrophins in chemosensitivity of B-cell lymphoma: implications in DLBCL.**

Cynthia BELLANGER, Marie-Claude LISE, Anne-Laure FAUCHAIS, Marie-Odile JAUBERTEAU and Danielle TROUTAUD.

Rituximab (a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) is currently being used, alone or in combination with chemotherapy, in the treatment of B-non-Hodgkin's lymphoma (B-NHL). Addition of rituximab immunotherapy (R-CHOP) has improved overall survival among patients with diffuse large-B-cell lymphoma. However, a subset of patients does not initially respond to rituximab and several responsive patients develop resistance to further rituximab treatment. Diffuse large-B-cell lymphoma is a molecularly heterogeneous disease, and it is unclear whether rituximab preferentially improves the outcome in certain subgroups of patients. Furthermore, the mechanism of rituximab unresponsiveness is not known.

The neuronal growth factors, neurotrophins, and their receptors are widely expressed in a variety of non-neuronal tissues including the immune system. Several reports indicate that survival and activation of normal B lymphocytes are regulated by nerve growth factor (Hiddemann et al.) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) autocrine circuits. We have reported that secretion of endogenous BDNF is able to protect mature B cells and plasma cells from the apoptosis induced by serum deprivation. Thus, we hypothesized that secretion of neurotrophins by tumoral B cells could be implicated in chemoresistance and thus therapeutic escape. This hypothesis was tested using SU-DHL cell lines known to be differently sensitive to the antiproliferative effects of Rituximab.