

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE ED 524

EA 3842 HOMEOSTASIE CELLULAIRE ET PATHOLOGIES

Thèse N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie-Santé

Option : Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

LYDIE DUBANET

Le 16 Décembre 2013

**Neurotrophines, survie cellulaire
et microenvironnement : cas du lymphome diffus
à grandes cellules B**

Thèse dirigée par : **Pr Danielle TROUTAUD**

Soutenue devant le Jury composé de :

Rapporteurs **Pr Robert-Alain TOILLON** – INSERM U908, Université Lille 1.
 Pr Jean-Philippe MERLIO – EA2406, Université Bordeaux

Examineurs **Pr Marie-Odile JAUBERTEAU** – Directrice de l'EA 3842, Université
de Limoges.
 Pr Danielle TROUTAUD – EA 3842, Université de Limoges.

Membres Invités **Pr Jean FEUILLARD** – UMR CNRS 7276, Université de Limoges
 Pr Dominique BORDESSOULE – CHU de Limoges

Je dédie cette thèse à mon grand père, Amédée

Remerciements

Je tiens avant toute chose à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Aux rapporteurs : Professeur Jean-Philippe MERLIO et Professeur Robert-Alain TOILLON, pour le temps que vous avez consacré à ce travail et l'investissement dont vous avez fait preuve, soyez assurés de ma sincère gratitude et de mes profonds remerciements.

Au Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU m'ayant permis d'effectuer ce travail au sein du laboratoire et pour le temps accordé à son évaluation, puissiez-vous trouver ici l'expression de ma grande reconnaissance.

Enfin, je tiens à remercier le Professeur Dominique BORDESSOULE et le Professeur Jean FEUILLARD de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury.

Je tiens tout particulièrement à remercier Danielle TROUTAUD qui a su montrer un investissement, une écoute et une disponibilité sans faille durant la durée de ce travail. Vous avez été remarquable dans votre rôle de directrice, allant même jusqu'à être pour moi une « seconde mère » et je vous en remercie. Notre tandem me laissera d'excellents souvenirs tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel.

Je tiens à remercier les services d'Hématologie Clinique et d'Anatomo-Pathologie pour leur collaboration essentielle à l'étude menée sur les biopsies de patients, et donc les malades sans l'accord desquels ce travail n'aurait pu se faire.

Au sein du service d'Hématologie Clinique, je remercie le Professeur BORDESSOULE, le Docteur Marie-Pierre GOURIN et l'attachée de recherche clinique Agnès OLIVRIE pour la récolte, la mise à jour des données cliniques et l'aide dans l'analyse de ces données.

Je remercie également le Professeur Jean FEUILLARD, le Docteur Nathalie FAUMONT et enfin Isabelle ALAMOME (UMR CNRS 7276) pour leur aide dans l'obtention de lignées de type ABC et l'étude des ARNs issus des patients.

Au sein du service d'Anatomo-Pathologie, je tiens à remercier le Professeur LABROUSSE, le Docteur Manuella DELAGE et plus particulièrement le Docteur Barbara PETIT qui a effectué la sélection des biopsies, leur inclusion dans les blocs de paraffine et une relecture des lames obtenues après marquages. Un grand merci à Brigitte FOURNIER qui a effectué les coupes et certains marquages. Merci pour ta gentillesse et le temps que tu nous as accordé. Puisses-tu trouver ici l'expression de ma sincère gratitude et de mon amitié. Merci également à Annie, Chantal et Cédric pour leur bonne humeur.

Je remercie également les responsables des plateformes technologiques qui m'ont épaulée : Catherine OUK, Magalie et Claire CARRION, je vous remercie pour votre aide et le temps que vous m'avez accordé.

Au sein de l'EA3842, je souhaite remercier Mireille VERDIER, Marie-Hélène RATINAUD, Fabrice LALLOUE et Serge BATTU pour leur gentillesse et avec qui j'ai partagé de bons moments.

Je tiens à exprimer ma sympathie envers tous mes collègues de l'EA3842 : mes collègues de bureau Sofiane « Asul ! mdr, lol xD ptdr ☺ », Sandra « la savonnette », amatrice de Kasteel, Philippe, Pierre et enfin...

Romain !!! : mon binôme de galère, de rigolades et avec qui j'ai développé une grande complicité. Tu vas beaucoup me manquer, « travailler » avec toi fût un grand plaisir !

Je remercie tout autant Carole dite « Carolus » pour sa bonne humeur et sa « connerie » perpétuelle. J'ai passé avec Romain et toi de très bons moments, merci... :-D

Je remercie également Aurélie P., Hussein, Clément, Amazigh « à ma guise », Barbara, Soha, Aurélie L., Ludo « LudeMic », grâce à qui nos surnoms n'auraient jamais existé, Thomas, Cornélia, Julien et Tayssir. Je remercie particulièrement Hafidha « Hafibene » qui a participé de manière active à ce travail. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi et je te souhaite beaucoup de réussite. Je remercie également notre mascotte Elodie M. avec qui j'ai passé de très bons moments.

Enfin, je remercie mes amis et ma famille pour le soutien qu'ils m'ont apporté durant ces trois années et tout particulièrement François pour avoir su m'épauler chaque jour.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
Préambule.....	5
1. Lymphomagenèse et lymphomes B.....	7
1.1.1 Histoire de la classification des lymphomes B.....	7
1.1.2 Origines cellulaires des lymphomes B.....	8
1.1.3 Etude du processus de lymphomagenèse B.....	11
1.1.3.1 Evénements géniques transformants.....	11
1.1.3.2 Rôle du BCR.....	14
1.1.3.3 Implications du microenvironnement.....	14
1.1.3.3.1 Importance des lymphocytes T.....	14
1.1.3.3.2 Importance de l'angiogenèse et de l'hypoxie.....	15
2. Le lymphome diffus à grandes cellules B	17
2.1 Origine et évolution du classement des DLBCL.....	17
2.1.1 Profils d'expression génique.....	19
2.1.2 Profils histologiques.....	20
2.1.3 Sous-type GCB versus sous-type ABC.....	21
2.1.4 Marqueurs biologiques de pronostic.....	27
2.1.5 Importance du microenvironnement : lien entre signatures stromales, angiogenèse et hypoxie 29	
2.2 Facteurs cliniques de pronostic.....	33
2.2.1 Classification Ann Arbor.....	33
2.2.2 Index pronostic international.....	34
2.3 Traitements.....	36
2.3.1 Du traitement CHOP au traitement R-CHOP.....	36
2.3.2 Les anti-CD20.....	37
2.3.3 L'ère du rituximab.....	38
2.3.3.1 Structure du rituximab.....	38
2.3.3.2 Mécanismes d'action du rituximab.....	38
2.3.3.2.1 La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC).....	38
2.3.3.2.2 La cytotoxicité dépendante de l'activation du complément (CDC).....	40
2.3.3.2.3 Apoptose induite par la signalisation du CD20.....	41
2.3.3.3 Résistances thérapeutiques au R-CHOP.....	42
2.3.3.4 Vers de nouveaux anti-CD20.....	44
2.3.4 Nouvelles thérapies ciblées.....	44
2.3.4.1 Les anticorps monoclonaux.....	45
2.3.4.2 Les thérapies ciblant la voie du BCR.....	46
2.3.4.3 Les anti-angiogéniques.....	46
3. Les neurotrophines	49
3.1 Histoire et structure des neurotrophines.....	49
3.1.1 Découverte des neurotrophines.....	49
3.1.2 Des gènes aux protéines des neurotrophines.....	51
3.1.2.1 Les gènes.....	51
3.1.2.2 Les protéines.....	52

3.1.3	Les récepteurs Trk	53
3.1.3.1	Structure des récepteurs Trk	53
3.1.3.2	Isoformes de TrkA	55
3.1.3.3	Isoformes de TrkB	55
3.1.3.4	Isoformes de TrkC	56
3.1.4	Le récepteur p75 ^{NTR}	56
3.1.4.1	Structure du récepteur p75 ^{NTR}	56
3.1.4.2	Isoformes de p75 ^{NTR}	58
3.2	Signalisations induites par les récepteurs des neurotrophines	60
3.2.1	Voies de signalisation des récepteurs Trk	60
3.2.1.1	Signalisation canonique des récepteurs Trk	60
3.2.1.2	Rôles biologiques des récepteurs tronqués	62
3.2.2	Voies de signalisation du récepteur p75 ^{NTR}	63
3.2.3	Co-récepteurs de p75 ^{NTR}	66
3.2.3.1	Interaction avec les récepteurs Trk	66
3.2.3.2	Interaction avec la sortiline	67
3.2.3.3	Les autres co-récepteurs	68
3.2.4	Signalisation rétrograde des récepteurs Trk et p75 ^{NTR}	69
4.	Neurotrophines et système immunitaire	70
4.1	Neurotrophines et cellules immunocompétentes matures	70
4.1.1	Neurotrophines et cellules B normales	71
4.1.2	Neurotrophines et cellules B : aspects physiopathologiques	75
5.	Neurotrophines, cancers et lymphomes B	76
RESULTATS	79	
1.	Première partie: contribution à l'étude de la signalisation des neurotrophines dans des lignées de type GCB de DLBCL: effet du rituximab	81
1.1	Contexte scientifique	81
1.2	Objectif de travail	82
1.3	Méthodologie	82
1.4	Résultats et conclusions	82
1.5	Article 1: Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis	83
2.	Deuxième partie: Etude comparative de la fonctionnalité et de la signification clinique des axes NTs/récepteurs dans les sous-types GCB et ABC.	97
2.1	Contexte scientifique	97
2.2	Objectifs de travail et méthodologie	98
2.3	Résultats et conclusions	99
2.4	Article 2: Functional role and clinical significance of neurotrophins and their receptors in ABC and GCB DLBCL subtypes.	100
3.	Travaux complémentaires :	131
3.1	Etude de la modulation des neurotrophines sur l'effet apoptotique du rituximab	131
3.2	Mise en place des shRNA BDNF	133
3.2.1	Objectifs	133
3.2.2	Matériel et méthodes	134
3.2.2.1	Matériel	134
3.2.2.1	Méthode d'amplification et de transfection	134
3.2.2.2	Principe et méthode de l'infection	135

3.2.3	Résultats	137
3.2.3.1	Effet des shRNA de BDNF dans les cellules SUDHL4	137
3.2.3.2	Effet de l'inhibition de la synthèse du BDNF par shRNA sur la réponse des cellules SUDHL4 au rituximab et la sécrétion de VEGF.	138
3.3	Discussion/Conclusions	139
4.	Mise en place de modèles animaux.....	141
4.1	Xénogreffes sur CAM	141
4.1.1	Objectif	141
4.1.2	Matériel et méthode	142
4.1.3	Résultats	142
4.2	Xénogreffes sur souris SCID	143
4.2.1	Objectifs	143
4.3	Méthodologie.....	144
4.3.1.1	Obtention des tumeurs.....	144
4.3.1.2	Immunohistochimie	144
4.3.1.3	Extraction de protéines.....	144
4.3.2	Résultats	145
4.4	Conclusions	147
5.	Etude <i>in vivo</i> de l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk.....	147
5.1	Objectifs	147
5.2	Protocole.....	148
5.3	Résultats.....	148
5.3.1	Croissance tumorale.....	148
5.3.2	Analyse de l'expression des neurotrophines et leurs récepteurs ainsi que des acteurs de la survie/apoptose.....	149
5.4	Conclusions	149
	DISCUSSION GENERALE	151
	PERSPECTIVES.....	157
	Etude de la fonctionnalité et de l'implication des neurotrophines dans la survie des cellules B tumorales de DLBCL	157
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	161

Liste des abréviations

-A-

ABC: Activated B-Cell like
Ac: Anticorps
ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
Ag: Antigène
AID: Activation-Induced cytidine Deaminase
AIF: Apoptosis Inducing Factor
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm: ARN messenger

-B-

BAD: BCL-2 Associated agonist of cell Death
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-10: B-Cell Lymphoma 10
BCR: B-Cell Receptor
BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor
BGN: BiGlycaN
BH3: BCL-2 Homology domain 3
BID: BH3 domain Interacting Death agonist
BIK: BCL-2 Interacting Killer
BIM: BCL-2 Interacting Mediator of cell death
BLIMP1: B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1
Btk: Bruton's tyrosine kinase

-C-

CD: Cluster de Différenciation
CDC: Complement Dependent Cytotoxicity
CG: Centre Germinatif
CHOP: Cyclophosphamide Hydroxydaunorubicine Oncovin Prednisone
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène
CRD: Cystein Rich Domain
CRP: Complement Regulating Protein
CSR: Class Switch Recombination

-D-

DAG: DiAcyl-Glycerol
DD: Death Domain
DLBCL: Diffuse Large B Cell Lymphoma

-E-

EBV: Epstein-Barr Virus
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

-F-

Fc: Fragment constant
FcγR: Fc gamma receptor
FDC: Follicular Dendritic Cell
FL: Follicular Lymphoma

-G-

GCB: Germinal Center B-cell like
GEP: Gene Expression Profiling
GTP: Guanosine-5' - TriPhosphate

-H-

HAT: Histones AcétylTransférases
HDAC: Histone DeAcetylase
HIF-1α/β/2α: Hypoxia Inducible Factor-1 alpha/beta/2alpha subunit

-I-

IFN-γ: InterFeroN γ
Ig: Immunoglobuline
Ig-like: Immunoglobuline-like
IκBα/β/ε: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha/Beta/epsilon
IκK1: IκB kinase 1
IL-3/4/10: Interleukine-3/4/7/10
IL-7R: Interleukine-7 receptor
IP3: Inositol triphosphate
IPI: International Prognostic Index
IRF-4: Interferon Regulatory Factor 4
IRF-8: Interferon Regulatory Factor 8
ITAMs: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs

-J-

JAK: JAnus Kinase
JNK: c-Jun N-terminal Kinase

-K-

kb: kilo bases
kDa: kilo Dalton

-L-

LB: Lymphocyte B
LDH: Lactate DesHydrogenase

Liste des abréviations

LNH: Lymphome Non Hodgkinien
LT: Lymphocyte T
LT_c: Lymphocyte T cytotoxique
LT_h: Lymphocyte T helper

-M-

MAPK: Mitogen Associated Protein Kinase
mIg: Ig membranaire
miRNA: microRNA
MMP3/7/9: Matrix Metalloproteinase 3/7/9
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
MUM1: MUltiple Myeloma oncogene 1

-N-

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B
NF κ B1/2: Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1/2
NGF: Nerve Growth factor
NK: Natural Killer
NOD/SCID: NonObese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency
NRAGE: Neurotrophin Receptor-interacting mAGE homolog
NRIF: Neurotrophin Receptor Interacting Factor
NT-3: Neurotrophine 3
NT 4/5: Neurotrophine 4/5
NT-6: Neurotrophine 6
NT-7: Neurotrophine 7
NTRK1/2: NeuroTrophin Receptor Kinase1/2
NTs: NeuroTrophines

-P-

p38: p38 MAP kinase
p75^{NTR}: p75 Neurotrophin Receptor
p75^{NTR} ECD: p75NTR ExtraCellular Domain
p75^{NTR} ICD: p75NTR IntraCellular Domain
PARP: Poly-ADP Ribose Polymerase
PI3K: PhosphatidyInositol 3-Kinase
PIP2: PhosphatidyInositol 4, 5-biPhosphate
PIP3: PhosphatidyInositol (3, 4, 5)-trisPhosphate
PKC β : Protein Kinase C β
PLC γ 1/2: PhosphoLipase C γ 1/2
Pro-NTs: pro-NeuroTrophines
PTEN: Phosphatase and TENsin homologue on chromosome 10

-R-

RAG: Recombination Activating Gene
Ras: Ras GTPase activating protein
R-CHOP: Rituximab+CHOP

RE: réticulum endoplasmique
RhoA: Ras homolog gene family, member A
RNAi: RNA interference
RTK: Récepteur Tyrosine Kinase

-S-

SHM: somatic hypermutation
shRNA: Small hairpin RNA

-T-

TCR: T-cell receptor
TdT: Terminal deoxynucleotidyl Transférase
TIMP: Tissue Inhibitor of MetalloProteinases
TrkA/B/C: Tropomyosin-Related Kinase A/B/C

-V-

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR1/2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1/2
V_H: variable region of heavy chain

Liste des illustrations

Figure 1: Schéma du programme transcriptionnel du développement des lymphocytes B dans le centre germinatif ou post centre germinatif.	9
Figure 2 : Origine cellulaire des cellules B de divers types de lymphomes.	11
Figure 3 : Schéma du microenvironnement vasculaire d'un lymphome.	15
Figure 4 : Algorithme de Hans permettant de classer les DLBCL selon les sous types GCB et non-GCB.	20
Figure 5 : Schéma des voies de survie oncogéniques des sous-types GCB et ABC.	24
Figure 6: Mécanismes d'action du rituximab.	40
Figure 7 : Schéma du gène <i>bdnf</i> .	51
Figure 8 : Schéma des domaines constituant les neurotrophines.	52
Figure 9 : Schéma de la structure des récepteurs Trk.	54
Figure 10 : Schéma de la structure du récepteur $p75^{NTR}$.	58
Figure 11 : Schéma de la structure du récepteur total $p75^{NTR}$ et de son isoforme tronquée <i>s-p75</i> .	59
Figure 12 : Représentation des voies de signalisations induites par l'activation des récepteurs Trk.	62
Figure 13 : Représentation schématique des voies de signalisation induites par l'activation	65
Figure 14 : Schéma représentant les voies de signalisation induites par la dimérisation du récepteur $p75^{NTR}$ avec la sortiline (à gauche) et avec les récepteurs Trk (à droite) dans le cerveau.	67
Figure 15 : Viabilité cellulaire à 48h des lignées GCB soumises à l'anti-BDNF 15µg/mL ou au pro-BDNF 10µg/mL seuls ou en association avec le rituximab 20µg/mL (n=3).	131
Figure 16 : Western Blot révélant le clivage de la PARP après traitement des SUDHL4 à l'anti-NGF 50ng/mL seul ou en association avec le rituximab (1µg/mL) en normoxie et en hypoxie (western blot représentatif de 4 expériences indépendantes).	132
Figure 17 : Etude de la sécrétion de VEGF lors de la neutralisation du NGF endogène (anti-NGF 50ng/mL) en association ou pas avec le traitement des cellules par le rituximab (1µg/mL). Les taux de VEGF issus du dosage ELISA sont exprimés en ratio par rapport au contrôle chez les SUDHL4 après 48h de traitement (n=3).	133
Figure 18 : Schéma de la construction du pLKO.1 puro.	135
Figure 19: Schématisation de la formation du complexe RISC.	136
Figure 20 : Résultats obtenus lors de la transfection des cellules SUDHL4 par des shRNA ciblant le BDNF.	137
Figure 21 : Effets du rituximab sur les cellules SUDHL4 transfectées avec des shRNA ciblant le BDNF.	138
Figure 22 : Etude de la sécrétion de VEGF par les SUDHL4 infectées avec les shRNA B212 de BDNF ou le vecteur vide pLKO et traitées ou non pendant 48h au rituximab (1µg/mL).	139
Figure 23 : Schéma représentant les différentes étapes permettant l'obtention de tumeurs lors de greffes de cellules SUDHL4 sur la membrane allantoïdienne de poulet. ED : Embryonic Day.	142
Figure 24 : Photos des vaisseaux entourant les tumeurs obtenues avec les SUDHL4 sur la CAM.	143
Figure 25 : (A) Photo des souris et localisation des tumeurs (traits en pointillés noirs) au bout de 30 à 40 jours après injection des SUDHL4 ou des OCI-LY3. (B) Courbe de croissance tumorale établie sur une durée de 15 jours pour des souris SCID 40j après avoir été greffées avec des cellules SUDHL4. Les résultats correspondent à la moyenne ± ET de 3 souris.	145
Figure 26: Marquage du CD20 humain en IHC sur une tumeur de DLBCL obtenue suite à la greffe de cellules SUDHL4 sur une souris SCID.	146
Figure 27 : Analyse en immunohistochimie de l'expression du Ki67, NGF, BDNF, TrkA et $p75^{NTR}$ d'une tumeur issue d'une xéno greffe réalisée chez une souris SCID avec des SUDHL4 (x400).	146
Figure 28 : Courbe de croissance tumorale sur une durée de 17 jours de souris injectées avec la lignée SUDHL4 et traitées avec le solvant ou avec le K252a.	148
Figure 29 : Analyse de l'effet du traitement par le K252a chez des souris greffées avec des cellules SUDHL4. Western blot comparant l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs, les formes totales (pan) et phosphorylées de l'Akt (Ser 473) et le clivage de la PARP par des tumeurs prélevées sur une souris traitée (Sk) et contrôle (Sc)	149
Figure 30: Schéma des mécanismes à l'origine de la synthèse de VEGF dans le cadre de la néo-angiogenèse. Schéma adapté d'après Nakamura et al., 2006 ; Saygili et al., 2011 et Nakamura et al., 2011.	154

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Classement des différents sous-types de DLBCL.</i>	18
<i>Tableau 2: Classification Ann Arbor des quatre stades du DLBCL.</i>	33
<i>Tableau 3: Echelonnage de l'Index pronostic international (IPI) et de l'IPI ajusté à l'âge (aaIPI).</i>	35
<i>Tableau 4: Caractéristiques des clones de BDNF.</i>	134

RESUME

Cette étude visait à évaluer la fonctionnalité des neurotrophines dans les DLBCL et leur possible implication dans l'hétérogénéité clinique des patients, notamment les phénomènes de résistance thérapeutique. Pour cela, des travaux ont été initiés *in vitro* à partir de lignées humaines issues des 2 principaux sous-types de DLBCL (GCB et ABC), et *ex vivo* par des analyses réalisées sur des biopsies issues d'une cohorte de 33 patients (17 GCB et 16 ABC). Les études réalisées sur les lignées ont révélé l'expression et la fonctionnalité des récepteurs de survie Trk des NTs pour les deux sous-types. De manière intéressante, l'inhibition pharmacologique des Trk permet d'induire l'apoptose de lignées ABC, résistantes au rituximab, et potentialise l'apoptose induite par le rituximab. De plus, ces effets cytotoxiques sont sensiblement augmentés dans des conditions d'hypoxie. La modulation de la signalisation des NTs (anticorps bloquants, NTs exogènes) nous a permis de mettre en évidence un axe BDNF/TrkB/p75^{NTR} impliqué dans la survie, et plus particulièrement celle des cellules de type GCB. Par ailleurs, nos travaux démontrent pour la première fois dans ces cellules tumorales B un lien entre l'activation des récepteurs Trk et la sécrétion de VEGF dont la production est aussi modulée par le rituximab. Ces résultats sont confortés par des données très préliminaires obtenues après transfection des cellules SUDHL4 par des shRNA ciblant BDNF. Enfin, l'étude rétrospective menée sur les biopsies de patients révèle des différences d'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs. De façon intéressante, la forte expression d'NGF et de TrkB a été corrélée au profil histologique (ABC) des patients. De même, une forte expression de p75^{NTR} est associée significativement au stade clinique (IPI). Ces données, en concordance avec celles obtenues sur les lignées cellulaires, suggèrent fortement un rôle pro-survie des NTs impliqué dans l'agressivité des DLBCL. Finalement, des résultats très préliminaires obtenus à partir de xénogreffes d'une lignée GCB sur des souris SCID semblent conforter cette hypothèse et le potentiel thérapeutique d'un ciblage de ces facteurs de croissance dans ces pathologies.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate functionality of neurotrophins in DLBCLs and their possible implication in clinical heterogeneity. To achieve this, *in vitro* studies were realized with human cell lines of both GCB and ABC subtypes and a retrospective study was done in 33 biopsies of patients with 17 were evaluated as GCB subtype and 16 as non-GCB. *In vitro* studies revealed that Trk receptors are functional since their inhibition induced cell death of both subtypes. Moreover, pharmacological Trk inhibition synergized with rituximab to induce apoptosis, what was enhanced by hypoxia. This enhanced apoptosis was also observed for ABC cell lines, less sensitive to the cytotoxic effect of rituximab. Modulation of neurotrophin signaling by neutralizing antibodies or exogenous neurotrophins gave evidence for a BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis implied in survival of GCB DLBCL cells. Furthermore, our work showed, for the first time in DLBCL cells, a link between Trk signaling and VEGF secretion, also influenced by rituximab. This link is also suggested by preliminary results obtained with shRNA of BDNF in SUDHL4 cells. Finally, data obtained on patients' samples revealed that NGF expression was associated with the ABC subtype marker, IRF4/MUM-1 and high TrkB expression with non-GCB profile. Moreover, a positive correlation was found between the expression of p75^{NTR} and IPI stage. These data in accordance with *in vitro* results strongly suggest a role for NTs in cell survival involved in aggressive DLBCLs. Finally, some preliminary results obtained from xenografts in SCID mice support this hypothesis and the therapeutic potential of targeting these growth factors in DLBCLs.

INTRODUCTION GENERALE

Le cancer est défini par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme un terme générique regroupant un ensemble de maladies qui peuvent affecter n'importe quelle partie du corps. Il se caractérise majoritairement par la création rapide et anormale de cellules qui prolifèrent anarchiquement et ne remplissent plus la fonction pour laquelle elles ont été formées. Il constitue actuellement la première cause de décès mondiale avec un taux ayant atteint les 13% en 2008.

Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) forment un groupe hétérogène de lymphomes agressifs les plus communs à travers le monde. L'analyse de leurs profils génétiques a permis de les classer en deux sous-types majeurs nommés GCB (Germinal Center B cell like) et ABC (Activated B cell like). Ces 2 types se différencient par plusieurs milliers de gènes associés à des altérations génétiques distinctes, à l'activation spécifique de certaines voies de signalisations et à des réponses thérapeutiques différenciées ce qui suggère la mise en place de mécanismes oncogéniques différents. A l'heure actuelle, le traitement des DLBCL consiste à administrer aux patients la polychimiothérapie (CHOP) à laquelle a été ajoutée il y a quelques années l'immunothérapie avec un anti-CD20, le rituximab. Bien que le traitement R-CHOP ait permis d'améliorer la réponse au traitement des patients, des résistances ont pu être observées, renforcées très certainement par l'hétérogénéité clinique de ces lymphomes. Il est donc à présent nécessaire de mettre en place des études visant à approfondir la compréhension des mécanismes de résistances afin d'élaborer des traitements plus efficaces et personnalisés.

Les facteurs de croissance sont nécessaires à la survie cellulaire et leur expression est finement régulée. Ils sont donc indispensables aux cellules tumorales et sont par conséquent la cible de dérégulations à la faveur de la survie et de la prolifération de ces cellules. Les neurotrophines sont des facteurs de croissance impliqués dans le développement neuronal mais qui participent également aux processus tumoraux de cellules non-neuronales. De manière intéressante, elles contribuent à la survie et à la prolifération de lymphocytes B malins. C'est pourquoi nos travaux de thèse se sont focalisés sur la compréhension du rôle de ces facteurs dans la survie des cellules de DLBCL et dans la réponse à l'apoptose induite par le rituximab. Pour cela, des travaux ont été initiés *in vitro* à partir de lignées humaines issues des 2 principaux sous-types de DLBCL (GCB et ABC), auxquels a succédé la mise en place de modèles animaux avec des xénogreffes sur souris SCID. En parallèle, une étude a été conduite *ex vivo* par des analyses réalisées sur des biopsies issues d'une cohorte de 33 patients (17 GCB et 16 ABC).

**INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE**

Préambule

Bien que les organismes dressent de façon immédiate plusieurs barrières défensives lors d'une infection microbienne, caractéristiques d'une première ligne de défense efficace appelée immunité innée, beaucoup de pathogènes ont mis en place des stratégies pour y échapper. C'est pourquoi au cours de l'évolution est apparue l'immunité adaptative/acquise, bien plus efficace de part son système de reconnaissance spécifique et adaptable. Les effecteurs cellulaires de cette seconde ligne de défense sont les lymphocytes T et B capables d'identifier spécifiquement un agresseur, tout en tolérant les cellules du soi. Cette immunité tire toute sa particularité du répertoire très varié et immense de récepteurs aux antigènes (TCR, BCR) des cellules lymphocytaires, représenté par les milliards de lymphocytes formés au sein d'un organisme. La structure moléculaire reconnue par ces récepteurs (ou les anticorps circulants) correspond à l'antigène (Ag). Les lymphocytes T auxiliaires (T_H) sont la plupart du temps les premiers lymphocytes à être alertés de la présence de l'Ag qui leur est présenté via des molécules du soi nommées CMH II par des cellules spécialisées dans cette fonction appelées « cellules présentatrices d'Ag » (CPA). Ils sont également au cœur de la coopération cellulaire notamment grâce aux messagers chimiques ou cytokines qu'ils sécrètent lors de leur activation. Les lymphocytes B ayant reconnu l'antigène vont s'activer la plupart du temps dans le cadre de la coopération T_H/B . La maturation des lymphocytes B induite par leur activation met en œuvre la formation, au sein des organes lymphoïdes périphériques, de structures nommées centres germinatifs (GC). Les lymphocytes B activés qui migrent dans ces GC vont alors subir une intense prolifération ainsi que divers processus de maturation et de sélection dont l'objectif ultime est d'aboutir à la formation d'anticorps de très haute affinité, capables de neutraliser très rapidement l'Ag cible. L'activation des lymphocytes T et B va également permettre une mise en mémoire de la rencontre avec l'Ag par la production de lymphocytes mémoires, capables de survivre plusieurs années et de permettre une réaction plus rapide et plus forte lors d'une deuxième rencontre (réponse secondaire). En effet les lymphocytes B activés comme les LT ont une durée de vie très courte, de l'ordre de quelques semaines. Ainsi, une fois l'Ag neutralisé il est nécessaire de stopper l'activation des lymphocytes générant des taux toxiques de cytokines, et d'éliminer les millions de cellules clonales spécifiques de l'Ag détecté au départ. Il se produit alors un processus d'induction de mort par apoptose des cellules surnuméraires permettant aussi de ré équilibrer la diversité du répertoire de reconnaissance des lymphocytes au niveau périphérique. Par conséquent l'activation lymphocytaire résulte d'une régulation fine entre la survie/prolifération des

cellules au début de la réponse et la mort physiologique de ces mêmes cellules en fin de réponse. Si toutefois un dérèglement de la balance survie/apoptose survient notamment au cours du processus de maturation des lymphocytes B, il peut induire leur prolifération incontrôlée, à l'origine de la formation de lymphomes B. Ceux-ci peuvent être caractérisés par la cellule originelle et possèdent diverses particularités tant sur les plans génétique et histologique que sur le plan clinique. Au cours de la première partie de notre introduction, nous allons nous intéresser aux conséquences d'un dysfonctionnement lors de la maturation des lymphocytes B suite à leur activation par l'Ag. Dans la deuxième partie, nous détaillerons plus particulièrement le cas des lymphomes diffus à grandes cellules B que nous avons choisis d'étudier, et dans une troisième partie nous présenterons les neurotrophines, facteurs de croissance ayant fait notre objet d'étude.

1. Lymphomagenèse et lymphomes B

Les maladies lymphoprolifératives B sont des proliférations malignes clonales de cellules B à différents stades de leur développement. Ces proliférations anormales sont à l'origine de lymphomes le plus souvent caractérisés par la cellule d'origine. Nous allons détailler la façon dont les lymphomes ont été classés au cours du temps, leurs origines cellulaires ainsi que les mécanismes impliqués dans la lymphomagenèse.

1.1.1 Histoire de la classification des lymphomes B

La première description d'un lymphome fut effectuée par Thomas Hodgkin en 1832 qui lui donna d'ailleurs son nom : maladie de Hodgkin, puis lymphome de Hodgkin. Par la suite, d'autres formes de lymphomes furent décrites et regroupées dans un certain nombre de classifications. On trouve parmi elles les classifications du British National Lymphoma Investigation (1974), Lukes and Collins (1974), Dorfman (1974), Kiel (1974) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (1976).

Comme celles-ci portaient à confusion et étaient controversées, l'Institut National du Cancer des Etats-Unis décida à la fin des années 70 d'entamer une étude visant à les comparer dans le but d'adopter celle étant la plus appropriée. Comme aucune ne convenait, la « Working Formulation » (WF) fut développée en 1982 pour l'usage clinique. La morphologie des cellules et la différence de survie des patients permirent l'établissement de 10 types histologiques majeurs et de trois grades cliniques. Cependant, cette WF possédait certaines lacunes puisqu'il n'y avait aucune classification en fonction du type immunologique. De plus, des entités proches biologiquement se trouvaient éloignées dans la classification alors que d'autres, sans liens, étaient classées ensembles (Weisenburger, 1992). Pour remédier aux frustrations des cliniciens et des pathologistes engendrées par la classification des lymphomes, un groupe international de 19 hématopathologistes (the International Lymphoma Study Group) se réunit en avril 1993 à Berlin. Ils rédigèrent alors une classification nommée REAL (Revised European-American classification of Lymphoid neoplasms) où les entités furent définies par leurs caractéristiques morphologiques, immunologiques et génétiques ainsi que par les cas cliniques observés et les traitements utilisés. Cette classification fut publiée en 1994 dans le journal *Blood* (Harris, et al., 1994). En 2001, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou WHO – World Health Organization) se basa sur la classification REAL et étendit ses principes à l'ensemble des cancers hématologiques. Elle groupa ainsi les lymphomes par type cellulaire et définit leurs caractéristiques phénotypiques, moléculaires et

cytogénétiques. Cette classification a été mise à jour en 2008 (Campo, et al., 2011 ; Martelli, et al., 2013).

1.1.2 Origines cellulaires des lymphomes B

Le centre germinatif est la structure formée dans les organes lymphoïdes périphériques (ganglions lymphatiques, rate...) quelques jours après l'activation par l'Ag et dans laquelle le lymphocyte B activé va augmenter notamment l'affinité de son récepteur (BCR) pour l'Ag. Comme il est représenté sur la figure 1, la régulation de l'expression de protéines par des facteurs de transcription spécifiques va permettre aux lymphocytes B de franchir les différents stades de maturation à l'origine de la formation de deux zones majeures des GC dites zone sombre et zone claire. Au sein de la zone sombre, on trouve des lymphocytes en forte prolifération nommés centroblastes qui n'expriment plus le BCR. La zone claire est quant à elle caractérisée par des lymphocytes B de plus petite taille, les centrocytes, enchevêtrés dans un large réseau de cellules folliculaires dendritiques (FDC). Ces cellules ne prolifèrent plus mais ré-expriment un BCR de plus haute affinité pour l'antigène et seront maturées soit en plasmocytes, soit en cellules B mémoires.

Au niveau de la zone sombre, le centroblaste qui prolifère activement va subir des remaniements de la région variable des gènes d'Ig appelés hypermutations somatiques (SHM, Somatic HyperMutation) dans le but d'augmenter l'affinité de son récepteur à l'Ag. Bien que réalisées au hasard, ces mutations dues à la sélection par l'Ag sont préférentiellement accumulées aux niveaux des régions hypervariables (CDRs – Complementarity-Determining Regions) déterminant la complémentarité avec l'Ag. Cette maturation d'affinité est effectuée par une enzyme nommée AID (Activation-Induced cytidine Deaminase) uniquement exprimée par les centres germinatifs (Muramatsu, et al., 1999 ; Muramatsu, et al., 2000) et dont les mécanismes d'action sont encore peu connus. L'hypermutation somatique met en jeu la création de coupures d'ADN simple brin et l'intervention du système de réparation des mésappariements nucléotidiques. Le gène *BCL-6*, identifié de par sa translocation dans le lymphome diffus à grandes cellules, est un régulateur du développement des cellules B du centre germinatif (Ye, et al., 1997). Ce facteur est un répresseur transcriptionnel, qui, au stade centroblaste, inhibe les gènes impliqués dans l'activation de la cellule B (CD69, STAT1, CD80), réprime les gènes impliqués dans la régulation négative du cycle cellulaire, inhibe la réponse au stress génotoxique (p53, ATR), inhibe la différenciation plasmocytaire (PRDM1/Blimp-1) et la différenciation en cellule B mémoire (Klein & Dalla-Favera, 2008). Puis, les centroblastes exprimant une Ig membranaire nouvellement générée suite aux

mutations somatiques deviennent des centrocytes et sont alors testés pour leur capacité à lier l'antigène. Ce test intervient dans la zone claire du centre germinatif, par l'intermédiaire des FDC qui exposent pendant plusieurs mois l'antigène sous forme de complexes immuns rendant possible son accès aux centrocytes. La stimulation du BCR, couplée aux signaux de co-stimulation transmis par les cellules T, fournit des signaux de survie à la cellule B qui va alors poursuivre et finir sa maturation. A l'inverse, l'échec de la liaison du BCR à l'Ag induit la mort de la cellule B (Gatto & Brink, 2010). Les centrocytes ayant subi une sélection positive vont aussi subir la commutation de classe (CSR - Class Switch Recombination) permettant, par la modification de classe du segment constant de l'Ig, de donner de nouvelles fonctions aux anticorps sans modifier leur spécificité de reconnaissance de l'Ag.

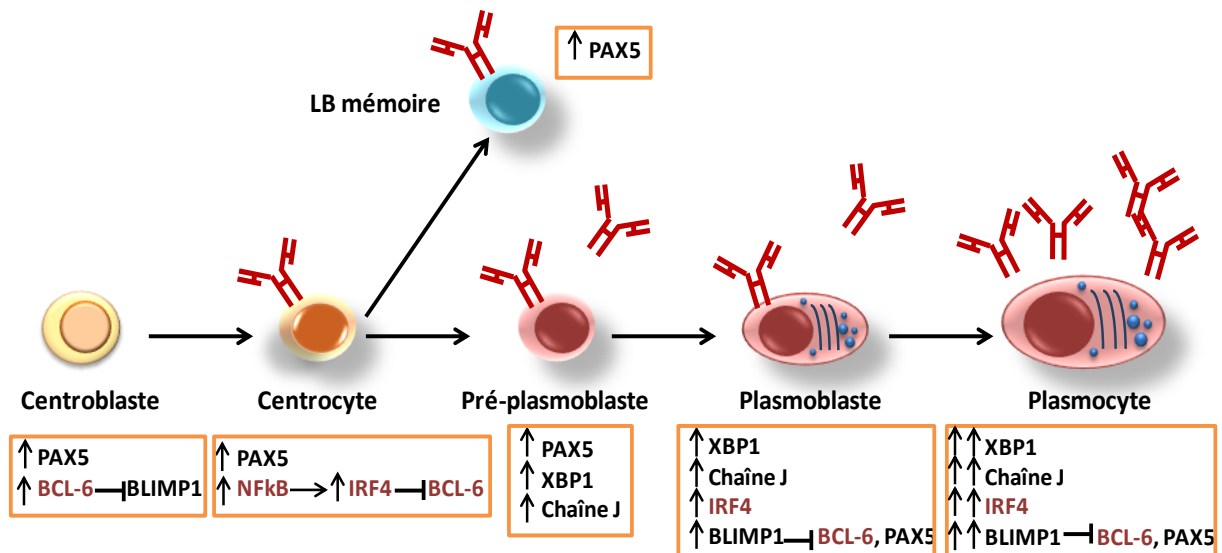


Figure 1: Schéma du programme transcriptionnel du développement des lymphocytes B dans le centre germinatif ou post centre germinatif.

Ce programme de régulation d'expression de facteurs de transcription permet aux lymphocytes B activés qui migrent dans les centres germinatifs (GC) de subir plusieurs étapes de maturation dans la zone sombre (centroblaste) puis dans la zone claire des GC (centrocyte). Finalement, ils sortiront des GC sous forme soit de plasmocytes (plasma cell) sécrétant d'Ac de haute affinité pour l'Ag soit de cellules B mémoires (memory B cells). Schéma adapté d'après Klein et Dalla Favera, 2008.

Les centrocytes ayant subi avec succès la commutation de classe quittent le centre germinatif sous forme de plasmocytes ou de LB mémoires à longue durée de vie. Les signaux qui induisent la transition du centrocyte soit en cellule plasmocytaire soit en cellule B mémoire sont à ce jour mal connus. Cependant, la régulation d'expression de certains facteurs de transcription (Shapiro-Shelef & Calame, 2005 ; Klein & Dalla-Favera, 2008) a été associée au processus de différenciation plasmocytaire comme la régulation négative de Bcl-6 et de PAX5 pour l'engagement vers la différenciation plasmocytaire, aboutissant à la génération d'un "pré-plasmablaste" sécrétant de faibles quantités d'Ac (Figure 1) (Angelin-Duclos, et

al., 2000 ; Shaffer, et al., 2002 ; Gatto & Brink, 2010). De même, la régulation positive de Blimp-1, IRF-4 et XBP1 est indispensable à la différenciation plasmocytaire terminale (Figure 1) (Reimold, et al., 2001 ; Shapiro-Shelef, et al., 2003 ; Klein, et al., 2006). Parmi les facteurs de transcription permettant la différenciation d'un centrocyte en une cellule B mémoire on peut citer le facteur PAX5 (Figure 1). Par contre, le rôle de Bcl-6 reste à clarifier (Gatto & Brink, 2010). De plus des expériences *in vitro* semblent attribuer un rôle à l'environnement cytokinique, comme l'IL-4, ainsi que la stimulation par le CD40 dans le développement des cellules B mémoires (Calame, et al., 2003 ; Klein, et al., 2003). Finalement, les LB mémoires peuvent soit retourner dans le centre germinatif subir une nouvelle sélection dans le but d'élargir le répertoire des Ig et devenir des plasmocytes, soit rentrer dans la circulation pour permettre une réponse immunitaire rapide lors d'une deuxième rencontre avec l'Ag.

La plupart du temps, les lymphomes B proviennent de cellules du centre germinatif ou post-centre germinatif. Comme on vient de le rappeler brièvement, le GC constitue le lieu où se déroulent les hypermutations somatiques, or la plupart des cellules issues de lymphomes ont des mutations somatiques de la partie variable des Ig (Küppers, 1999). De manière générale et quand cela est possible, les lymphomes sont classés par rapport à leur équivalent non tumoral ce qui est représenté sur la figure 2. Le lymphome de Hodgkin est une entité à part entière puisqu'il est issu d'une cellule nullement retrouvée dans les autres lymphomes : la cellule de Reed-Sternberg qui dérive la plupart du temps du centre germinatif (Küppers, et al., 2005). Par conséquent, les autres types de lymphomes font partie des lymphomes non hodgkiniens (LNH) correspondant à un groupe hétérogène de proliférations malignes du système lymphoïde dont le point de départ est extra-médullaire. Parmi ces lymphomes, les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) représentent le groupe le plus important.

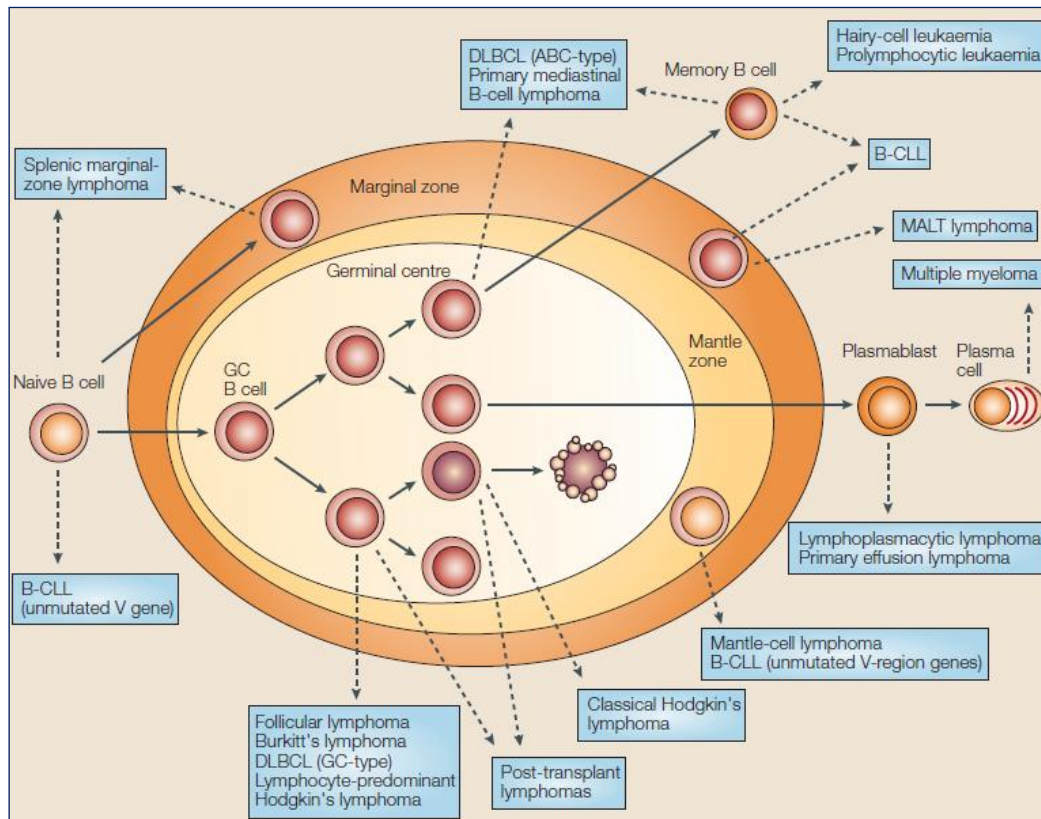


Figure 2 : Origine cellulaire des cellules B de divers types de lymphomes.

Les lymphomes B humains sont classés par rapport à leur équivalent non tumoral. La plupart proviennent des cellules B du centre germinatif (GC) ou de cellules B du post-centre germinatif, preuve de son rôle dans la pathogénèse des lymphomes B. Comme il est montré sur la figure, le centre germinatif est entouré par la zone du manteau contenant des cellules B naïves dont la plupart expriment le CD35. La zone marginale est une zone riche en cellules B qui inclut probablement les cellules B mémoires des post-GC et les cellules B naïves impliquées dans les réponses immunes indépendantes des cellules T. L'analyse du profil d'expression génique a identifié deux sous-type de DLBCL : l'un avec un profil semblable aux cellules des GC (sous-type GCB – germinal center B cell like), et l'autre semblable aux cellules B activées *in-vitro* (sous-type ABC – activated-B-cell like) (Küppers, et al., 2005).

1.1.3 Etude du processus de lymphomagenèse B

Dans cette partie, nous allons mettre en lumière les mécanismes responsables de la transformation des cellules B à l'origine des différents types de lymphomes. La survie anormale des lymphocytes B peut être due à des anomalies de la recombinaison des gènes des immunoglobulines (Ig) constituant le BCR, à des mutations affectant les régulations épigénétiques, à une activation chronique du BCR ou encore à l'environnement du lymphocyte B.

1.1.3.1 Evénements géniques transformants

Chaque étape de la physiologie du LB peut être émaillée d'accidents oncogéniques et notamment au cours des trois processus modifiant le BCR lors de la différenciation et maturation des lymphocytes B : la recombinaison V(D)J qui se produit dans la moelle osseuse

(phase de maturation Ag indépendante), l'hypermutation somatique et le changement de classe des Ig en périphérie (phase Ag dépendante). Au cours de ces trois processus peuvent avoir lieu des translocations chromosomiques à l'origine du développement d'un lymphome. Le résultat d'une translocation chromosomique est la dérégulation transcriptionnelle de gènes qui régulent le développement B dans les centres germinatifs ou l'expression ectopique de gènes qui sont normalement éteints à un stade de développement de la cellule B mature. Les translocations chromosomiques réciproques impliquant l'un des trois loci des gènes codant les Ig et un proto-oncogène sont rencontrées dans un grand nombre de lymphomes B. C'est par exemple le cas au cours de la recombinaison V(D)J qui met en jeu l'activité des enzymes RAG à l'origine de cassures de l'ADN double brin. Celles-ci sont normalement réparées mais peuvent potentiellement, si elles persistent, être à l'origine de translocations chromosomiques. Ainsi, les translocations t(11 ;14) et t(14 ;18) sont connues pour se produire au cours de recombinaisons V(D)J. La t(14 ;18) qui est détectée dans la plupart des lymphomes folliculaires et une fraction des DLBCL, implique le gène *BCL-2* et le locus *IgH*, aboutissant à la dérégulation de Bcl-2 conférant un avantage de survie aux cellules B. De façon similaire, la t(1 ;14) retrouvée dans les lymphomes du manteau juxtapose le gène *CCND1* au locus *IgH* aboutissant à une surexpression de la cycline D1 (Küppers, et al., 2005 ; Nogai, et al., 2011).

Le processus d'hypermutations somatiques contribue lui aussi à la lymphomagenèse non seulement en causant des translocations chromosomiques mais également en ciblant des gènes ne codant pas pour les Ig. C'est par exemple le cas des gènes codant Bcl-6, Pax5, c-Myc, Fas, et Pim-1. On parle d'ASHM (Aberrant Somatic HyperMutation) (Klein & Dalla-Favera, 2008). Ces mutations en dehors des régions variables des Ig se produisent de façon physiologique dans les centres germinatifs. Ainsi, il a été montré que les gènes codant pour Bcl-6 et CD95 (Fas) contenaient des mutations dans un grand nombre de cellules B du centre germinatif et de cellules B mémoires normales (Pasqualucci, et al., 1998). Au cours du développement B, ces gènes sont donc des cibles de la machinerie des hypermutations somatiques. Dans de rares cas, les mutations touchant ces gènes peuvent induire un lymphome. Une mutation capable d'inactiver CD95 est retrouvée dans 20% des lymphomes B post-centre germinatif. Elle rendrait alors la cellule insensible à l'apoptose par liaison du ligand CD95L exprimé par exemple par les lymphocytes T_H (Grønbaek, et al., 1998). Dans le cas du gène *BCL6*, les hypermutations pourraient causer sa translocation sur un locus codant pour une Ig ou une autre protéine. En effet, la région 5' du gène *BCL6* est non seulement le site d'hypermutations, mais également celui de translocations chromosomiques (Küppers, et al., 2005).

Lors de la commutation de classe des Ig, on identifie également des translocations caractérisées par la présence de points de cassures dans les régions « switch » des régions constantes comme c'est par exemple le cas de l'*IgH* où ont été détectées un grand nombre de translocations. Elles incluent *c-myc* [t(8 ;14)] dans certains cas de lymphome de Burkitt, *Bcl-6* [t(3 ;14)] et *Lyt-10* (t(10 ;14)] dans le lymphome diffus à grandes cellules B, *Pax-5* (t(9 ;14)] dans le cas du lymphome lymphoplasmacytoïde, *Muc1* [t(1 ;14)] dans le lymphome extranodal et enfin *c-maf* (t(14 ;16)] et *MUM1/IRF4* (t(6 ;14)] dans le myélome multiple (Küppers & Dalla-Favera, 2001). Tous ces exemples montrent à quel point les translocations sont variées et expliquent la grande diversité des lymphomes.

Si les translocations chromosomiques impliquant les loci des Ig sont clairement une caractéristique de la plupart des types de lymphomes B, d'autres événements géniques transformants peuvent être impliqués dans la lymphomagenèse telles que des mutations de gènes suppresseurs de tumeurs (p53 ou $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), des amplifications génomiques (*REL*), ou encore l'implication de virus. L'exemple de plus connu est celui du virus d'Epstein-Barr (EBV, membre de la famille des herpes virus), qui est retrouvé dans la majorité des lymphomes de Burkitt endémiques, dans la plupart des lymphomes post-transplantations, des lymphomes associés au SIDA et des lymphomes diffus des séreuses, ainsi que dans 40% des cas de maladies de Hodgkin classiques (Küppers, et al., 2005).

L'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans les lymphomes a permis de grandes avancées scientifiques aussi. En effet, le gène anti-apoptotique *BCL2* a été découvert comme étant le partenaire de translocation du locus *IgH* dans la t(14 ;18)(q32 ;q21) qui intervient souvent dans le cas du lymphome folliculaire. Le fait que l'augmentation de l'expression d'une seule protéine pouvait induire la survie a eu un fort impact dans le domaine de la biologie. De même, la découverte qu'un certain nombre de lymphomes diffus à grandes cellules B montraient une dérégulation de l'expression du répresseur transcriptionnel Bcl-6 a permis de mieux comprendre le programme de développement des cellules B activées par l'Ag ainsi que les événements transformant de ce lymphome (LeBien & Tedder, 2008).

L'expression des gènes est aussi contrôlée par l'état de la chromatine qui peut subir diverses modifications (ex : méthylation et acétylation des histones) modulant l'accessibilité de facteurs de transcription ou l'activité transcriptionnelle de gènes proches. De récentes études ont montré que des mutations des protéines impliquées dans les mécanismes épigénétiques et des perturbations dans la structure épigénomique étaient fréquentes dans les lymphomes B. En effet, des déséquilibres dans la méthylation des histones sont impliqués

dans divers cas de lymphomes B (Kirmizis, et al., 2004 ; Velichutina, et al., 2010 ; Shaknovich & Melnick, 2011.

1.1.3.2 Rôle du BCR

Tout au long de leur développement, les LB subissent une pression de sélection dans le but d'avoir un BCR fonctionnel et le plus efficace possible. C'est donc de la qualité de ce récepteur que dépend la survie de la cellule. Un BCR fonctionnel donnera des signaux de survie et de prolifération à la cellule, alors qu'un BCR non fonctionnel ou absent entraînera l'apoptose de celle-ci (Kraus, et al., 2004). Il semble que les cellules malignes subissent également cette pression de sélection. En effet, la plupart des cellules B de lymphomes expriment un BCR si ce n'est parfois en faible quantité. Il semble qu'au moment des translocations chromosomiques dans les loci des gènes des Ig, l'inaptitude des cellules à former un BCR soit incompatible avec leur survie et leur développement au sein d'une tumeur. Finalement, des mutations somatiques des régions variables dont le profil indique une sélection par l'Ag sont retrouvées dans divers types de lymphomes au cours de leur expansion clonale (Bahler & Levy, 1992). Il existe cependant de rares cas pour lesquels les cellules malignes n'expriment pas de BCR. C'est le cas dans 25% des lymphomes de Hodgkin où la région V du gène des Ig est mutée, rendant le réarrangement génétique non fonctionnel.

1.1.3.3 Implications du microenvironnement

1.1.3.3.1 Importance des lymphocytes T

Tout comme les cellules B saines, les cellules B malignes gardent des interactions avec les cellules du microenvironnement. A titre d'exemple, les cellules du lymphome folliculaire prolifèrent *in vivo* dans des structures proches des lymphocytes T_H et des cellules folliculaires dendritiques. Celles qui en sont éloignées montrent une activité de prolifération réduite. Ceci suppose que la survie et la prolifération de la cellule tumorale dépendent de son interaction avec les cellules du microenvironnement. Des études menées *in vitro* corroborent cette hypothèse puisque les cellules malignes folliculaires ne peuvent proliférer qu'en présence de lymphocytes T_H, de cellules stromales ou d'un anticorps se liant au CD40. C'est également le cas du lymphome gastrique du MALT de bas grade qui est souvent associé à une infection par *Helicobacter Pylori*. Cette bactérie induit *in vitro* et *in vivo* la prolifération des lymphocytes T infiltrant la tumeur et son élimination par un traitement à base d'antibiotiques permet une régression du lymphome. Ceci montre l'importance de l'interaction avec les

lymphocytes T dans la progression de ce lymphome (Hussell, et al., 1996 ; Ferreri, et al., 2013).

Il semble que le microenvironnement, notamment la présence de cellules T_H, ait également une grande importance dans la survie des cellules de Reed Steinberg dans le lymphome de Hodgkin. En effet, ces cellules qui ont pourtant perdu le phénotype B expriment toujours des molécules nécessaires à l'interaction avec les lymphocytes T_H telles que le CMH II, le CD40 et les protéines de co-stimulation CD80 et CD86. De plus, ces cellules survivent rarement en culture (Küppers, et al., 2002 ; Küppers, et al., 2005).

1.1.3.3.2 Importance de l'angiogenèse et de l'hypoxie

Les analyses des propriétés angiogéniques des cellules néoplasiques et du microenvironnement vasculaire suggèrent que l'angiogenèse est un phénomène ayant lieu au cours de divers lymphomes. Les cellules néoplasiques de lymphomes agressifs tels que le DLBCL, le lymphome du manteau ou encore la leucémie lymphoïde chronique expriment le VEGF (Foss, et al., 1997 ; Chen, et al., 2000). La figure 4 représente le microenvironnement vasculaire d'un lymphome.

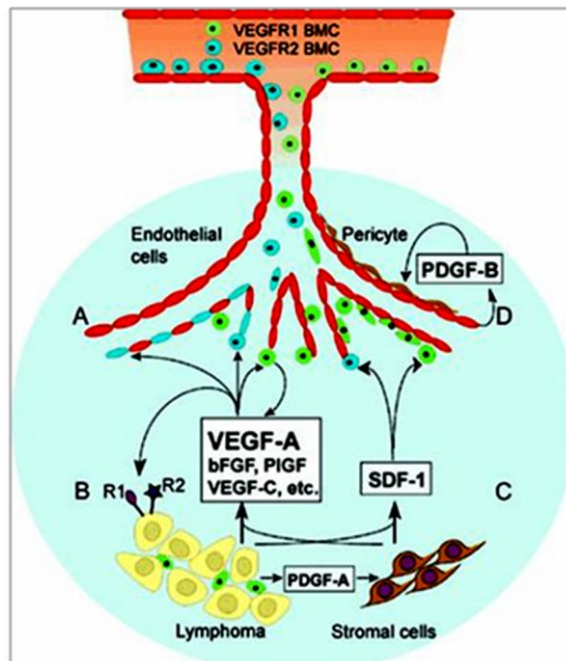


Figure 3 : Schéma du microenvironnement vasculaire d'un lymphome.

(A) Les cellules tumorales produisent du VEGF-A et d'autres facteurs angiogéniques tels que le bFGF, le PIGF et le VEGF-C ce qui induit la néo-angiogenèse via au moins deux mécanismes : l'angiogenèse due à des cellules endothéliales résidentes et la vasculogenèse par recrutement de cellules progénitrices issues de la moelle osseuse (BMC). (B) Le VEGF-A induit également par un phénomène autocrine la survie, la prolifération et la migration des cellules de lymphome qui expriment les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. (C) Le stroma composé de fibroblastes et de cellules inflammatoires fournit des facteurs angiogéniques supplémentaires comme la sécrétion de SDF-1. (D) Les cellules endothéliales produisent du PDGF-B qui permet le recrutement de péricytes (Ruan, et al., 2009).

Les cellules malignes expriment les récepteurs du VEGF. Le blocage des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 diminue le taux de croissance de xénogreffes tumorales humaines réalisées sur des souris NOD-SCID, ce qui suggère la mise en place de voies de survie autocrine et paracrine (Wang, et al., 2004).

Un facteur qui pourrait permettre de corrélérer l'angiogénèse à la survie est l'analyse de la densité des micro-vaisseaux (MVD : MicroVessels Density). Cependant, la valeur clinique prédictive de la MVD reste peu claire. En général, le taux de MVD tend à être plus important dans les sous-types agressifs de lymphomes comme le lymphome de Burkitt, le PTCL (Peripheral T-Cell Lymphoma), intermédiaire dans les DLBCL et plus bas dans les lymphomes indolents comme le lymphome folliculaire. Cependant, les données restent conflictuelles en ce qui concerne le DLBCL mais nous y reviendrons plus en détail dans la partie dédiée à ces lymphomes (Ruan, et al., 2009). L'angiogénèse semble donc être un phénomène important dans le développement et le maintien des cellules de lymphomes. Il paraît donc nécessaire de mettre en place des études visant à comprendre les enjeux de cette vascularisation pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Par les mécanismes responsables de la forte production de VEGF par les cellules tumorales et par conséquent de la néo-angiogénèse tumorale, il est classiquement fait référence à l'hypoxie mettant en jeu l'HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1). Les lymphocytes sont soumis à l'hypoxie durant leur développement pour acquérir des fonctions effectrices (Caldwell, et al., 2001), mais la présence et le rôle de zones hypoxiques dans les lymphomes ont été peu étudiés. Le chef d'orchestre des modifications fonctionnelles due à l'hypoxie est en effet la protéine HIF1 qui est composée de 2 sous-unités HIF1 α et HIF1 β . Alors qu'HIF1 β est exprimée de façon ubiquitaire, l'expression d'HIF1 α est fortement régulée par les niveaux d'oxygène (Semenza, 2007). En condition physiologique (normoxie), HIF1 α est dégradée alors que l'hypoxie permet sa stabilisation et sa fonction en tant que facteur de transcription, suite à son hétérodimérisation avec HIF1 β . HIF1 α est exprimée par les cellules B normales des centres germinatifs ainsi que par les cellules malignes issues de LNH comme par beaucoup de tumeurs solides, et permet d'activer des voies de signalisation oncogéniques (Stewart, et al., 2002 ; Semenza, 2010). La grande majorité des tumeurs, incluant les lymphomes, possèdent des zones d'hypoxie (Semenza, 2001). Cependant, les mécanismes d'adaptation des cellules malignes à ce phénomène restent inconnus à ce jour. Bien qu'HIF1 α soit stabilisée par l'hypoxie, d'autres phénomènes peuvent rentrer en jeu. En effet, il a été montré que la protéine NF κ B pouvait induire son activation de manière aberrante dans les lymphomes (Qiao, et al., 2010). Bien que le rôle d'HIF dans les lymphomes reste peu connu,

une stabilisation constitutive d'HIF1 α est observée dans beaucoup de lignées cellulaires de LNH, ainsi que dans les cellules tumorales de certains patients atteints de DLBCL et de lymphomes folliculaires. Ces données suggèrent un rôle potentiel de l'activation aberrante d'HIF1 α dans les LNH (Evens, et al., 2010).

Outre l'implication des signaux de survie fournis par la dérégulation d'un oncogène, l'activation du BCR ou l'infection par l'EBV, l'environnement joue donc lui aussi un rôle important dans le développement et le maintien de la tumeur. Dans la partie suivante, nous allons nous intéresser de manière plus spécifique au lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) qui fut celui que nous avons choisi d'étudier au cours de notre thèse.

2. Le lymphome diffus à grandes cellules B

Les lymphomes diffus à grandes cellules B constituent un groupe hétérogène de lymphomes agressifs. A l'heure actuelle, ils représentent en fonction des continents entre 30% et 58% des lymphomes non hodgkiniens ce qui en fait les lymphomes les plus communs à travers le monde. Au sein de l'Union Européenne, leur incidence est de 3-4/100 000 cas par an et elle augmente avec l'âge. Elle est en effet de 0,3/100 000 cas par an pour les personnes âgées de 35 à 39 ans et de 26,6/100 000/ an pour les personnes âgées de 80 à 84 ans (Morgan, et al., 1997 ; Tilly, et al., 2012). Le DLBCL peut être *de novo*, c'est-à-dire qu'il est détecté sur la biopsie ganglionnaire d'une personne n'ayant pas d'antécédent de lymphome, ou secondaire, dans le cas où il survient au cours de l'évolution ou la progression d'un autre lymphome.

2.1 Origine et évolution du classement des DLBCL

Initialement classé en tant que grade intermédiaire de pronostic par la « Working Formulation », il a par la suite été reconnu comme une entité distincte par la classification REAL et l'OMS. Selon la classification revue en 2008, le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) se définit comme une prolifération diffuse de larges cellules lymphoïdes néoplasiques de la lignée B, dont la taille du noyau est égale ou supérieure à celui d'un macrophage normal ou à plus de deux fois celui d'un lymphocyte normal. Différentes études morphologiques, biologiques et cliniques ont permis la subdivision des DLBCL en variants morphologiques (centroblastiques, immunoblastiques, riches en cellules T ou histiocytes), sous-types moléculaires et immunophénotypiques et en entités cliniques distinctes. La récente mise à jour de la classification WHO en 2008 a tenté de clarifier la situation en redéfinissant

ou en identifiant sur la base de leur localisation anatomique et d'aspects cliniques de nouveaux sous-groupes de DLBCL, dont certains avaient été décrits précédemment et inclus dans des variants morphologiques ou phénotypiques d'autres sous-types (Campo, et al., 2011 ; Swerdlow, et al., 2013 ; Martelli, et al., 2013). Ainsi, selon cette classification, on subdivise les DLBCL en 4 sous-groupes (voir tableau 1). Le premier, le plus important, reste biologiquement hétérogène et sans caractéristique ou pathologie spécifique, constituant ainsi en clinique le groupe NOS (Not Otherwise Specified). Le 2^e groupe est celui des DLBCL ayant une localisation majoritairement extra-nodale (ex : médiastinale, intravasculaire, cutanée ou au sein du système nerveux central...). Le 3^e groupe correspond aux tumeurs issues de la différenciation terminale post GC des cellules B (ex : le lymphome anaplasique à grandes cellules B ALK⁺). Enfin, le dernier groupe rassemble les cas de DLBCL à la frontière ou intermédiaires avec d'autres lymphomes comme le lymphome de Burkitt ou le lymphome classique de Hodgkin. Cependant chaque catégorie inclue toujours des variants morphologiques et/ou clinico-pathologiques. De plus, cette classification ne permet pas d'obtenir une réponse au traitement uniforme de la part des patients qui, avec un même score pronostic, ont une survie très différente. Ces différences de comportement reflètent les hétérogénéités génétiques et moléculaires à l'origine de l'agressivité et de la progression tumorale. De ce fait, la dernière décennie a été consacrée à des études cytogénétiques et histologiques permettant d'augmenter la résolution diagnostique dans le but de développer des thérapies personnalisées (Lossos & Morgensztern, 2006 ; Flowers & Armitage, 2010).

Diffuse large B-cell lymphoma.
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma (T/HRBCL)
EBV+ DLBCL of the "elderly"
DLBCL with a predominant extranodal location
Primary mediastinal (thymic) large B cell lymphoma (PMBL)
Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL)
Primary cutaneous DLBCL, leg type (PCLBCL, leg type)
Primary DLBCL of CNS
Lymphomatoid granulomatosis
Large-cell lymphomas of terminally differentiated B-cells
ALK positive large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma (PBL)
Primary effusion lymphoma (PEL)
DLBCL associated with chronic inflammation
B-cell neoplasms with features intermediated between DLBCL and other lymphoid tumours
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse and
Large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse and
Large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma

Tableau 1: Classement des différents sous-types de DLBCL.
Tableau de Martelli (Martelli, et al., 2013).

2.1.1 Profils d'expression génique

Les études des profils d'expression génique (GEP) ont permis de mieux définir les différents sous-types de DLBCL. La première étude non supervisée menée en 2000 sur 42 patients traités avec une chimiothérapie à base d'anthracycline a ainsi caractérisé deux sous-types majeurs du DLBCL : le sous-type GCB (Germinal Center B cell like) et le sous-type ABC (Activated B Cell like) dont les signatures transcriptionnelles étaient respectivement comparables à celles des lymphocytes B des centres germinatifs (CD10, Bcl-6...) et aux lymphocytes B activés périphériques (MUM1/IRF4, Foxp-1, Bcl-2...). Bien qu'aucun de ces profils génétiques ne soit corrélé avec un sous-type morphologique décrit, cette découverte a eu un gros impact clinique en ce qui concerne le diagnostic. En effet, de façon intéressante, l'étude a montré que les patients atteints du sous-type GCB répondaient mieux au traitement que les patients atteints du sous-type ABC (Alizadeh, et al., 2000).

Par la suite, un troisième type de DLBCL ne montrant ni l'expression des gènes des cellules B des centres germinatifs, ni celle des cellules B activées est découvert. Il est caractérisé par le fait que les patients atteints sont considérablement plus jeunes que les autres et que leur lymphome implique souvent des structures thoraciques. Il est alors nommé PMBCL (Primary Mediastinal B Cell Lymphoma). Le GEP a permis à cette époque de relier ce type de DLBCL au lymphome de Hodgkin puisque plus du tiers des gènes les plus fortement exprimés dans ce lymphome le sont aussi dans les cellules du lymphome de Hodgkin (Rosenwald & Staudt, 2003).

Une étude plus récente menée sur 73 patients et sur 21 lignées a mis en évidence 322 gènes mutés de manière récurrente dans les DLBCL. Ces mutations concernent des gènes déjà connus ou nouveaux ainsi que des voies de signalisation des DLBCL incluant des modifications de la chromatine (*ARID1A* et *MEF2B*), de NFκB (*CARD11* et *TNFAIP3*), de la PI3Kinase (*PIK3CD*, *PIK3R1* et *mTOR*), de gènes en relation avec la lignée B (*IRF8*, *POU2F2* et *GNAI3*) ou encore de la signalisation WNT (*WIF1*) (Zhang, et al., 2013).

Toutes ces études montrent l'hétérogénéité génétique impliquée dans la mise en place des différents types de DLBCL et mettent en évidence la nécessité d'élaborer des traitements plus spécifiques et personnalisés à chaque patient.

2.1.2 Profils histologiques

L'analyse des profils génétiques nécessite l'utilisation de tissu frais ou congelé et les coûts qu'elle engendre la rendent peu accessible. C'est pourquoi d'autres techniques ont été mises en place pour établir des profils protéiques capables de représenter au mieux les GEP. Parmi ces techniques, l'immunohistochimie est celle que l'on retrouve le plus fréquemment utilisée en clinique. Des algorithmes ont ainsi été élaborés sur tissus en paraffine pour permettre de différencier les lymphomes de type GCB de ceux de type ABC. Bien qu'imparfait, l'algorithme de Hans, schématisé sur la figure 5, est le plus utilisé en clinique. Il est corrélé à environ 80% au GEP et permet de différencier les deux sous-types selon trois marqueurs : CD10, Bcl-6 et MUM1/IRF4 (Hans, et al., 2004). Selon cet algorithme, les tumeurs CD10 positives et Bcl-6 positives/MUM1 négatives sont classées tumeurs GCB. Les cas restants Bcl-6 négatifs et Bcl-6 positifs/MUM1 positifs sont alors classés non-GCB ; ces derniers sont en majorité des types ABC caractérisés par l'expression négative de CD10 en présence d'une expression positive de MUM1/IRF4 (Hans, et al., 2004 ; Muris, et al., 2007). Un autre algorithme nommé algorithme de Choi basé sur 5 marqueurs immunohistochimiques (GCET1, CD10, Bcl-6, MUM1 et FoxP1) est corrélé à 87% avec les résultats du GEP (Choi, et al., 2009). De plus, une étude récente ayant ré-examiné les différents algorithmes a de même proposé l'algorithme Tally qui montre la meilleure concordance avec les résultats du microarray ainsi qu'une grande valeur pronostique (Meyer, et al., 2011).

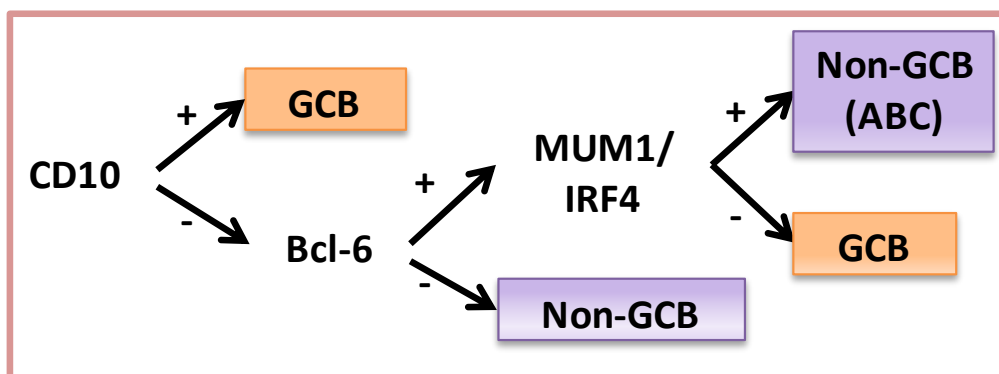


Figure 4 : Algorithme de Hans permettant de classer les DLBCL selon les sous types GCB et non-GCB. Cet algorithme utilise trois marqueurs : CD10, Bcl-6 et MUM1/IRF4. Schéma adapté d'après DePaepe & DeWolf-Peeters, 2007.

2.1.3 Sous-type GCB versus sous-type ABC

Tout d'abord, comme nous l'avons vu précédemment, les sous types divergent par le stade de maturation du lymphocyte B originel. Ainsi, la classification selon la cellule d'origine (COO) permet de déterminer 3 groupes principaux : le type GCB, le type ABC et les tumeurs dont le type n'est ni GCB ni ABC (Erik, et al., 2013). Cependant, plusieurs milliers de gènes différencient ces 2 types qui sont aussi associés à des altérations génétiques distinctes, l'activation spécifique de certaines voies de signalisations moléculaires et des réponses thérapeutiques différenciées, suggérant des mécanismes oncogéniques différents (Rosenwald, et al., 2002 ; DePaepe & DeWolf-Peeters, 2007). Nous allons passer en revue les données caractéristiques de chacun de ces sous-types. Les différences d'expressions géniques des sous-types GCB et ABC sont schématisées sur la figure 6.

Sous-type GCB :

Ces lymphomes sont caractérisés par l'expression d'une centaine de gènes qui définissent le stade des cellules B des centres germinatifs. Les clones malins ont souvent réalisé la commutation de classe des IgH et continuent de subir des hypermutations somatiques (Steinhardt & Gartenhaus, 2012).

BCL6 : Le sous-type GCB est caractérisé par l'expression de Bcl-6, un facteur de transcription qui comme nous l'avons vu précédemment (Figure 1) est nécessaire au développement des centres germinatifs et du processus de maturation d'affinité (Ye, et al., 1993 ; Allman, et al., 1996). En conditions physiologiques, Bcl-6 permet la régulation de molécules impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. Il régule négativement des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que CDKN1A (p21) et CDKN1B (p27^{kip1}) et empêche l'expression de la protéine TP53 (Frick, et al., 2011). Celle-ci est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la réplication, la réparation de l'ADN et le maintien de la stabilité génomique. Ainsi, l'expression de Bcl-6 favorise l'arrêt de la différenciation cellulaire, induit une prolifération accrue des cellules et permet une augmentation de l'instabilité génomique ce qui concourt à la transformation néoplasique. Cette contribution de Bcl-6 à la lymphomagenèse pourrait se produire quand l'inhibition de sa production, qui normalement se produit après la maturation d'affinité, n'est plus réalisée (Steinhardt & Gartenhaus, 2012).

Les translocations chromosomales, sur le locus 3q27 du gène *BCL6*, sont les plus caractéristiques et communes des anomalies génétiques détectées dans les DLBCL (30 à 40%) avec une proportion plus importante observée pour le type ABC (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. Finalement la dépendance des cellules tumorales à Bcl-6 n'est pas corrélée à la classification COO puisqu'elle est observée autant dans des lignées cellulaires GCB qu'ABC (Polo, et al., 2007).

BCL2 (B-cell Lymphoma 2) : ce gène code pour une protéine anti-apoptotique. Il est le premier membre de la famille Bcl2, qui compte aussi des membres pro-apoptotiques comme Bax, et qui constitue une famille de régulateurs clefs de la voie mitochondriale de l'apoptose (apoptose intrinsèque) (Cory, et al., 2003). Il a été découvert pour la première fois dans le cadre de la translocation t(14;18) observée dans 90% des lymphomes folliculaires (Tsujiimoto, et al., 1985). Cette translocation met le gène *BCL2* sous le contrôle du locus de la chaîne lourde des Ig, induisant une activation constitutive de la protéine anti-apoptotique ce qui favorise la survie des cellules B tumorales. La surexpression du gène *BCL2* est retrouvée dans 47 à 58% des DLBCL. Elle peut être due à la translocation t(14;18)(q32;q21) qui permet donc sa surexpression dans environ 20% des cas. Elle peut également être due à l'amplification du gène *BCL2* indépendamment de la t(14;18) dans 10% des cas de DLBCL de type GCB mais aussi 34% des types ABC (Gascoyne, 1997 ; Steinhardt & Gartenhaus, 2012).

PTEN : les délétions du gène codant pour le facteur suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) font partie des anomalies génétiques qui caractérisent le type GCB, détectées dans 15% des DLBCL de type GCB et pas dans le type ABC (Lenz, et al., 2008 ; Lenz & Staudt, 2010). Une étude très récente réalisée à partir de 248 tumeurs primaires de patients a depuis montré une perte d'expression de PTEN dans 55 % des tumeurs GCB contre seulement 14% des tumeurs non-GCB. Plusieurs mécanismes moléculaires contribuent à cette perte d'expression et notamment, en plus des délétions, un certain nombre de mutations qui aboutissent à une réduction de la stabilité de la protéine. De plus, dans les tumeurs comme les lignées cellulaires de type GCB, le statut d'expression de PTEN est inversement corrélé avec l'activation de la voie oncogénique PI3K/Akt (Pfeifer, et al., 2013). En effet, en tant que lipide phosphatase, PTEN est aussi le régulateur négatif majeur de la

voie PI3K/Akt, responsable de la déphosphorylation en 3' des phosphatidylinositol 3, 4, 5 triphosphates, impliqués dans l'activation de l'Akt (Cantley & Neel, 1999). Ainsi, la perte d'expression de PTEN fournit une explication à l'expression constitutive de la voie PI3K/Akt dans un grand nombre de DLBCL, favorisant la prolifération et la survie des cellules tumorales (Pfeifer, et al., 2013). Dans le cas du type GCB, la perte d'expression de PTEN peut également être la conséquence de l'amplification du locus du miR-17-92 connu pour réguler négativement *PTEN* (Xiao, et al., 2008).

Mutations et régulations épigénétiques : comme il a été vu dans la première partie de l'introduction, des régulations épigénétiques aberrantes ont un rôle dans la lymphomagenèse. Elles sont le résultat de mutations se produisant sur les gènes codant pour certains facteurs épigénétiques. On retrouve ainsi des mutations de la méthyltransférase EZH2 dans environ 20% des tumeurs GCB qui ne sont jamais observées dans les DLBCL de type ABC (Shaknovich & Melnick, 2011). De récentes études ont également mis en évidence les mutations d'histones acétyltransférases. Par exemple, des mutations du gène *CREBBP* sont retrouvées dans 32% des cas de type GCB alors qu'elles ne sont que de 13% dans le cas du sous-type ABC. Ces lésions sont pour la plupart mono-alléliques et retrouvées de façon fréquente pour d'autres lymphomes comme le lymphome folliculaire, suggérant qu'une réduction de l'activité HAT est très importante pour le processus de lymphomagenèse (Pasqualucci, et al., 2011).

REL : De façon inattendue, une anomalie récurrente des DLBCL (30% des cas GCB et 5% des ABC) concerne l'amplification du locus de ce gène qui code pour une sous-unité du facteur de transcription NFκB. Cependant, le rôle de cette amplification reste inconnu car elle n'est pas associée à l'expression de c-Rel au noyau et que la survie des cellules tumorales du sous-type GCB ne dépend pas de cette voie de signalisation (Lenz, et al., 2008 ; Staudt, 2010).

Sous-type ABC :

Bien que l'origine cellulaire du type ABC soit mal connue, ce groupe est caractérisé par une signature génique similaire à celle des plasmocytes normaux comme le montre le facteur de transcription XBP1 qui régule la sécrétion des Ig. Cependant, la différenciation terminale en plasmocytes sera bloquée. Ces lymphomes présentent de fortes quantités d'AID et les gènes de leur IgH sont fortement mutés. Néanmoins, la plupart des lymphomes de type ABC n'ont pas réalisé la commutation isotypique, contrairement aux lymphomes de type GCB, et les

cellules B tumorales expriment l'IgM à leur surface (Wright, et al., 2003 ; Lenz & Staudt, 2010).

IRF4/MUM1 : Ce gène codant pour une protéine de la famille des IRF (Interferon Regulatory Factor) est exprimé au sein des cellules T et B matures (Tsuboi, et al., 2000). C'est un régulateur de la différenciation et de la maturation des cellules lymphoïdes, myéloïdes et dendritiques. Il permet donc de caractériser le sous-type ABC (Alizadeh, et al., 2000) et a été utilisé par Hans dans son algorithme pour différencier les sous-types de DLBCL. Il est également observé dans un grand nombre de pathologies myéloïdes et lymphoïdes comme l'indique son nom MUM1 (multiple myeloma-1) (Gualco, et al., 2010).

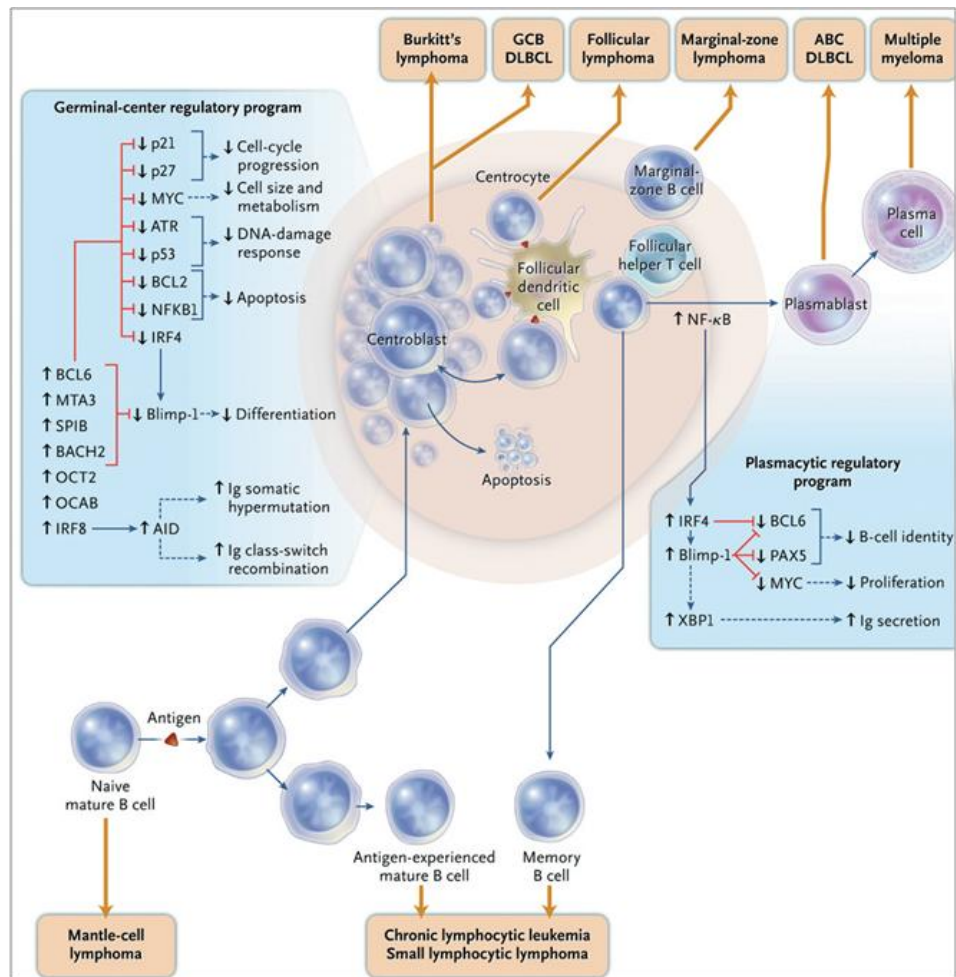


Figure 5 : Schéma des voies de survie oncogéniques des sous-types GCB et ABC.

Les lymphomes peuvent survenir à différents stades du développement des lymphocytes B normaux et notamment au cours de leur activation dans les centres germinatifs (GC). Un grand nombre de facteurs de transcription sont nécessaires à l'établissement et au maintien de l'identité et à la fonction des cellules du GC. Les lignes rouges indiquent l'inhibition d'un gène ou d'une fonction cellulaire par le facteur régulateur et les lignes bleues indiquent une régulation positive. Sur ce schéma sont indiquées les possibles origines de divers lymphomes non-Hodgkiniens, incluant les sous-types GCB et ABC du DLBCL (Lenz & Staudt, 2010).

L'activation constitutive de la voie NF κ B, caractéristique majeure du sous-type ABC, est responsable de l'expression d'IRF4 ce qui tend à pousser les cellules tumorales B vers la différenciation en plasmocytes. Cependant, d'autres mécanismes génétiques vont interférer avec cette différenciation comme l'inactivation de *BLIMP-1*. Ce blocage semble être une étape précoce dans la pathogenèse de type ABC (Davis, et al., 2001 ; Staudt, 2010).

NF κ B : Il s'agit en fait d'un complexe de cinq facteurs de transcription nommés RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 et NF- κ B2 qui régulent des gènes cibles par la formation d'homodimères ou d'hétérodimères. L'activation constitutive de la voie NF κ B dans le groupe ABC favorise la survie et la prolifération cellulaires ainsi que l'inhibition de l'apoptose. Ainsi, elle induit notamment la surexpression de *BCL2*, gène cible de NF κ B, ce qui explique, avec les amplifications de ce gène, que la plupart des DLBCL de type ABC présentent une forte expression de Bcl2 contribuant au mauvais pronostic associé à ce type (Viatour, et al., 2003 ; Lenz, et al., 2008). En conditions physiologiques, cette voie est inhibée par la liaison de protéines nommées I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ au complexe NF κ B. La stimulation de certains récepteurs de surface induit la phosphorylation de I κ B α et sa dégradation par le protéasome ce qui a pour conséquence la libération du complexe NF κ B et son activation en tant que facteur de transcription. Dans le cas du DLBCL de type ABC, l'activation de la voie NF κ B ne nécessite pas de stimulation par les récepteurs puisque l'activation est constitutive (Davis, et al., 2010 ; Lenz & Staudt, 2010). Les mécanismes responsables de l'activation constitutive de cette voie dans ces lymphomes ont été élucidés grâce à l'apport de la technique d'ARN interférence (par shRNA). Elle est en grande majorité due à l'activation constitutive du complexe de signalisation CBM formé par l'association de CARD11, Bcl10 et MALT1, et qui est nécessaire à l'activation de la voie NF κ B en aval de la signalisation du récepteur des cellules à l'Ag (BCR) (Krappmann, 2012 ; Fontán & Melnick, 2013). Dans les cellules normales, ce complexe est activé de façon transitoire après la stimulation par l'Ag. Dans les tumeurs ABC, il serait activé suite à différentes altérations génétiques : des mutations de CARD11 (environ 10%), ou une activation chronique du BCR elle-même liée soit à des mutations du BCR (ex : mutations de CD79A ou CD79B dans 20% des cas) ou de kinases activées en aval comme Syk, PI3K, BTK ou la PKC γ (Staudt, 2010 ; Sehn, 2012). De récentes études montrent que d'autres mécanismes peuvent aussi contribuer à l'activation constitutive de la voie NF κ B, comme la délétion génétique d'A20, régulateur négatif de NF κ B, observée dans 30% des DLBCL de type ABC (Compagno, et al., 2009). De même, des mutations de MYD88, une protéine adaptatrice impliquée dans la signalisation des récepteurs aux

interleukines et des TLR (Toll Like Receptor), mais qui active aussi NFκB, se produit dans 39% des tumeurs ABC (Ngo, et al., 2011 ; Kraan, et al., 2013).

JAK et STAT3 : Une autre conséquence importante de la signalisation de NFκB dans la biologie des cellules tumorales du groupe ABC est la production de cytokines IL-6 et IL-10 qui agissent via les kinases JAK et le facteur de transcription STAT3 en déterminant des signaux autocrines de survie (Lam, et al., 2008). Les tumeurs ABC présentent une forte signature des gènes cibles de STAT3 associée à des taux importants de STAT3 et à la présence de STAT3 phosphorylée au noyau, ce qui n'est pas le cas des tumeurs GCB. Finalement STAT3, interagissant physiquement avec NFκB, réalise une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ce facteur (Staudt, 2010).

BLIMP1 : Il a été montré que le gène *BLIMP1* est inactivé dans le sous-type ABC de plusieurs façons : délétions homozygotes, mutations non-sens et répression transcriptionnelle par la protéine Bcl-6 constitutivement activée dans 53% des DLBCL de type ABC. L'inactivation de ce gène induit la lymphomagenèse en bloquant la différenciation des cellules plasmiques (Pasqualucci, et al., 2006 ; Mandelbaum, et al., 2010 ; Calado, et al., 2010).

BCL2 : Tout comme dans le cas du sous-type GCB et en plus de son expression suite à l'activation constitutive de la voie NFκB, le gène *BCL2* peut être amplifié, favorisant la survie des cellules du sous-type ABC, ce qui est retrouvé dans 34% des cas (Staudt, 2010).

miRNA : ces dernières années, un certain nombre de travaux ont établi l'implication et le rôle de microARN (miRNA) dans le développement B normal mais aussi l'oncogenèse B. Les miARN font partie d'une classe d'ARN non codants de petite taille qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes, certains étant potentiellement impliqués dans la carcinogenèse. Dans le cas des DLBCL, les cellules tumorales présentent 10 à 30 fois plus de copies de miR-155 que les cellules B périphériques normales, avec un taux significativement plus fort pour le type non-GCB. Ce miRNA joue un rôle important dans le développement notamment des GC, sa présence diminuant les processus de SHM et de commutation isotypique ; de plus il régule négativement l'expression de CD10 qui comme nous l'avons vu, est un marqueur des GC. C'est aussi le cas de miR-21 impliqué dans l'activation de la voie PI3K en inactivant *PTEN* et miR-221 qui régule p27, que l'on retrouve fortement exprimés

dans le sous-type ABC (Lawrie, et al., 2007 ; Pezzolesi, et al., 2008 ; Jung & Aguiar, 2009 ; DiLisio, et al., 2012).

2.1.4 Marqueurs biologiques de pronostic

L'hétérogénéité des DLBCL est augmentée par l'expression variable d'un grand nombre d'anomalies moléculaires dont certaines ont été corrélées avec le devenir des patients. Depuis de nombreuses années, un grand nombre d'études ont mis en avant la recherche de biomarqueurs individuels à valeur pronostique. Ces études, souvent rétrospectives, sont menées sur des cohortes de patients ayant la plupart du temps reçu le traitement classique de chimiothérapie à base d'anthracycline (CHOP) ou celui auquel a été rajouté l'immunothérapie (R-CHOP). L'expression des biomarqueurs est ensuite corrélée au statut clinique des patients (Frick, et al., 2012 ; Perry, et al., 2012 ; Lossos & Morgensztern, 2006). Bien qu'elles aient permis d'améliorer la compréhension de la pathogénicité de ces lymphomes, beaucoup de ces études ont abouti à des résultats controversés. Les raisons de ces écarts sont sans doute liées à la nature rétrospective, la taille des échantillons de patients, le manque d'uniformité dans les techniques utilisées ou les traitements des patients, ou encore l'interférence avec d'autres mécanismes non pris en compte dans le devenir des patients. Ainsi par exemple, l'arrivée du rituximab dans les traitements en association avec la chimiothérapie a remis en cause ou a modifié sensiblement la réalité de certains biomarqueurs moléculaires définis avant l'introduction de cette immunothérapie (R-CHOP versus CHOP). C'est notamment le cas de Bcl-2 qui a été ré-évalué suite au traitement R-CHOP. Sa surexpression dans 40 à 60% des DLBCL avait été initialement associée à un mauvais pronostic mais on ne trouvait plus de corrélation avec la survie lorsque les patients recevaient la chimiothérapie et le rituximab. Puis des études récentes ont analysé le rôle de Bcl-2 au sein des 2 sous-groupes ABC/GCB chez des patients traités au R-CHOP. L'expression de Bcl-2 se révèle alors prédictive d'un mauvais pronostic chez les patients atteints du type GCB et pas ABC traités au R-CHOP, alors que l'inverse avait été initialement obtenu pour ceux traités uniquement au CHOP (Mounier, et al., 2003 ; Iqbal, et al., 2006 ; Iqbal, et al., 2011). Ces résultats opposés s'expliquent cependant par la différence des mécanismes à l'origine de la surexpression de Bcl-2 entre le groupe ABC et le groupe GCB, comme nous l'avons vu, et le mode d'action du rituximab inhibant certaines voies de survie activées constitutivement dans ces lymphomes (Sehn, 2012).

Le rôle de l'oncogène *MYC* a également été mis en évidence, les études montrant que le réarrangement du gène *MYC* est un facteur de mauvais pronostic chez les patients traités au

R-CHOP (Savage, et al., 2009). Plus récemment, sa signification clinique a été associée fortement à celle de Bcl-2. Les patients présentant la double translocation *MYC/BCL2* (« double-hit »), soit environ 5% des cas, sont associés à un très mauvais pronostic, avec une très faible espérance de vie (moins d'un an) (Aukema, et al., 2011 ; Johnson, et al., 2012 ; Li, et al., 2013). Une autre étude montre que le statut du gène *MYC* en concordance avec l'expression des protéines Bcl-2 et Bcl-6 permet de prédire la réponse au traitement des patients (Horn, et al., 2013 ; Lin & Medeiros, 2013). Enfin, l'étude d'un rare cas de lymphome « double-hit » possédant les translocations $t(6;14;18)(p25;q32;q21)$ suggère l'existence de deux translocations indépendantes *c-MYC/BCL-2* et *IRF4/BCL-2* (Tabata, et al., 2013).

Parmi les nouveaux marqueurs moléculaires évalués ces dernières années, il faut finalement citer les études sur les microARN. En effet, la mise en évidence de l'implication des microARN dans certains cancers s'est poursuivie par l'étude de l'expression de certains miARN au niveau tumoral ou, encore mieux, du profil d'expression d'un grand nombre de miARN (signature de miARN ou « miRNome ») par technique de microarray pour évaluer leur intérêt diagnostique et/ou pronostic. Il a été montré par plusieurs études que la réponse à plusieurs classes de médicaments anticancéreux pouvait être modulée par le niveau d'expression de certains miARN. C'est ainsi que dans le cas des DLBCL, les microARN comme miR-18a, miR-181a, and miR-222 sont prédictifs de la survie des patients traités au R-CHOP (Alencar, et al., 2011). Bien que ces travaux doivent être poursuivis et validés par d'autres études indépendantes, ces résultats sont déjà prometteurs et laissent espérer qu'ils pourraient, au-delà de leur valeur clinique, constituer à l'avenir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ainsi, un grand nombre de marqueurs ont pu être découverts mais à l'heure actuelle, ils ne sont pour la plupart pas encore utilisés en clinique en tant que facteurs de pronostic. Ces études ont permis cependant d'envisager et de rechercher des thérapies alternatives plus ciblées et individuelles pour traiter des patients, certes plus rares, mais qui en associant plusieurs anomalies génétiques sont les plus gravement atteints.

2.1.5 Importance du microenvironnement : lien entre signatures stromales, angiogenèse et hypoxie

Les études menées sur tissu microarray ont permis de classer le DLBCL en deux principaux types selon la cellule d'origine : les sous-types GCB et ABC. La survie globale à 5 ans des patients traités par chimiothérapie conventionnelle (CHOP-like) était alors de 60% pour les patients GCB contre 30% pour les patients ABC (Wright, et al., 2003). L'addition du rituximab à la chimiothérapie (R-CHOP) a permis une avancée thérapeutique considérable augmentant de 10 à 15% la survie des patients atteints de DLBCL, mais la corrélation entre ce traitement R-CHOP et la survie des patients est devenue plus incertaine (Tomita, et al., 2013). Une étude menée sur des patients traités par chimiothérapie (CHOP) ou par chimiothérapie et immunothérapie (R-CHOP) a permis de proposer un modèle composé de deux signatures distinctes capables de prédire la survie des patients pour les deux traitements. De manière intéressante, ces signatures reflètent des caractéristiques de cellules non malignes dans les DLBCL, mettant alors en lumière l'importance du microenvironnement dans ces lymphomes. Les deux signatures géniques ont été nommées signatures « stromal-1 » et « stromal-2 ». La signature « stromal-1 » est de bon pronostic. Elle est caractérisée par des gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire ou impliquées dans son remodelage (fibronectine, collagène, MMP, TIMP...) ainsi que par des gènes exprimés par la lignée monocytaire (*CEBPA*, *CSF2RA*) supposant une infiltration par des histiocytes. La signature « stromal-2 », quant à elle de mauvais pronostic, est caractérisée par des gènes codant pour des marqueurs des cellules endothéliales (Von Willebrand Factor, CD31...), des régulateurs de l'angiogenèse (VEGFR2, GRB10, intégrine alpha-9, TEK...) ou des gènes uniquement exprimés par les adipocytes (*ADIPOQ*, *FABP4*...). Compte tenu de la forte connexion de cette signature avec l'angiogenèse, la signature « stromal-2 » reflèterait une densité importante des vaisseaux sanguins au sein de la tumeur, qui a été finalement observée et associée à un mauvais pronostic (Lenz, et al., 2008).

De récents travaux effectués sur des patients traités CHOP ou R-CHOP ont mis en évidence le fait que la combinaison de seulement deux gènes, un marqueur des cellules tumorales (*LMO2*) et un marqueur du microenvironnement (*TNFRSF9*), est capable de prédire la réponse au traitement. Le premier gène code pour la protéine LMO2 (LIM domain only 2), facteur de transcription marqueur du sous-type GCB. L'autre gène code quant à lui pour le TNFRSF9 ou CD137 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 9) récepteur de co-stimulation exprimé par les cellules T infiltrant la tumeur, impliqué dans les fonctions effectrices des

lymphocytes (Natkunam, et al., 2008 ; Alizadeh, et al., 2011). L'expression seule de LMO2 s'est révélée être un exceptionnel moyen de prédiction à la fois du sous-type de DLBCL et de la survie des patients car associée à un bon pronostic quel que soit leur traitement. De même, la forte expression seule du TNFRSF9 est associée à un bon pronostic des patients traités au CHOP comme au R-CHOP. Finalement, la combinaison indépendante de ces 2 marqueurs s'est révélée être un puissant outil pour prédire la survie globale des patients, indépendamment du sous-type cellulaire, des signatures stromales ou des indices de pronostic cliniques (IPI). Ce nouveau modèle d'estimation de la survie basé sur 2 gènes a été finalement validé sur 3 cohortes indépendantes de patients et lorsque l'IPI est intégré au modèle, cela permet de stratifier les patients en 3 groupes de risques (faible, intermédiaire et fort). Ainsi les données obtenues par l'analyse de l'expression de seulement 2 gènes fournissent un outil de pratique clinique d'évaluation du risque, et devraient permettre de différencier les traitements proposés en fonction des risques établis pour les patients.

La signalisation du VEGF, dont le récepteur VEGFR2 est impliqué dans la néovascularisation en condition normale et pathologique, fait partie de la signature « stromal-2 ». Suite à cette découverte, un certain nombre d'études ont alors analysé le rôle de ces facteurs de croissance et angiogéniques ainsi que leur valeur clinique et pronostique dans les DLBCL. Les transcrits et la protéine VEGF ont été fortement détectés dans les DLBCL ainsi que dans d'autres types de lymphomes. Au niveau clinique, les cellules tumorales de la plupart des patients présentant un DLBCL co-expriment le VEGF et ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2, résultat retrouvé aussi dans les lignées cellulaires humaines de DLBCL (Wang, et al., 2004 ; Gratzinger, et al., 2008). De façon intéressante, les études montrent toutes une forte corrélation positive entre l'expression du VEGF et de ses récepteurs au niveau des cellules tumorales des patients suggérant, en plus du rôle angiogénique, l'implication de signalisations autocrines du VEGF dans la lymphomagenèse (Gratzinger, et al., 2007 ; Gratzinger, et al., 2008). La forte expression du récepteur VEGFR2 dans les tumeurs des patients traités au R-CHOP est corrélée à un mauvais pronostic, contrairement à celle du VEGFR1 qui semble plutôt favorable (Gratzinger, et al., 2008).

Comme nous venons de le voir, la forte expression de gènes reflétant la densité des vaisseaux (dont le VEGFR2) dans l'environnement tumoral a été associée à un mauvais pronostic dans le cas de certaines tumeurs de patients atteints de DLBCL (Lenz & Staudt, 2010). La possibilité d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant l'angiogenèse pour le traitement des cancers a suscité un intérêt de plus en plus fort pour l'évaluation de l'importance et de l'impact pronostique de la densité des micro-vaisseaux (MVD) dans les

DLBCL. Les études menées dans ce sens montrent que l'augmentation de la densité des micro-vaisseaux a été retrouvée associée de façon significative à un faible taux de survie des patients traités au CHOP (Gratzinger, et al., 2008). Le pronostic défavorable de la forte densité des micro-vaisseaux au sein des tumeurs a été très récemment confirmé sur 2 cohortes indépendantes de patients traités par immunochimiothérapie (R-CHOP). Cette dernière étude a de plus révélé que la MVD observée dans le groupe ABC était significativement plus forte que dans le groupe GCB, ce qui est concordant avec l'activation constitutive de la voie NF- κ B connue pour réguler aussi des gènes impliqués dans l'angiogenèse (Cardesa-Salzman, et al., 2011). Cependant, le lien entre la MVD et l'expression du VEGF localement au sein des tumeurs n'est pas établi. En effet, une étude menée sur 94 cas de DLBCL diagnostiqués *de novo* a montré une corrélation entre la MVD et le taux de VEGF suggérant alors un rôle paracrine du VEGF dans l'angiogenèse locale, alors qu'une autre étude menée par la même équipe sur 182 patients n'a permis d'établir aucune corrélation (Gratzinger, et al., 2007 ; Gratzinger, et al., 2008). Des études supplémentaires sont par conséquent nécessaires pour clarifier le rôle du VEGF produit par les cellules tumorales des patients sur l'angiogenèse locale, et pour préciser l'impact biologique et clinique de cette néovascularisation dans les DLBCL.

Par ailleurs, il convient de distinguer les taux de VEGF mesurés localement par immunohistochimie des taux circulants dosés dans les sérums des patients. Au niveau systémique, les données sont plus claires puisqu'une corrélation significative est observée entre les taux circulants de VEGF et la réponse au traitement ou la survie. Ainsi, l'augmentation du taux plasmatique du VEGF est associée à l'agressivité du DLBCL et à un mauvais pronostic (Salven, 2001). Cependant, le lien, si toutefois il existe, entre le taux circulant de VEGF et celui produit localement par les cellules tumorales n'est pas connu. Une étude très récente menée sur 157 patients traités de façon uniforme par chimiothérapie a confirmé la valeur prédictive du niveau plasmatique du VEGF avant traitement pour la réponse thérapeutique. Le taux circulant de VEGF pourrait par conséquent permettre de sélectionner des patients pour qui des alternatives thérapeutiques pourraient être proposées comme celles basées sur les inhibiteurs du VEGF (Lech-Maranda, et al., 2013).

La néo-angiogenèse tumorale est souvent en lien avec l'hypoxie cellulaire qui induit l'expression et la stabilisation du facteur de transcription HIF1, promoteur du processus angiogénique. Ainsi, une corrélation significative a été décrite entre l'expression de la forme phosphorylée (active) des récepteurs du VEGF (pVEGFR2), et la forte expression du VEGF avec HIF1 α dans les DLBCL. Il est aussi intéressant de noter que ces surexpressions de

facteurs angiogéniques et marqueurs d'hypoxie ne sont pas retrouvés dans les ganglions réactionnels sains, suggérant leur importance dans la lymphomagenèse et la prise en compte thérapeutique de ces lymphomes (Giatromanolaki, et al., 2008 ; Evens, et al., 2010). Plusieurs autres études ont confirmé la forte stabilisation de HIF1 α dans les DLBCL comparativement même à d'autres lymphomes B. Ainsi, une étude menée sur 82 patients atteints de FL et de DLBCL a montré que 44% des patients atteints de DLBCL avaient une expression modérée à forte de HIF1 α et HIF2 α contre seulement 11% pour les patients atteints de FL. 56% des patients atteints de DLBCL avaient une faible expression contre 32% pour les patients atteints de FL. Ces données pouvaient laisser penser que cette surexpression de HIF1 α serait en lien avec l'agressivité des DLBCL et par conséquent un mauvais pronostic. C'est effectivement ce qui est décrit dans beaucoup de tumeurs solides (Semenza, 2003). De façon surprenante cependant, l'étude de la survie des patients montre que l'expression d'HIF pourrait influencer le pronostic des patients (Evens, et al., 2008). Ces résultats ont été précisés plus récemment par une étude réalisée sur 153 patients atteints de DLBCL et traités soit par chimiothérapie CHOP, soit par immunochimiothérapie (R-CHOP). La forte expression d'HIF1 α est alors effectivement associée à une meilleure réponse thérapeutique mais uniquement lors du traitement R-CHOP. Ainsi, la survie sans progression de la maladie (PFS) et la survie globale à 5 ans des patients HIF1 α positifs versus les patients HIF1 α négatifs sont de : 71% vs 43% et 75% vs 54% respectivement (Evens, et al., 2010). Plusieurs explications à cette étonnante découverte sont envisagées : la régulation positive de l'expression du CD20, sous le contrôle aussi comme HIF1 α des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui expliquerait une meilleure réponse thérapeutique au rituximab ciblant le CD20. De plus, l'expression de HIF1 α est retrouvée associée dans cette étude avec celle d'autres gènes de la signature « stromal-1 » fortement impliqués dans la régulation de la matrice extra cellulaire (*BGN*, *COL1A2*, *COL5A1*, et *PLOD2*), signature dont nous avons vu qu'elle est favorable à la survie des patients (Evens, et al., 2010).

En résumé, l'expression d'HIF1 α est donc un facteur indépendant de pronostic favorable pour les patients atteints de DLBCL et traités au R-CHOP. Cependant, aucun lien ne peut être fait avec l'hypoxie actuellement. De même, une forte expression de marqueurs angiogéniques est corrélée de façon significative avec ce marqueur d'hypoxie dans les DLBCL contrairement aux ganglions sains, laissant penser que tous ces facteurs sont liés mais aucune relation fonctionnelle n'a encore pu être établie. Ces données montrent sans doute un aperçu de l'hétérogénéité et de la complexité du processus angiogénique dans les DLBCL, qui n'a probablement rien à voir avec celui des tumeurs solides. Des études seront donc nécessaires

pour confirmer et comprendre le rôle de l'hypoxie et/ou de l'angiogenèse dans le microenvironnement des cellules tumorales et leur impact sur la survie des cellules B malignes.

2.2 Facteurs cliniques de pronostic

Les différents stades de la maladie ont tout d'abord été définis grâce à la classification d'Ann Arbor. Cependant, cette classification ne permettait pas à elle seule de donner un pronostic sur le long terme. C'est pourquoi en 1993 a été développé l'index pronostic international (IPI), capable de prédire au mieux le devenir des patients.

2.2.1 Classification Ann Arbor

La classification Ann Arbor proposée en 1971 lors de la conférence du même nom a longtemps été utilisée pour classer les lymphomes hodgkiniens et non-hodgkiniens en stades anatomo-cliniques. Elle permet de déterminer le stade de la pathologie et donc d'adapter le type de traitement. Selon cette classification, on différencie quatre stades distincts de la maladie qui sont représentés dans le tableau 2 (Carbone, et al., 1971).

Stade de la maladie	Caractéristiques
I	Implication d'une seule région ganglionnaire ou d'un seul site extra-ganglionnaire.
II	Implication de deux ou plusieurs ganglions du même côté du diaphragme ou localisés/Implication d'un organe ou d'un site extra ganglionnaires et d'un ou plusieurs ganglions d'un même côté du diaphragme.
III	Implication de régions ganglionnaires situées de part et d'autre du diaphragme et qui peuvent être accompagnées par l'implication de la rate ou par l'implication localisée d'un organe ou d'un site extra-ganglionnaire ou les deux.
IV	Implication diffuse ou disséminée d'un ou plusieurs tissus ou organes extra-ganglionnaires, avec ou sans association avec un ganglion.

Tableau 2: Classification Ann Arbor des quatre stades du DLBCL.

2.2.2 Index pronostic international

Comme la classification Ann Arbor ne permettait pas de prédire la survie des patients à long terme, une étude nationale a été menée en 1993 par les scientifiques appartenant au projet national d'étude des facteurs pronostics des lymphomes non-Hodgkiniens (LNH). Ils ont ainsi créé un indice de pronostic international (IPI) capable de prédire la survie des patients atteints de LNH agressifs (Hermans, et al., 1995). Cet IPI a été basé sur l'analyse multiparamétrique de la survie de 2031 patients atteints de LNH agressifs qui ont par la suite été traités à la chimiothérapie (CHOP) entre 1982 et 1987. Cinq facteurs de risque ont été retenus durant cette étude revue par Shipp et al en 1993:

- L'âge des patients
- Le taux de lactate déshydrogénase (LDH) circulant: ce taux est un marqueur de lésions cellulaires et donc de la taille et de l'agressivité de la tumeur.
- L'étude de la performance : elle vise à déterminer la capacité du patient à supporter le traitement. Pour cela des « échelles de performance » ont été créées telle que l'échelle ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) allant de 0 à 4.
- Le stade clinique de la pathologie selon la classification Ann Arbor
- Le nombre de sites extra-ganglionnaires

L'IPI se calcule par l'addition des facteurs de risque défavorables et peut donc s'échelonner 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) (tableau 3).

International Prognostic Index (IPI) for DLBCL.			
IPI		aa-IPI	
Risk group	IPI factors	Risk group	IPI factors
Low	0 or 1	Low	0
Low intermediate	2	Low intermediate	1
High intermediate	3	High intermediate	2
High	4 or 5	High	3
IPI Factors			
Older than 60 years of age (not used for aa-IPI)			
Disease stage III/IV			
Lactate dehydrogenase level elevated			
ECOG performance score ≥ 2			
Extranodal disease > 1 site (not used for aa-IPI)			
aa-IPI, age-adjusted International Prognostic Index; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; IPI, International Prognostic Index; R-IPI, revised International Prognostic Index.			

Tableau 3: Echelonnage de l'Index pronostic international (IPI) et de l'IPI ajusté à l'âge (aaIPI).
D'après Martelli (Martelli, et al., 2013).

Le taux de rémission complète et la survie à 5 ans sont clairement différents en fonction de ce score. Les patients âgés de plus et de moins de 60 ans présentant des survies différentes, un index pronostique spécifique aux patients âgés de moins de 60 ans a été construit (aaIPI, age-adjusted IPI). Lorsqu'on restreint l'analyse aux patients âgés de moins de 60 ans, seuls trois paramètres conservent leur valeur prédictive : le stade Ann Arbor, le « performance status » et le taux de LDH. Cela permet d'identifier à nouveau quatre nouveaux groupes pronostiques dont les taux de réponse complète au traitement, de survie sans récurrence et de survie globale à cinq ans diffèrent significativement (tableau 3). C'est cet IPI adapté à l'âge qui est le plus fréquemment utilisé (Bosly, et al., 2008 ; Martelli, et al., 2013).

L'IPI est donc utilisé depuis 1993, à l'époque où le traitement consistait à administrer de la chimiothérapie à base d'anthracycline, communément appelé traitement CHOP (cyclophosphamide, hydroxydoxorubicine, oncovine, prednisone). Par la suite, le développement de l'immunothérapie et plus particulièrement des anti-CD20 tels que le rituximab (Mabthera) a permis d'améliorer considérablement la survie des patients. Cependant, la valeur pronostic de l'IPI n'était pas évaluée dans l'ère du rituximab. C'est pourquoi un nouvel index nommé R-IPI (IPI révisé) permettant d'inclure le nouveau traitement a été développé. Une étude menée en 2006 montre que le R-IPI permet de mieux prédire la survie des patients atteints de DLBCL que l'IPI standard (Sehn, et al., 2007). Une autre étude parue en 2010 montre que l'IPI standard reste un facteur de pronostic valide dans l'ère du rituximab pour les LNH agressifs (Ziepert, et al., 2010). Finalement, l'IPI ajusté à l'âge a été développé dans l'ère du rituximab et prédit mieux la survie des patients.

2.3 Traitements

Les patients atteints de DLBCL présentent diverses caractéristiques cliniques ainsi qu'un pronostic et une réponse au traitement variable. Le DLBCL étant un LNH agressif, l'absence de traitement limite la survie des patients à quelques semaines ou mois. Une fois diagnostiqués, c'est le score obtenu à l'IPI qui détermine le traitement à suivre.

La plupart des patients sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie lors du pronostic. Jusqu'à une dizaine d'années, le traitement consistait à administrer de la chimiothérapie à base d'anthracycline et/ou faire de la radiothérapie (Campbell, 2013) selon un protocole défini par le score obtenu à l'IPI. Le développement des anti-CD20, et plus particulièrement du rituximab, a permis d'améliorer considérablement la survie des patients. Cependant, un grand nombre d'entre eux continue à mourir de cette maladie du fait du grand nombre de mécanismes cellulaires de résistance thérapeutique.

2.3.1 Du traitement CHOP au traitement R-CHOP

Depuis les années 80, le traitement de base du DLBCL est la polychimiothérapie à base de cyclophosphamide, d'hydroxydoxorubicine, d'oncovine et de prednisone connue sous le sigle CHOP. Le cyclophosphamide est un agent alkylant de l'ADN. L'(Hydroxy)doxorubicine est une anthracycline qui inhibe la topoisomérase II. Elle induit également la production de radicaux libres et est un chélateur du fer capable de se lier à l'ADN pour induire l'apoptose. Elle inhibe également la synthèse d'ARN et d'ADN en s'intercalant entre les paires de bases et en créant un encombrement stérique. L'oncovine (ou vincristine) est un poison du fuseau mitotique qui, en interagissant avec la tubuline, cause l'arrêt du cycle cellulaire. La prednisone est quant à elle un agoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes. Sa fixation induit une diminution de la réponse inflammatoire par inhibition de la fonction des médiateurs de l'inflammation tels que les macrophages (revue d'évaluation du médicament, CHNIM, 2001).

Par la suite, le développement de l'immunothérapie a permis la création d'anticorps monoclonaux dirigés contre le CD20, récepteur spécifique des lymphocytes B. Le premier à être autorisé par la FDA (Food and Drug Administration) est le rituximab en 1998. Des études ont montré que l'association du rituximab à la polychimiothérapie classique permet d'augmenter la survie des patients. Le rituximab est alors devenu une base de traitement pour les patients atteints de DLBCL (Coiffier, et al., 2002 ; Feugier, et al., 2005 ; Habermann, et al., 2006 ; Pfreundschuh, et al., 2006).

Le DLBCL peut également être traité avec la radiothérapie mais ses bénéfices sont controversés à l'heure actuelle. Elle a longtemps été utilisée en combinaison avec le traitement CHOP avec ou sans rituximab pour traiter les patients avec une tumeur localisée. Un grand nombre d'études ont tenté de déterminer son intérêt dans les différents stades de la maladie (Miller, et al., 1998 ; Shenkier, et al., 2002 ; Bonnet, et al., 2007 ; Pfreundschuh, et al., 2006 ; Pfreundschuh, et al., 2008 ; Persky & Miller, 2009).

2.3.2 Les anti-CD20

Le CD20 humain, protéine transmembranaire non glycosylée de 32kDa, 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. Bien que ses fonctions biologiques soient peu connues, des études ont montré qu'il exerce ses fonctions via l'interaction avec des tyrosines kinases de la famille Src telles que Lyn, Fyn et Lck (Cang, et al., 2012). Les études *in vitro* montrent qu'il pourrait jouer le rôle de canal calcique (Putney & McKay, 1999). De plus, des souris déficientes pour le CD20 montrent une diminution de la réponse immunitaire T- dépendante, lui suggérant un rôle dans ce phénomène (Kuijpers, et al., 2010). Le fait qu'il constitue un marqueur de surface des lymphocytes pré-B et des lymphocytes B matures désigne le CD20 comme une cible thérapeutique de choix. C'est pourquoi ces dernières années ont été consacrées au développement d'anticorps monoclonaux capables de le cibler. Le succès du rituximab en clinique a développé l'intérêt pour ces anticorps et stimulé les recherches visant à comprendre leurs mécanismes d'action, cependant, chaque modèle possède ses limites. Les études menées *in vitro* permettent de comprendre des mécanismes spécifiques et ne reflètent par conséquent pas l'environnement clinique. Les modèles animaux, bien qu'ils se rapprochent de la réalité clinique, impliquent l'utilisation de souris immunodéprimées pour la xéno greffe de cellules malignes humaines et la formation des tumeurs ne respecte pas la localisation et la cinétique de la pathologie. Les essais cliniques menés sur patients représentent la source d'informations la plus riche mais visent à étudier l'efficacité d'un traitement et non à comprendre les mécanismes mis en jeu. En effet, même lorsque des études corrélatives sont effectuées en laboratoire, il demeure impossible d'évaluer les causes des effets observés en clinique. Les informations qui découlent de chaque modèle sont significatives mais les limites des études doivent être prises en compte quand il s'agit d'interpréter des résultats expérimentaux.

Il a été montré que les anti-CD20 sont capables d'exercer un effet anti-tumoral par divers mécanismes. En effet, ils peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et permettent de sensibiliser les cellules aux agents cytotoxiques. Ils permettent également d'induire l'apoptose des cellules cibles via la cytotoxicité induite par le complément (CDC) et la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC). Ces mécanismes sont décrits plus particulièrement dans le cas du rituximab dans la partie suivante.

2.3.3 L'ère du rituximab

2.3.3.1 Structure du rituximab

Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le CD20 produit par la fusion de la partie variable d'un anticorps murin dirigé contre le CD20 humain avec des parties constantes de chaînes lourde (IgG1) et légère (κ) humaines. L'aspect chimérique de cet anticorps lui accorde une spécificité accrue à l'antigène via la partie variable murine ainsi qu'une grande tolérance, atout majeur pour son utilisation en thérapie. Les régions constantes humaines interagissent avec les effecteurs de l'immunité pour induire la destruction de la cellule cible. L'isotype IgG1 confère au rituximab une pharmacocinétique semblable à celle des IgG humains. Par conséquent, sa distribution dans les compartiments intravasculaire et extravasculaire lui permet d'atteindre les ganglions impliqués dans la pathologie malgré leur architecture complexe (Weiner, 2010).

2.3.3.2 Mécanismes d'action du rituximab

En tant qu'anti-CD20, le rituximab est capable d'induire l'apoptose des cellules cibles par action directe ou par l'intervention des effecteurs de l'immunité innée (figure 6). Nous allons détailler chacun de ces mécanismes et leurs implications dans les modèles *in vitro*, *in vivo* et dans les études cliniques.

2.3.3.2.1 La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC)

L'ADCC met en jeu l'intervention des cellules de l'immunité innée. *In vitro*, elle est induite par la liaison de la partie Fc du rituximab aux récepteurs Fc γ (Fc γ Rs) des cellules effectrices telles que les cellules NK (qui expriment le récepteur de faible affinité pour la partie Fc des IgG Fc γ RIIIaR ou CD16), les granulocytes ou les macrophages (Manches, et al., 2003). Ces Fc γ Rs peuvent induire des signaux activateurs ou inhibiteurs en fonction de l'IgG qu'ils lient. La plupart des récepteurs activateurs s'associent à un homodimère de chaînes γ

(Fc γ R-chain). La transduction du signal d'activation est alors induite par les motifs ITAM situés sur la partie intracellulaire des chaînes γ responsables du recrutement de kinases cellulaires. Le récepteur inhibiteur Fc γ RIIb est quant à lui formé d'une simple chaîne. Il inhibe l'activation cellulaire lorsqu'il est co-activé avec un récepteur activateur. Le signal inhibiteur est alors transmis via le motif ITIM (immunoreceptor tyrosine based inhibition) situé sur la partie intracellulaire du récepteur et responsable du recrutement de phosphatases cellulaires (Boross & Leusen, 2012). Des études menées sur des modèles animaux ont montré l'importance du phénomène d'ADCC par l'interaction de la partie Fc du rituximab avec les Fc γ R activateurs. En effet, le rituximab est inefficace chez des souris n'ayant pas la chaîne γ responsable du signal activateur et montre un meilleur effet chez les souris n'ayant pas le récepteur inhibiteur Fc γ RIIb (Clynes, et al., 1998 ; Clynes, et al., 2000). Des études corrélatives menées en clinique ont montré que la réponse au rituximab est liée au CD16 porté par les cellules NK. En effet, chez certains patients, le CD16 possède une meilleure affinité pour les IgG1 due à un SNP (single nucleotide polymorphism) induisant le remplacement de la phénylalanine 158 par une valine. De manière intéressante, ces patients montrent une meilleure réponse au traitement (Cartron, et al., 2002 ; Weng & Levy, 2003).

Finalement des études menées chez la souris montrent que l'activation des cellules effectrices de l'ADCC peut aussi être la conséquence de la mise en jeu de la cascade du complément lors du traitement au rituximab. En effet, l'activation du complément induit la formation d'anaphylatoxines comme C3a et C5a qui peuvent recruter les cellules effectrices au site de la tumeur. Les macrophages possèdent le récepteur au C5a (C5aR). Ainsi, sa liaison par le C5a induit une augmentation de l'état d'activation de ces cellules, permettant d'amplifier l'effet de l'ADCC (Zhou, et al., 2008).

L'ensemble de ces données montre l'importance des cellules NK dans l'ADCC mais ne permet pas de déterminer si elles possèdent une action directe ou indirecte dans ce phénomène. En effet, *in vitro*, les cellules NK activées par liaison au rituximab produisent de l'IFN γ . Or, celui-ci est connu pour réguler positivement l'expression des Fc γ R des granulocytes (CD64) ce qui pourrait augmenter leur capacité à médier l'ADCC (Weiner, 2010).

2.3.3.2.2 La cytotoxicité dépendante de l'activation du complément (CDC)

Le rôle du complément dans l'effet du rituximab reste controversé à l'heure actuelle. Des études menées *in vitro* sur des lignées de cellules B malignes ou des cellules tumorales primaires montrent que le rituximab se lie à C1q, première protéine de la cascade de la voie classique du complément, et induit la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) (Cragg & Glennie, 2004). De plus, la surexpression des protéines régulatrices du complément (CRP) CD55 et CD59, impliquées dans son inhibition, induit une résistance des cellules B issues de lymphomes à la CDC. La neutralisation de ces CRP par des anticorps monoclonaux rétablit la sensibilité des cellules au complément (Ziller, et al., 2005). En revanche, les effets observés *in vivo* varient d'un modèle à l'autre, faisant du complément un mécanisme tout autant primordial pour certains d'entre eux, qu'inutile pour d'autres.

Les observations cliniques ne sont, quant à elles, pas en faveur d'un effet bénéfique du complément. Bien que des études montrent une activation du complément durant le traitement au rituximab chez certains patients, celle-ci est corrélée à une augmentation de la toxicité à l'origine de fièvre et/ou d'éruptions cutanées (Kolk, et al., 2001).

Si le rôle du complément dans les mécanismes de toxicité du rituximab est admis, la part de sa contribution dans l'efficacité de la thérapie anti-tumorale et la mesure dans laquelle il reste actif en dehors du compartiment intravasculaire restent méconnues. C'est là que réside l'enjeu des anti-CD20 de nouvelle génération qui, par une meilleure liaison au complément, apporteront peut-être une réponse (Weiner, 2010).

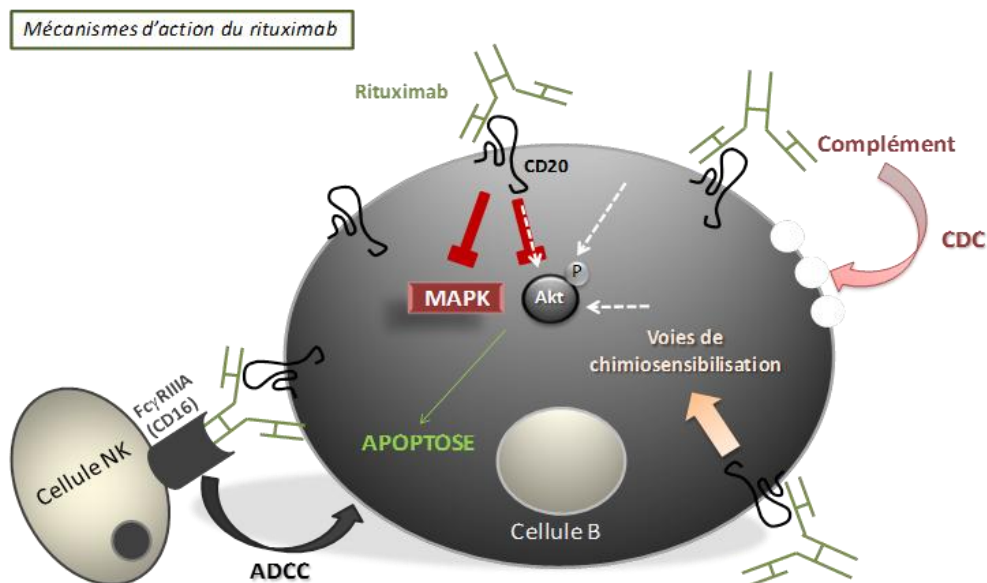


Figure 6: Mécanismes d'action du rituximab.

Le rituximab permet d'induire l'apoptose des cellules via sa liaison au CD20 par trois mécanismes distincts : la CDC, l'ADCC et l'apoptose induite par la signalisation du CD20 (Schéma adapté d'après Weiner, 2010).

2.3.3.2.3 Apoptose induite par la signalisation du CD20

Les études menées *in vitro* en l'absence d'effecteurs immunitaires ont montré que le rituximab pouvait induire l'apoptose de cellules B malignes, à un degré dépendant du type de lignée. La liaison du rituximab au CD20 induit une réorganisation fonctionnelle de ce dernier au sein de rafts lipidiques, permettant de potentialiser les signalisations découlant de cette interaction (Semac, et al., 2003). Ces signalisations incluent l'inhibition des voies de survie impliquant la kinase p38, NFκB et les voies de signalisation ERK et Akt/PI3K/mTOR (Jazirehi & Bonavida, 2005 ; Suzuki, et al., 2007 ; Weiner, 2010).

Des études cliniques montrent également que le rituximab peut induire la régression du lymphome indépendamment de l'intervention du système immunitaire. En effet, son injection dans le fluide cérébrospinal de patients atteints d'un lymphome du système nerveux central a montré un effet anti-tumoral local (Rubenstein, et al., 2007).

De manière étonnante et contradictoire, une étude récente a montré que le rituximab activait les voies de survie de Syk et Akt dans certaines lignées de lymphomes CD20 positives ainsi que dans des cultures primaires issues de six patients atteints de lymphomes B dont des DLBCL, et ce, de manière dépendante d'un fort taux de cholestérol membranaire. Cette suractivation de l'Akt est associée dans le cas des lignées à une résistance à l'apoptose qui serait en partie réalisée par l'activation d'HIF1α. Ainsi ces données nouvelles pourraient, en interférant avec les effets attendus du traitement au rituximab, permettre d'expliquer certaines résistances thérapeutiques. De plus, ces observations suggèrent que les taux de cholestérol membranaire des cellules tumorales pourraient représenter un nouveau biomarqueur capable de prédire la réponse des patients au rituximab (Nozaki, et al., 2013).

L'effet le plus probant du rituximab réside sûrement dans sa capacité à potentialiser l'effet des drogues cytotoxiques (Bonavida, 2007 ; Weiner, 2010). *In vitro*, les études montrent une potentialisation d'action entre le rituximab et les agents de la chimiothérapie (Emmanouilides, 2002 ; Jazirehi, et al., 2003 ; Vega, et al., 2009). Il semble de plus que les deux traitements possèdent des mécanismes d'action communs puisque les clones résistants au rituximab le sont également à la chimiothérapie (Jazirehi, et al., 2007). L'étude de l'ajout du rituximab à la chimiothérapie sur les modèles animaux a montré une potentialisation des deux traitements et a permis la mise en place du protocole clinique utilisé à l'heure actuelle (Mohammad, et al., 2002 ; Schliemann, et al., 2009). Les études cliniques comparatives ont montré l'efficacité de la combinaison rituximab et du traitement CHOP dans le cas des patients âgés atteints de DLBCL mais également pour les autres LNH et leurs rechutes ainsi que pour la LLC (Czuczman, et al., 1999 ; Coiffier, et al., 2002 ; Keating, et al., 2005 ; Habermann, et al.,

2006). De nouvelles combinaisons entre le rituximab et des agents de chimiothérapie sont à l'étude pour traiter les rechutes et les lymphomes résistants au traitement (Corazzelli, et al., 2009 ; Tsimberidou & Keating, 2009).

L'association du rituximab et de la chimiothérapie CHOP est donc devenue le traitement standard des patients atteints de DLBCL permettant d'améliorer la réponse au traitement et de permettre une rémission à long terme pour certains patients. Cependant, le rituximab n'est pas efficace pour tous les patients et certains développent des résistances, c'est pourquoi, comme nous le verrons plus loin, de nouveaux anti-CD20 sont à l'étude dans le but d'augmenter les effets anti-tumoraux.

2.3.3.3 Résistances thérapeutiques au R-CHOP

On définit par « résistants au rituximab » des patients qui ne répondent pas à un traitement contenant du rituximab, ou qui montrent une progression de la maladie au bout de six mois de traitement avec un régime à base de rituximab. Des mécanismes à l'origine de ces résistances ont été décrits pour chaque effet anti-tumoral du rituximab (CDC, ADCC, signalisation apoptotique et sensibilisation à la chimiothérapie). La compréhension de ces mécanismes permettrait de mettre en place de nouveaux traitements plus efficaces (Rezvani & Maloney, 2011).

Résistance à la CDC : Les CRPs (CD46, CD55 et CD59) sont des protéines capables de bloquer l'activation du complément ou d'interférer avec la formation du complexe d'attaque membranaire. Elles sont exprimées par un grand nombre de cellules cancéreuses et pourraient leur conférer une protection contre la lyse du complément (Beers, et al., 2010). *In vitro*, la neutralisation des CRPs par des anticorps permet d'augmenter l'efficacité du rituximab. Leur utilisation *in vivo* pose cependant quelques problèmes puisque les anticorps neutralisant ne différencient pas les cellules tumorales des cellules saines. Or, les cellules saines ont besoin de ces CRPs pour se protéger de la lyse du complément, d'où la difficulté d'élaborer de tels traitements (Golay, et al., 2001 ; Macor, et al., 2007).

Résistance à l'ADCC : bien que l'ADCC semble être le mécanisme d'action prépondérant du rituximab, il existe peu de données capables d'expliquer les résistances qu'elle implique. Elle nécessite la reconnaissance de la partie Fc du rituximab par les cellules effectrices. Une mauvaise exposition du fragment due à des modifications de la structure membranaire pourrait donc expliquer l'absence de lyse par les effecteurs. Comme nous

l'avons vu précédemment, le cholestérol semble jouer un rôle important dans l'effet du rituximab. Une étude a en effet montré qu'en présence de statines (inhibent la synthèse de cholestérol), l'ADCC induite par le rituximab est diminuée. Des altérations des rafts lipidiques contenant les complexes CD20-rituximab pourraient donc expliquer les résistances à l'ADCC (Rezvani & Maloney, 2011). De même, le polymorphisme du CD16 en faveur d'une diminution de l'affinité pour l'IgG1 pourrait expliquer en partie les résistances observées. En effet, les patients atteints de ce polymorphisme ont de plus faibles taux de réponse et de survie sans progression.

Résistances à l'apoptose : *In vitro*, le rituximab est capable d'induire l'apoptose de diverses cellules B malignes. Le développement de lignées cellulaires résistantes au rituximab et à la chimiothérapie a montré que la résistance n'était pas due à une régulation de l'expression du CD20, mais à une modification des voies de signalisations de survie. La balance survie/apoptose se fait par la modulation de l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bak ou anti-apoptotiques comme Bcl-2. L'un des facteurs souvent surexprimé dans les cellules résistantes est la protéine NFκB qui induit la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. L'inhibition de ces voies de signalisation permet en effet de re-sensibiliser les cellules au rituximab (Jazirehi, et al., 2007 ; Jazirehi & Bonavida, 2011).

D'autres mécanismes sont impliqués dans la résistance au rituximab. Des dysfonctionnements dans la maturation ou dans le trafic du CD20 peuvent en effet empêcher la reconnaissance de l'épitope par le rituximab (Ding, et al., 2013). Le microenvironnement tumoral pourrait également jouer un rôle dans les résistances puisque les effecteurs diffèrent en fonction de la localisation des cellules malignes. Chez des souris transgéniques surexprimant le CD20 humain, il a été montré que les cellules B circulantes sont détruites par le phénomène d'ADCC, alors qu'au sein de la zone marginale des ganglions elles sont détruites surtout par la CDC (Beum, et al., 2008). Il se pourrait également que la dose de rituximab soit impliquée dans la réponse et certains auteurs encouragent à utiliser des doses élevées de rituximab (Khouri, et al., 2005). Il a été montré que les patients répondant au rituximab avaient de plus forts taux d'anticorps plasmatiques que les patients ne répondant pas. Comme la pharmacocinétique du rituximab diffère d'un patient à l'autre en fonction de la pathologie, des études ont proposé des simulations pharmacocinétiques pour différentes doses de rituximab (Ternant, et al., 2009). Cependant, ces simulations doivent être validées par des études cliniques chez des patients atteints de DLBCL.

Concernant les résistances à la chimiothérapie CHOP, une étude très récente menée à partir d'approches de protéomique sur des tissus de 14 patients atteints de DLBCL, sensibles et résistants à la chimiothérapie a permis d'identifier 19 protéines exprimées de manière différentielle. La valeur pronostique de certains de ces biomarqueurs de sensibilité et de résistance a ensuite été validée par immunohistochimie sur des biopsies tumorales issues de 98 patients traités au R-CHOP. Ainsi, une augmentation de l'expression des protéines de sensibilité (S100A9, EZR, PLEK...) était corrélée à la réponse au traitement (Liu, et al., 2013). Ces données sont les premières à apporter des pistes dans la compréhension des bases moléculaires des résistances aux polychimiothérapies. Elles pourraient aussi permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques.

2.3.3.4 Vers de nouveaux anti-CD20

Des anti-CD20 de seconde génération ont été développés dans le but d'augmenter l'effet anti-tumoral dû au mécanisme d'ADCC. Pour cela, ils possèdent un fragment constant de meilleure affinité pour le CD16 des cellules NK. Parmi les anti-CD20 de deuxième génération, on trouve l'ofatumumab, le veltuzumab et l'ocrelizumab, tous trois d'origine entièrement humaine de façon à diminuer l'immunogénicité. Des études cliniques mettant en jeu ces anti-CD20 sont actuellement en cours.

Des anti-CD20 de troisième génération ont également été développés. Ils possèdent un fragment constant de meilleure affinité pour le CD16 des cellules NK. Pour trois d'entre eux, des tests cliniques sont actuellement en cours : l'AME-133v, le PRO131921 et le GA101 (Cang, et al., 2012).

2.3.4 Nouvelles thérapies ciblées

Bien que les anti-CD20 aient un grand avenir dans le traitement des LNH, la grande diversité des mécanismes impliqués dans ces pathologies nécessite la mise en place d'autres formes de traitements. Dans le cas du DLBCL, la voie de signalisation du BCR est responsable de l'activation constitutive des voies de survie, la signature stromale est prédictive de la survie et celle dont le pronostic est défavorable implique l'angiogénèse. Ces facteurs sont donc autant de cibles thérapeutiques à développer. Parmi les thérapies ciblées, on trouve des anticorps monoclonaux dirigés contre diverses cibles thérapeutiques, la radioimmunothérapie, les anticorps conjugués à un agent chimiothérapeutique, les molécules bispécifiques capables d'activer les lymphocytes T, les agents immunomodulateurs, les

inhibiteurs de kinases et la thérapie anti-angiogénique (Sehn, 2012 ; Cultrera & Dalia, 2012 ; Martelli, et al., 2013). Seules quelques stratégies seront détaillées dans cette partie.

2.3.4.1 Les anticorps monoclonaux

En dehors du CD20, d'autres marqueurs des cellules B peuvent être considérés comme des cibles thérapeutiques. Le CD22 est un marqueur spécifique des cellules B qui joue un grand rôle dans la signalisation et l'internalisation du BCR ainsi que dans le « homing » des cellules B. L'epratuzumab est un anti-CD22 humanisé qui a montré de bons résultats en phase I. Il est efficace et bien toléré. Bien qu'il ne montre pas d'effet important chez les patients atteints de DLBCL lorsqu'il est administré seul, il a une meilleure efficacité en combinaison avec le rituximab. Des tests permettant d'évaluer son efficacité en combinaison avec divers agents sont actuellement mis en place (Micallef, et al., 2011).

Le CD40 est quant à lui une protéine transmembranaire de la super famille des récepteurs au (TNFR) qui est exprimée par les cellules B et également par les cellules du DLBCL. Le dacetuzumab est un anti-CD40 humanisé qui induit à lui seul une inhibition de la croissance cellulaire. Il pourrait également avoir un effet sur l'ADCC. Une étude de phase I a montré sa tolérance et son efficacité chez des patients atteints de DLBCL (Advani, et al., 2009).

Le CD19, spécifique des cellules B, et le CD3, spécifique des cellules T, peuvent tous deux être ciblés par un anticorps bi-spécifique nommé blinatumomab avec un mode d'action très nouveau. Sa liaison au CD19 induit un arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose alors que sa liaison au CD3 induit une stimulation de la prolifération des lymphocytes T au contact des cellules B tumorales qu'ils attaquent. Une étude de phase I a montré que la moitié des patients sensibles à cet anticorps continuait d'y répondre un an après la thérapie (Nagorsen, et al., 2009). Des études sont encore en cours dans le cas du DLBCL notamment pour tester l'efficacité de cet anticorps sur des patients réfractaires ou en rechute.

Le CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) est impliqué dans la voie de signalisation responsable de la réduction de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi le blocage de cette voie pourrait permettre une augmentation de l'activité des cellules T contre les cellules tumorales. L'ipilimumab (MDX-010) est un anticorps antagoniste de cette voie approuvé par la FDA dans le traitement du mélanome réfractaire ou de ses rechutes. Une étude de phase I a montré des résultats encourageants dans le cas du DLBCL (Ansell, et al., 2009).

2.3.4.2 Les thérapies ciblant la voie du BCR

L'activation constitutive de la voie du BCR dans les DLBCL induit une sur-activation des voies de survie situées en aval impliquant un certain nombre de kinases qui peuvent alors être de potentielles cibles thérapeutiques. Parmi celles-ci on trouve les kinases Syk et Btk. Syk (spleen tyrosine kinase) est impliquée dans la survie des cellules B matures et est par conséquent constitutivement activée dans les lymphomes B. La Btk (Bruton's tyrosine kinase) est quant à elle impliquée dans la signalisation du BCR, nécessaire notamment pour l'activation de la PLC γ 2, et joue aussi un rôle important lors de la maturation B (Porto, et al., 2004). Cette kinase est particulièrement importante dans la survie des DLBCL de type ABC, même si elle est également exprimée par les DLBCL de type GCB.

Des études ont montré que l'inhibition de ces kinases pouvait permettre une régression des rechutes ou de LNH réfractaires (Cultrera & Dalia, 2012). Le fostamatinib disodium est un inhibiteur de Syk qui a montré des effets bénéfiques dans des essais de phase I/II incluant une cohorte de patients atteints de DLBCL. Les toxicités liées à la prise de ce médicament sont surtout hématologiques et réversibles, cependant des toxicités de grade 3/4 bien que rares sont aussi constatées (Chen, et al., 2008 ; Friedberg, et al., 2010). Le PCI-32765 est un inhibiteur sélectif et irréversible de la Btk. Il induit par conséquent une inhibition de l'activation des cellules B et empêche la croissance des cellules malignes qui la surexpriment. Les tests cliniques effectués montrent son efficacité pour traiter des patients atteints de LLC, de rechutes de LNH agressifs ou encore du DLBCL de type ABC. Des essais de phase II sont en cours sur des patients de type ABC versus GCB (Advani, et al., 2013 ; Byrd, et al., 2011 ; Staudt, et al., 2011 ; Dasmahapatra, et al., 2013).

2.3.4.3 Les anti-angiogéniques

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2.1.4, l'angiogénèse est l'un des facteurs responsables de l'hétérogénéité clinique du DLBCL. Par exemple, la signature « stromal-2 » de mauvais pronostic correspond à la mise en place de nouveaux vaisseaux au sein de la tumeur. Un grand nombre de stratégies anti-angiogéniques sont testées pour traiter les LNH. Parmi les thérapies testées pour le traitement du DLBCL, on trouve les anti-VEGF, les agents immunomodulateurs aux propriétés anti-angiogéniques ainsi que les composés ciblant la signalisation responsable de la croissance pro-angiogénique incluant la rapamycine (inhibiteur de mTOR) (Ruan, et al., 2009).

Les anti-VEGF : le bevacizumab (Avastin) est un anticorps monoclonal humanisé qui cible l'axe de signalisation du VEGF-A, permettant alors d'inhiber les voies de survie autocrines et paracrines qui en découlent. Une étude clinique visant à déterminer l'efficacité de cet anticorps en combinaison avec le traitement R-CHOP a été menée sur 13 patients avec des DLBCL non traités. Cinq patients ont montré une rémission complète, six autres une réponse partielle, et un une stabilisation de la maladie. Le taux de réponse était de 85%, le taux de réponse complète était de 38% et la survie à long terme sur 12 mois était de 77% (Ganjoo, et al., 2013). Une étude clinique de phase II réalisée pour évaluer l'effet du bevacizumab seul chez des patients atteints de DLBCL et de lymphomes du manteau en rechute a donné des résultats décevants (Stopeck, et al., 2009). Le faible taux de réponse s'explique sans doute par la complexité et la multitude des mécanismes mis en jeu dans l'angiogenèse dont certains sont redondants, et le dialogue entre les cellules tumorales et les cellules stromales (Ruan et Leonard, 2009). L'avenir de ces stratégies sera plutôt dans leur combinaison avec d'autres traitements anti-angiogéniques ou avec les traitements conventionnels. Ainsi une étude multicentrique de phase III est actuellement en cours sur des patients traités au R-CHOP en combinaison avec le bevacizumab.

Les agents immunomodulateurs : le lenalidomide est un immunomodulateur et anti-angiogénique de nouvelle génération qui a montré une activité clinique significative comme simple agent thérapeutique ou en combinaison avec le rituximab dans le cas de divers types de lymphomes. Le lenalidomide agit par plusieurs mécanismes bloquant la croissance tumorale par des effets tumoricides directs mais aussi de façon indirecte par ses actions immunomodulatrices. Cette drogue présente l'intérêt d'avoir à la fois des activités anti-angiogéniques et anti-prolifératives, déclenchant l'apoptose des cellules tumorales et inhibant certaines voies de survie comme celle de l'Akt ou NF- κ B (Reddy, et al., 2008 ; Martelli, et al., 2013). Son activité module l'environnement cellulaire tumoral et stimule les effecteurs cellulaires immunitaires de la réponse anti-tumorale (lymphocytes T cytotoxiques, cellules NK). Deux études cliniques de phase II ont été réalisées avec le lenalidomide seul sur des patients réfractaires ou en rechute atteints de LNH agressifs incluant des DLBCL. Dans ces études, le taux de réponse complète était de 19 à 28% pour les DLBCL avec 7 à 12% de réponses complètes (Witzig, et al., 2011 ; Wiernik, et al., 2008). Les patients réfractaires/en rechute des 2 sous-types de DLBCL présentaient de plus une réponse différente au traitement par le lenalidomide, le phénotype non-GCB étant caractérisé par une réponse significativement meilleure et une plus longue PFS que le phénotype GCB (Hernandez-

Ilizaliturri, et al., 2011). Ces résultats encourageants sont en cours de validation dans le cadre d'une étude multicentrique de phase 2/3. Ils pourraient permettre d'identifier un sous-groupe de patients atteints de DLBCL, qui pourraient bénéficier de cette nouvelle monothérapie à base de lenalidomide lors de rechute ou en cas de non réponse aux traitements conventionnels. Finalement une étude récente démontre qu'une thérapie combinant le rituximab et le lenalidomide par voie orale est à la fois relativement bien tolérée malgré des toxicités hématologiques de grade 3/4 et efficace pour des patients DLBCL réfractaires ou en rechute (Wang, et al., 2013).

Les inhibiteurs de mTOR : certains inhibiteurs sélectifs de mTOR ont montré une activité anti-angiogénique par inhibition de la production de VEGF due à l'activation d'HIF-1 α ainsi que des effets inhibiteurs sur la prolifération des cellules endothéliales (Mayerhofer, et al., 2002 ; Guba, et al., 2002). Ainsi, l'everolimus (RAD001, Novartis) est un dérivé oral de la rapamycin. Une étude récente montre qu'il est bien toléré par les patients et qu'il possède une activité lorsqu'il est associé au rituximab pour traiter des rechutes de DLBCL avec 38% de taux de réponses (Barnes, et al., 2013).

En conclusion, ces différentes drogues en cours de développement clinique s'annoncent prometteuses pour les DLBCL, notamment pour les patients réfractaires aux traitements conventionnels ou en rechute. De plus, leur efficacité semble potentialisée lorsqu'on les associe à d'autres stratégies thérapeutiques comme les inhibiteurs du protéasome, ce qui permettra sans doute de proposer là encore de futures alternatives ciblées et personnalisées (Dasmahapatra, et al., 2013).

3. Les neurotrophines

3.1 Histoire et structure des neurotrophines

3.1.1 Découverte des neurotrophines

L'identification de la première neurotrophine remonte au début des années 50. Cette « saga », définie comme telle par Rita Levi-Montalcini, auteure de cette grande découverte, a débuté lorsqu'elle fit l'hypothèse de l'existence d'une molécule soluble capable d'induire la croissance et la différenciation des cellules nerveuses d'embryon de poulet en développement (Levi-Montalcini & Hamburger, 1951). Cette molécule fut alors nommée « nerve growth-stimulating factor » et par la suite NGF. De manière surprenante, il fut détecté dans le venin du « *californian mocassin snake* » lors d'une tentative de purification. L'étude menée sur l'organe analogue des mammifères, la glande salivaire, a montré que le NGF était présent en grande quantité dans les glandes submandibulaires de souris mâles (Levi-Montalcini & Booker, 1960). L'abondante production de NGF par cet organe a ainsi permis de l'isoler et de mieux le caractériser (Aloe, 2011). Il a fallu attendre 1982 pour que le second membre de la famille des neurotrophines soit découvert et identifié comme un facteur de survie neuronal du cerveau de porc (Barde, et al., 1982). Cet homologue du NGF fut nommé « Brain Derived Neurotrophic Factor » (BDNF) (Leibrock, et al., 1989). Par la suite, deux autres neurotrophines ont été découvertes chez les mammifères : la neurotrophine 3, NT-3, identifiée grâce à l'étude des homologues de structure primaire entre le NGF et le BDNF (Hohn, et al., 1990 ; Jones & Reichardt, 1990 ; Maisonpierre, et al., 1990) et la neurotrophine 4/5, NT-4/5 (Hallbröök et al., 1991). Deux autres neurotrophines ont été identifiées exclusivement chez les poissons : la neurotrophine 6 (NT-6) (Götz, et al., 1994) et la neurotrophine 7 (NT-7) (Lai, et al., 1998 ; Nilsson, et al., 1998).

Les neurotrophines ont un rôle important dans le développement du système nerveux central et périphérique et sont impliquées dans la différenciation, la prolifération, la balance survie/apoptose, la myélinisation, ainsi que la croissance axonale et la plasticité synaptique des cellules neuronales et astrocytaires. Elles exercent leurs actions physiologiques par leur interaction avec divers récepteurs parmi lesquels figurent le récepteur dit de basse affinité $p75^{\text{NTR}}$ ainsi que des récepteurs de haute affinité nommés Trk (tropomyosin related kinase). Le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ a été découvert en 1973 et fut cloné pour la première fois en 1986 et identifié comme le récepteur du NGF (Herrup & Shooter, 1973 ; Chao, et al., 1986). Il s'avéra être par la suite le récepteur de basse affinité des neurotrophines ($K_d = 10^{-9}\text{M}$) et celui de

haute affinité pour les pro-neurotrophines. En 1986, le gène du premier récepteur Trk a également été cloné dans le carcinome du colon comme étant un oncogène fusionné avec le gène de la tropomyosine (Martin-Zanca, et al., 1986). Cet oncogène engendrait la production d'une protéine avec une activité tyrosine kinase constitutive, à l'origine d'une prolifération des cellules. Ce proto-oncogène, situé sur le chromosome 1, est nommé *NTRK1* (Neurotrophin Receptor Kinase 1) et code pour la protéine appelée tropomyosin-related kinase A (TrkA). Ce fut une surprise quand des années plus tard il s'avéra être le récepteur de haute affinité du NGF (Kaplan, et al., 1991 ; Klein, et al., 1991). Par la suite, deux autres récepteurs ont été identifiés grâce à leur homologie de séquence et de structure avec le récepteur TrkA. TrkB fut identifié comme étant le récepteur de haute affinité de BDNF et NT-4/5 et TrkC celui de NT-3 (Klein, et al., 1991 ; Lamballe, et al., 1991).

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. En effet, la présence des neurotrophines et de leurs récepteurs a été retrouvée dans de nombreux tissus non-neuronaux sains et même pathologiques (cancéreux), où ces facteurs de croissance semblent exercer des fonctions diverses notamment au cours du développement cardiaque, de la néo-vascularisation, et comme nous allons le détailler plus loin, dans le système immunitaire (Levi-Montalcini, et al., 1996 ; Aloe, 2001 ; Donovan, et al., 2000 ; Lin, et al., 2003 ; Vega, et al., 2003 ; Coppola & Tessarollo, 2004). Ainsi, les données structurales et fonctionnelles liées à la signalisation induite lors de la liaison des NTs à leurs récepteurs Trk et p75^{NTR} sont issues des études menées sur des modèles neuronaux comme des lignées cellulaires (ex : la lignée PC12 largement utilisée) ou des cultures primaires de cellules d'origine nerveuse. Ce sont ces données que nous allons présenter dans les paragraphes suivants pour décrire la structure des NTs et de leurs récepteurs ainsi que les différentes voies de transduction des messages qu'elles génèrent au sein de leurs cellules cibles pour réaliser leurs fonctions biologiques. De même nous nous attacherons surtout à détailler celles concernant les 2 neurotrophines qui ont fait l'objet de notre étude, à savoir NGF et BDNF.

3.1.2 Des gènes aux protéines des neurotrophines

3.1.2.1 Les gènes

Les gènes codant pour les neurotrophines sont conservés durant l'évolution et possèdent une structure similaire. Les études menées sur des poissons à mâchoires ont permis de montrer qu'ils sont issus des duplications successives du génome d'un chordé ancestral. Elles supposent également que les gènes *ngf/nt3* et *bdnf/nt4/5* ont évolué selon des événements de duplication séparés (Hallböök, 1999). Chez l'Homme, les gènes qui codent pour les neurotrophines NGF, BDNF et NT-3 se situent respectivement sur les chromosomes 1, 11 et 12 (Francke, et al., 1983 ; Ozçelik, et al., 1991). L'information permettant de coder le pré-pro-peptide se situe sur un seul exon discontinu. Il est précédé par des exons non codants qui subissent des épissages alternatifs et donnent naissance à des régions 5' UTR de l'ARNm non traduites. Les gènes des NTs possèdent divers promoteurs en amont de ces exons non codants. Le gène *ngf* possède 3 promoteurs, le gène *bdnf* quatre et le gène *nt3* deux. Les différents promoteurs donnent naissance à des ARNm possédant un seul exon non codant accolé à l'exon codant (Metsis, 2001). Le taux d'expression génique des neurotrophines, régulé par leurs promoteurs respectifs, peut être modulé par les interactions cellulaires au sein des tissus ainsi que par de multiples stimuli extrinsèques tels que Wnt et les membres de la famille du TGF- β , des hormones thyroïdiennes, des stéroïdes et également par des cytokines inflammatoires. La figure 7 représente le gène *bdnf*. Pour exemple, l'expression de BDNF est régulée par quatre promoteurs. De manière intéressante, l'expression de l'un d'entre eux est régulée au sein du cerveau par l'activité neuronale due à un flux entrant d'ions Ca^{2+} à travers un canal calcique de type L. Le Ca^{2+} ainsi accumulé dans le cytosol active la transcription de *bdnf* via une cascade de kinases qui conduit à l'activation de divers facteurs de transcription tels que le facteur CREB (cyclic AMP response element binding protein) et les facteurs de transcription activés par les ions Ca^{2+} . La transcription de *bdnf* est également favorisée par la phosphorylation dépendante du Ca^{2+} du répresseur transcriptionnel MeCP2 (methyl CpG-binding protein 2) ce qui permet son détachement du promoteur de BDNF (Reichardt, 2006).



Figure 7 : Schéma du gène *bdnf*.

Chacun des quatre exons 5' (I-IV) possède son propre promoteur et est combiné avec l'exon 3' (V) pour former un ARNm codant pour le pré-pro-BDNF. La petite bande blanche de l'exon V représente un site d'épissage alternatif qui donne naissance à deux variants pour chacun des quatre transcrits. Chaque ARNm est exprimé dans un tissu spécifique et est régulé au cours du développement. La portion de bande grise de l'exon V code pour le pré-pro-BDNF (Lessmann, et al., 2003).

3.1.2.2 Les protéines

Les neurotrophines (NTs) possèdent une structure et un processus de maturation semblables (figure 8). Elles sont produites sous forme de précurseurs nommés pré-neurotrophines d'environ 250 acides aminés qui sont acheminés au sein du réticulum endoplasmique (RE) via leur peptide signal. Le clivage de ce dernier donne naissance aux pro-neurotrophines (30-35kDa) qui peuvent s'associer directement en homo-dimères reliés par des liaisons non covalentes dans le RE et qui sont acheminées vers l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de vésicules de transports. Elles s'accumulent ensuite au niveau des replis membranaires du réseau *trans* golgien (Lessmann, et al., 2003). Les pro-neurotrophines sont clivées sur un acide aminé dibasique par des protéases intracellulaires telles que la furine, PACE4 (paired basic amino acid cleaving enzyme) ou des pro-convertases (PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PC7) ce qui permet de libérer la forme active de 12 à 14 kDa en C-terminal qui sera sécrétée par la cellule (Khatib & Geraldine, 2006).

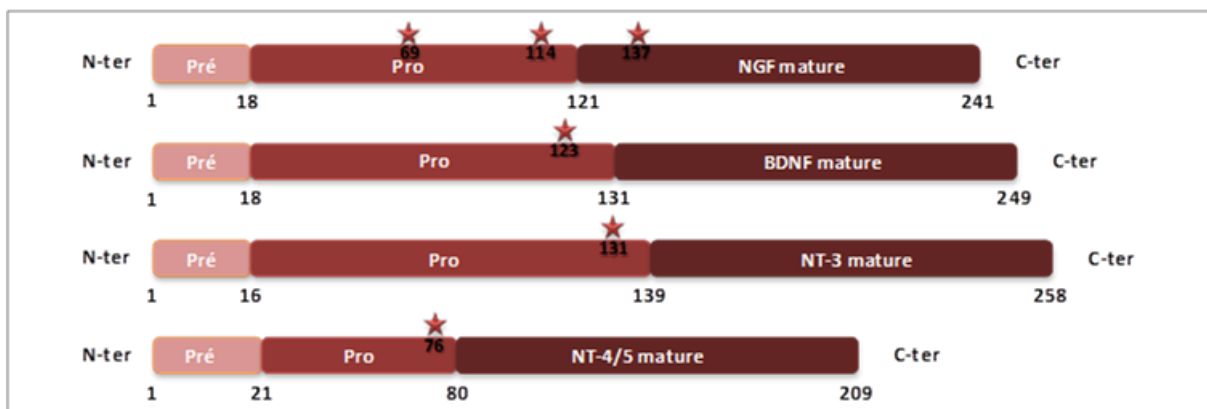


Figure 8 : Schéma des domaines constituant les neurotrophines.

Le peptide signal (18 à 21 acides aminés) est représenté en rose, le pro-domaine en rouge clair et le domaine de la neurotrophine mature en rouge foncé. Les étoiles symbolisent les sites potentiels de N-glycosylation. Schéma adapté d'après (Lessmann, et al., 2003).

Chaque NT ainsi obtenue forme des homo-dimères d'environ 26kDa par une liaison non-covalente. Les pro-neurotrophines peuvent également être sécrétées par la cellule et être clivées par des enzymes extracellulaires telles que la plasmine et des métalloprotéases (MMP-3, MMP-7 ou MMP-9) (Lee, et al., 2001 ; Pang, et al., 2004). Les sites de glycosylation 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). Ces différentes étapes de protéolyse intra et extracellulaire donnent ainsi naissance, au niveau du SNC, à de nombreuses isoformes des NTs dont les masses moléculaires vont de 12 kDa à 35 kDa. Les peptides de taille intermédiaire correspondent vraisemblablement aux différents

produits de clivage de furines protéases et de MMP extracellulaires (Lee, et al., 2001). 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). Une fois sécrétées, les NTs et les pro-NTs interagissent avec les récepteurs présents à la membrane plasmique. Les NTs possèdent une forte affinité pour les récepteurs Trk alors que les pro-NTs possèdent une forte affinité pour le récepteur p75^{NTR} ($K_d=10^{-10}\text{M}$) (Chao & Bothwell, 2002).

3.1.3 Les récepteurs Trk

3.1.3.1 Structure des récepteurs Trk

Les récepteurs transmembranaires Trk font partie de la famille des récepteurs TK (tyrosine kinase). Ces protéines, d'un poids moléculaire de 145kDa, possèdent des structures similaires aux glycoprotéines et, à l'image de leurs ligands, montrent des structures similaires. En effet, les homologies de séquence peptidique entre TrkA et TrkB, TrkA et TrkC et TrkB et TrkC sont respectivement d'environ 49%, 51% et 55% (Nakagawara, et al., 2005 ; Brodeur, et al., 2009). Ces récepteurs sont constitués de trois domaines distincts représentés sur la figure 9 :

- Le domaine extracellulaire possède une structure lui conférant une spécificité du ligand. Il possède une région riche en leucines entourée par deux régions riches en cystéines. La spécificité du récepteur pour un ligand donné est due à la présence de deux domaines « Ig-like » de type C2. En effet, le domaine « Ig-like » le plus proche du domaine transmembranaire contrôle la réponse des récepteurs TrkA, TrkB et TrkC à leurs ligands respectifs NGF, BDNF ou NT-4/5 et NT-3 (Patapoutian & Reichardt, 2001). Cependant, dans certaines conditions et en l'absence de son récepteur, la NT-3 peut se lier aux récepteurs TrkA et TrkB (Rydén & Ibáñez, 1996). Ces domaines « Ig-like » permettraient également d'empêcher l'activation des récepteurs Trk en l'absence de ligand (Benito-Gutierrez et al, 2006). Enfin, la partie extracellulaire du récepteur est très fortement glycosylée (Chao & 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).

- Le domaine transmembranaire est constitué d'une courte hélice.

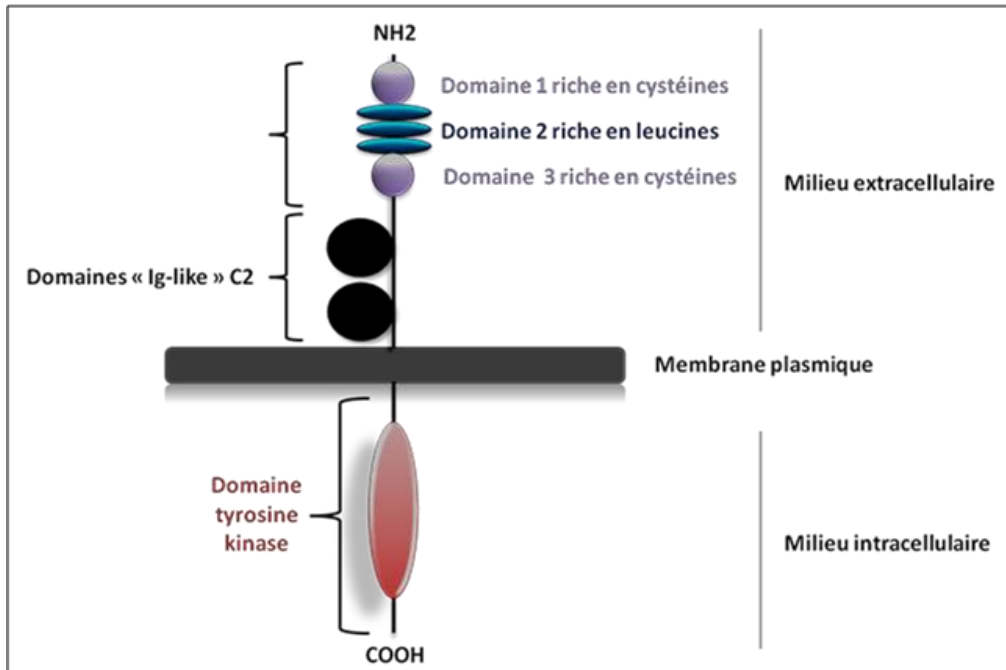


Figure 9 : Schéma de la structure des récepteurs Trk.

Les récepteurs TrkA, B et C possèdent une structure commune composée d'un domaine extracellulaire comprenant des régions riches en cystéines, leucines et deux domaines Immunoglobuline-like « Ig-like », un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine intracellulaire doté d'une activité tyrosine kinase. La liaison des NTs à ces récepteurs de haute affinité et leur dimérisation s'effectuent au niveau des domaines « Ig-like ».

- Le domaine intracytoplasmique contient le domaine à activité tyrosine kinase. La liaison des NTs à leur récepteur Trk résulte en une dimérisation de celui-ci ce qui induit l'activation du domaine kinasique. Il y a 10 résidus tyrosine conservés dans le domaine intracytoplasmique de chaque récepteur Trk, et 3 d'entre eux sont présents dans la boucle d'autorégulation du domaine à activité kinase. La transphosphorylation de ces acides aminés prolonge l'activation des kinases. La phosphorylation des autres résidus favorise la signalisation en créant des sites de recrutement pour des protéines adaptatrices qui couplent ces récepteurs aux cascades de signalisations intracellulaires parmi lesquelles figurent les voies Ras/Erk, PI3K/Akt et PLC δ 1 (Patapoutian & Reichardt, 2001 ; Reichardt, 2006).

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.

3.1.3.2 Isoformes de TrkA

Le gène *NTRK1* codant pour le récepteur TrkA est situé chez l'Homme sur le chromosome 1 et plus précisément en 1q21 (Valent, et al., 1997). A l'heure actuelle, trois isoformes du récepteur TrkA ont été découvertes. Elles sont nommées TrkA-I, TrkA-II et TrkA-III (Brodeur, et al., 2009):

- L'isoforme TrkA-I est retrouvée principalement dans les tissus neuronaux. Elle est constituée de 790 acides aminés car il lui manque l'exon 9 codant pour 6 acides aminés de la région extracellulaire proches du domaine transmembranaire de la protéine. Ceci n'altère cependant pas la liaison de NGF et l'activation du récepteur vers une signalisation de survie et de différenciation neuronale.
- L'isoforme TrkA-II, la plus commune, est non épissée et la plus longue. Elle est retrouvée dans les tissus non-neuronaux, et plus particulièrement dans les cellules hématopoïétiques et les cellules immunitaires (Barker & Shooter, 1994). Elle est constituée de 796 acides aminés et montre une réponse accrue à la NT-3.
- L'isoforme TrkA-III est retrouvée tôt lors du développement. Elle est épissée à partir des exons 6, 7 et 9 et est constitutivement active indépendamment de la présence d'un ligand. Les études menées par Tacconelli ont montré qu'elle favorise l'angiogenèse et la résistance au stress hypoxique de lignées issues de neuroblastome humain (Tacconelli, et al., 2005).

3.1.3.3 Isoformes de TrkB

Le gène *NTRK2* codant pour le récepteur TrkB est situé sur le chromosome 9 (9q22), mesure 350 kb et contient 24 exons (Stoilov, et al., 2002). Ce gène permet la transcription de plus de 100 ARNm de 0.7 à 9 kb et au moins 36 isoformes protéiques de la protéine TrkB sont traduites à partir de ces transcrits (Middlemas, et al., 1991 ; Luberg, et al., 2010). Le codon initiateur de la forme totale du récepteur en N-terminal se situe sur l'exon 5 et permet la traduction de trois protéines principales chez l'Homme (Fenner, 2012 ; Wong & Garner, 2012).

- Le récepteur TrkB-TK⁺ ou TrkB FL (full length) est généré à partir de l'épissage alternatif de l'exon 24.
- Le récepteur TrkB-T1 ou TrkB-TK⁻ est l'isoforme la plus courte, retrouvée dans de nombreux tissus comme le cerveau, le cœur, les poumons, le muscle squelettique, les reins ou le pancréas. Cette isoforme est générée par l'épissage alternatif de l'exon 16. Ce récepteur tronqué possède le domaine extracellulaire permettant la liaison de BDNF et de NT-4/5 ainsi que la partie transmembranaire. Il est en revanche dépourvu du domaine C terminal intracellulaire et ne possède donc pas d'activité tyrosine kinase (TK).
- Le récepteur TrkB-Shc, identifié uniquement dans le cerveau, est quant à lui généré par l'épissage alternatif de l'exon 19. Il partage 100% d'homologie du domaine extracellulaire avec TrkB-T1 car tronqué aussi du domaine kinasique C terminal mais diffère par sa partie intracellulaire possédant un domaine de liaison aux protéines Shc (Stoilov, et al., 2002).

3.1.3.4 Isoformes de TrkC

Le récepteur TrkC est codé par le gène *NTRK3* situé chez l'Homme sur le chromosome 15 en position 15q25 (Valent, et al., 1997). Tout comme pour les récepteurs TrkA et TrkB, l'épissage alternatif des ARNm permet d'obtenir diverses formes tronquées du récepteur à l'origine d'un défaut d'activité tyrosine kinase. Il existe quatre isoformes tronquées et dépourvues d'un domaine kinasique complet, mais seul TrkC-T1 semble avoir un rôle important *in vivo* (Esteban, et al., 2006).

3.1.4 Le récepteur p75^{NTR}

3.1.4.1 Structure du récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} est une protéine glycosylée de 75kDa (396 acides aminés), membre de la superfamille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor). Il est constitué d'un domaine extracellulaire impliqué dans la liaison au ligand, d'un domaine transmembranaire et d'une courte séquence intracytoplasmique dépourvue d'activité catalytique (figure 10) (Roux & Barker, 2002 ; Skeldal, et al., 2011).

- Le domaine extracellulaire (ECD) est constitué d'un peptide signal clivable de 28 acides aminés suivi par 4 domaines riches en cystéine (CRD) conservés de 40 acides aminés avec 6 résidus cystéine (CRD1 à CRD4) permettant la liaison au ligand ainsi qu'une région riche en sérine/thréonine (Welcher, et al., 1991). Le premier domaine riche en cystéine (CRD1) contient un site de N-glycosylation. Le récepteur p75 est présent à la membrane cellulaire sous forme d'homodimères capables de lier les NTs selon un complexe symétrique (Gong, et al., 2008 ; Feng, et al., 2010) mais également selon un complexe asymétrique via une stœchiométrie 1:2 (He & Garcia, 2004). La partie juxta-membranaire contient quant à elle des sites de O-glycosylation.
- La partie transmembranaire est constituée d'une simple hélice.
- Le domaine intracellulaire, long de 155 acides aminés, ne possède pas d'activité catalytique mais il est palmitoylé au niveau de la cystéine 279 (Barker & Shooter, 1994 ; Roux & Barker, 2002) et phosphorylé sur des résidus sérines et thréonines (Grob, et al., 1985 ; Taniuchi, et al., 1986). Il contient un domaine de mort DD (Death Domain) de type II de 80 acides aminés semblable à celui des récepteurs au TNF (Roux & Barker, 2002 ; Skeldal, et al., 2011). Ce domaine de mort est constitué de deux groupes perpendiculaires de 3 hélices formant une structure globulaire. La présence d'une zone dépourvue de résidus chargés suppose qu'il existe un site d'interaction avec des cibles en aval (Liepinsh, et al., 1997). Le domaine de mort permet d'induire l'apoptose cellulaire via son interaction avec des protéines adaptatrices telles que NADE (p75^{NTR} Associated cell Death Executor), RIP2 (Receptor-Interacting Protein-2) et RhoA (Ras homolog gene family, member A) qui activent la cascade des caspases (Roux & Barker, 2002). Au niveau de la région juxta-membranaire se trouve un domaine nommé « Chopper » de 29 acides aminés capable d'induire une mort cellulaire rapide lorsqu'il reste lié à la membrane ou lorsqu'il est palmitoylé (Coulson, et al., 2000). Il possède la séquence la plus conservée du récepteur p75^{NTR} avec une homologie de 95% entre l'Homme, le rat et le poulet (Large, et al., 1989). Ce domaine comporte 4 sites potentiels d'interaction avec des protéines adaptatrices. Parmi elles, on trouve les protéines de la famille TRAF (TNF Receptor Associated Factor). Des co-immunoprécipitations ont montré que les 6 protéines TRAF peuvent s'associer avec le récepteur p75^{NTR} sans le lier directement et que cette association peut parfois dépendre de la liaison avec les NTs. TRAF4 et

TRAF6 s'associe avec la région juxta-membranaire alors que TRAF2 se lie à la région C-terminale (Coulson, et al., 2000). Il semble donc que seuls TRAF4 et TRAF6 puissent interagir avec le domaine Chopper (Krajewska, et al., 1998 ; Khursigara, et al., 1999).

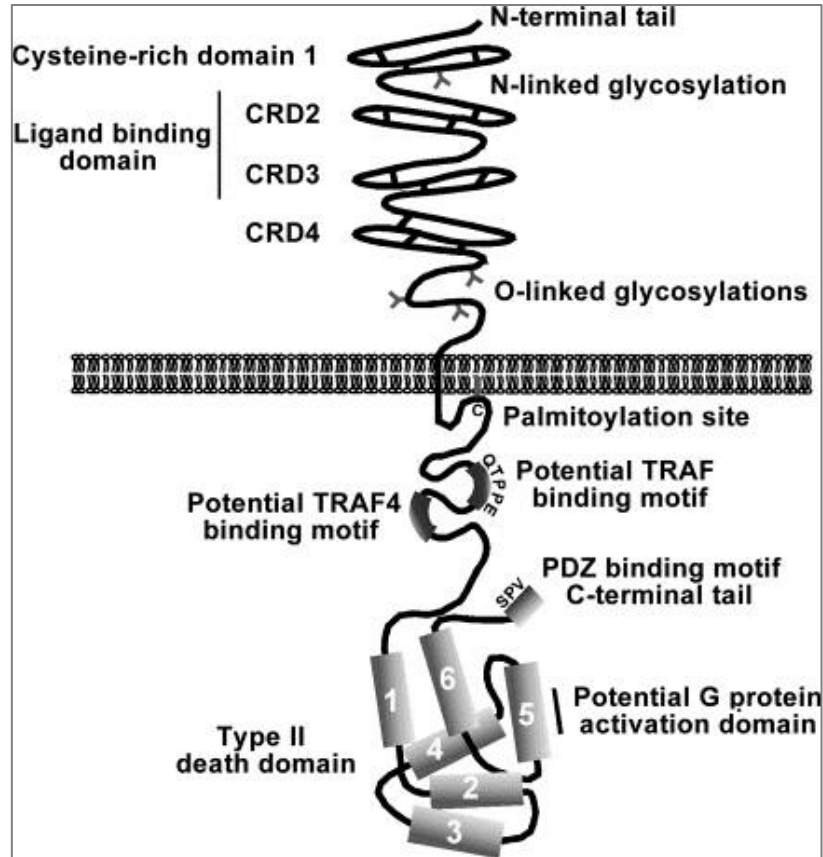


Figure 10 : Schéma de la structure du récepteur $p75^{\text{NTR}}$.

Le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ est un récepteur transmembranaire de type I possédant un domaine extracellulaire contenant quatre domaines riches en cystéines (CRDs – cysteine-rich domains), et de multiples sites de O et N-glycosylation. Le domaine intracellulaire contient un site de palmitoylation sur la cystéine 279, des sites potentiels de liaison à TRAF, un domaine de mort de type II, un domaine potentiel d'activation de protéine G et un domaine contenant un motif PDZ (Roux & Barker, 2002).

3.1.4.2 Isoformes de $p75^{\text{NTR}}$

Le gène $p75^{\text{NTR}}$ codant pour le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ contient 6 exons et est situé chez l'Homme sur la région 17q12-17q22 (Huebner, et al., 1986 ; Sehgal, et al., 1988). On retrouve diverses isoformes du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ dues à l'épissage alternatif des ARNm mais également au clivage de la protéine. Le gène codant pour $p75^{\text{NTR}}$ permet l'expression d'isoformes du récepteur ne possédant pas de domaine de liaison aux NTs. Le plus commun ne possède pas l'exon III qui code pour les domaines riches en cystéines 2, 3 et 4 (Dechant, et al., 1997 ; Schack, et al., 2001). Ces variants sont nommés $s-p75^{\text{NTR}}$, et malgré l'absence de

domaine de liaison des NTs, ils pourraient interagir avec des protéines de signalisation intracellulaires via leur fragment C-terminal (CTF) ce qui leur conférerait une fonction indépendante du ligand (Skeldal, et al., 2011) (figure 11). Bien que la liaison de son ligand représente la façon la plus fréquente d'activer la signalisation en aval de ce récepteur, d'autres facteurs structuraux sont impliqués dans la transduction du signal. Ainsi, comme beaucoup d'autres récepteurs membranaires apparentés, $p75^{\text{NTR}}$ peut être clivé par des α -sécrétases extracellulaires telle que ADAM 10 et ADAM 17/TACE (TNF Alpha Converting Enzyme). Ce clivage génère un fragment extracellulaire soluble nommé $p75\text{-ECD}$, ou ectodomaine, capable de lier les NTs et un fragment C-terminal ou $p75\text{-CTF}$ comprenant les domaines transmembranaire et intracellulaire (ICD) de la protéine (Zupan, et al., 1989 ; DiStefano, et al., 1993 ; Zampieri, et al., 2005).

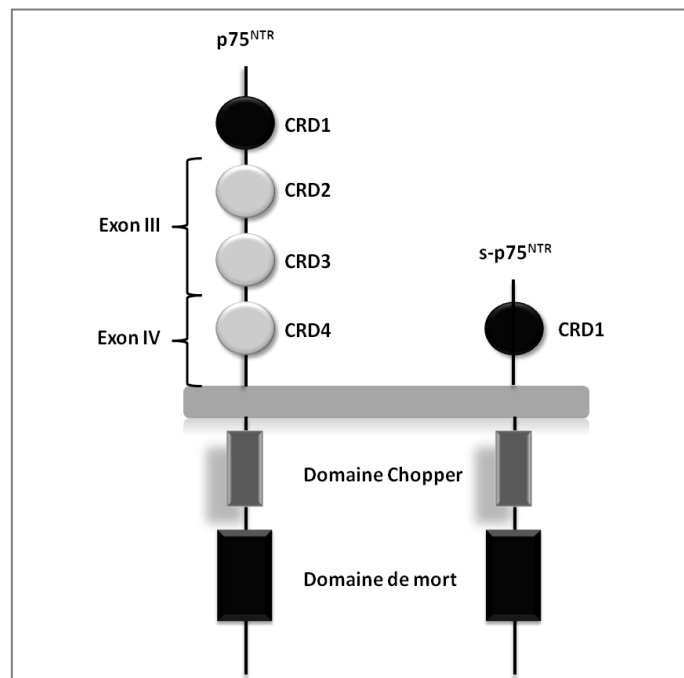


Figure 11 : Schéma de la structure du récepteur total $p75^{\text{NTR}}$ et de son isoforme tronquée $s\text{-}p75$.
Schéma adapté d'après (Fujii & Kunugi, 2009).

Le fragment CTF peut ensuite être clivé par un complexe de γ -sécrétases intracellulaires (presenilin dépendant γ -secretase) pour libérer dans le cytosol un fragment soluble intracellulaire nommé $p75\text{-ICD}$ capable d'interagir avec TRAF6, SC-1, NADE, NRAGE et RhoA (Hempstead, 2002). Il peut également jouer le rôle de facteur de transcription (Kanning, et al., 2003 ; Jung, et al., 2003).

3.2 Signalisations induites par les récepteurs des neurotrophines

Comme il a été dit précédemment, les NTs sont des facteurs de croissance essentiels à la survie, au développement et à l'activité des neurones. Mais on sait maintenant que ces facteurs de croissance ne sont pas exclusifs du système nerveux et réalisent leur fonction dans d'autres tissus comme ceux du système immunitaire. Ainsi, Levi-Montalcini propose en 1996 le paradigme « des neurotrophines aux neurokines » évoquant la fonction de type cytokine que semblent jouer certaines neurotrophines comme le NGF sur de nombreuses cellules immunitaires. Nous avons choisi d'étudier le rôle des NTs dans le cas d'une maladie lymphoproliférative et plus précisément d'un lymphome provenant des lymphocytes B. Aussi, dans ce paragraphe nous nous intéresserons majoritairement aux signalisations liées à la fonction « facteur de croissance » des NTs, et nous ne détaillerons donc pas celles plus spécifiques au système nerveux comme la différenciation ou la plasticité neuronale.

3.2.1 Voies de signalisation des récepteurs Trk

La signalisation des récepteur Trk est initiée par leur activation due à la fixation des dimères de NTs matures uniquement. Ceci induit leur dimérisation ainsi que leur autophosphorylation sur les résidus tyrosine de la boucle d'activation du domaine kinase. Les tyrosines contenues dans le domaine cytoplasmique sont très conservées chez les vertébrés. Trois d'entre elles situées dans la boucle autorégulatrice (comme Y670, Y674 et Y675 de TrkA chez l'Homme) sont responsables de l'activité kinase des récepteurs. La phosphorylation des autres résidus tyrosine, comme Y490 et Y785 de TrkA chez l'Homme, permet de créer des sites de liaison pour des protéines intracellulaires contenant des domaines de liaison aux tyrosines phosphorylées (PTB, phosphotyrosine binding) ou domaines SH2 (src-homology 2) (Arévalo & Wu, 2006 ; Reichardt, 2006).

3.2.1.1 Signalisation canonique des récepteurs Trk

Seules les NTs matures sont capables d'activer les récepteurs Trk avec une affinité de 10^{-10} M. La réponse des récepteurs Trk est donc contrôlée par l'activité des protéases impliquées dans la maturation des NTs. Au sein du système nerveux, l'activation des récepteurs Trk par les NTs induit la survie cellulaire, la différenciation, la formation et la plasticité des synapses ainsi que la croissance axonale (Arévalo & Wu, 2006). Ces phénomènes sont la conséquence de l'activation de 3 voies de survie principales : la voie

Ras/MAPK (Mitogen Associated Protein Kinases), la voie PI3K/Akt (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase) et la voie de la PLC γ (phospholipase C γ) (figure 12) (Kaplan & Miller, 2000 ; Reichardt, 2006). La transphosphorylation des récepteurs Trk induit majoritairement l'activation de la voie de survie PI3K/Akt (Dudek, et al., 1997). L'activation des PI3K de classe I peut être dépendante ou non de la protéine Ras. Dans la plupart des neurones, l'activation Ras-dépendante est un phénomène prépondérant à l'origine de l'activation des voies de survie. En ce qui concerne l'activation Ras-indépendante, elle met en jeu plusieurs protéines adaptatrices comme Shc, qui est phosphorylée suite à l'activation du récepteur Trk. Shc phosphorylée recrute Grb2 par ses domaines SH2 qui à son tour fournit des sites de fixation pour le recrutement de Gab1 qui une fois phosphorylé se lie aux domaines SH2 de la PI3K et permet son activation (Holgado-Madruga, et al., 1997). Les PIP3 générés par la PI3K jouent de grands rôles dans les phénomènes de survie et de développement neuronaux. Leur action de concert avec des kinases dépendantes des phospho-inosotides permet l'activation d'Akt qui contrôle par phosphorylation l'activité d'un grand nombre de protéines responsables de la survie cellulaire. Parmi les substrats d'Akt figurent des protéines régulatrices de l'apoptose mitochondriale telles que Bad. Lorsque Bad est phosphorylée, elle est séquestrée par les protéines 14-3-3 ce qui l'empêche d'interagir avec Bcl-X_L pour induire l'apoptose. Akt régule également la fonction de facteurs de transcription tels que forkhead (FKHRL1) ou NF κ B. Ainsi, la phosphorylation de FKHRL1 permet sa séquestration dans le cytoplasme par les protéines 14-3-3 ce qui l'empêche d'activer des gènes apoptotiques (Brunet et al, 2001). Akt phosphoryle également I κ B ce qui induit sa dégradation et la libération du facteur de transcription NF κ B à l'origine de l'induction de la survie (Hamanoue, et al., 1999). Shc phosphorylée peut également recruter à la membrane le complexe SOS (Son Of Sevenless) via Grb2 ce qui permet une activation transitoire de Ras qui active à son tour les voies de la PI3K, de p38, de c-Raf/ERK. L'une des cibles de ERK, RSK (ribosomal S6 kinase), agit de concert avec MAPKK2 pour phosphoryler le facteur CREBBP (CREB-binding protein) ainsi que d'autres facteurs de transcription. La phosphorylation de TrkA sur la tyrosine 785 induit la phosphorylation et l'activation de la PLC δ qui permet de former le DAG et l'IP3 à partir du PIP3. L'IP3 permet le relargage des stocks intracellulaires de Ca²⁺ et le DAG induit l'activation de la PKC. De récentes études ont montré que le NGF active la PKC- δ nécessaire à l'activation de la cascade ERK et à la croissance des neurites. Cette PKC semble réaliser ses effets en agissant entre les voies de signalisation impliquant Raf et MAPK/ERF (Patapoutian & Reichardt, 2001).

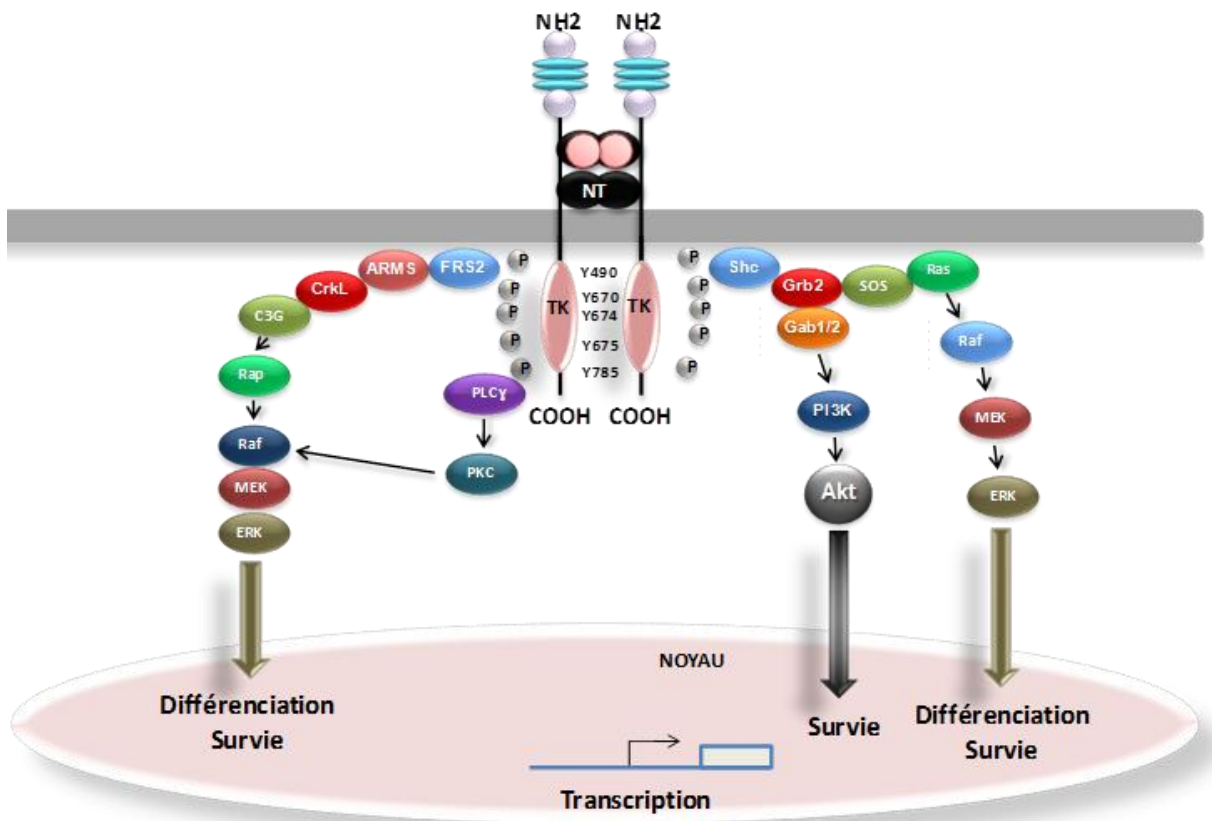


Figure 12 : Représentation des voies de signalisations induites par l'activation des récepteurs Trk.

La liaison des dimères de NTs à leurs récepteurs respectifs Trk entraîne l'activation de ces derniers par dimérisation et autophosphorylation des tyrosines Y490, Y670, Y674, Y675 et Y785. Les récepteurs Trk engendrent alors diverses signalisations suite au recrutement de protéines adaptatrices comme Shc. Ces signalisations parmi lesquelles les voies Ras / Raf / MAP-kinase ERK, PI3-kinase / Akt et la phospholipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$) convergent sur la régulation des fonctions biologiques des cellules comme la survie, la prolifération et la différenciation. Schéma adapté d'après Arévalo & Wu, 2006.

3.2.1.2 Rôles biologiques des récepteurs tronqués

Il a été montré que l'expression d'isoformes ne possédant pas le domaine kinase empêchait la dimérisation des récepteurs Trk totaux et donc la liaison des NTs. Ceci induit une inhibition des voies de survie engendrées par la PI3K, la $PLC\gamma$ et les MAP kinases.

Ainsi, le rôle physiologique de TrkB-T1 serait d'inhiber la signalisation de TrkB-TK⁺ soit en séquestrant BDNF soit en jouant le rôle de récepteur dominant négatif dans des hétérodimères non fonctionnels avec TrkB-TK⁺ (Eide, et al., 1996 ; Brodeur, et al., 2009). Cependant, les études menées depuis sur ce récepteur tronqué ont montré qu'outre son rôle de dominant négatif, il possédait diverses autres fonctions (Fenner, 2012). En effet, il permet de réguler la quantité extracellulaire de BDNF tant au niveau du cerveau que dans le cas de cellules non-neuronales. Lorsque le taux de BDNF extracellulaire augmente, il est capté par les récepteurs

TrkB-T1 qui l'internalisent et le séquestrent dans des vésicules de transport de façon à le sécréter rapidement en cas de besoin. Le mécanisme permettant de réguler la translocation du BDNF par TrkB-T1 est inconnu. Ce récepteur permet également d'induire la croissance de filopodes et de neurites d'astrocytes, de neurones et de cellules de neuroblastome par un mécanisme indépendant du BDNF et par inhibition mutuelle avec le récepteur TrkB total (Yacoubian & Lo, 2000). Une découverte importante a montré que le récepteur TrkB-T1 peut réguler directement l'activité kinase des récepteurs complets (Baxter, et al., 1997). En 2000, des protéines capables d'interagir avec la partie intracellulaire du récepteur TrkB-T1 ont été découvertes et nommées TTIP (truncated-trkB interacting protein) mais leur rôle reste encore inconnu (Kryl & Barker, 2000).

Le rôle physiologique de TrkB-Shc tronqué est plus incertain, mais une étude récente a montré qu'il pourrait être régulé par le BDNF exogène et intervenir dans la régulation négative de la phosphorylation de TrkB-TK⁺ pour limiter une activation excessive des cellules (Wong & Garner, 2012).

3.2.2 Voies de signalisation du récepteur p75^{NTR}

p75^{NTR} est connu pour se lier aux pro-neurotrophines et cet engagement aboutit à des conséquences très différentes de celles induites par la signalisation des récepteurs Trk telles que l'apoptose cellulaire (Lee, et al., 2001). Comme nous le verrons plus bas, la signalisation de mort induite par la liaison des pro-NTs à p75^{NTR} nécessite la présence d'un co-récepteur, la sortiline, qui reconnaît spécifiquement les pro-domaines du pro-NGF et du pro-BDNF (Nykjaer, et al., 2004). C'est aussi le récepteur commun à toutes les neurotrophines matures, bien que leur affinité soit 1000 fois plus faible que celle des pro-NTs, et il constitue la base de leur dualité fonctionnelle. En effet, s'il est clairement établi que la liaison des NTs aux récepteurs Trk permet l'activation de voies de survie, il n'en est pas de même en ce qui concerne p75^{NTR}. En effet, l'interaction des NTs avec p75^{NTR} peut induire diverses réponses cellulaires parfois paradoxales allant de la survie, à l'apoptose en passant par la différenciation ou la prolifération cellulaires (figure 13) (Arévalo & Wu, 2006 ; Reichardt, 2006). p75^{NTR} est capable de fonctionner seul ou en tant que co-récepteur et notamment avec les récepteurs Trk, interférant alors avec leur signalisation canonique (Bibel, et al., 1999). Bien que l'interaction des ligands avec p75^{NTR} permette la mise en place de mécanismes de survie, son rôle pro-apoptotique est cependant prédominant. L'absence d'activité catalytique dans le domaine intracytoplasmique de p75^{NTR} a suggéré très vite que la signalisation de ce récepteur était dépendante de protéines adaptatrices soit constitutivement associées soit

recrutées sur le récepteur en réponse aux NTs. Ainsi, le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices a été mis en évidence, faisant le lien entre le récepteur et la signalisation intracellulaire en aval (Arévalo & Wu, 2006). A l'heure actuelle, l'interaction directe entre p75^{NTR} et ces protéines n'a pas été montrée mais certaines preuves sont en faveur de leur implication et de leur nécessité à l'activation des voies de signalisation induites par p75^{NTR}. Ce récepteur est capable de potentialiser la réponse des récepteurs Trk à une faible concentration de NTs (Chao & Hempstead, 1995). Il est également capable de signaler seul en activant NF-κB ou c-Jun (Hempstead, 2002 ; Roux & Barker, 2002) ou d'induire l'apoptose lorsqu'il est lié à la sortiline. Il peut également se complexer avec les récepteurs NogoR et Lingo-1 ce qui bloque la régénération du système nerveux (Wong, et al., 2002 ; Bandtlow & Dechant, 2004).

Voies de survie activées par p75^{NTR} : il semble que l'activation du récepteur p75^{NTR} puisse avoir des rôles anti-apoptotiques et prolifératifs en l'absence ou en présence des récepteurs Trk (DeFreitas, et al., 2001 ; Hempstead, et al., 1991 ; Chao, 2003). Ces effets biologiques seraient induits par l'activation du facteur de transcription NF-κB dont l'activation reste cependant modeste, ainsi que de la voie PI3K/Akt qui serait activée indépendamment de la présence de ligand et impliquant au moins la protéine adaptatrice Shc (Dudek, et al., 1997 ; Roux, et al., 2001). L'Akt étant connue pour phosphoryler l'IKK1 impliquée dans l'activation de NF-κB, ce mécanisme serait responsable des effets pro-survie de la signalisation de p75^{NTR} (Roux & Barker, 2002).

Voies pro-apoptotiques activées par p75^{NTR} : plusieurs mécanismes ont été décrits parmi lesquels figure l'activation de la *c-jun* N-terminal kinase (JNK) (Casaccia-Bonnet, et al., 1996 ; Yoon, et al., 1998) des caspases (Gu, et al., 1999) et la production de céramides (Dobrowsky, et al., 1994). Parmi eux, la voie JNK est nécessaire à l'effet pro-apoptotique de p75^{NTR} (Yoon, et al., 1998). Le mécanisme de l'activation de JNK a été élucidé et met en jeu l'activation d'une GTPase, Rac, suite à l'interaction du ligand avec le récepteur. Rac induit à son tour le recrutement et l'activation de la cascade kinasique par phosphorylation de la MAPK JNK (Harrington, et al., 2002). L'activation de Rac se ferait via une protéine adaptatrice liée à la partie cytoplasmique de p75^{NTR} telle que NRIF (NT-receptor interacting factor), NADE (NT-associated cell death receptor), NRAGE (NT-receptor interacting MAGE homolog) ou encore TRAFs (TNF receptor-associated factors). Ces protéines se lient à des régions distinctes du domaine cytoplasmique de p75^{NTR}.

Suite à l'activation de JNK survient la phosphorylation de c-jun, l'activation de p53 et des protéines de la famille « BH3-only » telles que Bad et Bim. Cette signalisation conduit finalement à la translocation et l'activation de protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bak déterminant l'apoptose mitochondriale par la libération du cytochrome c ainsi que l'activation des caspases 9, 6 et 3 (Bhakar, et al., 2003 ; Roux & Barker, 2002 ; Okuno, et al., 2004 ; Nykjaer, et al., 2005).

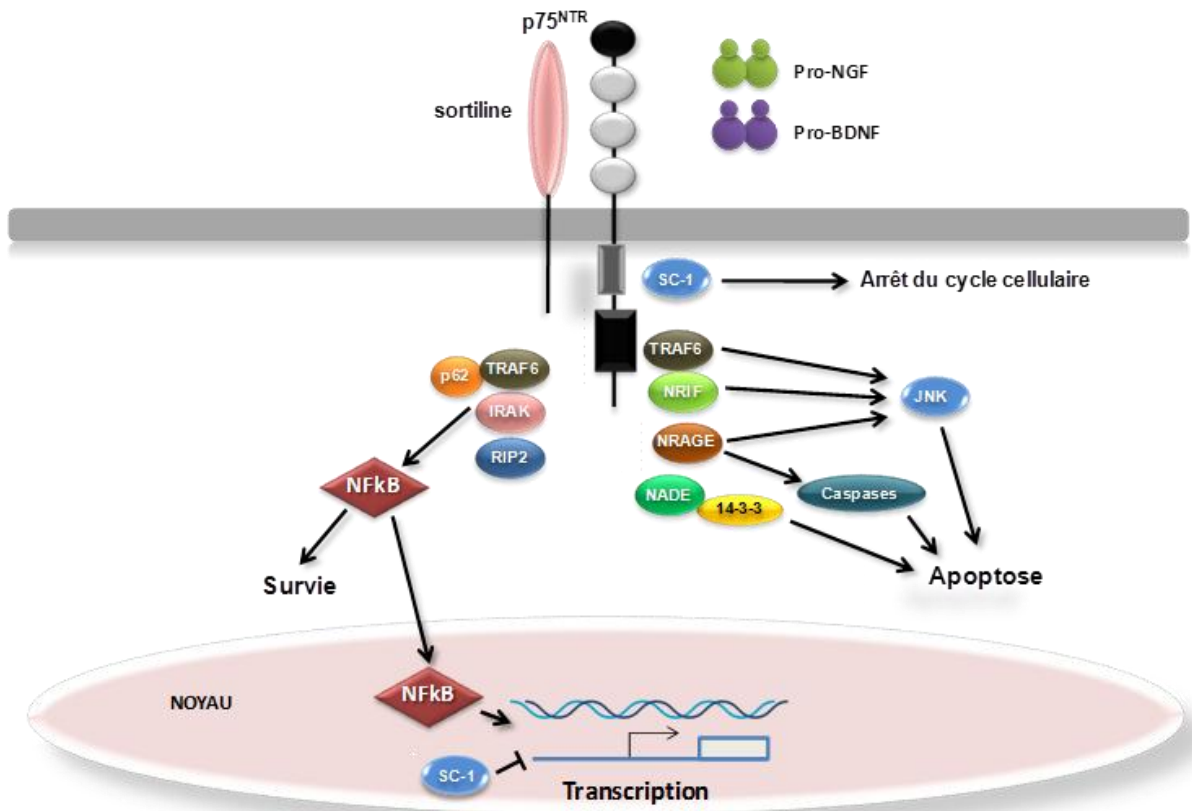


Figure 13 : Représentation schématique des voies de signalisation induites par l'activation du récepteur $p75^{NTR}$.

La liaison des NT matures ou des pro-NT à $p75^{NTR}$ induit l'activation de plusieurs voies de signalisations via le recrutement aux domaines intracellulaires des récepteurs de différentes molécules adaptatrices, ce qui a pour conséquence des effets parfois opposés tels que la survie, l'apoptose, la croissance axonale ou encore l'arrêt du cycle cellulaire. Schéma adapté d'après Arévalo & Wu, 2006.

De récentes études montrent que l'apoptose induite par la liaison du ligand à $p75^{NTR}$ nécessite un clivage par une γ -sécrétase du récepteur suite à son engagement, libérant le domaine ICD. Cela aboutit, via l'interaction avec TRAF6, un autre partenaire de l'ICD, à l'activation et à la translocation nucléaire de facteurs de transcription associés à l'ICD comme NRIF, qui conduirait finalement à la transcription de gènes pro-apoptotiques (Geetha, et al., 2005 ; Kenchappa, et al., 2010). Finalement, la mise en jeu de protéines TRAF comme TRAF6,

permettrait via l'activation de JNK, de fournir aussi une boucle d'amplification de la signalisation de mort induite par p75^{NTR} (Ichim, et al., 2012).

Ainsi, après l'avoir envisagé comme un "récepteur à dépendance" signalisant l'apoptose cellulaire en l'absence de ligand (NTs matures), les travaux récents caractérisent p75^{NTR} davantage comme un récepteur de mort plus classique lorsqu'il est engagé par des pro-NTs. L'hypothèse actuelle est que p75^{NTR} est un fort déclencheur d'apoptose qui intègre le type de neurotrophines présent dans le milieu, la population cellulaire et le type de récepteurs et de protéines adaptatrices exprimés pour déterminer le devenir ultime des cellules (Ichim, et al., 2012).

3.2.3 Co-récepteurs de p75^{NTR}

3.2.3.1 Interaction avec les récepteurs Trk

Des interactions fonctionnelles existent entre Trk et p75^{NTR}, souvent avec des effets opposés. Le récepteur p75^{NTR} peut former des complexes hétérodimériques avec les récepteurs Trk par une interaction des domaines transmembranaires et cytoplasmiques (figure 15) (Esposito, et al., 2001). Ces interactions sont aussi facilitées par l'assemblage de complexes multimoléculaires composés des 2 récepteurs et de protéines adaptatrices communes (Roux & Barker, 2002 ; Reichardt, 2006). Plusieurs protéines capables d'interagir physiquement et simultanément avec les récepteurs Trk et p75^{NTR} ont été découvertes et pourraient jouer un rôle dans l'interaction fonctionnelle entre les deux récepteurs. Ainsi, la protéine transmembranaire ARMS (ankyrin repeat-rich membrane-spanning) (figure 12) (Kong, et al., 2001), ou les cavéolines (Bilderback, et al., 1997) capables d'interagir avec TrkA et p75^{NTR} pourraient permettre d'augmenter la formation de complexe TrkA/ p75^{NTR}. Finalement, le complexe p62-TRAF6-IRAK décrit dans la signalisation de p75^{NTR} apparaît comme un autre moyen d'associer les 2 signalisations, avec la liaison de TRAF6 à p75^{NTR} et de p62 à TrkA (Wooten, et al., 2001).

L'association des récepteurs permet d'augmenter la sélectivité et l'affinité des NTs pour leurs sites de liaison avec un K_D de 10^{-11} M au lieu d'environ 10^{-9} M pour des récepteurs exprimés séparément. En effet, la dimérisation de p75^{NTR} à TrkA permet d'augmenter l'affinité de TrkA pour NGF en diminuant l'affinité pour la NT-3. Il en va de même pour l'interaction TrkB-p75^{NTR} qui augmente l'affinité de liaison du BDNF (Bibel, et al., 1999 ; Yano & Chao, 2000). De façon générale, la signalisation des récepteurs Trk inhibe à plusieurs niveaux la voie pro-apoptotique majeure induite par p75^{NTR}, la voie JNK (Yoon, et al., 1998). De cette façon,

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 (Mazzoni, et al., 1999). L'association de ces deux types de récepteurs peut également potentialiser la signalisation de survie induite par les récepteurs Trk. En effet, $p75^{\text{NTR}}$ peut lier la protéine adaptatrice des récepteurs Trk, Shc, et stimuler sa phosphorylation pour augmenter la signalisation qui en découle (Epa, et al., 2004). Finalement, les deux types de récepteurs activent la voie NF- κ B, ce qui permet un effet synergique des deux signalisations sur la survie cellulaire (Reichardt, 2006).

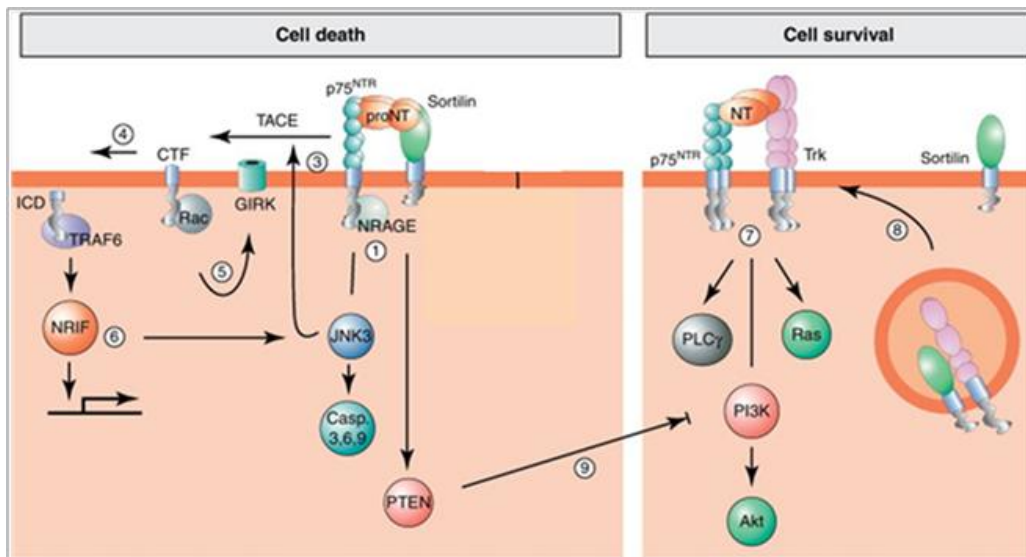


Figure 14 : Schéma représentant les voies de signalisation induites par la dimérisation du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ avec la sortiline (à gauche) et avec les récepteurs Trk (à droite) dans le cerveau.

A gauche : les pro-NTs induisent la mort cellulaire via leur interaction avec le complexe sortiline/ $p75^{\text{NTR}}$ lié en conjonction avec NRAGE, ce qui induit l'activation de JNK et des caspases 3, 6 et 9 (1) la protéolyse membranaire de $p75^{\text{NTR}}$ par des enzymes TACE et ADAM17 pourrait produire le fragment CTF (3). Par la suite, la partie intracellulaire soluble (ICD) est libérée sous l'action de la δ -sécrétase (4). Le fragment CTF active un canal potassium (GIRK) (5). L'ICD forme quant à lui un complexe avec NRIF et TRAF6 conduisant à la translocation de TRAF6 au noyau tout en amplifiant l'activation de JNK3 (6) A droite : Les signaux de survie transmis par les récepteurs Trk seuls ou associés au récepteur $p75^{\text{NTR}}$ induisant l'activation de la PLC δ , des MAPK, et de la voie PIP3/Akt (7). La sortiline contribue fortement à la signalisation induite par les NTs via le transport antérograde des récepteurs Trk (8). La signalisation des récepteurs Trk est contrecarrée par l'induction des phosphatases par les pro-NT et par PTEN ce qui interfère avec la PI3K (9) (Nykjaer & Willnow, 2012).

3.2.3.2 Interaction avec la sortiline

La sortiline est un neuropeptide d'environ 95kDa rattaché à la famille des récepteurs de type I parmi lesquels figurent la protéine SorLA/LR11 et les protéines SorCS (1, 2 et 3) (Hampe, et al., 2001 ; Nyborg, et al., 2006). Ces protéines comportent des homologies de séquence avec la protéine de levure Vps10p. La sortiline montre une dualité fonctionnelle puisqu'elle peut jouer le rôle de transporteur mais également celui de co-récepteur (figure 14). Elle est majoritairement présente au sein du milieu intracytoplasmique (90%) et plus spécifiquement au niveau de l'appareil de Golgi et du réseau *trans*-golgien où elle permet le

transport du pro-NGF et du pro-BDNF vers la membrane plasmique (Skeldal, et al., 2011). Comme elle ne possède qu'un court domaine C-terminal, elle ne peut interagir directement avec des protéines de signalisation et doit par conséquent s'associer avec un récepteur capable de signaler pour induire ses effets biologiques. C'est ainsi qu'elle joue le rôle de co-récepteur pour $p75^{\text{NTR}}$ par l'intermédiaire duquel elle engendre l'effet pro-apoptotique des pro-neurotrophines qu'elle lie de manière spécifique (Nykjaer, et al., 2004). En effet, contrairement au récepteur $p75^{\text{NTR}}$ qui lie uniquement les formes matures de NGF et BDNF, la sortiline ne peut lier que le pro-domaine de ces protéines. Sa dimérisation avec le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ permet d'augmenter 20 fois son affinité pour le pro-NGF (Nykjaer, et al., 2004). Ainsi, le pro-NGF lie de manière simultanée la sortiline via son pro-domaine et le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ via son domaine mature, créant ainsi un complexe ternaire capable d'activer les voies de signalisations apoptotiques. Si peu de données permettent de décrire les voies de signalisation induites par la liaison des pro-NTs, certaines hypothèses peuvent cependant être émises. Le court domaine cytoplasmique de la sortiline pourrait recruter des protéines adaptatrices capables de moduler ou activer la signalisation du récepteur $p75^{\text{NTR}}$. Il a en effet été montré que la protéine NRIF est transloquée au noyau après stimulation par le pro-NGF et les résultats non publiés de Nykjaer suggèrent que le pro-NGF induit la phosphorylation de c-jun et par conséquent l'activation de JNK. La sortiline permet également l'internalisation du pro-NGF ce qui permettrait de faciliter la signalisation de $p75^{\text{NTR}}$ par transport rétrograde dans des endosomes comme c'est le cas pour les récepteur Trk (Nykjaer, et al., 2004 ; Nykjaer, et al., 2005).

3.2.3.3 Les autres co-récepteurs

$p75^{\text{NTR}}$ peut également interagir avec le récepteur Nogo-R (glycolipid-anchored Nogo Receptor) et la protéine transmembranaire LINGO-1 (Mi, et al., 2004 ; Wang, et al., 2002). La liaison de ligands dérivés des myélines tels que Nogo, MAG ou OMgp à $p75^{\text{NTR}}$ induit alors l'activation de RhoA. Ce dernier est un régulateur négatif des GTPases de la famille Rho, capable d'empêcher l'échange de nucléotides et l'association à la membrane, ce qui est à l'origine de l'inhibition de la croissance neuritique (Yamashita & Tohyama, 2003).

3.2.4 Signalisation rétrograde des récepteurs Trk et p75^{NTR}

Bien que la liaison des neurotrophines aux récepteurs Trk permette la mise en place de voies de signalisation débutant au niveau de la membrane plasmique, elle induit également l'internalisation du complexe ligand/récepteur à l'intérieur de vésicules au sein desquelles les récepteurs demeurent actifs tant que le ligand leur est associé. La mise en évidence du transport rétrograde des récepteurs Trk a été découverte dans les années 90 lors d'expériences de ligature du nerf sciatique et de cultures de neurones du système périphérique (Yano & Chao, 2004). Comme les types d'effecteurs varient en fonction de la localisation intracellulaire, les récepteurs ainsi internalisés peuvent activer des voies de signalisation différentes de celles prenant départ au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, les effets biologiques induits par la liaison des neurotrophines pourront être dus soit à l'activité membranaire des récepteurs, soit à leur activité intracellulaire au niveau des endosomes. Il a par exemple été montré que la différenciation neuronale est due à l'activité des récepteurs au sein des endosomes intracellulaires alors que la survie cellulaire est induite par l'activation membranaire des récepteurs qui permet une activation prolongée de la voie PI3K/Akt (Zhang, et al., 2000). Les travaux menés par Philippidou ont montré que les endosomes de signalisation rétrograde des récepteurs Trk sont des corps multi-vésiculaires (MVBs - microvesicular bodies) dérivés de macro-endocytose dépendante de Rac et Pincher. Ces endosomes seraient réfractaires au processus lysosomal ce qui permettrait aux récepteurs Trk d'assurer une signalisation à long terme au sein du cytoplasme en faveur de la régulation de certains gènes (Philippidou, et al., 2011). L'un des mécanismes permettant le déplacement des endosomes met en jeu l'interaction des récepteurs Trk avec la dynéine qui leur permettrait de se déplacer le long des filaments de tubuline afin de progresser dans le cytoplasme (Yano, et al., 2001). Il semble de plus que la tyrosine 701 (Y701) impliquée dans l'activation du récepteur TrkA joue également un rôle dans son trafic intracellulaire. Il a en effet été montré que le remplacement de la Y701 par un résidu aspartate ou une phénylalanine induit une diminution du taux d'internalisation et réduit la co-localisation du récepteur TrkA avec la chaîne lourde de la clathrine formant les vésicules (Pablo, et al., 2008).

Le transport axonal et la signalisation rétrograde du récepteur p75^{NTR} ont été peu étudiés. Des études menées à l'aide de NGF marqué ont mis en évidence son internalisation dans différentes structures telles que des petites vésicules, le réticulum endoplasmique, des corps multi-vésiculaires ou encore des lysosomes. Cette hétérogénéité pourrait refléter l'internalisation différentielle des récepteurs TrkA et p75^{NTR}. De plus, la cinétique

d'endocytose du récepteur p75^{NTR} est plus lente que celle des récepteurs Trk, suggérant que leur trafic serait indépendant (Bronfman, et al., 2003).

4. Neurotrophines et système immunitaire

Le rôle des NTs au sein du système nerveux est largement décrit, cependant leur action n'y est pas restreinte. En effet, elles sont impliquées dans les mécanismes de survie et d'apoptose des cellules d'un grand nombre de tissus parmi lesquels figure le système immunitaire. La revue de Vega publiée en 2003 récapitule les connaissances établies jusqu'alors entre système immunitaire et NTs. Durant les 20 dernières années, les travaux menés chez les vertébrés ont permis de déterminer la distribution tissulaire et la localisation cellulaire des récepteurs aux NTs dans le système immunitaire. On retrouve ainsi les NTs (NGF et BDNF) et leurs récepteurs (p75^{NTR}, TrkA, TrkB notamment) dans les organes lymphoïdes. Plus précisément, leur expression caractérise certaines populations de cellules immunitaires suggérant un rôle immunomodulateur pour ces facteurs de croissance. Cette hypothèse est renforcée par le fait que leur présence dans les tissus et cellules du système immunitaire a été retrouvée conservée dans l'échelle animale, des humains aux poissons (Hannestad, et al., 1997 ; Hannestad, et al., 2000 ; Ciriaco, et al., 1996 ; Aloe, et al., 1999 ; Vega, et al., 2003). Ce rôle immunomodulateur a par la suite été confirmé par les études précisant le rôle *in vitro* et *in vivo* des NTs et notamment du NGF sur les cellules immunitaires. Finalement, l'analyse du phénotype immunitaire des souris déficientes en NTs ou en récepteurs aux NTs fonctionnels a été réalisée récemment. Elle a révélé des modifications structurales des organes lymphoïdes et a contribué à une meilleure connaissance du rôle *in vivo* de ces neuropeptides dans la différenciation et la fonction des cellules impliquées dans les réponses immunitaires (García-Suárez, et al., 2000 ; Garcia-Suarez, et al., 2002 ; Ruberti, et al., 2000 ; Pérez-Pérez, et al., 2003).

4.1 Neurotrophines et cellules immunocompétentes matures

Les études menées jusqu'à aujourd'hui ont surtout concerné NGF, la première neurotrophine découverte, et ont montré son importance dans la survie, la maturation et la fonction d'un grand nombre de cellules immunocompétentes.

NGF possède diverses fonctions au sein des cellules du système immunitaire. Il permet par exemple de stimuler la dégranulation rapide des mastocytes et des basophiles, induit la

différenciation, l'activation et la production de cytokines par les mastocytes, les granulocytes et les macrophages, de même que l'activation des éosinophiles. De plus, il potentialise la prolifération de certaines cellules B et T, augmente la production de cytokines par les Th2 et la synthèse d'IgE et induit la différenciation des cellules B activées en plasmocytes (Braun, 2000). NGF et BDNF régulent également les sécrétions d'IL-4, de TNF- α et d'IFN γ par les cellules mononucléaires et les cellules T circulantes spécifiques de l'antigène (Bayas, et al., 2003).

Les NTs, et plus particulièrement NGF, sont également produites par un grand nombre de cellules hématopoïétiques telles que les mastocytes, les macrophages, les lymphocytes T et B au cours de la réaction inflammatoire. Il semble que l'expression des NTs et de leurs récepteurs soit dépendante de l'activation des cellules immunocompétentes puisque l'expression de NGF et TrkA par les lymphocytes T CD4⁺ est induite par leur activation suite à la rencontre avec l'Ag. De plus, la voie de signalisation qui découle de l'interaction entre la NT et son récepteur semble fonctionnelle puisque le traitement par NGF de lymphocytes T CD4⁺ stimulés par l'Ag induit l'expression de c-fos (Ehrhard, et al., 1994 ; Vega, et al., 2003). BDNF est quant à lui exprimé par les lymphocytes T et B activés, les macrophages, les mastocytes et les thrombocytes (Braun, 2000).

4.1.1 Neurotrophines et cellules B normales

Les travaux ont surtout porté sur les productions de NGF et BDNF et les résultats trouvés chez l'Homme sont conformes à ceux relatés sur d'autres espèces de mammifères comme la souris. NGF est produit par les lymphocytes B humains normaux qui semblent constituer une population majeure dans cette production (Edling, et al., 2004). Celle-ci est augmentée suite à une activation polyclonale (Santambrogio, et al., 1994 ; Torcia, et al., 1996 ; Torcia, et al., 2001). De même, les LB humains produisent la forme mature biologiquement active du BDNF (Kerschensteiner et al, 2009). En culture, la sécrétion du BDNF par les lymphocytes B humains 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- α . Au contraire, les LB non stimulés circulants n'expriment pas de transcrits codants pour le BDNF suggérant que la transcription de BDNF est faible dans ces cellules à l'état basal (Hu, et al., 2006).

Les récepteurs de haute affinité TrkA et TrkB tronqués sont aussi exprimés à la surface des LB humains normaux et cette expression membranaire est augmentée ou induite par la stimulation des cellules ou une situation de stress (Otten, et al., 1989 ; Brodie &

Gelfand, 1992 ; Aloe, et al., 1994 ; Torcia, et al., 1996 ; Besser & Wank, 1999 ; D'Onofrio, et al., 2000 ; Schuhmann, et al., 2005). Dans le cas des lignées cellulaires B humaines, cette expression protéique des récepteurs Trk est variable selon les lignées et les conditions de culture. Ainsi, TrkA n'est pas détecté dans la lignée EBV⁻ BL41 ni dans les lignées B matures EBV⁺ (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). De même, les transcrits codant pour les formes tronquées de TrkB (95 kDa) sont aussi exprimés par l'ensemble des lignées B matures EBV⁻ étudiées, mais une expression membranaire de ce récepteur n'a pu être 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). De façon générale, les observations sur les lignées et les LB normaux font état d'une faible expression membranaire des récepteurs Trk en condition basale de culture, alors que l'expression protéique semble plus importante au niveau intracellulaire, suggérant l'existence d'une séquestration intra-cytoplasmique de ces récepteurs (Schenone, et al., 1996).

Le récepteur p75^{NTR} est aussi exprimé par les LB circulants (Ottens, et al., 1989 ; Brodie & Gelfand, 1992 ; Melamed, et al., 1995 ; Fauchais, et al., 2008 ; Fauchais, et al., 2009). Son expression membranaire, comme pour TrkA, augmente après un stress (Aloe et al., 1994) ou suite à une stimulation par des agents mitogéniques. Dans les lignées B humaines, l'expression du récepteur p75^{NTR} 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 ; Pearce, et al., 2005), pour d'autres il est exprimé dans un grand nombre de lignées B, et majoritairement au niveau des stades pré-B, des B matures et surtout des B mémoires (Brodie & Gelfand, 1994 ; Pica, et al., 2000 ; Rosini, et al., 2000 ; Rosini, et al., 2004 ; Fauchais, et al., 2008 ; Fauchais et al., 2009). Finalement, notre équipe a montré pour la première fois au niveau des LB périphériques et dans des lignées B la présence et le rôle pro-apoptotique du co-récepteur de p75^{NTR}, la sortiline (Fauchais, et al., 2008 ; Fauchais, et al., 2009).

La présence conjointe des NTs et leurs récepteurs a suggéré très tôt la possibilité de boucles de régulations autocrines et notamment un rôle pro-survie des voies NTs/Trk pour les cellules B. Il semble en effet que les voies NGF/TrkA et à un degré moindre BDNF/TrkB soient impliquées dans la survie des LB.

Le traitement par NGF permet de préserver en vie des LB ou des lignées cellulaires B humaines suite à une induction d'apoptose (Kronfeld, et al., 2002 ; Fauchais, et al., 2008). La signalisation anti-apoptotique induite par NGF/TrkA 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). On observe ainsi l'activation d'Erk-2 (Franklin, et al., 1995), de la PI3K et de la PKC γ , (Kronfeld, et al., 2002). De plus, il a été montré que la signalisation anti-apoptotique était associée à l'inactivation de p38MAPK ce qui empêche l'inhibition de Bcl-2 par phosphorylation, et par là même, l'induction de la voie de mort mitochondriale. Cet effet est dû à l'induction par le NGF de la transcription de la phosphatase MPK-1 responsable de la déphosphorylation de la p38MAPK (Rosini, et al., 2000 ; Torcia, et al., 2001 ; Rosini, et al., 2004). De façon intéressante, ce rôle autocrine pro-survie d'NGF semble concerner plus particulièrement les cellules B mémoires qui le produisent aussi. Sa neutralisation *in vitro* par des Ac antagonistes induit dans ces cellules, contrairement aux cellules B naïves, une augmentation de l'apoptose liée à la phosphorylation et la translocation mitochondriale de la p38MAPK puis à la neutralisation de Bcl-2. Cette apoptose est bloquée par la surexpression de MPK-1 (Torcia, et al., 1996 ; Torcia, et al., 2001 ; Rosini, et al., 2004). En plus de promouvoir la survie des LB mémoires, le NGF potentialise la production d'immunoglobulines par ces cellules et notamment des IgG, IgA et IgM. Bien que cet effet ne soit pas exclusif de la seule population des B mémoires, il semble s'y exprimer de façon plus importante (Torcia, et al., 1996).

Les études sur le rôle de la voie BDNF/TrkB dans les cellules B sont beaucoup plus rares et les résultats moins évidents que ceux de la voie NGF/TrkA. Cependant, sa fonction protectrice de l'apoptose, notamment induite par privation sérique, a été démontrée à partir de cultures de LB matures issus de sujets sains ou de lignées (Pearse, et al., 2005 ; Hu, et al., 2006). Cette protection est associée à une induction ou une augmentation d'expression de TrkB membranaire, alors que la preuve de cette expression n'est pas réalisée à l'état basal des cultures (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 également mis en évidence ce rôle dans des lignées plus immatures. La neutralisation du BDNF mature 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).

Bien que la plupart des travaux se soient focalisés sur la démonstration de l'évidence de boucles autocrines de survie de type NTs/Trk dans l'homéostasie lymphocytaire, notre équipe a montré pour la première fois le rôle pro-apoptotique autocrine des pro-NTs et notamment du pro-BDNF suite à sa fixation à l'hétérodimère p75^{NTR} / sortiline. Ce rôle a été confirmé par la neutralisation de la sortiline par des anticorps bloquants et la compétition d'affinité avec un autre ligand de la sortiline, la neurotensine (Fauchais, et al., 2008). Des données similaires ont été trouvées récemment à propos des cellules NK, cellules d'origine lymphoïdes non spécifiques de l'immunité innée, spécialisées dans la détection et l'élimination de cellules infectées ou tumorales. En effet, les cellules NK ne produisent pas de pro-NGF mais expriment p75^{NTR} et la sortiline, et l'expression de p75^{NTR} est fortement augmentée lors de leur activation, notamment par l'IL-12. L'engagement de p75^{NTR} / sortiline par du pro-NGF exogène induit l'apoptose cellulaire (Rogers, et al., 2010). La sécrétion des formes immatures des NTs a peu été étudiée au niveau des lymphocytes et plus particulièrement des cellules B. Notre groupe a cependant mis en évidence celle du pro-BDNF à partir de lignées cellulaires B humaines à différents stades de différenciation (Fauchais, et al., 2008). Cependant, aucune autre étude à notre connaissance n'a porté sur le rôle des pro-NTs dans les LB normaux.

En conclusion, les LB secrètent les NTs et expriment les récepteurs p75^{NTR} / sortiline sans doute de façon basale. L'expression des récepteurs Trk varie quant à elle (forme totale, tronquée, membranaire ou cytosolique) en fonction du stade de différenciation (immature/mature) ou de l'état d'activation (naïf/activé/plasmocyte) ou de stress (privation en facteurs de croissance, traitements...), et l'ensemble des données converge vers une séquestration intracellulaire des différents récepteurs. Les études confirment le rôle autocrine/paracrine des NTs comme facteurs de survie plus que facteurs de croissance pour les cellules B et ces circuits autocrines de survie s'expriment davantage lors de l'activation des cellules B ou dans les cellules B mémoires. De plus, on peut supposer que ces circuits NTs/récepteurs soient aussi la base d'interactions cellulaires bidirectionnelles engageant les LB et des cellules de leur environnement, dans un contexte de régulations paracrines de l'homéostasie cellulaire.

4.1.2 Neurotrophines et cellules B : aspects physiopathologiques

Les données lymphocytaires ainsi que les propriétés anti-apoptotiques des NTs 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 LB 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 & Dawbarn, 2006). Dans le cadre des travaux menés dans notre équipe sur le rôle des neurotrophines, nous avons notamment montré leur implication dans le syndrome de Goujerot Sjögren (Fauchais et al, 2009), la sclérose systémique (Lise et al., 2010), et plus récemment le lupus érythémateux disséminé (Fauchais et al, 2013).

Ainsi, chez les sujets allergiques, le BDNF induit une augmentation de la production d'IgE par des LB périphériques. Cet effet est en partie bloqué *in vitro*, par l'IFN- γ 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 qui postule que les neurotrophines seraient par des effets de type « cytokines-Th2 » des modulateurs des réponses allergiques et inflammatoires.

Une production excessive et un taux sérique élevé de neurotrophines (NGF et/ou BDNF) sont souvent corrélés avec le degré d'hyperactivité des lymphocytes notamment B dans un certain nombre de pathologies du système immunitaire. C'est le cas de certaines maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé et le syndrome de Goujerot Sjögren (Matucci-Cerinic, et al., 2001 ; Fauchais, et al., 2009 et 2013), ou de maladies inflammatoires chroniques, comme la polyarthrite rhumatoïde (Dicou, et al., 1993). Cette surproduction est aussi associée à une surexpression des récepteurs Trk et p75^{NTR} comme c'est le cas pour NGF, TrkA et p75^{NTR} dans les tissus synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. De plus, l'expression synoviale de ces récepteurs décroît progressivement au cours du traitement par anti-TNF (infiximab), suggérant une implication directe du NGF, dans les processus inflammatoires locaux conduisant à la destruction articulaire (Rihl, et al., 2005).

L'ensemble des données est en faveur d'une implication des neurotrophines dans la physiopathologie des maladies auto-immunes, en favorisant la survie anormale des

lymphocytes auto-immuns. La prise de conscience au niveau clinique de ces données nouvelles est à l'origine de la recherche de stratégies thérapeutiques innovantes ciblant notamment les axes NGF/TrkA et BDNF/TrkB comme c'est aussi le cas pour la sclérose en plaques (ciblant ici les cellules T) (Santi, et al., 2009).

Les récepteurs Tyrosine Kinases (RTKs) sont fréquemment impliqués dans le processus tumoral et dans la régulation des réponses des cellules malignes aux traitements (Stommel, et al., 2007). Les récepteurs Trk des NTs sont impliqués dans la survie et la protection des lymphocytes B normaux. Par conséquent, on pouvait imaginer que ces voies NTs/Trk pouvaient contribuer aussi à la survie et à la résistance aux traitements de cellules B malignes.

5. Neurotrophines, cancers et lymphomes B

L'implication du récepteur TrkA dans le processus cancéreux neuronal fut d'abord montrée dans le cas du neuroblastome (NBL) et par la suite dans celui du médulloblastome. La surexpression de TrkA dans le NBL est un facteur de bon pronostic pour lequel une régression spontanée de la tumeur peut parfois être observée (Brodeur, et al. 2009). Cependant et bien avant d'être décrits dans le cas des cancers neuronaux, des études avaient révélé que les gènes *Trk* sont des proto-oncogènes impliqués dans la biologie de cancers d'origine non-neuronale. En effet, et comme nous l'avons vu dans la partie 3.1.1, le proto-oncogène *NTRK1* codant pour le récepteur TrkA fut cloné dans le cas du carcinome du colon. Sa fusion avec le gène de la tropomyosine dans le domaine extracellulaire de TrkA lui conférait une activation constitutive du domaine tyrosine kinase. Ce gène fut l'un des premiers gènes transformant identifiés dans les cancers humains. Un certain nombre d'études, dont celles réalisées au sein de notre équipe, ont mis en évidence l'implication des neurotrophines (NGF et BDNF) et leurs récepteurs Trk dans des tumeurs non neuronales. Ainsi, dans le cas du cancer du colon, du sein ou de la prostate ils interviendraient dans la croissance des cellules tumorales et le processus métastatique et pourraient représenter des marqueurs de la progression tumorale (Zhu et al., 2001 ; Akil et al., 2011 ; Hondermarck, 2012 ; Sasahira et al., 2013). Finalement ces facteurs de croissance ont été identifiés aussi dans des pathologies malignes du système immunitaire telles que les leucémies, le myélome multiple ou plus récemment certains lymphomes B (Pearse, et al., 2005 ; Renné, et al., 2008 ; Li, et al., 2009 ; Sniderhan, et al., 2009).

Bien que des NTs soient nécessaires à la survie des lymphocytes B, peu d'études ont été menées à l'heure actuelle pour déterminer leur éventuelle implication dans les processus cancéreux touchant le système immunitaire. En ce qui concerne les lymphomes B, il a été montré que l'interaction de NGF avec TrkA est nécessaire à la survie de lignées issues de lymphome de Hodgkin (Renné, et al., 2008). Une autre étude a mis en évidence l'implication des voies de signalisation des récepteurs Trk dans la survie et la prolifération de lignées issues de lymphomes non-hodgkinien. En effet, des cultures primaires de NHL ainsi que des lignées de DLBCL expriment les récepteurs Trk et leurs ligands. Les voies de survie induites par leurs interactions semblent fonctionnelles puisque l'ajout de K252a (un inhibiteur pharmacologique des récepteurs Trk) induit une diminution de prolifération ou encore l'apoptose des cellules. De manière intéressante dans la lignée OCI-LY3, issue de DLBCL de type ABC, le K252a induit une séquestration de RelA dans le nucléole inhibant l'activité transcriptionnelle de NFκB, bloquant ainsi la production de facteurs de survie indispensables comme par exemple l'IL-6 (Sniderhan, et al., 2009).

En conclusion, une expression aberrante ou des réarrangements des gènes *Trk* jouent clairement un rôle dans toute une variété de cancers même si l'origine de ces surexpressions reste à déterminer. Devant l'évidence de leur rôle dans le comportement biologique et clinique de certains cancers, l'inhibition des récepteurs Trk est actuellement envisagée dans les nouvelles stratégies thérapeutiques seules ou le plus souvent en combinaison avec d'autres traitements. La réalité des productions des NTs et l'expression de leurs récepteurs a été démontrée dans un certain nombre de lymphomes B, le plus souvent à partir de lignées humaines. Néanmoins, aucune étude n'a jusqu'à présent été réalisée sur un grand nombre de patients, ni déterminé précisément le rôle de ces circuits impliquant les neurotrophines dans l'hétérogénéité biologique et clinique des lymphomes B et plus particulièrement des DLBCL. Après cette présentation du domaine de recherche dans lequel nous nous sommes investies au cours de cette thèse, la partie suivante présente les différents objectifs que nous nous étions fixés ainsi que les résultats obtenus qui ont donné lieu à publication.

RESULTATS

1. Première partie: contribution à l'étude de la signalisation des neurotrophines dans des lignées de type GCB de DLBCL: effet du rituximab.

1.1 Contexte scientifique

Comme nous l'avons vu dans les parties 4 et 5 de l'introduction bibliographique, les études menées sur le système immunitaire ont montré que les NTs, et plus particulièrement le NGF, avaient un rôle immunomodulateur grâce à leur participation à divers processus impliqués dans la survie et la fonction des cellules immunocompétentes normales. Ainsi, les lymphocytes B humains normaux du stade pro-B au stade plasmocytaire produisent du NGF et dans une moindre mesure du BDNF. Ils expriment également les récepteurs de haute affinité TrkA et TrkB sous leur forme tronquée ainsi que le récepteur de basse affinité p75^{NTR} dont les expressions membranaires augmentent en conditions de stress. Les études menées afin de déterminer l'implication des NTs dans la survie cellulaire B ont montré que le NGF permet de maintenir en vie des LB humains soumis à une induction d'apoptose et que cet effet pro-survie semble concerner plus particulièrement les cellules B mémoires qui le produisent également. De même, notre laboratoire a montré le rôle anti-apoptotique de BDNF sur des lignées B immatures et plasmocytaires. En tant que facteurs de survie des lymphocytes B normaux, les NTs et leurs récepteurs sont également impliqués dans les processus pathologiques qui mettent en jeu ces cellules telles que des maladies inflammatoires, des maladies auto-immunes ou encore des cancers. Le peu d'études menées sur les lymphomes B ont montré l'importance de l'axe NGF/TrkA dans la survie de lignées issues de lymphome de Hodgkin. De même, les NTs et leurs récepteurs sont exprimés par des lignées issues de LNH, parmi lesquels on trouve des lignées issues de DLBCL. De plus, leur interaction semble fonctionnelle. Comme les lymphomes diffus à grandes cellules B sont fréquents en Limousin, notre équipe a décidé d'établir le rôle potentiel des neurotrophines dans la biologie de ce lymphome. Lors de mon arrivée au laboratoire, des travaux étaient menés sur deux lignées issues de DLBCL de type GCB, SUDHL4 et SUDHL6, choisies pour leur différence de sensibilité au rituximab (Thèse de Cynthia Bellanger). Il avait été montré que ces lignées expriment les neurotrophines (NGF, BDNF) et leurs récepteurs (p75^{NTR}, Trk, sortiline) et que ces expressions et la localisation (membranaire/cytoplasmique) des récepteurs pouvaient être

modulées par l'engagement du BCR ou encore par des conditions de stress telles que la privation sérique.

1.2 Objectif de travail

La lignée SUDHL6 étant plus sensible au rituximab que la lignée SUDHL4, mon travail a consisté à déterminer si l'expression des NTs pouvait être à l'origine de cette différence. Dans une autre partie du travail, je me suis attachée à préciser si les récepteurs aux NTs étaient fonctionnels, et auquel cas évaluer si leur activation pouvait influencer la réponse au rituximab. Ces travaux ont complété ainsi les données obtenues à partir des travaux de thèse de Cynthia Bellanger et m'ont permis d'être co-auteur de l'article publié en 2011.

1.3 Méthodologie

Afin de déterminer l'impact du rituximab sur l'expression des NTs, nous avons soumis nos lignées GCB à une dose de 20µg/mL de rituximab sur une durée allant de 48h à 72h. Suite au traitement, nous avons récupéré les cellules afin d'effectuer des lysats en vue d'une analyse protéique en western blot. Par la suite, nous avons évalué la fonctionnalité des récepteurs Trk en incubant les lignées avec un inhibiteur sélectif, le K252a (Tapley, et al., 1992). Dans un premier temps, nous avons déterminé la dose-réponse des cellules à l'inhibiteur par l'intermédiaire d'un test de viabilité XTT. Une fois la dose choisie (350nM), nous avons incubé les cellules en présence de K252a et de rituximab 1 ou 20µg/mL seuls ou en association pour déterminer l'influence potentielle de l'activation des récepteurs dans la résistance à l'apoptose induite par le rituximab. Ainsi, l'apoptose cellulaire a été détectée en cytométrie en flux au moyen de marquages avec l'Annexine V-FITC qui se fixe sur les phosphatidylsérines externalisées au cours de l'apoptose, et avec l'iodure de propidium (IP) qui pénètre le noyau de cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Les analyses issues des données de cytométrie en flux ont ensuite été réalisées grâce au logiciel Cellquest.

1.4 Résultats et conclusions

Les analyses en western blot des lysats obtenus après 72h de culture en présence de rituximab ont révélé une augmentation de l'expression du pro-NGF et du pro-BDNF par les cellules des deux lignées étudiées. Cependant, si la sécrétion de NGF augmente chez les deux lignées en présence de rituximab, les sécrétions de pro-BDNF et de BDNF mature par les cellules SUDHL6 semblaient diminuer fortement en présence de rituximab alors qu'elles

étaient stables chez les SUDHL4. De plus, les études d'immunoprécipitations montrent une augmentation de l'expression du récepteur TrkA restreinte aux SUDHL4, cellules moins sensibles que les SUDHL6 à l'effet du rituximab. Ainsi, ces données suggèrent la mise en place de processus autocrines de survie chez les SUDHL4, via l'activation de la voie de signalisation engendrée par l'interaction de NGF avec son récepteur de haute affinité TrkA. Cela favoriserait une relative résistance au rituximab. En revanche, la diminution de la sécrétion du facteur de survie BDNF par les SUDHL6 pourrait expliquer une plus grande sensibilité à ce traitement. L'étude de l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk par le K252a révèle chez les SUDHL4 une diminution significative de la viabilité croissante avec la dose, dès 24h de traitement pour les doses 350nM et 500nM. Ceci est corrélé avec les résultats obtenus en cytométrie en flux puisque l'apoptose induite par le K252a est aussi importante que celle induite par le rituximab. Ces données suggèrent fortement une activation basale des récepteurs Trk dans nos cultures cellulaires. De manière intéressante, l'ajout de cet inhibiteur au rituximab permet d'augmenter ses effets apoptotiques suggérant, comme on l'a évoqué précédemment, la mise en place de boucles autocrines de survie engendrées par l'activation des récepteurs Trk au cours du traitement. Ces derniers résultats suggèrent l'implication des signalisations de survie des neurotrophines dans certaines résistances thérapeutiques et notamment celles observées lors des traitements par le rituximab.

1.5 Article 1: Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis

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

PLoS One. 2011;6(11):e27213

Endogenous Neurotrophins and Trk Signaling in Diffuse Large B Cell Lymphoma Cell Lines Are Involved in Sensitivity to Rituximab-Induced Apoptosis

Cynthia Bellanger¹, Lydie Dubanet¹, Marie-Claude Lise¹, Anne-Laure Fauchais¹, Dominique Bordessoule^{2,3,4}, Marie-Odile Jauberteau¹, Danielle Troutaud^{1*}

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

Abstract

Background: Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a common and often fatal malignancy. Immunochemotherapy, a combination of rituximab to standard chemotherapy, has resulted in improved survival. However a substantial proportion of patients still fail to reach sustained remission. We have previously demonstrated that autocrine brain-derived neurotrophic factor (BDNF) production plays a function in human B cell survival, at least partly via sortilin expression. As neurotrophin receptor (Trks) signaling involved activation of survival pathways that are inhibited by rituximab, we speculated that neurotrophins may provide additional support for tumour cell survival and therapeutic resistance in DLBCL.

Methodology/Principal Findings: In the present study, we used two DLBCL cell lines, SUDHL4 and SUDHL6, known to be respectively less and more sensitive to rituximab. We found by RT-PCR, western blotting, cytometry and confocal microscopy that both cell lines expressed, in normal culture conditions, BDNF and to a lesser extent NGF, as well as truncated TrkB and p75^{NTR}/sortilin death neurotrophin receptors. Furthermore, BDNF secretion was detected in cell supernatants. NGF and BDNF production and Trk receptor expression, including TrkA, are regulated by apoptotic conditions (serum deprivation or rituximab exposure). Indeed, we show for the first time that rituximab exposure of DLBCL cell lines induces NGF secretion and that differences in rituximab sensitivity are associated with differential expression patterns of neurotrophins and their receptors (TrkA). Finally, these cells are sensitive to the Trk-inhibitor, K252a, as shown by the induction of apoptosis. Furthermore, K252a exhibits additive cytotoxic effects with rituximab.

Conclusions/Significance: Collectively, these data strongly suggest that a neurotrophin axis, such NGF/TrkA pathway, may contribute to malignant cell survival and rituximab resistance in DLBCL.

Citation: Bellanger C, Dubanet L, Lise M-C, Fauchais A-L, Bordessoule D, et al. (2011) Endogenous Neurotrophins and Trk Signaling in Diffuse Large B Cell Lymphoma Cell Lines Are Involved in Sensitivity to Rituximab-Induced Apoptosis. PLoS ONE 6(11): e27213. doi:10.1371/journal.pone.0027213

Editor: Jacques Zimmer, Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé), Luxembourg

Received: September 30, 2011; **Accepted:** October 12, 2011; **Published:** November 4, 2011

Copyright: © 2011 Bellanger et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

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). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: danielle.troutaud@unilim.fr

Introduction

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of non-Hodgkin's lymphoma (NHL). This lymphoma is a clinically and biologically heterogeneous disease [1]. Rituximab (a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody), alone or combined with chemotherapy, has demonstrated efficacy in DLBCL, resulting in an increased proportion of cured patients disease [2]. The *in vivo* mechanisms of rituximab-mediated antitumor effects include antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cell cytotoxicity (CDC), growth-inhibition and apoptosis by binding to the CD20 antigen specifically expressed on B-cells [3]. Constitutively activated growth signaling pathways have frequently been observed in DLBCL tumors and DLBCL cell lines including protein kinase AKT and nuclear factor κ B (NF- κ B) transcription factor. Activation of these pathways controls a variety of mechanisms that inhibit apoptosis and

prolong cell survival notably in resulting downstream overexpression of functional anti-apoptotic proteins such as Bcl-x_L and Bcl-2 that can also lead to chemoresistance [4,5]. Interestingly, by contrast, treatment with rituximab inhibits these survival pathways resulting in augmentation of the association of Bcl-X_L and Bad, as well as downregulation of Bcl-X_L expression leading to chemosensitization [6]. Despite therapeutic advances, a subset of patients does not respond or relapses after the initial treatment, and the mechanism of rituximab resistance, a growing concern, is not clear [3]. Thus, it is still important to identify new targets for development of additional therapeutic options.

Members of the neurotrophin (NT) family like nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are structurally and functionally related neurotrophic factors that control neuron survival and axon growth during nervous system development and repair [7]. Each NT binds to a specific high-affinity tyrosine kinase receptor, Trk. NGF binds to TrkA, BDNF

and NT-4/5 to TrkB. In addition NTs share a common low-affinity p75^{NTR} NT receptor (p75^{NTR}) a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily. Signaling by NTs through Trk and p75^{NTR} receptors has been extensively studied in the context of nervous system development, survival, and plasticity. NT binding to Trk receptors results in receptor dimerization, leading to subsequent signaling cascades including MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3 kinase/Akt) and NF- κ B that favour cellular survival [8,9]. In contrast, the functions of the p75^{NTR} receptor are complex and have been more difficult to ascertain. It is clear that p75^{NTR} functions as a Trk co-receptor that increases binding affinity and specificity of Trk [10], but engagement of p75^{NTR} also triggers divergent pathways involving notably Jun kinase (JNK) activity and caspase activation, that facilitate apoptosis [11]. Thus, while p75^{NTR} binding can increase the survival effect of Trk-NT interactions, p75^{NTR} can also induce apoptosis when Trk is reduced or absent. Furthermore, NTs are synthesized as pro-NTs which proteolysis generates mature NTs. Both the pro-NTs and the mature forms are secreted. However they display opposite biological activities on cell proliferation and apoptosis. Indeed, pro-NTs such as pro-NGF and pro-BDNF, display greater affinity for p75^{NTR} and preferentially interact with sortilin —also known as neurotensin receptor-3 and a member of the Vps10p-domain receptor family —together with p75^{NTR} to form a complex capable of activating an apoptotic cascade [12,13]. Thus, the overall cellular outcome in response to NT exposure reflects a balance between p75^{NTR} and Trk engagement that is controlled by pro-NT processing.

Although NTs are thought to exert their actions predominantly on neurons, increasing evidence shows that some NTs, notably NGF and BDNF, can also influence the development and activation of many cell types of the immune system, including B lymphocytes [14,15,16]. NT (NGF, BDNF) and TrkA, TrkB, p75^{NTR} receptor expressions have been detected in normal human B lymphocytes and in human B cell lines. Membranous or intracellular localization varied according to cell line and culture conditions [17,18]. In B cells, autocrine BDNF and NGF signaling appears to be essential for the survival of mature and memory B cells, respectively, especially in pro-apoptotic or pro-inflammatory conditions [19,20,21]. Trk and their NT ligands have been also found in malignant B cell lines notably multiple myeloma and NHL cell lines [22,23] but involvement of NTs in the pathogeny of B cell tumors, and notably in DLBCL, needs to be elucidated.

In recent studies we have shown an autocrine production of BDNF and pro-BDNF in human pre-B, mature, and plasmacytic malignant B cell lines. The endogenous BDNF released under stress culture conditions, such as serum deprivation and/or Fas-induced apoptosis, exerts antiapoptotic effects. Furthermore, we demonstrated that this autocrine regulation is linked to the presence of sortilin which has not been previously described in B cells [24]. The goal of this study was to define the NGF and BDNF expression and secretion and their respective TrkA, TrkB and p75^{NTR} receptors in DLBCL cells cultured under standard and apoptotic conditions, including exposure to rituximab, to evaluate a potential link between rituximab sensitivity and NT production. To assess this hypothesis we used two DLBCL cell lines, SUDHL4 and SUDHL6, known to be respectively less and more sensitive to the rituximab induced-apoptosis [25]. We report herein i) that NGF, BDNF, TrkB, p75^{NTR} and its co-receptor sortilin were expressed in two DLBCL cell lines and ii) that their responsiveness to rituximab was depending on NT secretion and TrkA expression suggesting a relationship between Trk signaling and rituximab sensitivity.

Materials and Methods

Human B cell lines and cell cultures

The CD20-expressing human DLBCL cell lines SUDHL4 and SUDHL6 were obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany). Under basal culture conditions, the B cell lines (5×10^5 cells/ml) were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Calf Serum (FCS), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine (Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. NTs production and expression of p75^{NTR} and Trk receptors were analyzed in different cell culture conditions (24–72 h): with (control) and without FCS (serum deprivation), in the presence of 1–20 μ g/ml of rituximab (MabThera®, stock 10 mg/ml, a generous gift from CHRU Dupuytren of Limoges, Pharmacie centrale, France) or control human IgG (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, UK). For K-252a sensitivity tests, cells were grown in triplicate in 96 well tissue culture plates (starting with 5×10^4 cells/well) with various concentrations of K-252a (0–500 nM, Alomone labs, Jerusalem, Israel).

Antibodies

Rabbit mAb anti-Akt (Akt[pan], C67E7), anti-phospho-Akt (Ser473, D9E and Thr308, C31E5E), and rabbit mAb anti- β -actin (13E5) were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Mouse mAbs Anti-TrkA (MAB1751) and anti-TrkB (MAB3971) were purchased from R&D System (Minneapolis, MN, USA). Anti-NGF (rabbit polyclonal Ab, H-20), anti-BDNF (rabbit polyclonal Ab, N-20), anti-p75^{NTR} (H-137, a rabbit polyclonal Ab reactive with the N-terminal domain of p75^{NTR}), anti-p75^{NTR} (H-92, a rabbit polyclonal Ab reactive with the C-terminal domain of p75^{NTR}) and anti-sortilin (a goat polyclonal Ab, C20) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Purified mouse or rabbit IgG Ab (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were used as negative controls to determine background and positive thresholds.

Cell viability assay

Cellular viability of DLBCL cell lines was assessed using the colorimetric XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate)-assay (Cell Proliferation Xit II, XTT Roche, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as the relative cell viability of untreated control cells.

Analysis of apoptosis

DNA fragmentation was detected by flow cytometric analysis after propidium iodide staining as previously described [26] and using a FACSVantage DIVA SE flow cytometer. Percentage of apoptotic cells was then defined as the percentage of cells with DNA staining before G0/G1 peak (hypodiploid, sub-G1 peak). Furthermore apoptosis-associated phosphatidylserine (PS) exposure on the outer plasma membrane was also analyzed by flow cytometry using the PI/Annexin V-FITC double staining method (kit Beckman Coulter, Villepinte, France); this method effectively distinguishes apoptotic cells from necrotic cells. Annexin V-positive and propidium iodide-negative cells were scored as apoptotic cells. Cells were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) acquiring 10 000 events.

Flow cytometric analysis

Expression of TrkA, TrkB, p75^{NTR}, BDNF and NGF was studied on 2×10^6 cells by flow cytometry with or without (TrkA,

TrkB and p75^{NTR}) permeabilization (Intrastain Kit, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) as per the manufacturer's instructions. After washing in 1% BSA-PBS and incubation with 5% BSA-PBS for 15 min at room temperature, cells were incubated at room temperature for 15 min with either anti-TrkA or anti-TrkB (12.5 µg/ml) or anti-p75^{NTR}, anti-BDNF, anti-NGF (10 µg/ml) or isotypic controls. After washing, samples were then incubated with Alexafluor 488-conjugated goat either anti-mouse IgG Ab or anti-rabbit IgG Ab (both, 1 µg/ml; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for 15 min at room temperature. After washing, cells were suspended in PBS and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). For samples without permeabilization (membrane expression of receptors), all incubations were realized for 30 min at 4°C and finally resuspended in PBS with 1% formaldehyde, before analysis by flow cytometry acquiring 10 000 events.

Immunofluorescence microscopy

After two washes in PBS, samples ($2-4 \times 10^6$ cells) were fixed for 30 min at 4°C with 1% formaldehyde in PBS for 10 min at 4°C. After washing, an ice-cold 100% methanol permeabilization step was realized for 10 minutes at 4°C and then cells were rinsed in PBS for 5 min. The samples were further blocked with 5% goat serum in PBS and then incubated for 30 minutes at 4°C with primary antibodies (anti-Trk, anti-BDNF, anti-NGF, p75^{NTR}) or IgG controls. After washing, cells were incubated with Alexafluor-conjugated secondary antibodies (dilution: 1/1000) for 30 min at 4°C. After two step washes, samples were finally incubated with DAPI (Molecular Probes, Invitrogen), coverslipped and sealed using mounting media (Dako North America, Carpinteria, CA, USA). Pictures were captured using a Leica microscope and a Leica digital camera. Images were processed using Leica IM500 Image Manager. For cell surface antigen stainings, incubations with primary and secondary antibodies were realized before the formaldehyde fixation step.

Western blotting

Proteins were obtained from whole cell lysates or from supernatants of cell cultures. After two washes in PBS, cell lysates were prepared using lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% Nonidet P40, 10% glycerol, 150 mM NaCl supplemented with 1% protease and phosphatase inhibitor mixtures) (Sigma) followed by centrifugation at 20 000 g for 20 min at 4°C. Cell supernatants were concentrated to analyze neurotrophins released by B cultured cells. Briefly, growth medium was collected and centrifuged for 30 min at 3000 g in vivaspin columns (Millipore, Billerica, MA, USA). Equal amounts of proteins from cell lysates and cell supernatants (50 µg/lane) were separated on SDS-polyacrylamide gels under denaturing conditions and transferred onto nitrocellulose sheets (PALL Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA). Nonspecific binding sites were blocked for 1 h with 5% nonfat dry milk in TBS containing 0.1% Tween 20. After overnight incubation at 4°C with specific primary Ab (dilution 1/200), membranes were incubated with appropriate HRP-conjugated secondary Ab (DakoCytomation; dilution 1/1000) for 1 h at room temperature and revealed by an enhanced chemiluminescent detection method (Immubilon Western, Millipore). Protein-loading control was performed with anti-βactin Ab. Western blots were scanned using a bioimaging system (Genesnap; Syngene Europe, Cambridge, UK).

For co-immunoprecipitation studies, cell lysates (200 µg) were incubated with anti-Akt or anti-BDNF antibody (1/50) for 1 h at 4°C and then with protein A/G-Agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) with gentle mixing overnight at 4°C. Beads were

washed three times with lysis buffer and subsequently boiled for 5 min in SDS-sample buffer and finally immunoprecipitates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, before analysis by western blotting.

Measurement of neurotrophin secretion by ELISA

BDNF and NGF concentrations in cell supernatants were determined by using the BDNF E_{max} and NGF E_{max} Immuno-Assay Systems (Promega France, Charbonnières les Bains, France) as previously described [24]. This assay cannot distinguish between pro-NT and mature NT. When detected, neurotrophin secretions were expressed as pg/10⁶ cells.

RT-PCR analysis

TRIzol was used to isolate total RNA from 5×10^6 SUDHL cells. cDNA synthesis was performed with the Super Script III First-strand synthesis kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, using oligo(dT). Then amplification was performed using *Taq*DNA polymerase (Invitrogen) and specific primer sequences (Table 1) as previously reported [24]. Transcripts of NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75^{NTR} and sortilin were obtained using UnoCycler (VWR France, Fontenay sous Bois, France). Total RNA isolated from a human neuroblastoma cell line (IMR32) was used as a positive control.

Statistical analysis

Data on cell viability were compared by ANOVA with Statview 5.0 software (Abacus Concepts). A value of $p \leq 0.05$ was considered as significant.

Results

Expression and production of NTs in DLBCL cell lines

BDNF and NGF expression in DLBCL cell lines was characterized at the transcript level in the both cell lines SUDHL4 and SUDHL6, maintained in basal (10% FCS) culture conditions for 3 days (Figure 1A). Controls assessed that cell viability was not modified at 72 h in both SHDHL cell lines (data not shown). These expressions were confirmed at the protein level by western blotting with the detection for BDNF and, to a lesser extent for NGF, of the immature forms of NTs (pro-NGF: 27 kDa, pro-BDNF: a 32/34 kDa doublet proteins, Figure 1B). Moreover NT expression was also confirmed by flow cytometric analysis after cell permeabilization in four experiments. Indeed, as shown in Figure 1C, NGF and BDNF were detected in the majority of cells under basal culture conditions ($80.4\% \pm 13.8\%$ and $87.3\% \pm 5.6\%$ of positive cells, respectively, for SUDHL4 and $77.6\% \pm 12.7\%$ and $82.7\% \pm 16.8\%$ of positive cells, respectively, for SUDHL6). Interestingly, pro-BDNF and mature BDNF were also found in culture supernatants from both cell lines, notably in SUDHL6 cell supernatants, after immunoprecipitation and western blotting (Figure 1D), whereas this basal production was often under the range of detection of the ELISA assay (data not shown). Moreover, secretion of NGF in basal culture conditions of SUDHL cell lines was not detected by immunoprecipitation nor by ELISA (data not shown).

DLBCL cell lines express p75^{NTR}/sortilin and TrkB receptors

To evaluate the possibility of an autocrine mechanism of NT signaling we also analyzed Trk and p75^{NTR} expression in the two DLBCL cell lines using RT-PCR, western-blotting and flow cytometry. Transcripts of the low-affinity common receptor

Table 1. Primers used in RT-PCR studies.

Name	Primer sequences	Amplified fragments	Hybridation temperature	3' location
BDNF	F: TACTTTGGTTGCATGAAGGCTGCC	266 pb	58°C	596
	R: ACTTGACTACTGAGCATCACCCCTG			
NGF	F: ATACAGGCGGAACCACTC	313 pb	58°C	123
	R: TGCTCCTGTGAGTCCTGTTG			
TrkA	F: TCAACAAATGTGGACGGAGA	197 pb	58°C	1372
	R: GTGGTGAACACAGGCATCAC			
TrkB145	F: AGGGCAACCCGCCACGGAA	571 pb	60°C	2860
	R: GGATCGGTCTGGGAAAAG			
TrkB95	F: GTTTCATAAGATCCCACTGGA	261 pb	58°C	7111
	R: TGCTGCTTAGCTGCCTGAGAG			
p75^{NTR}	F: GTGGGACAGAGTCTGGGTGT	200 pb	60°C	3109
	R: AAGGAGGGGAGGTGATAGGA			
Sortilin	F: CTGGGTTGGACAATCTTT	199 pb	60°C	1161
	R: CACCTTCCTCTTGGTCAA			
β-actin	F: TGGATTCCTGTGGCATCCATGAAAC	355 pb	58–60°C	2828
	R: TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG			

F: forward; R: reverse.

doi:10.1371/journal.pone.0027213.t001

p75^{NTR}, and strikingly its co-receptor sortilin were detected by RT-PCR in both cell lines (Figure 2A) which was confirmed at the protein level by western blotting (Figure 2B) and immunofluorescence (p75^{NTR}, data not shown). However, membrane expression

of p75^{NTR} was not detected by flow cytometry (data not shown). As shown in Figure 2A, after 72 h cell culture in basal conditions we never detected TrkA mRNA in either cell line. Interestingly, RT-PCR analyses revealed, in both cell lines and notably in

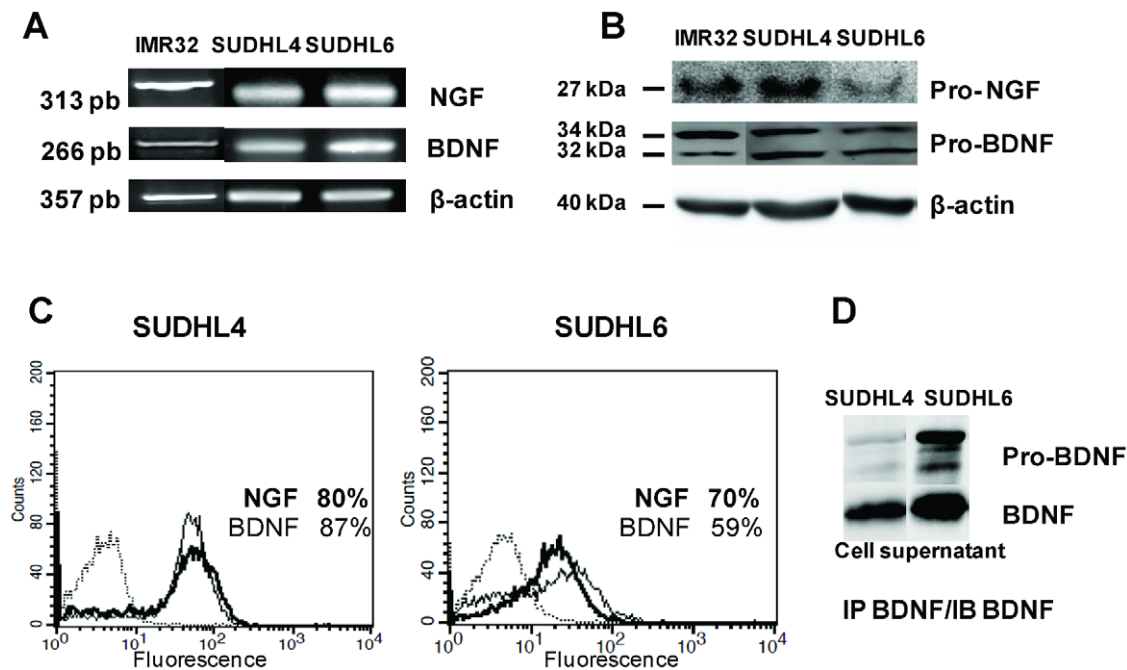


Figure 1. DLBCL cell lines produce neurotrophins. **A:** RT-PCR detection of NGF and BDNF mRNA was performed on SUDHL4 and SUDHL6 cells cultured with 10% FCS for 72 h. β -actin was included as a control of cDNA quality. **B:** Neurotrophin production was confirmed by western blotting of cell lysates demonstrating immature forms. Blots were reprobed with anti- β -actin as a loading control. **C:** Flow cytometry analysis demonstrating NGF (bold line) and BDNF intracellular expression in permeabilized cells (isotypic controls in dotted line). **D:** secretion of immature and mature BDNF was also detected in cell supernatants after immunoprecipitation (IP) and immunoblotting (IB) analysis. The neuroblastoma cell line, IMR32, was used as a positive control. Data are from one representative experiment out of four (RT-PCR, Flow cytometry and WB) or two (IP/WB) performed. doi:10.1371/journal.pone.0027213.g001

SUDHL6, expression of the truncated form of TrkB (gp95) (Figure 2A) but not full-length TrkB (gp145, data not shown). However, as for p75^{NTR}, we could not detect by flow cytometry membranous TrkA or TrkB protein expression in SUDHL4 cells cultured in basal conditions. In contrast, as shown in Figure 2C, flow cytometric analyses from 4 separate experiments revealed intracellular staining of TrkB in the majority of cells for both DLBCL cell lines, but TrkB membrane detection was observed only for ~20% SUDHL6 cells (17%±7% of positive cells). According that anti-TrkB antibodies were raised to recognize the extracellular domain of both isoforms of the receptor (gp95 and gp145), our results collectively suggest that the TrkB receptor expressed in SUDHL6 cells is the truncated TrkB. Finally, positive expression of TrkB by some SUDHL6 was also confirmed by immunofluorescence assays (Figure 2D), whereas isotype control antibodies did not produce any detectable staining of the cells (data not shown). Of note, this TrkB expression by SUDHL6 was observed in cells, which were also positive for BDNF staining, suggesting a potential autocrine support for BDNF/TrkB signaling pathway (Figure 2D).

Modulation of NT production and TrkB/p75^{NTR} expressions are induced by serum deprivation

As membranous expression of TrkB and p75^{NTR} was moderate or not present respectively in basal conditions, we further analyzed

these expressions and NT production under stress conditions. Thus, cells were studied after serum deprivation for 24–72 h. Results were obtained after 72 h serum deprivation only for SUDHL4 cells, which were more resistant to this apoptotic condition. The apoptotic response was evaluated by flow cytometric detection of DNA fragmentation (27%±3% of sub-G1 cells in deprived condition, as compared to 3%±3% in the 10% FCS control, data not shown). Under such conditions, we observed a strong reduction in the number of NGF and BDNF positive SUDHL4 cells surviving after 72 h in culture (Figure 3E). Consistent with these data, production of BDNF in cell supernatant was no longer detectable after immunoprecipitation and western blotting (Figure 3D). Strikingly, after 72 h culture in FCS-free medium, mRNA TrkB truncated expression was clearly enhanced (Figure 3A) as compared with basal conditions (10% FCS), which was confirmed at the protein level by flow cytometry (Figure 3E). Indeed, in contrast to basal conditions, TrkB membranous expression appeared in 30%±10% SUDHL4 deprived cells after 72 h culture, whereas intracellular detection of TrkB was strongly reduced, suggesting membrane relocation of this receptor. Finally a weak enhanced expression of protein p75^{NTR} was also observed by western-blotting in serum deprived cell lysates, without affecting sortilin expression or association (Figure 3B and C). Of note, the bands of p75^{NTR} were detected

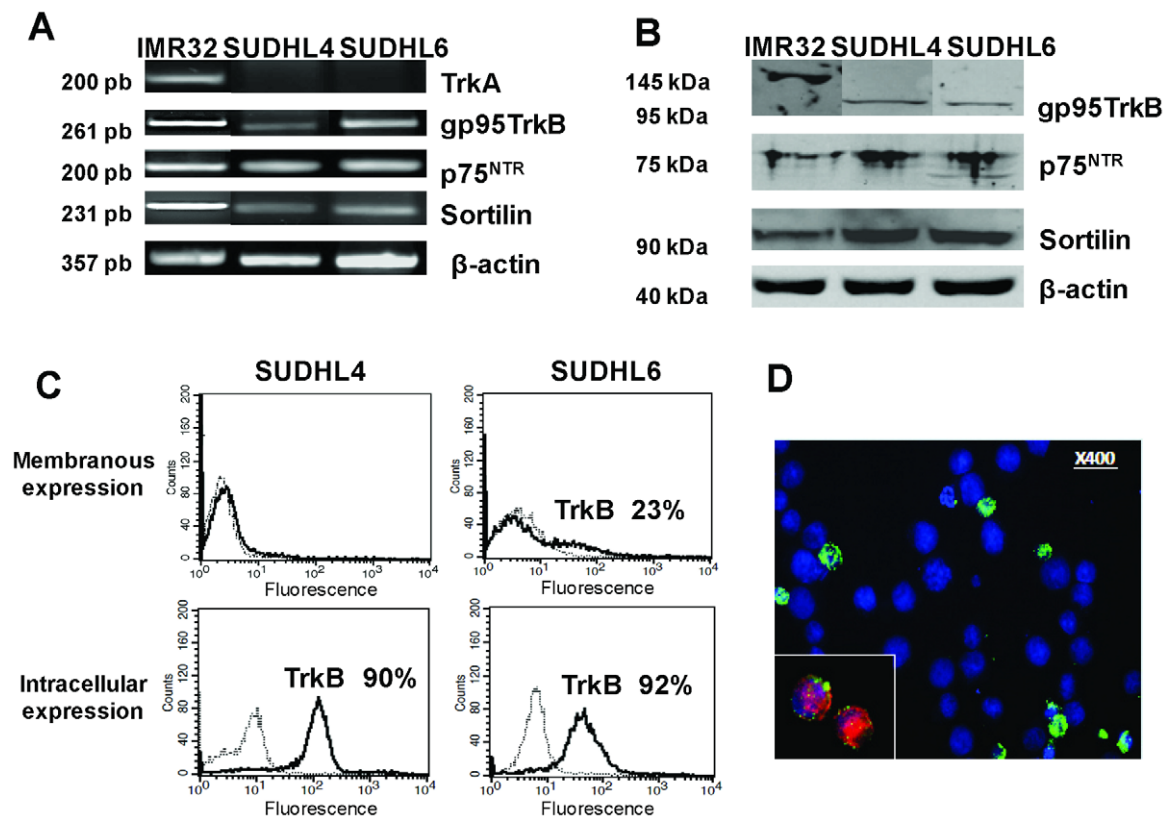


Figure 2. DLBCL cell lines express neurotrophin receptors. **A:** RT-PCR detection of p75^{NTR}, and its co-receptor sortilin, TrkA and truncated gp95TrkB mRNA was performed on SUDHL cells cultured with 10% FCS for 72 h. β -actin was included as a control of cDNA quality. **B:** The truncated TrkB, p75^{NTR} and sortilin receptor protein expression was confirmed by western blotting of cell lysates. Blots were reprobated with anti- β -actin as a loading control. **C:** Flow cytometry analysis demonstrating TrkB membrane detection expressed in percentage of positive cells (bold line) in unpermeabilized SUDHL6 cells in contrast to SUDHL4 cells, whereas both cell lines expressed intracellular TrkB (dotted line: the isotypic controls). **D:** Immunofluorescence staining was performed, as described in Materials and Methods, in DLBCL cell lines that confirmed surface TrkB expression (in green) in some BDNF (inset in red) positive SUDHL6 cells (in blue: DAPI staining). The neuroblastoma cell line, IMR32, was used as a positive control. Data are representative of four independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0027213.g002

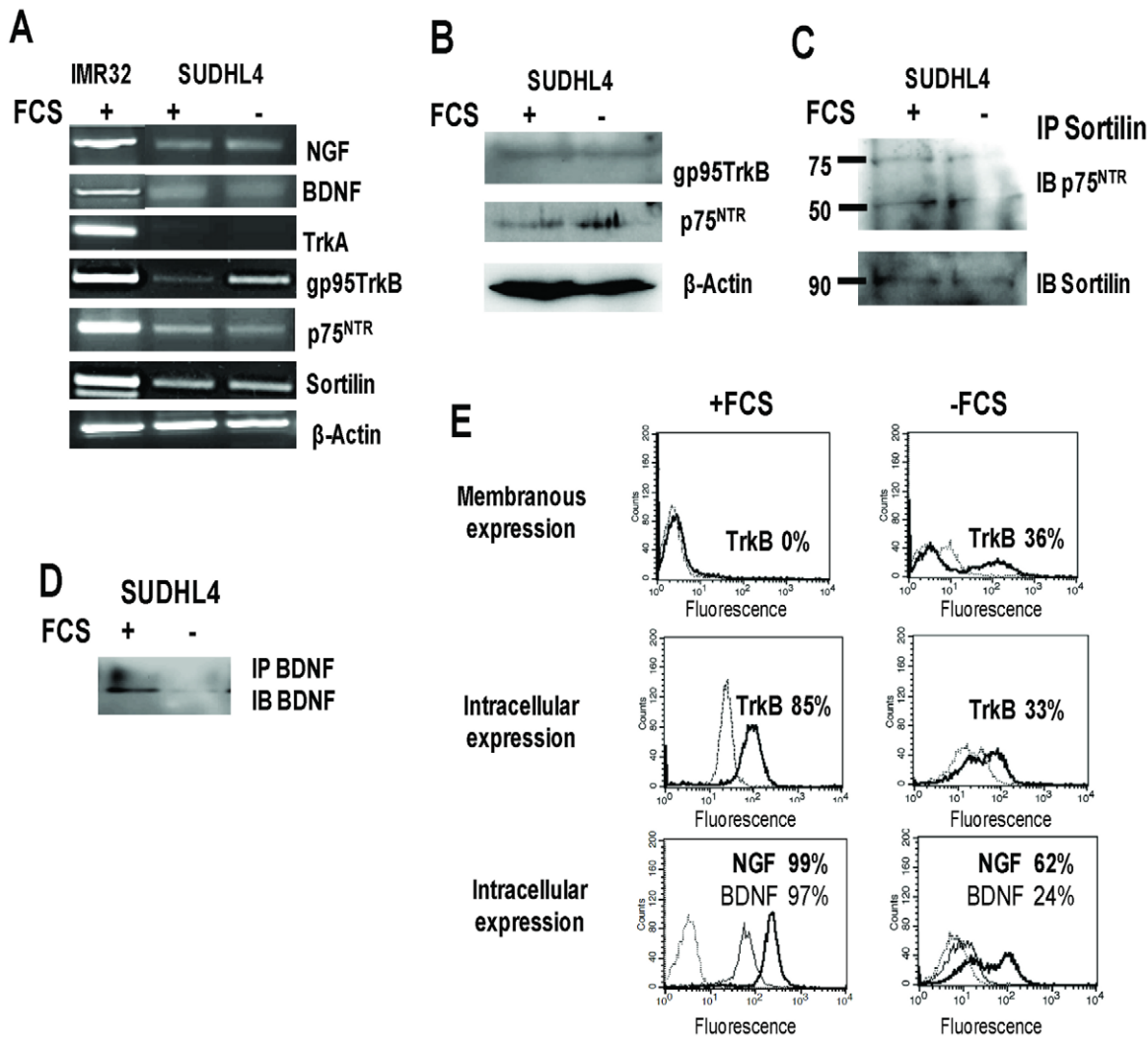


Figure 3. Modulation of neurotrophin and TrkB expression by SHDHL4 cells is induced by serum deprivation. **A:** RT-PCR analysis of NGF, BDNF, TrkA, gp95TrkB, p75^{NTR} and sortilin mRNA on SUDHL4 cells submitted to 72 h serum deprivation (–FCS) as compared to standard culture conditions (10% FCS, +FCS). β -actin was included as a control of cDNA quality. **B:** Western blot detection of truncated TrkB and p75^{NTR} protein expression. Blots were reprobated with anti- β -actin as a loading control. **C:** Immunoprecipitation of sortilin (IP) and western blotting analysis (IB, immunoblotting with anti-p75^{NTR} or anti-sortilin as control) demonstrating the association of sortilin with p75^{NTR} in cell lysates of both culture conditions. **D:** secretion of BDNF detected in cell supernatants after immunoprecipitation and western blotting. **E:** Flow cytometry analysis demonstrating membranous expression of TrkB (bold line) and intracellular TrkB, NGF (bold line) and BDNF expressions expressed in percentage of SUDHL4 positive cells cultured with or without FCS (dotted line: isotypic controls). Data are representative of four independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0027213.g003

at 75 and 50 kDa after sortilin immunoprecipitation, corresponding to the mature and the ectodomain shedding pieces of p75^{NTR} respectively. Collectively, our results showed lower neurotrophin production and enhanced expression of receptors (i.e. p75^{NTR}, truncated TrkB) in association with apoptotic culture conditions.

Rituximab sensitivity of DLBCL cell lines is associated with regulation of NT production and Trk receptor expression

The CD20-expressing human DLBCL cell lines tested in the present study has been reported to have differential apoptotic sensitivity in response to rituximab, SUDHL6 cells being more sensitive than other DLBCL cell lines and notably SUDHL4. Thus to evaluate a potential link between anti-CD20 sensitivity and NT production, we analyzed secretion of NGF and BDNF, as well as expression of receptors in cell cultures with or without rituximab.

As a negative control, an isotype control of rituximab was also done (IC). To investigate the dose-response relationship and the kinetics of growth inhibition and cell death induced by rituximab, SUDHL cells were incubated in the presence of various concentrations of rituximab (0, 0.1, 1, 10 and 20 μ g/ml) for 6 to 72 h. Cell viability was then monitored by the XTT assay. Furthermore, the ability of rituximab to induce apoptosis in SUDHL cells was measured by detecting PS translocation using Annexin V/PI staining, and evaluation of DNA fragmentation, followed by flow cytometry analyses. Figure 4 shows results obtained (viability) or representative (annexin V/PI stainings) of 4 independent experiments. Viability and PS translocation data confirmed the apoptotic effect of rituximab on both DLBCL cell lines, with a dose-dependent and a kinetic effect. No significant difference was observed when the isotypic control was compared to the culture control without rituximab (Figure 4A). Furthermore,

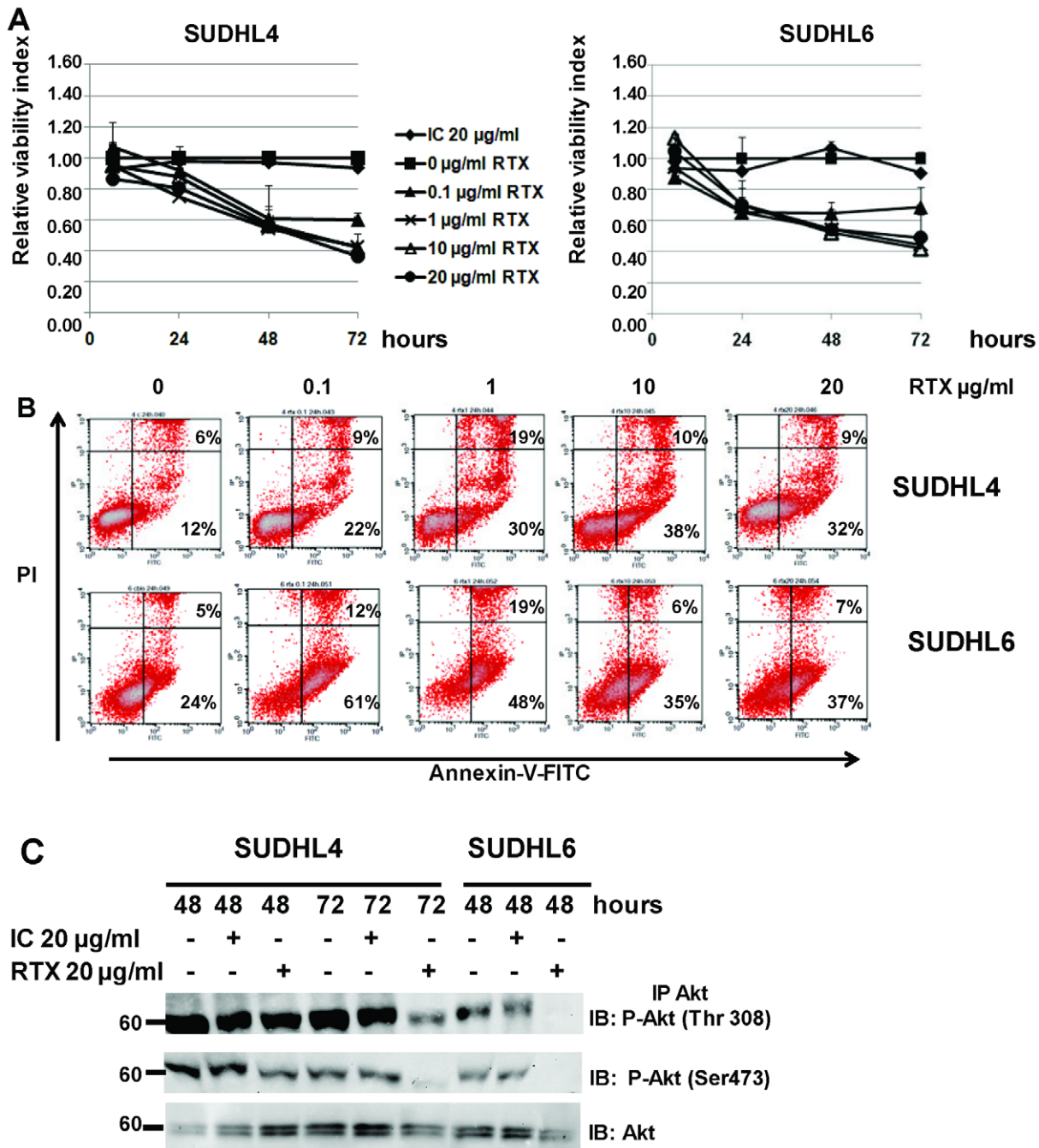


Figure 4. Effects of rituximab treatment on DLBCL cell lines. **A:** Viability of SUDHL4 and SUDHL6 cells exposed to various concentrations of rituximab (RTX) during 72 h in serum basal culture condition (10% FCS). Viability was determined by XTT assay and calculated relative to time-matched untreated (0) controls. A control human IgG was also used as negative control (IC: Isotype control). Results are expressed as means \pm SD of four experiments. **B:** Apoptosis induced by rituximab was measured after 24 h culture by Annexin-V-FITC/PI dual staining and the ratio of apoptotic (lower right quadrant) and necrotic (upper right quadrant) cells expressed as cell percentages was analyzed by flow cytometry. **C:** Rituximab induced inhibition of PI3K/Akt signaling which was detected by immunoprecipitation of Akt and western blot analysis of phosphorylated Akt (P-Akt) at 48 h and 72 h in SUDHL6 and SUDHL4 cell lysates. Data are representative of four independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0027213.g004

statistical analysis of the rituximab effect revealed by the XTT test showed a significant reduction of viability, which was seen for both cell lines from 1 µg/ml rituximab and after 48 h treatment (i.e. at 1 µg/ml rituximab: $p < 0.01$ and $p < 0.05$ for SUDHL4 and SUDHL6 respectively). This effect was enhanced after 72 h of cell exposure ($p < 0.001$ for both cell lines and from 1 µg/ml rituximab). However, the percent of hypodiploid nuclei (sub-G1)

induced by rituximab in the two cell lines was relatively low, even if a pronounced effect was found with SUDHL6 (data not shown). The maximum response was reached for SUDHL4 at 20 µg/ml rituximab after 72 h (Figure 4A). In contrast, SUDHL6 cells were more sensitive, with a strong cell cytotoxicity following 24 h exposure to rituximab, which was observed even at low dose of rituximab ($p = 0.05$ for 0.1 and 1 µg/ml rituximab treatment of

SUDHL6 cells, whereas no significant effect was observed with the SUDHL4 cell line). This differential apoptotic sensitivity of the two cell lines in response to rituximab was confirmed by flow cytometric analysis. A dose response was obtained for SUDHL4 after 24 h exposure, whereas a strong apoptotic response was often observed in SUDHL6 at this time for lower doses of rituximab (i.e. 61% of apoptotic cells as shown in Figure 4B), following by a decrease with high concentrations. Consistent with this, constitutive phosphorylation of Akt seemed to be enhanced in the more rituximab-resistant cell line, SUDHL4. Moreover, inhibition of the constitutively active PI3K/Akt signaling pathway was observed in SUDHL6 cells previously than SUDHL4 cells. Indeed, in contrast to the weak inhibition of P-Akt (Ser473) observed in SUDHL4, a strong dephosphorylation of Akt (Ser473 and Thr308) by rituximab was detected in SUDHL6 cell lysates after 48 h

exposure to 20 µg/ml rituximab (Figure 4C). As results for NTs strongly suggested an autocrine/paracrine survival axis in the SUDHL cell lines tested, we next analyzed expression of NTs and their receptors in cell cultures after 48 and 72 h exposure to rituximab (20 µg/ml). We found that rituximab induced NGF expression in both cell lines (Figure 5B), which was associated with the detection of NGF in cell supernatants. In contrast to basal culture conditions, strong NGF secretion was detected by ELISA for both cell lines after 48 h rituximab exposure that further decreased at 72 h (Figure 5D). In SUDHL4, the less rituximab sensitive cell line, it is noteworthy that NGF secretion was correlated with TrkA receptor expression, although weak, both at the transcript and protein levels, in contrast to SUDHL6 cells. Indeed, a low level of TrkA mRNA was detected after 48 h (SUDHL4 and SUDHL6 cells) and 72 h (SUDHL4 cells) of

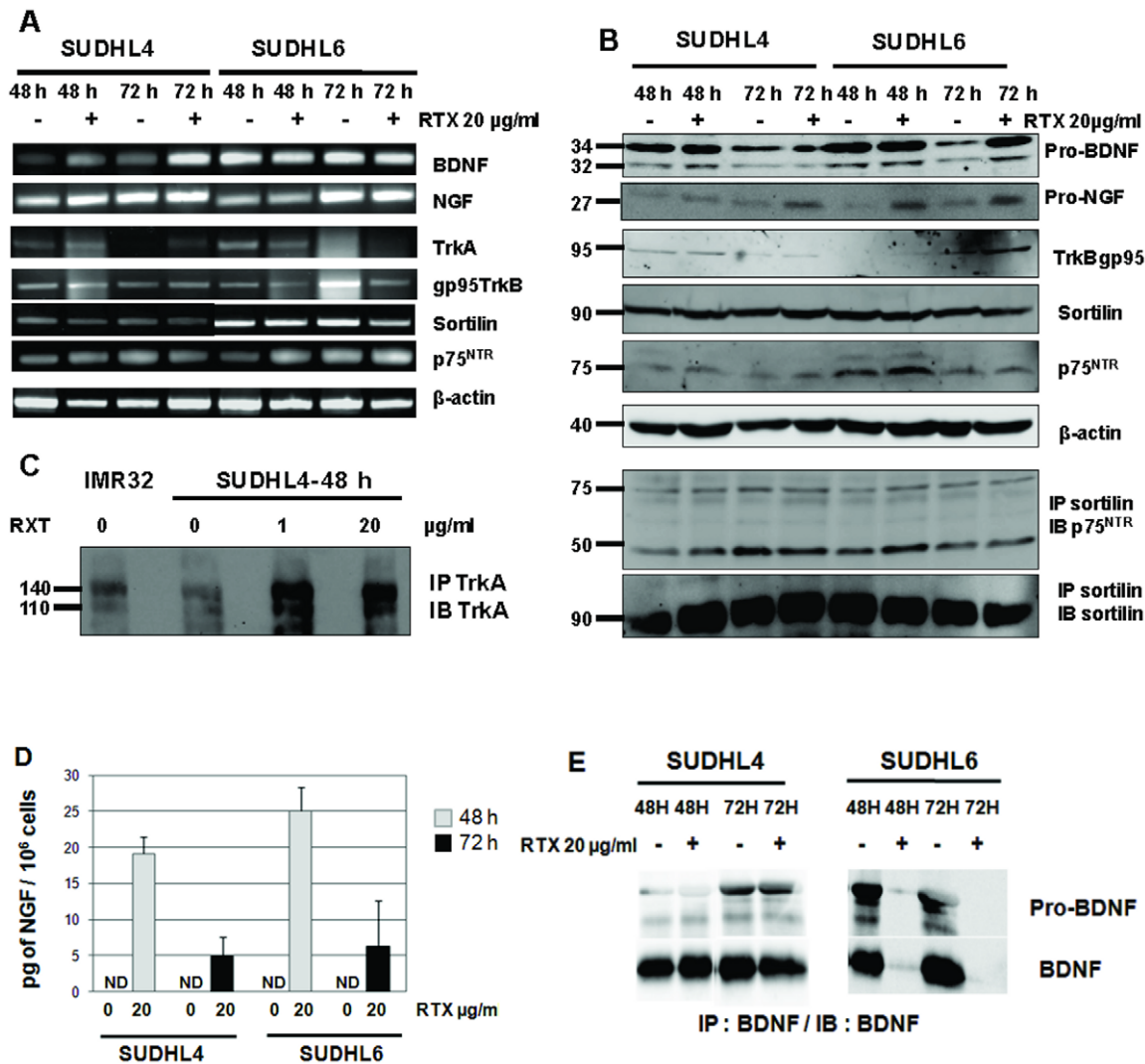


Figure 5. Effects of rituximab on neurotrophin production and Trk expression in DLBCL cell lines. **A:** RT-PCR analysis of NGF, BDNF, TrkA, truncated TrkB, sortilin and p75^{NTR} mRNA in SUDHL4 and SUDHL6 after 48 h and 72 h exposition to 20 µg/ml rituximab (RTX). β-actin was included as a control of cDNA quality. **B:** Western blott demonstrating in particular NGF protein expression following rituximab treatment and heterodimerization of p75^{NTR} with sortilin in cell lysates. Blots were reprobed with anti-β-actin as a loading control. **C:** Enhanced TrkA expression induced by rituximab was observed for the less rituximab sensitive cell line, SUDHL4, after immunoprecipitation (IP) and immunoblotting (IB) with specific antibodies. **D:** NGF production was confirmed after rituximab exposure by detection with ELISA in cell supernatants of both cell lines, whereas it was undetectable (ND, non detected) in control cultures. Results are means ± SD of three independent experiments. **E:** BDNF secretion seemed to decrease in the most rituximab sensitive cell line, SUDHL6, as shown by western blott analysis of BDNF in cell lysate immunoprecipitates. Data are from one representative experiment out of four (RT-PCR, WB) or two (IP/WB) performed. doi:10.1371/journal.pone.0027213.g005

rituximab exposure (Figure 5A), but enhanced expression of the TrkA receptor at the protein level was only observed for SUDHL4 cells by immunoprecipitation of TrkA in cell lysates (Figure 5C). As shown in Figure 5A, TrkA mRNA were also slightly detected after 48 h of culture in the control cell of both cell lines. Furthermore, we observed a decreased production of BDNF and pro-BDNF in cell supernatants of the most rituximab sensitive cell line, SUDHL6, exposed to rituximab, in contrast to SUDHL4 cells which seemed to maintain BDNF synthesis (Figure 5E). Moreover, rituximab did not modify expression of the truncated form of TrkB (gp95), or p75^{NTR} or sortilin expression at both mRNA and protein levels (Figure 5 A and B). Similarly, there was no change in protein expression of the p75^{NTR} forms (75 and 50 kDa) found in sortilin immunoprecipitates in both cell line lysates. Thus, these data suggest that differences in rituximab-induced apoptotic sensitivity could involve differential expression of survival Trk signaling in DLBCL cell lines.

Pharmacologic inhibition of Trk receptors induces apoptosis of DLBCL cells

Presence of both Trk receptors and NTs, notably BDNF expressed with TrkB receptors, in both cell lines suggest an autocrine pathway of neurotrophin signaling in DLBCL. In order to address the functionality of Trk receptors expressed in DLBCL cell lines, SUDHL cells were incubated with various concentrations of the Trk inhibitor K252a and cell survival was measured (Figure 6A). Results showed a strongest sensitivity of SUDHL4 cells to K252a by 24 h treatment, with significant decrease of viability correlated with increasing amounts of K252a. Indeed, SUDHL6 cells were significantly sensitive to cell death after 48 h of K252a exposure (data not shown). As shown in Figure 6B, K252a-induced cytotoxicity in SUDHL4 cells was associated with a strong apoptosis, measured with annexin-V/PI staining, after a 48 h exposure (i.e. 30.8% of apoptotic cells with 350 nM K252a *vs* 13% in DMSO culture controls). Interestingly, apoptosis obtained in SUDHL4 cells by inhibiting Trk receptors was comparable to the apoptotic effect of rituximab (i.e. 36.9% of apoptotic cells for 20 µg/ml rituximab). Furthermore, K252a exhibited additive cytotoxic effects with rituximab (i.e. 56.7% of apoptotic cells in presence of rituximab 20 µg/ml+K252a 350 nM). These data strongly support our hypothesis that autocrine neurotrophin signaling is an important survival factor for DLBCL cell lines, and may interfere with rituximab leading to therapeutic resistances.

Discussion

In the present study we demonstrated that DLBCL cell lines expressed the gene transcripts and proteins for BDNF and to a lesser extent NGF, and the high-affinity truncated TrkB as well low-affinity p75^{NTR} receptors. Furthermore, secretion of BDNF and pro-BDNF were also observed in DLBCL cell line supernatants, even though variable with the cell line. Moreover, in both cell lines, we detected strong sortilin (NTR3) expression, an intracellular transport protein for NTs and proNTs which is also involved, by heterodimerization with p75^{NTR}, in the cell death effect of pro-NTs. However, they lacked, in basal culture conditions, detectable mRNA expression for the full-length TrkB and TrkA receptors, but expressed the truncated form of TrkB. NT production and Trk receptor expression, including TrkA, seemed to be regulated by culture conditions that modulate cell survival (serum deprivation or rituximab exposure).

Several microarray studies performed on untreated *de novo* DLBCL identified two main prognostically different subgroups.

Both were characterized by a distinct gene expression profile either characteristic of normal germinal center B-cells or activated blood memory B-cells. The germinal center B-cell-like (GCB) subgroup was correlated with a significantly better prognosis in comparison to the activated B-cell-like (ABC) subgroup [27,28]. mRNA for NGF and BDNF were recently detected in ABC (OCI-LY3) and GCB (OCI-LY19) DLBCL cell lines, but NT protein production was undetectable by ELISA [23]. In the present study we used two GCB DLBCL cell lines (SUDHL4 and SUDHL6) [27,29]. We confirmed previous data and further demonstrated for the first time that NT secretion (BDNF) can be observed in cell supernatants after basal culture conditions (10% FCS). Of note, BDNF production was associated with a strong cytoplasmic TrkB sequestration suggesting, as was demonstrated in B cell lines [24], a potential survival autocrine signaling pathway. On the other hand, as shown by coimmunoprecipitation and western blotting analyses, association of sortilin with the death receptor p75^{NTR} was also observed, for the first time in DLBCL cells, in the present study. Moreover, we detected also the ectodomain shedding pieces (50 kDa) of p75^{NTR} in the sortilin immunoprecipitates. These data suggest proteolytic processing of p75^{NTR} and thus release of the intracellular domain of the receptor that is known to occur after ligand activation, initiating a second signaling apoptosis step [30]. Proteolytic processing of p75^{NTR}, together with strong intracytoplasmic sequestration of the receptor, may explain our difficulties in membrane detection of this receptor by flow cytometry. Indeed, the anti-p75^{NTR} used for this analysis was selected for its ability to target the extracellular domain of human p75^{NTR}. Present data demonstrated that pro-NTs, and notably pro-BDNF, are produced by both DLBCL cell lines tested. As the heterodimeric receptor p75^{NTR}/sortilin is known to be required for the cell death effect of pro-BDNF [13,31], pro-BDNF-p75^{NTR}/sortilin signaling pathway may act, in the absence or low membrane TrkB expression, by sensitizing cells to apoptotic cell death.

We detected expression of the truncated form of TrkB (gp95) but not full-length, in both DLBCL cell lines. Of note, the prominent form of truncated TrkB mRNA was previously reported in normal B lymphocytes [24]. The putative function of these truncated TrkB receptors, lacking tyrosine kinase activity, is still not clear. However, they can exert a functional activity in neurons, allowing activation and proliferation of neuroblasts in the presence of BDNF [32,33]. Moreover, in the present study, gp95TrkB expression increased in DLBCL cell line (SUDHL4) under stress conditions (i.e. serum deprivation), with a membrane relocation of the receptor as for previous B cell lines [24]. In contrast to TrkB, the heterodimeric p75^{NTR}/sortilin death receptor seemed to be unaffected by serum deprivation. This TrkB receptor relocation may suggest an autocrine survival mechanism of neurotrophin signaling in deprived cells, as we recently demonstrated in colorectal cancer cells [34]. However, we also observed a strong decrease in BDNF production in association with apoptosis which argues for a potential survival function of BDNF. Pharmacological inhibition of Trk receptors (K252a, 200 nM) was recently shown to inhibit proliferation and survival of malignant B cells, including an ABC DLBCL cell line (OCI-LY3) whereas the truncated TrkB receptor was the major Trk receptor expressed by these cells [23]. But an apoptotic effect of K252a was not observed on the GCB cell line tested (OCI-LY19). In the present study, we showed a differential response of the two GCB cell lines used. Whereas K252a significantly decreases the cell viability in DHL4 cells, it did not alter the viability of DHL6 cells at least after 24 h drug exposure, while cytotoxic effect was only observed by 48 h and for higher drug concentrations (500 nM, data not shown). Such differences in data can be explained by variations in the Trk

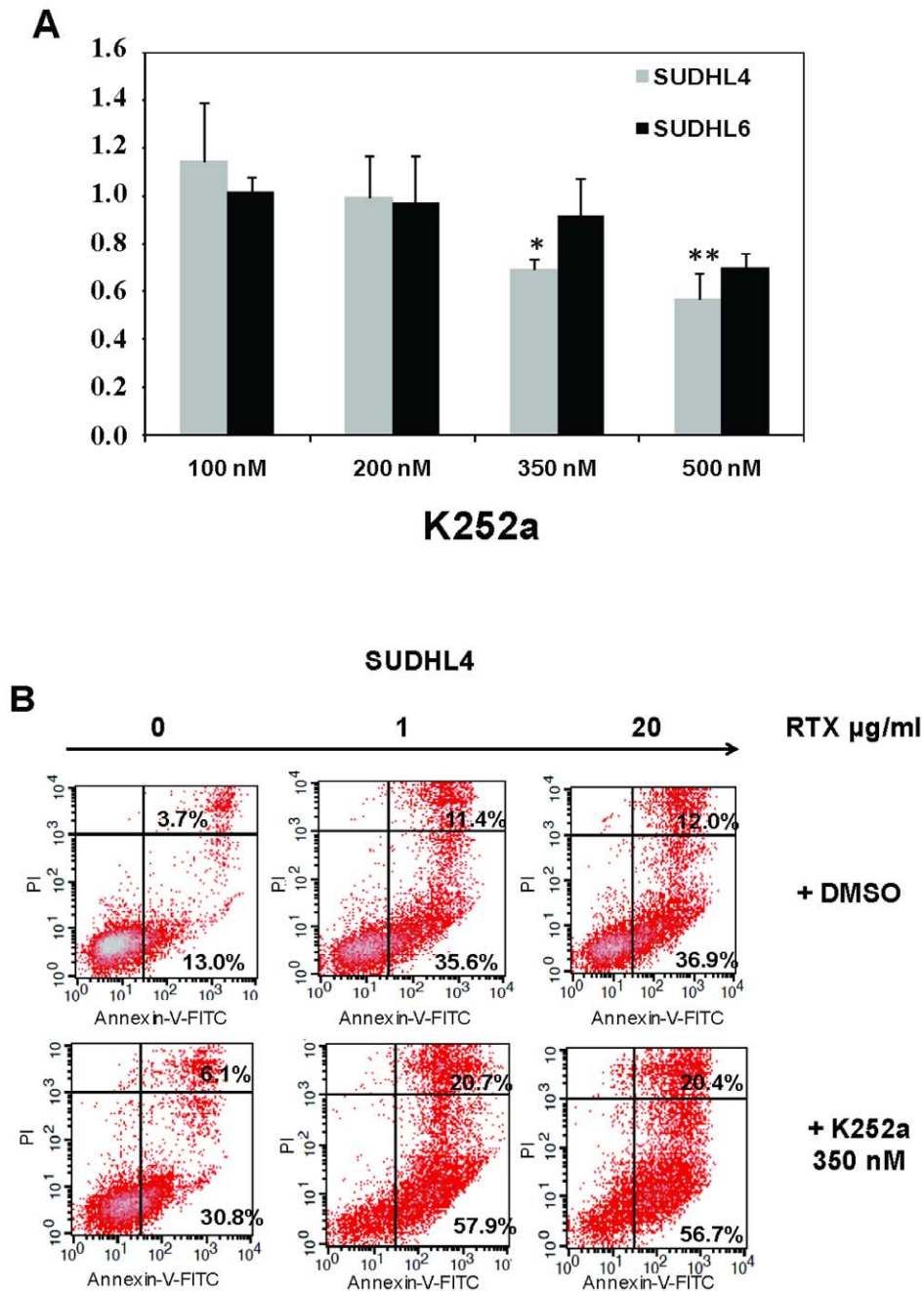


Figure 6. Pharmacologic inhibition of Trk receptors inhibits survival of DLBCL cell lines and synergizes rituximab induced apoptosis. A: Cell viability was evaluated using the XTT test for both SUDHL cell lines cultured for 24 h in presence of various concentrations of K252a. Data are expressed as means \pm SD of the relative cell viability of untreated control cells obtained from three independent experiments. Significant p values (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$) were determined in comparison with 100 nM K252a. B: K252a (350 nM) induced apoptosis in SUDHL4 cells, demonstrating a synergistic effect with rituximab (0–20 μ g/ml) exposure. Example of flow cytometry analysis of apoptosis using Annexin-V-FITC and propidium iodide (PI), as detailed in legend of Figure 4, obtained after 48 h cell culture. Data are from one representative experiment out of three performed.

doi:10.1371/journal.pone.0027213.g006

receptors expressed in DLBCL cell lines. In addition to the presence of TrkB transcripts in both cell lines, TrkA mRNA was also detected in the previous report of Sniderhan *et al.* [23] for OCI-LY3 cells and not for OCI-LY19 cells suggesting potential TrkA and TrkB protein expression in the ABC cell line as compared to GCB. In our study, albeit we did not detect TrkA protein expression in basal culture conditions in both cell lines, we had observed a low level of TrkA mRNA after 48 h standard

culture conditions, suggesting a possible regulation of TrkA expression by the cell cycle. Although K-252a affects several other kinases at higher concentrations and the effects observed may thus not only be due to inhibition of Trk signaling [35], numerous studies have used nanomolar quantities of K252a as a selective inhibitor of NT signaling. Thus, our present data strongly support the notion that SUDHL cells express functional Trk receptors.

The exact mechanism of rituximab resistance, a growing concern, is not entirely clear. Several tumor-associated and host-associated mechanisms have been proposed, including mutations or poor surface CD20 antigen expression and, more recently, polymorphisms in Fc γ RIIIA receptor [36]. To further assess the role of NT production in rituximab sensitivity, we exposed cells to rituximab, as the two studied SUDHL cell lines have been reported to have differential apoptotic sensitivity in response to rituximab [26]. As expected, apoptosis induced by rituximab was observed in both cell lines and associated with an inhibition of the constitutively activated PI3K-Akt signaling pathway, known to lead to chemosensitization [5,37]. Furthermore, we confirmed the higher apoptotic sensitivity of SUDHL6 [26]. Such differential sensitivity to apoptosis may be explained by the lower constitutively expression of P-Akt detected in SUDHL6 cells as compared to SUDHL4, in accordance to previous observations for other DLBCL cell lines [5]. Indeed, we did not find a significant difference in CD20 expression between the two cell lines (data not shown), as was previously reported [38]. Strikingly, we demonstrated for the first time that NGF production and secretion in cell supernatants were induced by rituximab exposure in both cell lines SUDHL4 and SUDHL6, by contrast to the weak NGF expression detected in basal culture conditions. Furthermore, up-regulation of TrkA expression was observed after 48 h exposure to rituximab in SUDHL4 cells, and not in the more sensitive cell line SUDHL6. In addition, rituximab-induced apoptosis was concomitantly associated with a decreased of BDNF secretion in SUDHL6 cell supernatants. These results argue for a relationship between rituximab resistance and an autocrine NT survival loop through

Trk receptor signaling of survival pathways, inhibited by rituximab. This hypothesis was supported by pharmacologic Trk inhibition (K252a) that enhanced rituximab-induced apoptosis of SUDHL cells. While exposure of SUDHL4 cells to K252a alone resulted in apoptotic cell death comparable to the effect induced by rituximab, the combination of both was synergistic in the apoptotic response of the more resistant DLBCL cell line. These data suggest that a NT/Trk fine-tuning regulation may be of crucial importance in drug sensitivity/cell survival in DLBCL. However, mechanisms underlying these differential regulations of NT/Trk expression induced by rituximab in SUDHL cells remains to be clarified.

In conclusion, therapeutic targeting of Trk-neurotrophin axis is beginning to emerge for NHL and present results point out to this possibility in DLBCL. We demonstrated notably that secretion of NGF, BDNF and the expression of their survival Trk receptors are regulated in DLBCL cell lines by culture conditions, and potentially could contribute to malignant cell survival and rituximab resistance.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Jeanne M. Cook-Moreau for reviewing the English version of this manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DT M-OJ DB. Performed the experiments: CB LD. Analyzed the data: CB LD DT. Contributed reagents/materials/analysis tools: M-CL A-LF. Wrote the paper: CB DT.

References

- De Paep P, De Wolf-Peeters C (2007) Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia* 21: 37–43.
- Coiffier B, Pfreundschuh M, Stahel R, Vose J, Zinzani PL (2002) Aggressive lymphoma: improving treatment outcome with rituximab. *Anticancer Drugs* 13: 43–50.
- Coiffier B (2007) Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 26: 3603–3613.
- Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM (2001) Constitutive nuclear factor κ B activity is required for survival of activated B cell like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 94: 1861–1874.
- Uddin S, Hussain AR, Siraj AK, Manogaran PS, Al-Jomah NA, et al. (2006) Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* 108: 4178–4186.
- Bonavida B (2007) Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunoresistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene* 26: 3629–3636.
- Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14: 2919–2937.
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emler DR, Dieterich R, Wong AJ (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: 12419–12424.
- Arevalo JC, Wu SH (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63: 1523–1537.
- Dechant G (2001) Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell Tissue Res* 305: 229–238.
- Wang X, Bauer JH, Li Y, Shao Z, Zetoune FS, et al. (2001) Characterization of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem* 276: 33812–33820.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294: 1945–1948.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, et al. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25: 5455–5463.
- Levi-Montalcini RS, Skaper D, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A (1996) Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinin. *Trends Neurosci* 19: 514–520.
- Coppola V, Barrick CA, Southon EA, Celeste A, Wang K, et al. (2004) Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development* 131: 5185–5195.
- Schuhmann B, Dietrich A, Sel S, Hahn C, Klingenspor M, et al. (2005) A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol* 163: 15–23.
- Otten U, Ehrhard P, Peck R (1989) Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 10059–10063.
- Melamed I, Kelleher CA, Franklin RA, Brodie C, Hempstead B, et al. (1996) Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocytes is mediated by gp140trk. *Eur J Immunol* 26: 1985–1992.
- Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, et al. (1996) Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85: 345–356.
- Torcia M, De Chiara G, Nencioni L, Ammendola S, Labardi D, et al. (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: 39027–39036.
- Abram M, Wegmann M, Fokuhl V, Sonar S, Luger EO, et al. (2009) Nerve growth factor and neurotrophin-3 mediate survival of pulmonary plasma cells during the allergic airway inflammation. *J Immunol* 182: 4705–4712.
- Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, Rafii D, Hempstead BL (2005) A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* 105: 4429–4436.
- Sniderhan LF, Garcia-Bates TM, Burgart M, Bernstein SH, Phipps RP, et al. (2009) Neurotrophin signaling through tropomyosin receptor kinases contributes to survival and proliferation of non-Hodgkin lymphoma. *Exp Hematol* 37: 1295–1309.
- Fauchais AL, Lalloue F, Lise MC, Boumediene A, Preud'homme JL, et al. (2008) Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol* 181: 3027–3038.
- Carnahan J, Stein R, Qu Z, Hess K, Cesano A, et al. (2007) Epratuzumab, a CD22-targeting recombinant humanized antibody with a different mode of action from rituximab. *Mol Immunol* 44: 1331–1341.
- Verdier M, Malissen E, Munteanu E, Jayat-Vignoles C, Ratinaud MH, et al. (2006) Aged mice exhibit distinct peripheral B-cell phenotypes differing in apoptotic susceptibility: an *ex vivo* analysis. *Cytometry A* 69: 999–1009.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, et al. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503–511.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346: 1937–1947.

29. Lyu MA, Rai D, Ahn KS, Sung B, Cheung LH, et al. (2010) The rGel/BLYS fusion toxin inhibits diffuse large B-cell lymphoma growth *in vitro* and *in vivo*. *Neoplasia* 12: 366–375.
30. Skeldal S, Matusica D, Nykjaer A, Coulson EJ (2011) Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR). *Bioessays* 33: 614–625.
31. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, et al. (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427: 843–848.
32. Rose CR, Blum R, Pichler B, Lepier A, Kafitz KW, et al. (2003) Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426: 74–78.
33. Tervonen TA, Ajamian F, De Wit J, Verhaagen J, Castren E, et al. (2006) Overexpression of a truncated TrkB isoform increases the proliferation of neural progenitors. *Eur J Neurosci* 24: 1277–1285.
34. Akil H, Perraud A, Mélin C, Jauberteau MO, Mathonnet M (2011) Fine-Tuning Roles of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor, TrkB and Sortilin in Colorectal Cancer Cell Survival. *PLoS ONE* 6(9): e25097. doi:10.1371/journal.pone.0025097.
35. Kase H, Iwahashi K, Nakanishi S, Matsuda Y, Yamada K, et al. (1987) K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 142: 436–440.
36. Rezvani AR, Maloney DG (2011) Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol* 24: 203–216.
37. Suzuki E, Umezawa K, Bonavida B (2007) Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene* 26: 6184–6193.
38. Stein R, Qu Z, Chen S, Rosario A, Shi V, et al. (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: 2868–2878.

2. Deuxième partie: Etude comparative de la fonctionnalité et de la signification clinique des axes NTs/récepteurs dans les sous-types GCB et ABC.

2.1 Contexte scientifique

Comme on l'a évoqué dans l'introduction bibliographique, deux principaux types de DLBCL ont été identifiés par les études en tissu microarray et sont caractérisés par la cellule d'origine. Le sous-type GCB (GCB – germinal center B cell like), met en jeu des altérations de gènes caractéristiques du centre germinatif tels que *BCL6*, *BCL2*, *PTEN* ou encore *REL*. Le sous-type ABC (ABC – activated B cell like) est caractérisé par une signature génique similaire à celle des plasmocytes normaux dont la différenciation terminale est bloquée, telle que montre la surexpression des gènes codant pour IRF4, JAK, STAT3, BLIMP1, BCL2 et NFκB qui est la caractéristique même de ce sous-type. Sur le plan clinique, le sous-type ABC est plus agressif et plus résistant à la chimiothérapie conventionnelle que le sous-type GCB. Par la suite, le rôle important de l'environnement tumoral dans l'agressivité de ces lymphomes a été révélé par l'identification de deux signatures géniques capables de prédire la survie des patients traités CHOP et R-CHOP, et caractéristiques des cellules non malignes entourant la tumeur. La signature « stromal-1 » associée à un pronostic favorable est définie par des gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation ou le remodelage de la matrice extracellulaire ainsi que par des gènes exprimés par la lignée monocyttaire. La signature « stromal-2 » est caractérisée quant à elle par des gènes codant pour des marqueurs des cellules endothéliales, des régulateurs de l'angiogenèse, parmi lesquels figure le récepteur VEGFR2, ou encore par des gènes spécifiques aux adipocytes. Cette signature est en étroite corrélation avec l'angiogenèse et est de mauvais pronostic pour les patients. Les études menées sur le ligand du récepteur VEGFR2, le VEGF, ont montré que la plupart des patients atteints de DLBCL, et en particulier du sous-type GCB, montrent une corrélation positive de l'expression du VEGF avec ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. Ceci suggère l'existence de boucles autocrines de survie activées par le VEGF au cours de la lymphomagenèse. Au sein des tumeurs de patients traités au R-CHOP, la forte expression du VEGFR2 est corrélée à un

mauvais pronostic, alors que celle du VEGFR1 semble plutôt favorable. En effet, parmi les 5 types de VEGF, le VEGF-A est celui qui contrôle majoritairement l'angiogenèse et le récepteur VEGFR2 est son médiateur majeur au sein des cellules endothéliales vasculaires. Le VEGFR1, dont l'affinité pour le VEGF-A est la plus importante, serait en revanche un contre régulateur du VEGFR2 (Sato, 2008).

Le principal moteur de l'angiogenèse, l'hypoxie, induit l'expression du VEGF-A via la stabilisation du facteur HIF1 α . Or, une forte expression de marqueurs angiogéniques est corrélée de façon significative avec ce marqueur d'hypoxie dans les DLBCL contrairement aux ganglions sains, ce qui suggère un lien entre ces facteurs. Cependant, aucune relation fonctionnelle n'a encore pu être établie. De manière intéressante, un grand nombre d'études montrent que les voies activées par l'interaction des NTs avec leur récepteurs de haute affinité peuvent induire l'expression du VEGF et l'angiogenèse (Wang, et al., 2008 ; Sun, et al., 2010 ; Zhang, et al., 2010 ; Li, et al., 2011 ; Kim, et al., 2013 ; Sasahira, et al., 2013). De plus, cette expression se fait dans certains cas via la stabilisation du facteur HIF1 α (Nakamura, et al., 2011 ; Nakamura, et al., 2006). Il a également été montré que le clivage du récepteur p75^{NTR} était un pré requis à la stabilisation d'HIF1 α et qu'il contrôlait l'intensité de la réponse à l'hypoxie (LeMoan, et al., 2011). Nos précédents travaux ont révélé l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs par des lignées DLBCL de type GCB. De plus la fonctionnalité des récepteurs Trk a été fortement suggérée dans les lignées GCB et une interaction possible avec les mécanismes impliqués dans la cytotoxicité du rituximab a été mise en évidence.

2.2 Objectifs de travail et méthodologie

La production des NTs et de leurs récepteurs par des cellules de type GCB de DLBCL ayant été démontrée ainsi que leur modulation en fonction des conditions expérimentales (privation sérique, traitement au rituximab...), la question de leur fonctionnalité et de leur réalité clinique s'imposait alors. Notamment, il nous a paru important d'évaluer leur production et leur fonctionnalité de façon comparative entre les 2 principaux sous-types et donc ABC versus GCB. Pour cela, nous avons utilisé 4 lignées cellulaires, 2 de type GCB et 2 de type ABC et étudié l'effet de plusieurs stratégies visant à interférer avec la signalisation des NTs endogènes (anticorps neutralisants anti-BDNF ou anti-p75^{NTR} ; pro-BDNF exogène ; inhibition des Trk par le K252a). De plus, afin de contribuer aux connaissances sur le rôle encore imprécis de l'hypoxie et de l'angiogenèse dans ces lymphomes, nous avons étudié

l'impact de conditions hypoxiques sur la survie des cellules de lignées GCB et ABC ainsi que sur leur production de VEGF. Cette étude a été aussi réalisée en présence ou non d'une inhibition pharmacologique des récepteurs Trk associée ou non au rituximab. La signification clinique de l'expression des NTs et leurs récepteurs a finalement été évaluée par RT-PCR et immunohistochimie, à partir de 33 biopsies de patients atteints de DLBCL dans le cadre d'une collaboration avec les services d'Hématologie clinique et d'Anatomie-pathologique du CHU de Limoges.

2.3 Résultats et conclusions

Nous montrons que l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs de haute et basse affinité est retrouvée sur les 4 lignées DLBCL étudiées indépendamment de leur type GCB/ABC. Les marquages effectués sans perméabilisation suggèrent une interaction entre les neurotrophines et leurs récepteurs Trk, associés au récepteur p75^{NTR}, et donc la mise en place de boucles autocrines/paracrines de survie. Cette hypothèse est confortée par la phosphorylation basale du récepteur TrkB sur la tyrosine 817. L'importance de l'axe BDNF/TrkB a pu être mise en évidence au sein des lignées GCB où la neutralisation du BDNF endogène induit une diminution de viabilité et augmente l'apoptose cellulaire. L'implication du récepteur p75^{NTR} dans le processus de survie a quant à elle été démontrée chez la lignée GCB SUDHL4 tout comme chez la lignée ABC OCI-LY10. L'analyse de la sécrétion de VEGF a révélé une production variable d'une lignée à l'autre et modulée par les traitements avec rituximab et K252a. Le rituximab permet de diminuer la production de VEGF chez les lignées GCB sensibles aux effets cytotoxiques du rituximab, alors qu'il reste sans effet sur les lignées ABC. Ces données suggèrent un lien entre la production de VEGF et la sensibilité au rituximab. Bien que la modulation des neurotrophines n'ait pas d'impact sur la sécrétion de VEGF, l'inhibition pharmacologique des Trk par le K252a démontre l'implication des récepteurs Trk dans ce phénomène puisqu'il diminue fortement sa production chez les lignées SUDHL4 et OCI-LY3 jusqu'à la rendre indétectable chez les SUDHL4. De plus, les études menées en hypoxie montrent une augmentation de l'effet du K252a seul ou en association avec le rituximab sur l'apoptose cellulaire. Ces résultats *in vitro* ont finalement été confortés par les données relatives à l'étude *ex vivo* à partir de biopsies de patients. Nous montrons en effet pour la première fois une corrélation significative entre l'expression d'acteurs de ces signalisations (NGF, TrkB, p75^{NTR}) et des marqueurs anatomo-

cliniques d'agressivité, impliquant ces circuits dans la survie des cellules tumorales de ces lymphomes et probablement pour partie dans des phénomènes de résistance thérapeutique.

2.4 Article 2: Functional role and clinical significance of neurotrophins and their receptors in ABC and GCB DLBCL subtypes.

Lydie Dubanet, Hafidha Bentayeb, Barbara Petit, Agnès Olivrie, Fabrice Lalloué, Marie-Pierre Gourin-Chaury, Dominique Bordessoule, Jean Feuillard, Manuela Delage, Anne-Laure Fauchais, Marie-Odile Jauberteau and Danielle Troutaud

A soumettre très prochainement

Functional role and clinical significance of neurotrophins and their receptors in ABC and GCB DLBCL subtypes.

Lydie Dubanet¹, Hafidha Bentayeb¹, Barbara Petit², Agnès Olivrie^{3,4}, Fabrice Lalloué¹, Marie-Pierre Gourin^{3,4}, Dominique Bordessoule^{3,4,5}, Jean Feuillard⁵, Manuela Delage², Anne-Laure Fauchais¹, Marie-Odile Jauberteau¹ and Danielle Troutaud^{1,*}.

¹ EA3842, Université de Limoges, France; ²Laboratoire d'Anatomie-Pathologique, CHU Limoges, France ; ³Structure Régionale de Référence des Lymphomes du Limousin, CHU Limoges, France ; ⁴Service d'Hématologie Clinique, CHU Limoges, France ; ⁵UMR CNRS 7276, Université de Limoges, France.

Running title: Neurotrophins and ABC/GCB DLBCL.

Correspondence: Danielle Troutaud, EA 3842, Facultés de Médecine et Pharmacie, Université de Limoges, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France. tel : 33 555 435 967

*E-mail: danielle.troutaud@unilim.fr

Abstract

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a common and often fatal malignancy that comprises tumors with varying clinical and molecular features. A better understanding of the biology of DLBCL is needed for the development of potential therapeutic agents that target specific intracellular pathways. We previously showed that GCB like DLBCL cell lines produce neurotrophins (NTs) and express their low (p75^{NTR}) and high affinity (Trk) receptors, suggesting autocrine/paracrine regulatory loops of tumor cell survival. In this study we investigated the functional role of neurotrophin and their association with clinicopathological features using a panel of GCB and ABC like DLBCL cell lines and 33 DLBCL patient samples. Inhibition of neurotrophin signaling by neutralizing anti-BDNF and anti-p75^{NTR}, as well as exogenous pro-BDNF treatment, induced cell apoptosis that was significantly observed in GCB like cell lines. In agreement with these results, p75^{NTR} was found associated to Trk receptors and not to its cell death co-receptor sortilin, suggesting pro-survival Trk/p75^{NTR} pathways in DLBCLs. As the full length form of Trk receptors was clearly found for TrkB in all cell lines, which was also phosphorylated at Tyr-817, we proposed that BDNF/TrkB signaling may be involved in DLBCL cell survival. Interestingly, pharmacological inhibition of Trk receptors (K252a) caused cell apoptosis with a synergistic effect when combined with rituximab. This response, confirmed in GCB cells, was demonstrated in ABC cell lines that were relatively refractory to rituximab-induced cell death. We also showed that K252a decreased significantly VEGF secretion in both subtypes. Furthermore, hypoxic culture conditions enhanced the cytotoxic effect of rituximab alone or in combination with K252a in all cell lines. Using immunohistochemistry, NGF, BDNF, and all their receptors were detected in DLBCL tumors. NGF expression was associated with the ABC subtype marker, IRF4/MUM-1 and high TrkB expression with non-GCB profile. Moreover, a positive correlation was found between the expression of p75^{NTR} and IPI stage. Collectively, our data suggest that inhibition of Trk signaling may be a potential target for therapeutic intervention in DLBCLs, notably for subgroup of DLBCL depending to a large extent on angiogenesis via VEGF for tumor survival and proliferation.

Keywords: DLBCL, neurotrophins, apoptosis, rituximab, hypoxia, VEGF.

Introduction

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) are highly aggressive non-Hodgkin's lymphoma (NHL) which are subdivided into 2 major prognostically significant subtypes, germinal center B-cell (GCB) type and activated B-cell (ABC) type which are respectively of better and worse prognostic respectively. These subtypes differ in the expression of thousands of genes and apparently arise from B cells that are at distinct stages of differentiation. GCB lymphomas have a gene expression profile pattern clustered with normal germinal center B cells. By contrast, ABC lymphomas have the plasma-cell expression program. [1-3]. In addition, the process of malignant transformation differs for each subtype, as evidenced by distinctive genetic abnormalities. A difference in the incidence of *BCL2* gene rearrangement was shown within the two subgroups as t(14;18) translocation was found to occur almost exclusively in the GCB-like subgroup. On the contrary, although the Akt pathway is constitutively activated in most tumor cells and in B-NHL cell lines [4, 5], constitutive activation of the NF- κ B signaling pathway is crucial for survival of ABC-DLBCL cells but not GCB-DLBCL cells [6-8]. Those lymphoma present an important clinical challenge. Indeed, despite significant survival improvement of patients obtained by combining a monoclonal anti-CD20 antibody, rituximab, with chemotherapy (R-CHOP immunochemotherapy), response to treatment is heterogeneous and the outcome is often unpredictable. A subset of patients does not initially respond to rituximab and several responsive patients develop resistance to further rituximab treatment [9].

Neurotrophins (NTs) among with NGF and BDNF are a family of structurally and functionally related growth factors that are widely expressed in a variety of tissues including the immune system [10, 11]. NTs are synthesized as proNTs, the both forms are secreted and exert biological activities. Binding of NTs to their common low-affinity receptor (p75^{NTR}) signals rather apoptosis whereas binding to the high-affinity tropomyosin kinase receptor TrkA (NGF) and TrkB (BDNF) trigger survival [12]. Furthermore, sortilin, an intracellular transport protein for NTs and proNTs is also involved by heterodimerization with p75^{NTR}, in the cell death effect of pro-NTs [13]. Previous studies in our laboratory showed, for the first time in B cell lines that an autocrine BDNF production is up-regulated by stress culture conditions and exerts a modulation of apoptosis through the sortilin pathway [14]. Moreover, we also showed that GCB DLBCL cell lines express and secrete neurotrophins that can be modified by culture conditions (serum deprivation) or treatment with rituximab [15]. Thus,

given the ability of neurotrophins and rituximab to target in a contradictory way PI3K/Akt and NF- κ B pathways, which are shown to be essential for the survival of DLBCL tumor cells, neurotrophins signaling could have a potential attractive autocrine /paracrine role in the clinical heterogeneity of human DLBCLs.

The presence of hypoxic areas is a common feature to malignant tumors, but little is known about the expression of hypoxia in hematologic malignancies [16, 17]. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) is a master regulator of the cellular response to hypoxia that regulates, in normal and neoplastic cells, expression of genes that are critical for the formation of new vasculature in response to tissue hypoxia [18, 19]. HIF-1 is a heterodimeric transcription factor, consisting of a constitutively expressed subunit HIF-1 β , and an inducible α subunit, the levels of which are tightly regulated by partial oxygen pressure (pO₂) [20]. It has been shown that HIF1 α is necessary to B cell development and is expressed in germinal centers. Furthermore, recent studies have reported that HIF-1 α is abnormally expressed in lymphoma tissue and in some DLBCL cell lines [17, 21, 22, 23]. The molecular mechanisms by which HIF-1 α is activated under normoxic conditions in lymphoma cells remain unknown. However, some factors in addition to hypoxia, such as PI3K/AKT or NF- κ B pathways, are known to be involved in the increase of synthesis or stabilization of HIF-1 α [24-27]. Indeed, implication of HIF1 α in DLBCLs is still controversial, even though it has been shown to be of good prognosis in DLBCL patients treated with R-CHOP [23].

The aim of the present study was to evaluate neurotrophin functionality in ABC and GCB like cell lines and their possible association with clinicopathological variables in DLBCLs. As BDNF/TrkB activation of the PI3K/mTOR pathway can also lead to an increase in HIF-1 α that stimulates VEGF production [28] , we also investigated the potential relationship between neurotrophins and HIF1 α by submitting DLBCL cell lines to physical hypoxia. Finally, to better understand the role of hypoxia in the response fo DLBCL cells to treatment, we analyzed the impact of hypoxia on Trk signaling pharmacological inhibition and rituximab response.

Material and methods:

Human B cell lines and cell cultures

The human DLBCL cell lines SUDHL4 and SUDHL6 were obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) and the human DLBCL cell lines OCI-LY3 and OCI-LY10 were a gift of Pr Feuillard (UMR CNRS

7276, Limoges University) with the kind agreement of Louis M. Staudt (National Cancer Institute, USA). The cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For the hypoxia study, cells were cultured in a humidified atmosphere with only 1% O₂ and 5% CO₂. For the viability tests, cells were grown in 96 well tissue culture plates (starting with 5x10⁴ cells/well) with: various concentrations of rituximab (1–20 µg/mL, MabThera®, stock 10 mg/mL, a generous gift from CHRU Dupuytren of Limoges, Pharmacie centrale), K-252a (350 nM, Alomone labs), pro-BDNF (1-10 ng/mL, Alomone labs), neutralizing anti-BDNF (15 µg/mL, Promega), exogenous BDNF (100 ng/mL, Promega), anti- p75^{NTR} neutralizing antibody (1-10-100 ng/mL, Millipore, clone ME20.4) alone or in combination.

Cell viability assay

Cellular viability of DLBCL cell lines was assessed using the colorimetric XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate)-assay (Cell Proliferation Kit II, XTT Roche) according to the manufacturer's instructions. All tests were performed in triplicate. Results are expressed as optical densities or as ratio to untreated control cells.

Analysis of apoptosis

DLBCL cell lines were seeded at 10⁶ cells/mL in flasks and cultured for 24-72h. Apoptosis-associated phosphatidylserine (PS) exposure on the outer plasma membrane was analyzed by flow cytometry using the propidium iodide (PI)/Annexin V-FITC double staining method (kit Beckman Coulter); this method effectively distinguishes apoptotic cells (Annexin V⁺/PI) from necrotic cells (Annexin V⁺/PI⁺). Cells were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) acquiring 10 000 events. Results are done as percentages of apoptotic cells.

Western blotting and immunoprecipitations

Rabbit anti-BDNF, anti-NGF, anti-NT3, anti-p75^{NTR}, goat anti-sortilin, mouse anti-PARP-1 antibodies (Abs) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Mouse anti-TrkB, anti-TrkA and anti-TrkC antibodies were purchased from R&D Systems. Anti-phospho TrkB was purchased from Abcam. Cell line cultures were washed once in PBS. Proteins were obtained

using lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% NP40, 10% glycerol, 150 mM NaCl supplemented with 1% proteases and phosphatases inhibitor mixtures) (Sigma) followed by centrifugation at 20 000 g for 20 min at 4°C. Supernatants were collected and protein concentration was determined using Bradford protein concentration assay (Sigma). Then equal amounts of proteins from cell lysates (40 µg/lane) were separated on SDS-polyacrylamide gels under denaturing conditions and transferred onto PVDF sheets (BioTrace™). Nonspecific binding sites were blocked for 1 h with 5% nonfat dry milk in PBS containing 0.1% Tween 20. After overnight incubation at 4°C with specific primary Ab in blocking solution, membranes were exposed with appropriate HRP-conjugated secondary Ab (DakoCytomation; dilution 1/1000) for 1 h at room temperature. Visualization of immunocomplexes was accomplished using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). Protein-loading control was performed with anti-βactin Ab (Sigma). Western blots were scanned using a bioimaging system (Genesnap; Syngene Europe). Co-immunoprecipitations were performed in accordance with the manufacturer's instructions (Catch and Release kit, Millipore) with 500 µg of proteins and anti-p75^{NTR} for 1 h at room temperature. Finally immunoprecipitates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, before analysis by western blotting (with anti-Trk, anti-sortilin and anti-p75^{NTR}).

Immunofluorescence microscopy

After two washes in PBS-BSA 2.5%, samples (2–4×10⁶ cells) were fixed with 4% PFA at 4°C for 10 min. After washing, cells were permeabilized or not (cell surface antigen staining) with ice cold 100% methanol for 10 min at 4°C. Then cells were rinsed in PBS for 5 min before being blocked with 5% goat serum in PBS. Samples were incubated for 1 hour at 4°C with primary antibodies (anti-Trk, anti-BDNF, anti-NGF, anti-p75^{NTR} and anti-sortilin) or IgG controls (Sigma) under agitation. After washing, cells were incubated with Alexafluor-conjugated secondary antibodies (dilution: 1/1000) for 30 min at 4°C. After two step washes, samples were finally incubated with DAPI (Molecular Probes, Invitrogen), coverslipped and sealed using mounting media (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dakocytomation). Pictures were captured using a Leica microscope and a Leica digital camera. Images were processed using Leica IM500 Image Manager.

Cell supernatant VEGF immunoassay

Growth medium was collected and the concentration of VEGF-A was then determined using the human VEGF ELISA kit (PeproTech) using the manufacturer's recommendations. All tests were performed in duplicate. Results were expressed as mean \pm SEM (pg/mL).

Patient samples

Thirty three cases of DLBCL diagnosed between 2001 and 2011 and treated in the hematology department of Dupuytren Hospital (Limoges, France) were collected from the Tumorothèque of Dupuytren Hospital (Limoges, France). All biopsies selected had been performed at initial diagnosis. Tumors were classified according to the current World Health Organization classification [29]. DLBCL cases were then categorized as germinal center B-cell (GCB) or non-GCB subtype according to the algorithm based on CD10, BCL-6, and MUM1 expression [30]. Clinical data of the patients were reviewed and are summarized for all patients in Table 1. Among the 33 patients, 29 were treated with the standard R-CHOP therapy and 4 only received the CHOP like regimen. The median follow-up was 48.9 months. All patients were informed of the use of their tissue samples in research studies. This study was conducted after approval of the local ethics committee (N° 98-2012-23).

RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from 5×10^6 cells with TRIzol. Quality and yield assessments were made by optical spectra as measured by the OD260/280 ratio using the Nanodrop spectrophotometer ND-1000 (Labtech). Total RNA (2 μ g) was reverse transcribed with the Super Script III First-strand synthesis kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, using oligo(dT). Amplification was performed using *Taq*DNA polymerase (Invitrogen) and specific primers as previously reported [14, 15]. Transcripts of NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75^{NTR} and sortilin were obtained using UnoCycler (VWR).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using Envision Kit (Dako). After a step of dewaxing, endogenous peroxidases were blocked using methanol-5% H₂O₂ and non specific sites were saturated using PBS-BSA3%. Then tissues were exposed to primary antibodies 1 hour RT or overnight. The anti-NGF, anti-BDNF, anti-p75^{NTR} and anti-TrkB were purchased from Santa Cruz Biotechnology, anti-

TrkA from R&D, mouse isotypic control IgG1 from Cell Signaling, and rabbit isotypic control was from Sigma. Secondary antibodies were anti-rabbit or anti-mouse conjugated to horse radish peroxidase and were revealed by DAB (diaminobenzidine). Nuclei were counterstained with hematoxylin. The staining intensity was scored from 0 to 4 as follows: 0, negative; 1, weak; 2, moderate; 3, strong; 4, very strong. Expression levels were assessed independently by LD, DT and an hematopathologist (BP), who were blinded to each other's scores and without knowledge of clinical information. In case of disagreement, the staining results were reanalyzed by the observers on a multihead microscope until consensus was reached.

Statistical methods

Statistical analyses were performed using the StatView v5.0 software (Abacus Concepts). Data of the *in vitro* study are presented as means \pm SD. *P* values were obtained using 2-tailed t test for evaluation of the statistical significance compared with the controls. For the DLBCL patient samples, mean comparisons were based on Mann-Whitney U test, and correlations between quantitative variables were assessed using the Spearman rank correlation coefficient ρ . *P* < .05 was considered statistically significant.

Results

Both GCB and ABC subtypes express neurotrophins and their receptors

NGF, BDNF, NT3, their high affinity receptors TrkA, TrkB and TrkC respectively, and their low affinity receptor p75^{NTR} with its coreceptor sortilin are present in all GCB and ABC DLBCL cell lines tested under basal (10% FCS) culture conditions. Their expressions were detected at the transcript (data not shown) and protein levels (Figure 1A) with some differences depending on cell lines but not on subtype of DLBCL. Indeed, mature BDNF expression was elevated in SUDHL4 and OCI-LY10 cell lines. Trk receptors are produced eventhough the truncated form (95 kDa) was mostly identified for TrkA and lesser for TrkB which was also seen at the transcripts level (data not shown). Notably, a very week expression of full length TrkA was always found in basal culture conditions by western blot for all DLBCL cell lines, as compared to truncated TrkA. Membrane localization of all receptors except sortilin was also demonstrated in GCB and ABC-like cells by immunofluorescence analysis performed without cell permeabilization, as shown in Figure 1B for SUDHL6 and

OCI-LY10. Interestingly, NT stainings performed on cell surface colocalized with Trk receptors that strongly suggests autocrine/paracrine loops involved in the regulation of tumor cell survival. Accordingly, basal activation of a fraction of TrkB was observed in DLBCL cell lines as demonstrated by the phosphorylation of Tyr-817 observed in all cell lines (Figure 1D). Furthermore, TrkA and TrkB were found clearly associated to p75^{NTR} by coimmunoprecipitation analysis (Figure 1C) and not sortilin, suggesting a major survival role for p75^{NTR} in Trk/p75^{NTR} complex in basal culture conditions, rather than an apoptotic function mediated by p75^{NTR}/sortilin association.

Trk receptors are functional in DLBCL cell lines and their inhibition synergizes rituximab-induced apoptosis in an ABC cell line

ABC cell lines are known to be more resistant to therapeutic agents like rituximab. To test if Trk receptors promote differential effect on cell survival in DLBCL cell lines, we exposed cells to a pharmacologic Trk inhibitor, K252a, for 48 h. Cell survival was evaluated for the ABC-like DLBCL cell line, OCI-LY10, as compared to GCB (SUDHL4 and SUDHL6). Furthermore cell response to K252a was also studied in comparison to rituximab sensitivity. Results showed that K252a significantly decreased cell viability of the two GCB tumor cells tested (as shown for SUDHL6 in Figure 2A). This effect was observed also for the ABC cell line, OCI-LY10 (Figure 2A), even though it was only significant after 72h of treatment (data not shown). Of note, as expected no significant effect of rituximab, tested at 1 and 20 µg/mL, was observed for the ABC cell line viability in contrast to the GCB cells. Sensitivity of OCI-LY10 to K252a was further confirmed by the cellular apoptosis that was detected by the cytometric analysis using the dual AnnexinV/IP staining (Figure 2 B). Indeed, as for GCB cell lines (data not shown) inhibition of Trk receptors induced significant apoptosis in OCI-LY10 with 24.5% ± 10.4 of Annexin-V⁺/PI cells in the control and 40.6% ± 8.5 of Annexin-V⁺/PI cells after K252 exposure (means of 4 independent experiments, $p=0.02$). Interestingly, a synergistic effect could be observed between K252a and rituximab for the GCB cell lines, as we previously reported, but also for OCI-LY10 cells. As shown in Figure 2B association of rituximab and K252a treatments induced a strong increase of OCI-LY10 apoptotic cell percentage as compared to the effect obtained with rituximab or K252a alone. This effect was shown significant with 54.3% ± 10.4 vs 36.7% ± 5.2 of Annexin-V⁺/PI cells for K252a + rituximab (1 µg/mL) and rituximab (1 µg/mL) respectively. It is noteworthy that this

synergistic effect was also observed in the viability study of OCI-LY10 cell when K252a was associated to the higher rituximab concentration (Figure 2A). Finally, the higher apoptotic response obtained by combined treatments was confirmed by detection of the cleaved form of the PARP-1 (Figure 2C). However the apoptotic effect of K252a used alone or in association with rituximab was more pronounced and more significant in the GCB cell lines (data not shown) accordingly to the viability data shown in Figure 1A.

Evidence of a pro-survival BDNF axis in GCB cell lines

Given the ability of K252a to inhibit survival of malignant DLBCL cells, and because complete TrkB was produced by GCB and ABC like cell lines (as seen in Figure 1), we next wanted to further explore the BDNF axis in these cells. When cultured during 72h, exogenous BDNF (100 ng/mL) did not have any effect on cell viability (data not shown). Nevertheless, blocking endogenous BDNF with neutralizing antibodies for 48h decreased cell viability in both GCB cell lines SUDHL4 and SUDHL6 with more significance for SUDHL4 ($p < 0.01$; Figure 3A). Moreover, exogenous pro-BDNF induced a decrease in cell viability with a significant effect ($p < 0.05$) observed for both GCB cell lines at 10 $\mu\text{g/mL}$. Similar results could be observed with anti-p75^{NTR} (Figure 3A). However, no significant effect was found for the ABC cell line tested (OCI-LY10) even if a weak reduction of cell viability was noticed after antagonistic anti-p75^{NTR} treatment (data not shown). The apoptotic effects of pro-BDNF, neutralizing anti-BDNF and anti-p75^{NTR} neutralizing antibodies were confirmed in cell lysates of GCB cell lines which revealed the proteolytic cleavage of PARP-1 (Figure 3B). Of note PARP cleavage was sometimes observed in OCI-LY10 exposed to anti-p75^{NTR} neutralizing antibodies as compared to control. Collectively, our results suggest a pro-survival function of the BDNF/TrkB/ p75^{NTR} axis in the DLBCL cells.

Previous studies have shown neurotrophins, and notably BDNF/TrkB, to modulate VEGF production [28], which has also been implicated in lymphomagenesis, we thus quantified VEGF secretion in cell supernatant of SUDH4 and OCI-LY10 cultures. This analysis was performed with or without cell exposure to pro-BDNF, anti-BDNF and anti-p75^{NTR} as for the viability assay, in comparison to the apoptotic effect of rituximab. We observed that VEGF production significantly varied between DLBCL cells rather than cell subtype, with for example 252 ± 60 and 190 ± 41 pg/mL for SUDHL4 and OCI-LY10 respectively (data obtained from 5 independent assays). In contrast, the OCI-LY3 cell production was higher

and more variable, perhaps due to a strong cell aggregation in culture, with VEGF production of 540 ± 204 pg/mL. No significant effect of anti-BDNF, exogenous pro-BDNF and anti-p75^{NTR} treatments was observed on VEGF secretion in the GCB and ABC cell lines tested (Figure 3C). However, when cells were exposed to the Trk inhibitor, K252a, we observed a strong decrease in secretion that reached levels, for SUDHL4 cells, lower than the threshold detection of the ELISA kit used for VEGF quantification (as shown in Figure 4D). This effect was detected for all cell lines tested. Finally, we demonstrated, for the first time in DLBCL tumor cells, that rituximab significantly decreased VEGF secretion. Interestingly, as shown in Figure 3C, this effect was only observed for the rituximab sensitive GCB cell line (i.e. SUDHL4,) and not for the more resistant ABC cells (i.e. OCI-LY10).

Hypoxia modulates Trk signaling and rituximab effects on DLBCL cell line viability.

One of the most potent stimuli for increased VEGF production by tumor cells is hypoxia by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) dependent mechanism. The presence of hypoxic areas is a common feature to malignant tumors, including lymphomas [21] and HIF-1 α is expressed by most of DLBCL patients as well as DLBCL cell lines. Thus, we subjected cell lines to physical hypoxia (1% O₂) in order to determine if this could modulate neurotrophins and the response to rituximab treatment. Post-24h hypoxia increased nuclear HIF1- α protein stabilization (data not shown) attesting hypoxia. After 48h, no clear variation could be observed for BDNF, NGF and phosphor-TrkB (Y817) expression in cell lysates (Figure 4A). However, as we already reported, rituximab tend to increase mature NGF expression in SUDHL4 cell lysates from cultures in normoxia which we also detected in hypoxia. Furthermore, whereas hypoxia did not significantly modify rituximab effect, results obtained from three independent experiments showed a clear decrease in viability when GCB cells were exposed to K252a alone or in combination to rituximab (Figure 4B). Accordingly, apoptosis analysis demonstrates that the response to treatment was enhanced by hypoxia in the GCB cell line SUDHL4 and to a lesser extent in the ABC cell lines OCI-LY3 (Figure 4C) and OCI-LY10 (data not shown). Indeed, PARP cleavage was strongly enhanced by hypoxia after rituximab and/or K252a treatment in SUDHL4. This hypoxia-induced increase of combined treatment efficacy in SUDHL4 cell apoptosis was also observed when rituximab was associated to neutralizing NGF antibodies (data not shown). Finally, we analyzed VEGF secretion in hypoxia as compared to normoxia condition. As indicated in Figure 4D, results

confirm the SUDHL4 rituximab sensitivity on VEGF secretion as compared to an ABC cell line (i.e. OCI-LY3), but no significant effect of hypoxia was observed for both cell lines. Remarkably, in normoxia K252a alone or in association with rituximab abolished or decreased VEGF secretion of SUDHL4 and OCI-LY3 respectively. Of note, hypoxia, as expected, then partially restored VEGF secretion in both cell lines (Figure 4D).

Expression of NGF, TrkB and p75^{NTR} receptors are correlated with clinicopathological parameters in DLBCL patients

Our *in vitro* studies, performed in DLBCL cell lines, showed a pro-survival role of NTs and specially for BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis which may vary according to the DLBCL subtype. We therefore analyzed the pattern of NTs and their receptor expression in a cohort of 33 patients, with 17 were evaluated as GCB subtype and 16 as non-GCB (ABC, as all were Mum-1 positive; table 1). This study was performed at the transcript and protein levels.

mRNA for NGF, BDNF, TrkA, total and truncated TrkB (TrkB95), p75^{NTR} and sortilin were found in GCB and ABC biopsies, with often a stronger expression in ABC as compared with GCB subtype (Figure 5A). Interestingly, only some patients had transcripts for the full length TrkB receptor (TrkB145) which seemed not related to DLBCL subtype (4/8 for ABC and 6/9 for GCB) (Figure 5A). Expression of NGF, BDNF and their receptors were further examined at the protein level by immunohistochemistry. As shown in Figure 5B and C, NT expression was seen in lymph nodes tumor B cells of all DLBCL samples as well as for TrkB but antibodies used for the protein study detect the both forms of Trk receptors. In the majority, tumor samples were also positive for TrkA and p75^{NTR}. NGF and BDNF were immunolocalized in the cytoplasm, while Trk and p75^{NTR} receptors were detected mainly in the cytoplasm, and more rarely at cell membrane. Furthermore, we also observed sometimes nuclear stainings for TrkA and TrkB. Interestingly, stronger staining intensities were found mostly associated with the ABC subtype of DLBCL patients. According to these observations, NGF expression was correlated positively with Mum-1, the ABC subtype marker, and TrkB expression with the DLBCL profile ($p = 0.009$ and $p = 0.04$ respectively, Spearman rank correlation test). Indeed, a higher expression of NGF was found statistically associated to Mum1 positive compared to Mum1 negative biopsies ($p = 0.0077$); likewise, higher TrkB staining was found among the non-GCB profile of the patients ($p = 0.045$). Of note, the expression of p75^{NTR} was also positively correlated with the IPI ($p = 0.04$)

suggesting, as for the *in vitro* data, a pro-survival role for this receptor in the DLBCL. No significant correlation was found with age, or clinical (AA) stage.

Discussion

Despite significant advances have been made in the rituximab era in the treatment DLBCL, the cure rate is at a plateau and patients who relapses or fails R-CHOP must be referred to the lymphoma centers for novel therapy [31]. Thus, incorporating additional therapies or alternative regimens to R-CHOP are needed to improve their outcomes. Indeed, in the case of DLBCL, variation to the outcomes suggests that clinical features cannot fully account for underlying biologic heterogeneity. Molecular-profiling studies have attempted to capture this diversity, for example by defining subtypes relating to cell of origin, such as the GCB-like and ABC-like subtypes, and predictive models integrating these subtypes have been proposed, capturing additional features from the tumor microenvironment [1, 32]. In the present study we show evidence for a physiological role of endogenous neurotrophin secretion in the survival of DLBCL cells that are predominantly expressed in the ABC subtype, known to be associated to a poorer outcome.

We have previously shown that GCB cell lines produce neurotrophins (NGF, BDNF) that were modulated by culture conditions (serum deprived, rituximab exposure) [15]. In the present work we evaluated neurotrophin functionality in ABC cell lines compared to GCB. Both GCB (SUDHL4/6) and ABC (OCI-LY3/10) cell lines express membranous TrkA and TrkB receptors, even if weakly, and produce their neurotrophin ligands, NGF and BDNF respectively. These cells also expressed others neurotrophin axis, like NT3/TrkC. Although both full length and truncated forms of TrkA and TrkB Trk receptors are detected by antibodies used for immunofluorescence, a prominent expression of truncated receptors was detected by western blotting. Moreover, immunoprecipitation studies showed that p75^{NTR} is associated in majority with truncated forms of TrkA and TrkB receptors suggesting a biological role for those isoforms in basal culture conditions. These results are in accordance with previous report showing that only mRNA of truncated form of TrkB (gp95) was present in OCI-LY3 [33]. Furthermore, TrkB receptor was found phosphorylated at tyrosine 817 in all cell lines, with a stronger expression for GCB cell lines. This last data provide evidence for a membranous expression of the TrkB-FL receptor and probably activation of PLC γ pathways in basal culture conditions. The higher detection of truncated form of TrkB than TrkB-FL itself was also observed in other non neuronal cancers recently like for example breast tumors

[34]. To date, little is known on the biological role of truncated TrkB, lacking the kinase domain, but recent works propose cooperation between p75^{NTR} and truncated TrkB (i.e. TrkB-T1) or a crosslinking of their signaling systems. Indeed, TrkB-T1 was proposed to act as dominant-negative to p75^{NTR} [35]. Therefore, our results demonstrate that DLBCL cell lines mostly express Trk survival receptors and that p75^{NTR}/truncated Trk complex may interfere with the apoptotic signaling of p75^{NTR} which need to heterodimerize with the co-receptor sortilin [12]. This hypothesis is consistent with the fact that we never observed sortilin expression at the cell membrane, neither in anti-p75^{NTR} immunoprecipitates from cell lysates.

We also observed in the present work a co-localization of Trk receptors and their respective ligands at the cell surface of DLBCL cells, suggesting NTs mediating an autocrine loop. Therefore; we used the Trk pharmacological inhibitor K252a, to evaluate the functionality of the pro-survival Trk receptors expressed by our DLBCL cell lines (i.e. TrkA, TrkB and TrkC). The results showed that K252a induced apoptosis in cells of both DLBCL subtypes. This data confirmed previous reports obtained in NHL cell lines included DLBCL lines [15, 33], but in the present study we compared the effect of Trk inhibition between ABC and GCB cell lines. Furthermore, we demonstrated a synergistic effect of K252a with rituximab, as cell apoptotic percentages were higher in combination therapy as compared to K252a or rituximab exposure alone. Interestingly, this effect was significant even for the ABC cell lines tested (OCI-LY10 and OCI-LY3) which were less or unresponsive to rituximab as compare to the GCB lines. The apoptosis-induced response of B lymphoma cells exposed to rituximab is well known, and mechanisms implied inhibition of survival pathways that are constitutively activated in most of non-Hodgkin lymphoma (NHL) like PI3K/Akt, Erk1/2, and NF- κ B leading also to chemosensitization [5, 36]. Interestingly, these survival pathways are also activated by Trk signaling included in B cells [12, 37, 38] and thus targeting by the Trk pharmacologic inhibition leading to a potential synergistic action with rituximab exposure. The relative resistance of the ABC cells, OCI-LY10, as compared to GCB (SUDHL4 and SUDHL6) is in agreement with earlier studies, showing that, as for ABC DLBCLs, ABC lines are characterized by constitutive NF- κ B activation [3, 39-41]. The ability of NF- κ B to inhibit responses to cancer therapeutic agents [42] was proposed to contribute to the refractory clinical behavior of ABC DLBCLs [39]. Interestingly, in the OCI-LY3 cell line, K252a was shown to induce a subnuclear distribution of NF- κ B resulting in the sequestration of RelA in the nucleolus, thereby inhibiting NF- κ B dependent gene transcription [33]. In this regard, the K252a sensitivity of the ABC cell lines suggests that

targeting these Trk signaling may lead to improvements in rituximab-containing treatment protocols.

Since a clear TrkB-FL expression was found in all cell lines we therefore evaluated the functionality of the BDNF/TrkB axis in these cells. Results obtained with neutralizing anti-BDNF or anti-p75^{NTR} as well as pro-BDNF cell exposure showed a cytotoxic effect with cell apoptosis. This effect, however lower than the rituximab response, was only significant in GCB cell lines. This last observation with exogenous pro-BDNF suggests evidence of some p75^{NTR}/sortilin complex at cell membrane, which signalling may be enhanced by this treatment. This data, with those obtained for the Trk pharmacological inhibition, show a pro-survival BDNF/TrkB/p75^{NTR} signaling in DLBCL cells. Furthermore, they also suggest differential neurotrophin secretion and balance of partners or ligands for p75^{NTR} in GCB and ABC cell lines. Indeed pro-NGF and pro-BDNF are produced by all DLBCL cell lines with the mature forms, but these relative productions cannot be quantified by ELISA in cell supernatants of basal culture conditions. However, even though not significant, we observed a weak apoptotic effect of anti-p75^{NTR} neutralizing antibodies in OCI-LY10 cells. We and others have previously shown a pro-survival role for endogenous BDNF in normal B lymphocytes [14, 43], and autocrine NGF/TrkA signaling was shown as an important survival factor for Hodgkin lymphoma derived cell lines [44]. However, to our knowledge, it is the first report showing a BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis in DLBCL cell lines.

A multivariate model created from three gene-expression signatures - termed “germinal-center B-cell,” “stromal-1,” and “stromal-2” – was shown recently predicted survival both in patients who received CHOP and patients who received R-CHOP. The prognostically favorable stromal-1 signature reflected extracellular-matrix deposition and histiocytic infiltration. By contrast, the prognostically unfavorable stromal-2 signature reflected tumor blood-vessel density [45]. The fact that VEGFR2 receptor involved in neovascularization is part of the “stromal-2” signature gave rise to studies with the aim to analyze the role of angiogenesis factors and their prognostic value in DLBCLs. VEGF was strongly detected in DLBCLs and tumor cells from DLBCL patients co-expressed VEGF and its receptors VEGFR1 and VEGFR2, as shown for DLBCL human cell lines, suggesting an autocrine loop for VEGF in lymphomagenesis [46, 47]. Interestingly, VEGFR2 and not VEGFR1 expression predicts poor overall survival in DLBCL treated with immunochemotherapy (R-CHOP) [48]. Finally, high level of serum VEGF has been associated to poor prognosis in non-Hodgkin lymphoma [49]. Thus in the present work we also focused on VEGF secretion. As expected we detected VEGF secretion in all tested

DLBCL cell supernatants. Although no variation of this secretion was noticed with the DLBCL subtype, the pharmacological inhibition of Trk signaling significantly reduced VEGF secretion in both groups, suggesting for the first time in DLBCLs a link between neurotrophins and VEGF production. Indeed, NGF-TrkA and/or BDNF-TrkB signaling pathways have been shown to stimulate VEGF transcription and secretion in neuronal cells and neuroblastomas, that was mediated by HIF-1 α induction [28, 50]. In addition our finding that rituximab only affects VEGF secretion of the rituximab sensitive GCB cell lines indicates a relationship between rituximab-induced apoptosis and secretion of this growth factor. VEGF is capable of functioning through autocrine growth mechanisms to promote tumor survival and VEGF /VEGFR-mediated autocrine loops have been implied in the survival and growth of NHL cell lines [46]. Activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway, which is observed in the majority of human cancers including most of the DLBCLs, can increase VEGF secretion both by HIF-1 α dependent and independent mechanisms [51]. As BDNF/TrkB activation of the PI3K/mTOR pathway leads to an increase of HIF-1 α that stimulates VEGF promoter activity and transcription in neuroblastoma cells [28], we propose that at least TrkB/PI3K/mTOR pathway also stimulates VEGF secretion in DLBCL cells. Consistent with this hypothesis, rituximab by inhibiting the same survival pathway could lead, as for the Trk signaling inhibition by K252a, to the inhibition of VEGF production as we observed in the present work for GCB cell lines.

A strong HIF-1 α stabilization has been reported in DLBCLs compared to other B lymphomas. Surprisingly, whereas this stabilization is of poor prognosis in solid tumors, it was reported that strong HIF1 α expression was a favorable independent prognostic factor for DLBCL patients treated with R-CHOP [23]. Nevertheless, even if no link can be established with hypoxia at present, we chose to evaluate effect of this tumor microenvironment condition on the Trk signaling and rituximab exposure by submitting our DLBCL cell lines to physiologic hypoxia. Results showed that treatment with rituximab alone or in combination with K252a induced more apoptosis in hypoxia than in normoxia in SUDHL4 cells which exhibited also HIF-2 α protein-stabilization. Analysis of the proteolytic cleavage of PARP-1 which is a pro-apoptotic signature [52] showed that this hypoxia-enhanced apoptosis was also observed for ABC cell lines. These data are consistent with the more favorable prognosis reported for DLBCL patients with high HIF-1 α expression.

Present data on DLBCL cell lines strongly suggest that NTs could be considered as pro-survival factors. We thus analyzed their expression in a cohort of 33 DLBCL patients to

evaluate if neurotrophins and/or their receptors may be related to tumor clinical heterogeneity. Although a direct prognostic value was not established here, our results showed that expression of NGF, BDNF and their Trk and p75^{NTR} receptors occurs in DLBCL tumors. Furthermore, we report for the first time a correlation with clinicopathological parameters in DLBCL patients. Indeed higher expression of NGF and TrkB are in relation (Mum1 for NGF) or associated with the non-GCB profile, and expression of p75^{NTR} is correlated to clinical stage (IPI). These data are consistent with the pro-survival effect that we found for BDNF/TrkB/ p75^{NTR} in DLBCL cell lines, and thus strongly suggest that autocrine/paracrine NT survival loops are involved in DLBCL tumor aggressivity.

Altogether, the present results indicate that inhibition of Trk signaling could be a potential treatment strategy notably for ABC subtype and subgroup of DLBCL depending to a large extent on angiogenesis via VEGF for tumor survival and proliferation.

Acknowledgments

The authors would like to thank Brigitte Fournier (Laboratoire d'Anatomie-Pathologique CHU Limoges, France) for technical support and Dr. Cornelia Wilson for reviewing the English version of this manuscript.

Disclosures

All authors report no relevant financial conflicts of interest.

References

[1] Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.

2] Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002 ;346(25):1937-47.

- [3] Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):9991-6.
- [4] Arranz E, Robledo M, Martínez B, Gallego J, Román A, Rivas C, Benítez J. Incidence of homogeneously staining regions in non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1996 ;87(1):1-3.
- [5] Suzuki E, Umezawa K, Bonavida B. Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene* 2007;13;26(42):6184-93.
- [6] Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL, Lynch JC, Armitage JO, Warnke RA, Alizadeh AA, Lossos IS, Levy R, Chan WC. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002; 99: 2285–2290.
- [7] Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, and Staudt LM). Constitutive nuclear factor B κ B activity is required for survival of activated B cell–like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*, 2001; 194, 1861–1874.
- [8] Lam LT, Davis RE, Pierce J, Hepperle M, Xu Y, Hottelot M, Nong Y, Wen D, Adams J, Dang L, Staudt LM. Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res*. 2005; 11, 28–40.
- [9] Rezvani AR and Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(2):203-16.
- [10] Bürgi B, Otten UH, Ochensberger B, Rihs S, Heese K, Ehrhard PB, Ibanez CF, Dahinden CA. Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *J Immunol*. 1996;157(12):5582-8.
- [11] Vega JA, García-Suárez O, Hannestad J, Pérez-Pérez M, Germanà A. Neurotrophins and the immune system. *J Anat*. 2003 ; 203(1):1-19.
- [12] Reichardt B. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(1473):1545-64.
- [13] Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004;427(6977):843-8.
- [14] Fauchais AL, Lalloué F, Lise MC, Boumediene A, Preud'homme JL, Vidal E, Jauberteau MO. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol*. 2008;181(5):3027-38.

- [15] Bellanger C, Dubanet L, Lise MC, Fauchais AL, Bordessoule D, Jauberteau MO, Troutaud D. Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS One*. 2011;6(11):e27213.
- [16] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*. 2001 Aug;7(8):345-50.
- [17] Stewart M, Talks K, Leek R, Turley H, Pezzella F, Harris A, Gatter K. Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*. 2002;40(3):253-60.
- [18] Hirota K and Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;59(1):15-26.
- [19] Monti E, Gariboldi MB. HIF-1 as a target for cancer chemotherapy, chemosensitization and chemoprevention. *Curr Mol Pharmacol*. 2011 Jan;4(1):62-77.
- [20] Wang G, Jiang B, Rue E, Semenza G. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995, 92, 5510-5514.
- [21] Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwalla Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P, Zhong H. 'The metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis Found Symp*. 2001;240:251-60.
- [22] Piovan E, Tosello V, Indraccolo S, Masiero M, Persano L, Esposito G, Zamarchi R, Ponzoni M, Chieco-Bianchi L, Dalla-Favera R, Amadori A. Differential regulation of hypoxia-induced CXCR4 triggering during B-cell development and lymphomagenesis. *Cancer Res*. 2007;67(18):8605-14.
- [23] Evens AM, Sehn LH, Farinha P, Nelson BP, Raji A, Lu Y, Brakman A, Parimi V, Winter JN, Schumacker PT, Gascoyne RD, Gordon LI. Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} expression predicts superior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2010;28(6):1017-24.
- [24] Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*. 2000;60(6):1541-5.
- [25] Kim JW and Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res*. 2006;66(18):8927-30.

- [26] Castellino RC and Durden DL. Mechanisms of disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node--an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007;3(12):682-93.
- [27] Fitzpatrick SF, Tambuwala MM, Bruning U, Schaible B, Scholz CC, Byrne A, O'Connor A, Gallagher WM, Lenihan CR, Garvey JF, Howell K, Fallon PG, Cummins EP, Taylor CT. An intact canonical NF- κ B pathway is required for inflammatory gene expression in response to hypoxia. *J Immunol.* 2011;186(2):1091-6.
- [28] Nakamura K, Martin KC, Jackson JK, Beppu K, Woo CW, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2006;66(8):4249-55.
- [29] Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: *IARC Press*; 2008.
- [30] Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 2004;103(1):275-82.
- [31] Moskowitz C. Diffuse large B Cell lymphoma: How can we cure more patients in 2012? *Best Practice & Research Clinical Haematology* 25 (2012) 41–47.
- [32] Alizadeh AA, Gentles AJ, Alencar AJ, Liu CL, Kohrt HE, Houot R, Goldstein MJ, Zhao S, Natkunam Y, Advani RH, Gascoyne RD, Briones J, Tibshirani RJ, Myklebust JH, Plevritis SK, Lossos IS, Levy R. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. *Blood.* 2011;118(5):1350-8.
- [33] Sniderhan LF, Garcia-Bates TM, Burgart M, Bernstein SH, Phipps RP, Maggirwar SB. Neurotrophin signaling through tropomyosin receptor kinases contributes to survival and proliferation of non-Hodgkin lymphoma. *Exp Hematol.* 2009;37(11):1295-309.
- [34] Vanhecke, Adriaenssens E, Verbeke S, Meignan S, Germain E, Berteaux N, Nurcombe V, Le Bourhis X, Hondermarck H. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clin Cancer Res.* 2011;17(7):1741-52.
- [35] Michaelsen K, Zagrebelsky M, Berndt-Huch J, Polack M, Buschler A, Sendtner M, Korte M. Neurotrophin receptors TrkB.T1 and p75NTR cooperate in modulating both functional and structural plasticity in mature hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 2010;32(11):1854-65.
- [36] Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol.* 2010;47(2):115-23.

- [37] Arévalo JC and Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(13):1523-37.
- [38] Heese K, Inoue N, Sawada T. NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. *Cell Mol Immunol.* 2006;3(1):63-6.
- [39] Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B-cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med.* 2001;194(12):1861-74.
- [40] Bavi P, Uddin S, Bu R, Ahmed M, Abubaker J, Balde V, Qadri Z, Ajarim D, Al-Dayel F, Hussain AR, Al-Kuraya KS. The biological and clinical impact of inhibition of NF- κ B-initiated apoptosis in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *J Pathol.* 2011;224(3):355-66.
- [41] Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang JK, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Johnson NA, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM. Chronic active B-cell receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 2010;463(7277):88-92.
- [42] Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest.* 2001;107(3):241-6.
- [43] Schuhmann B, Dietrich A, Sel S, Hahn C, Klingenspor M, Lommatzsch M, Gudermann T, Braun A, Renz H, Nockher WA. A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol.* 2005;163(1-2):15-23.
- [44] Renné C, Minner S, Küppers R, Hansmann ML, Bräuninger A. Autocrine NGFbeta/TRKA signalling is an important survival factor for Hodgkin lymphoma derived cell lines. *Leuk Res.* 2008;32(1):163-7.
- [45] Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle A, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E, Braziel RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Wrench D, Lister TA, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 2008;359(22):2313-23.
- [46] Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis.* 2004;7(4):335-45.
- [47] Gratzinger D, Zhao S, Tibshirani RJ, Hsi ED, Hans CP, Pohlman B, Bast M, Avigdor A, Schiby G, Nagler A, Byrne GE Jr, Lossos IS, Natkunam Y. Prognostic significance of

VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Lab Invest.* 2008;88(1):38-47.

[48] Gratzinger D, Advani R, Zhao S, Talreja N, Tibshirani RJ, Shyam R, Horning S, Sehn LH, Farinha P, Briones J, Lossos IS, Gascoyne RD, Natkunam Y. Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP). *Br J Haematol.* 2010;148(2):235-44.

[49] Salven P, Orpana A, Teerenhovi L, Joensuu H. Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin lymphoma: a single-institution study of 200 patients. *Blood.* 2000 ;96(12):3712-3718.

[50] Nakamura K, Tan F, Li Z, Thiele CJ. NGF activation of TrkA induces vascular endothelial growth factor expression via induction of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Cell Neurosci.* 2011;46(2):498-506.

[49] Li M, Liu C, Bin J, Wang Y, Chen J, Xiu J, Pei J, Lai Y, Chen D, Fan C, Xie J, Tao Y, Wu P. Mutant hypoxia inducible factor-1 α improves angiogenesis and tissue perfusion in ischemic rabbit skeletal muscle. *Microvasc Res.* 2011;81(1):26-33.

[50] Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2011;4:51.

[51] Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.* 2010;8:31.

Legend of figures

Figure 1: Comparative study of the pattern expression of neurotrophins and their receptors in GCB and ABC like DLBCL cell lines.

A: Analysis of NGF, BDNF, NT3 and their receptor expression in cell lysates of two GCB like (SUDHL4 and SUDHL6) and two ABC like (OCI-LY3 and OCI-LY10) DLBCL cell lines, by western blotting after a 72h culture in basal conditions. Blots were reprobed with anti- β -actin as a loading control. Data are representative of at least 4 independent experiments. **B:** Immunofluorescence staining performed without cell permeabilization in DLBCL cell lines confirmed surface Trk receptors (Alexa Fluor 488, in green) and neurotrophins (Alexa Fluor 594, in red) expression on tumor B cells. Merged image (yellow) revealed NTs/Trk colocalization in DLBCL (in blue: DAPI staining). Data are done for SUDHL6 to compare with OCI-LY10 and are representative of at least 3 independent experiments. **C:** Protein lysates from all cell lines were subjected to immunoprecipitation (IP) with rabbit polyclonal anti-p75^{NTR} followed by immunoblotting (IB) with indicated antibodies, showing p75^{NTR} interaction with truncated TrkA and TrkB receptors but not with sortilin. **D:** TrkB-phosphotyrosine Y817 level was revealed by western blotting in all DLBCL cell lysates after a 72h culture in basal conditions. Data are representative of 3 independent experiments.

Figure 2: Pharmacological inhibition of Trk receptors synergizes the effect of rituximab in an ABC resistant cell line.

A: GCB (SUDHL6) and ABC (OCI-LY10) like DLBCL cells were exposed to rituximab (RTX, 1 and 20 μ g/mL) during 48h in serum basal culture condition (10% FCS) with or without pharmacological inhibitor of Trk receptors, K252a (350 nM). Viability of cells were evaluated using the XTT test and data are expressed as means \pm SD of optical density (OD) obtained from 4 independent experiments. **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ when compared to DMSO controls (Student's t-test).

B: Apoptosis induced by rituximab and/or K252a was analyzed by flow cytometry using the Annexin-V-FITC/PI dual staining. Ratio of apoptotic (lower right quadrant) and necrotic (upper right quadrant) cells obtained after 35 h cell culture are expressed as cell percentages. Example of flow cytometric analysis representative of 3 experiments is done. **C:** Rituximab (RTX 1 μ g/mL) or/and K252a induced apoptosis were also evaluated by western blot analysis of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage after 48h exposure in OCI-LY10 cell lysates. Data are representative of 3 independent experiments. FL: full-length (FL), CL: cleaved PARP. Actin expression is done as loading reference.

Figure 3: A BDNF neurotrophin axis is functional in DLBCL cell lines

Effect of neutralization of endogenous BDNF (with anti-BDNF, 15 μ g/mL) or p75^{NTR} signaling (with anti-p75^{NTR} neutralizing antibodies, 1 and 10 ng/mL) and exogenous pro-BDNF (1 and 10 ng/mL) was analyzed on DLBCL cells during 72h in serum basal culture condition (10% FCS). **A:** Viability of cells exposed to anti-BDNF or pro-BDNF or anti-p75^{NTR} was evaluated in reference to rituximab response (1 μ g/mL) using the XTT metabolic

test. Data obtained on GCB DLBCL cells after 72h exposure are done as means \pm SD of optical density (OD) obtained from 7 independent experiments. Student *t* test was used to determine significance, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ when compared to controls (C). **B:** Analysis of apoptosis revealed by western blotting detection of PARP cleavage. Data obtained in a GCB cell line (SUDHL4) compared to an ABC cell line (OCI-LY10) are representative of 3 independent experiments. Actin is done as loading control. **C:** VEGF secretion by DLBCL cells was quantified by ELISA in cell supernatants after 48h. Results are expressed as means \pm SD (pg/mL) of at least 4 independent assays. **: $p < 0.01$ when compared to controls (Student *t* test).

Figure 4: Effect of hypoxia on Trk signaling and response to treatment.

A: Western blotting analysis of NGF, BDNF and phospho-TrkB (Y817) expression in SUDHL-4 and OCI-LY3 cultured in hypoxia vs normoxia conditions, in presence or not of rituximab (1 μ g/mL). **B:** Viability of SUDHL4 cells exposed to various concentrations of rituximab (RTX, 1 and 20 μ g/mL) during 48h in serum basal culture condition (10% FCS) with or without pharmacologic inhibitor of Trk, K252a in normoxia or in hypoxia. Data, from 3 independent experiments, are expressed as means \pm SD of optical density ratio to DMSO control. **C:** Western blot detection of the PARP cleavage showing apoptosis at 48h in SUDHL4 and OCI-LY3 cell lysates. Results are representative of 4 experiments. **D:** VEGF secretion by SUDHL4 and OCI-LY3 was quantified by ELISA in cell supernatants after 48h of culture in hypoxia as compared to normoxic condition. Results are expressed as means \pm SD (pg/mL) of 3 independent assays. nd= non detectable.

Figure 5: Neurotrophins and DLBCL tumor samples: a comparative analysis in ABC and GCB subtypes.

A: RT-PCR analysis was performed on 8 ABC and 9 GCB DLBCL patient biopsies using primers specific to NGF, BDNF, TrkB (truncated and full-length receptor), TrkA, p75^{NTR} and sortilin. Constitutively expressed actin is a control of PCR efficiency. **B:** Representative immunohistochemical stainings of NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75^{NTR} are done for ABC and GCB DLBCL subtypes from 33 tumors (200x). **C:** Box-plots analysis showing distribution of total immunostaining scores of NGF, BDNF, p75^{NTR}, TrkA and TrkB determined by immunohistochemistry in ABC tumor samples (n= 16) as compared to GCB (n=17) DLBCL subtype. The vertical axis gives the total immunostaining score.

Table 1. Baseline patient clinical characteristics

Characteristic	Number of patients (<i>n</i> = 33)
Age (range)	63 ±15 (31–89)
≤ 60	11
> 60	22
Sex (M/F)	22/11
GCB	17 (51%)
Ann Arbor	Stage I/II 10
	Stage III/IV 7
IPI	Low/low-intermediate (≤ 2) 13
	Intermediate-high/high (> 2) 4
Non-GCB	16 (48%)
Ann Arbor	Stage I/II 6
	Stage III/IV 10
IPI	Low/low-intermediate (≤ 2) 7
	Intermediate-high/high (> 2) 9
Serum LDH level >1x normal	13 (39%)
Therapy regimen	R-CHOP
5-Year overall survival	61%

M, male; F, female; LDH, lactate dehydrogenase.

Figure 1

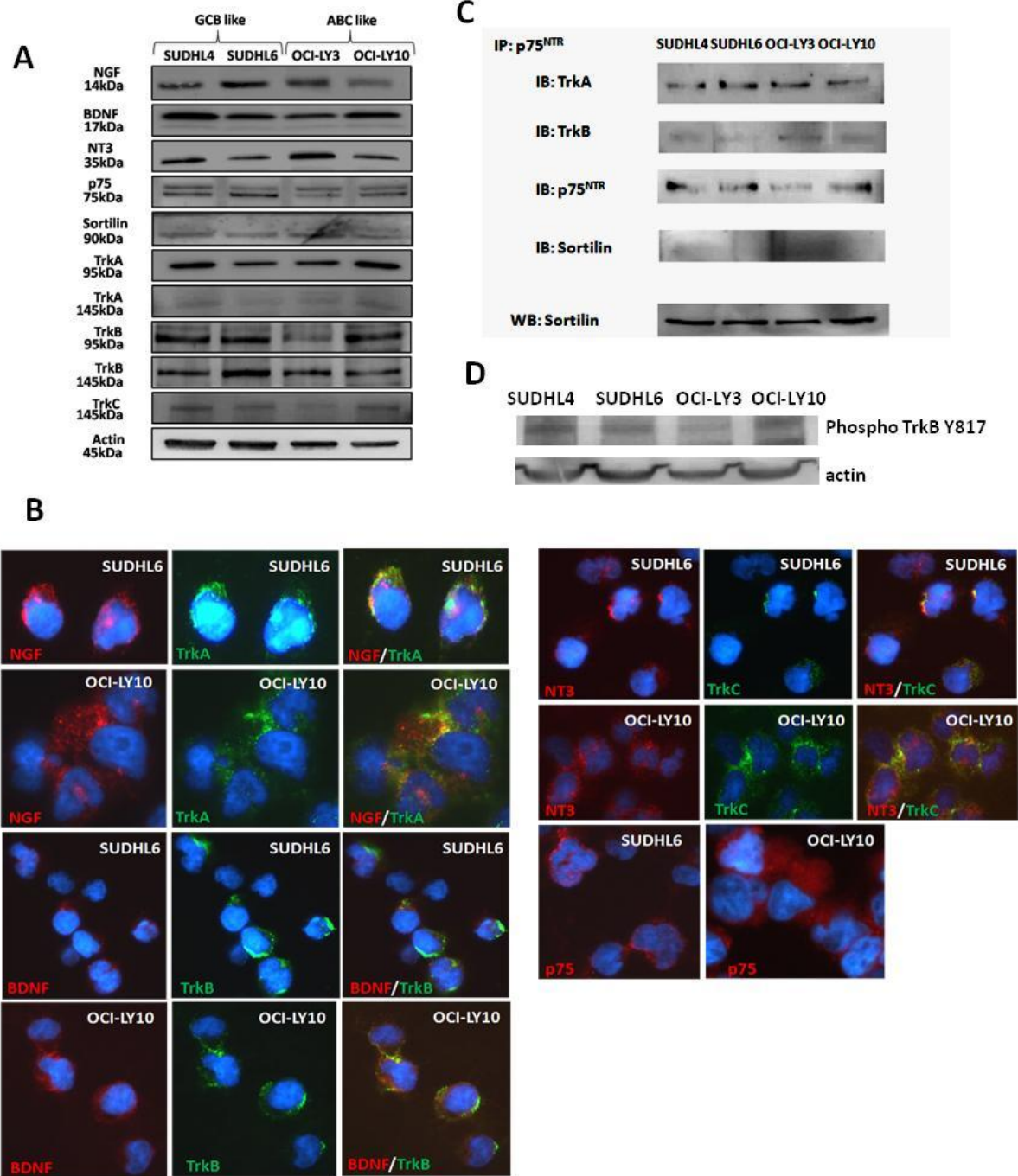
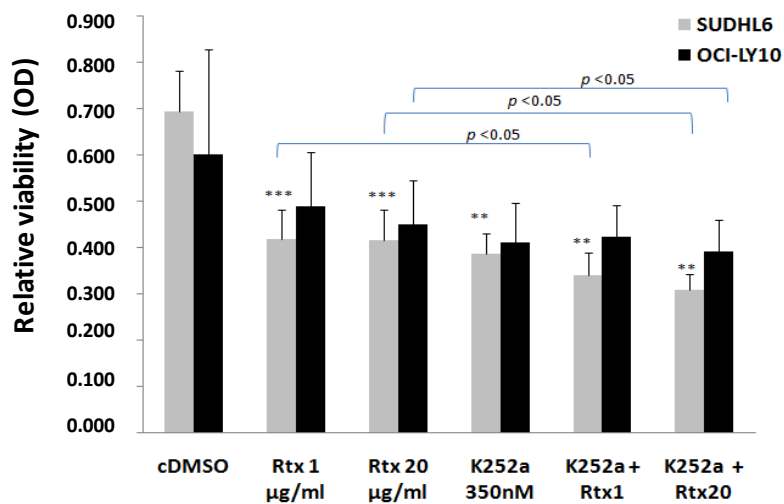
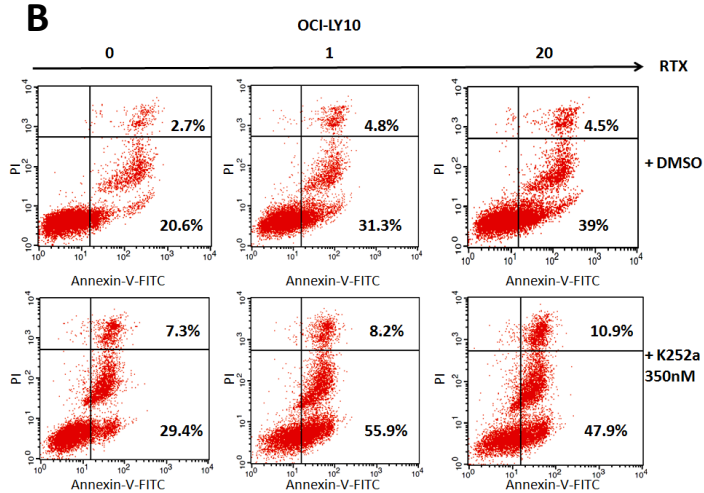


Figure 2

A



B



C

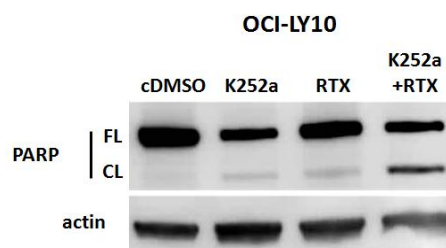


Figure 3

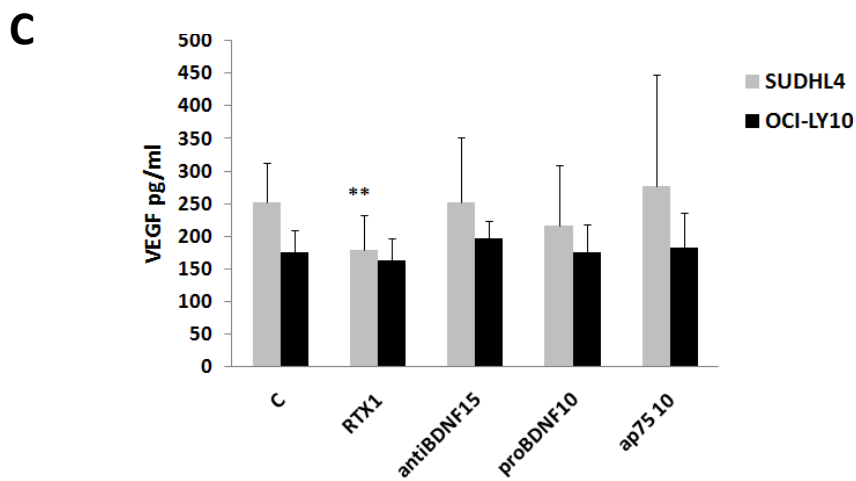
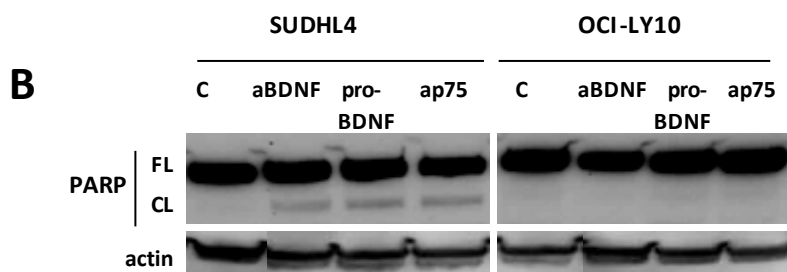
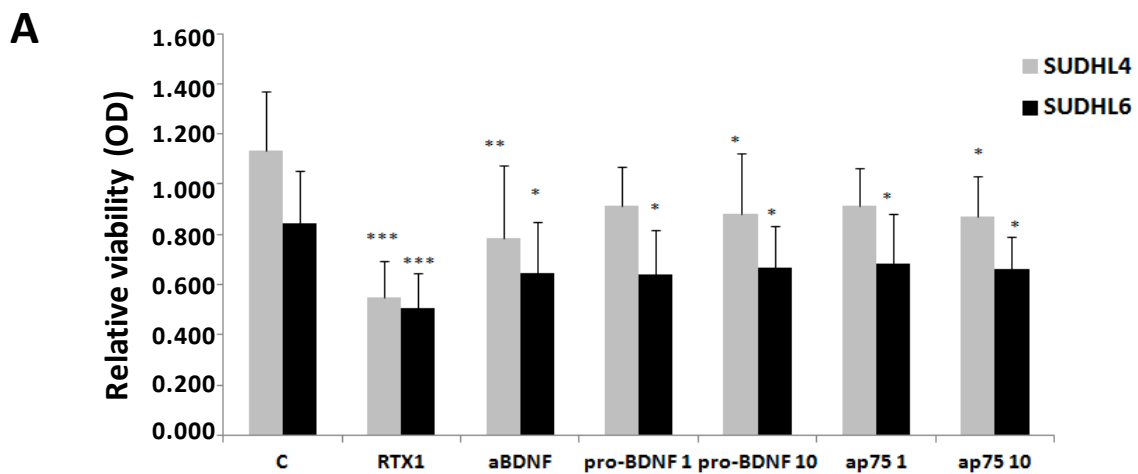


Figure 4

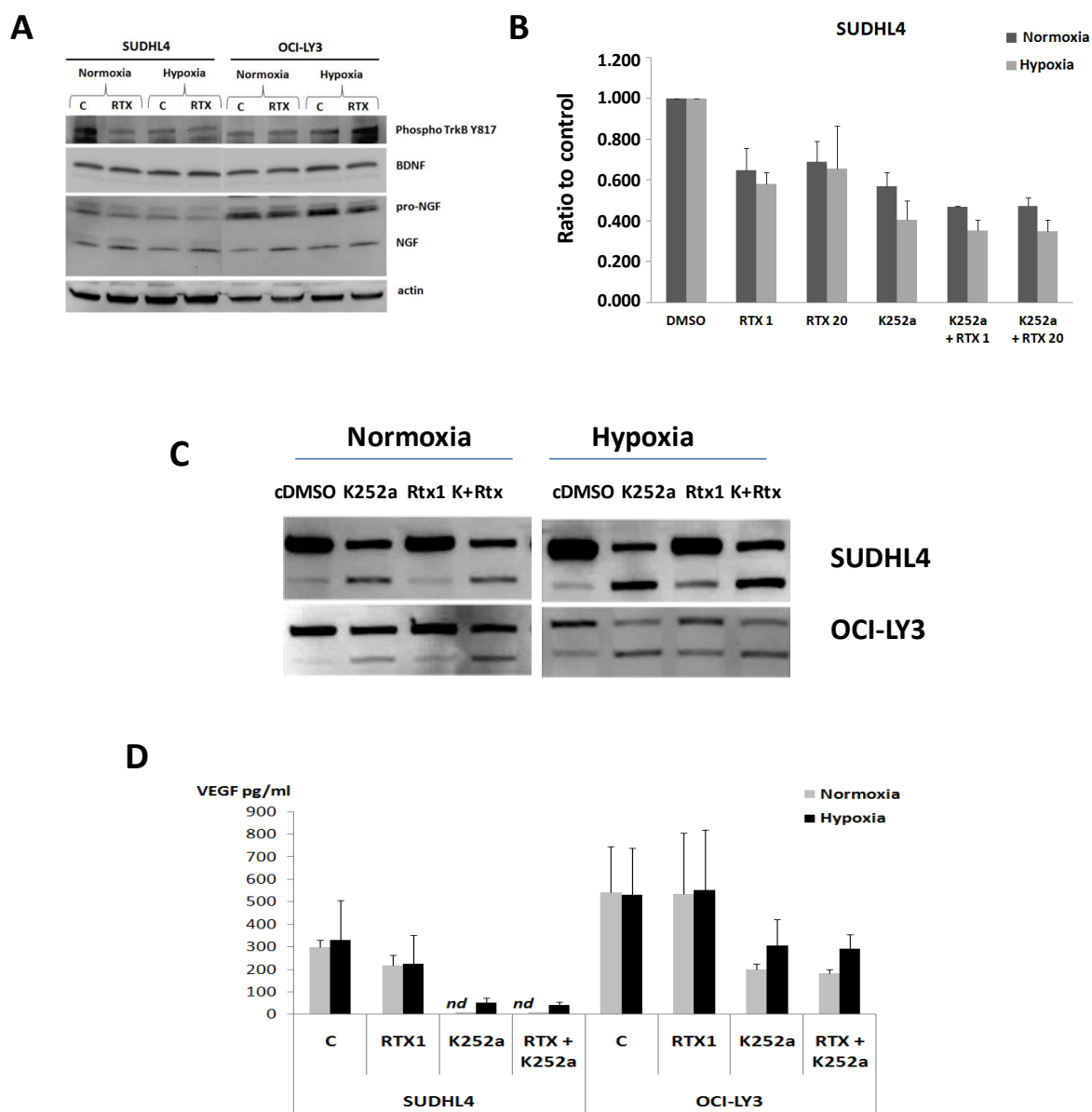
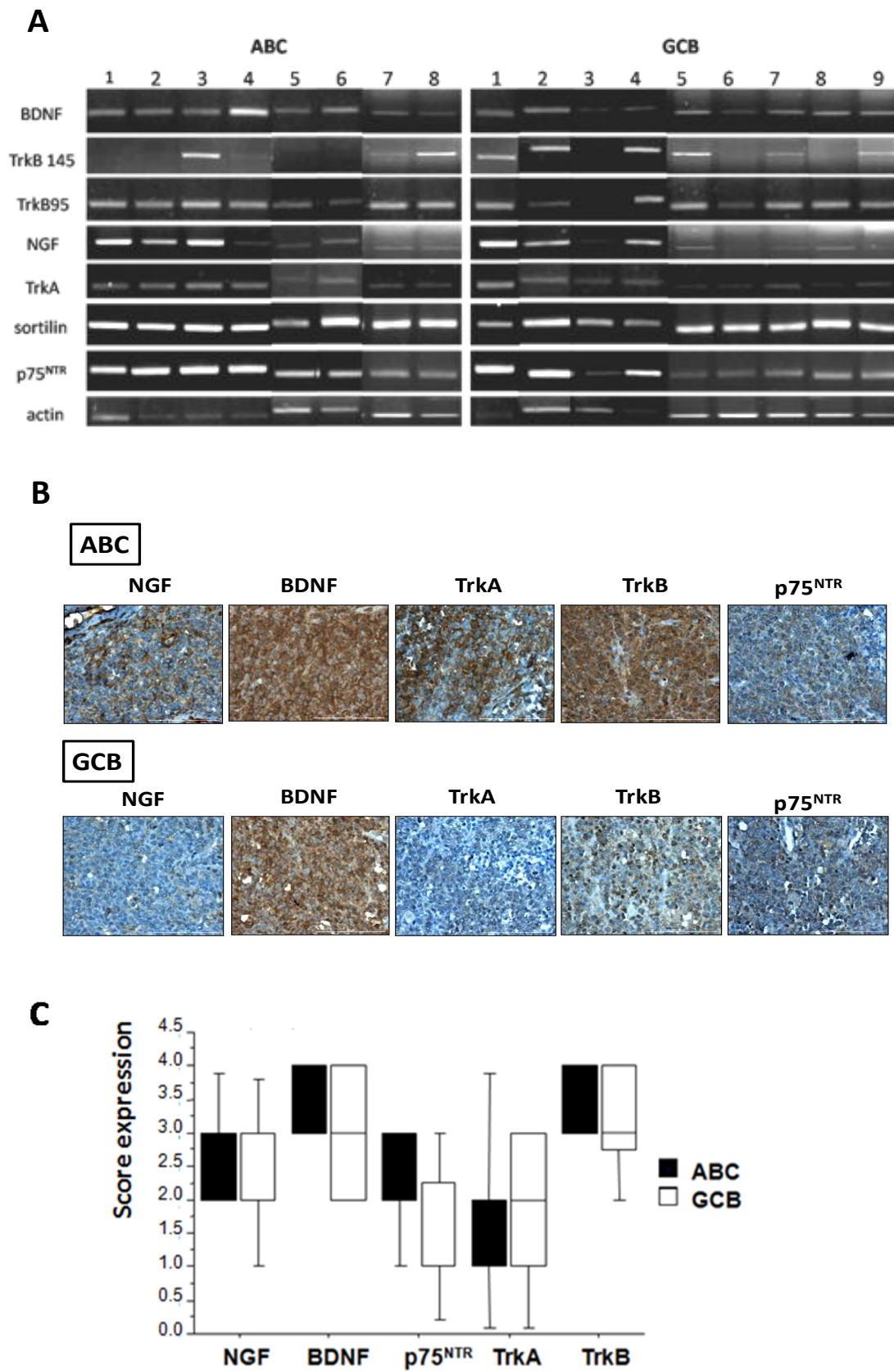


Figure 5



3. Travaux complémentaires :

3.1 Etude de la modulation des neurotrophines sur l'effet apoptotique du rituximab

Avant d'obtenir les lignées ABC (au cours de la 2^e année de notre thèse), nos travaux se sont focalisés sur l'impact des neurotrophines sur la réponse au rituximab des lignées GCB. Nous avons préalablement montré dans le premier article que l'inhibition pharmacologique (K252a) permettait de renforcer l'apoptose induite par le rituximab. Aussi, nous avons évalué l'impact de la modulation de la signalisation des NTs (neutralisation du BDNF endogène par des anti-BDNF, ajout aux cultures de pro-BDNF exogène) sur la réponse des cellules GCB au rituximab.

Comme nous l'avons relaté dans le second article, les résultats obtenus (Figure 15) confirment que la neutralisation du BDNF endogène diminue de façon significative la viabilité des lignées GCB. De plus, nous montrons que cette neutralisation potentialise l'effet cytotoxique induit par le rituximab dans le cas des SUDHL4 et de façon plus modérée pour les SUDHL6. En ce qui concerne le pro-BDNF, il tend à diminuer la viabilité des cellules SUDHL6 en conditions basales de culture, mais surtout, nous observons un effet synergique lorsqu'on l'associe au rituximab.

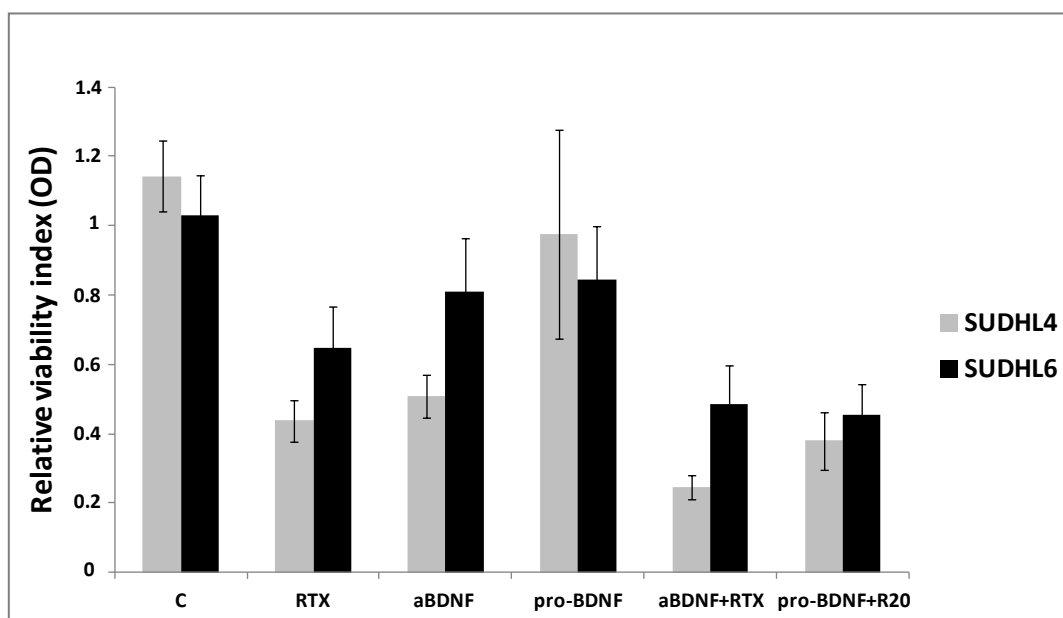


Figure 15 : Viabilité cellulaire à 48h des lignées GCB soumises à l'anti-BDNF 15µg/mL ou au pro-BDNF 10µg/mL seuls ou en association avec le rituximab 20µg/mL (n=3).

Les résultats correspondent aux moyennes ± ET des densités optiques issues de l'analyse de la viabilité par le test métabolique du XTT réalisées à partir de 3 expériences indépendantes.

Dans le premier article, nous avons montré que lors d'un traitement au rituximab, les lignées GCB secrètent plus de NGF. De plus, nos résultats présentés dans le 2^e article montrent que l'hypoxie renforce l'effet cytotoxique du rituximab et de l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk. Ces observations nous ont amenées à évaluer l'impact du blocage du NGF endogène en présence de rituximab en normoxie tout comme en hypoxie sur l'apoptose des cellules de DLBCL.

Les analyses en western blot du clivage de la PARP (Figure 16) ne révèlent aucun effet de l'anti-NGF seul ou en association au rituximab en normoxie. Comme il a été mentionné dans l'article 2, le clivage de la PARP dû au rituximab est quant à lui plus important en hypoxie. Cependant et de manière intéressante, on observe un fort clivage de la PARP lors de l'ajout de l'anti-NGF au rituximab en hypoxie et ces effets ne sont pas observés dans le cas des lignées ABC. Ces résultats renforcent l'hypothèse de la mise en place d'un circuit de survie NGF/TrkA dans les cellules SUDHL4 lors du traitement au rituximab, via la production de NGF ainsi que par la plus forte expression de TrkA montrée dans l'article 1. Ce circuit est neutralisé ici en partie par l'ajout d'anticorps neutralisants anti-NGF ce qui permet une meilleure sensibilisation à l'effet du rituximab.

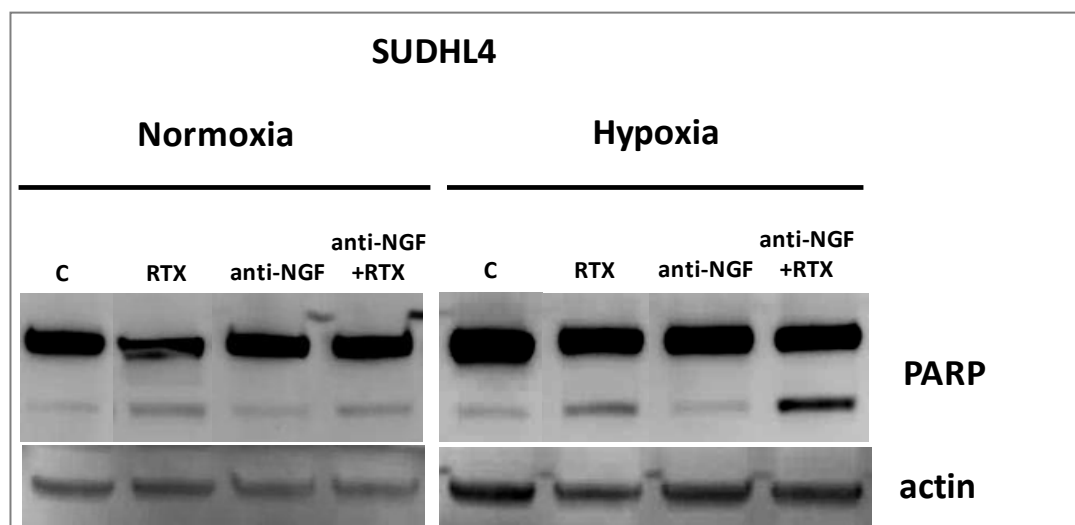


Figure 16 : Western Blot révélant le clivage de la PARP après traitement des SUDHL4 à l'anti-NGF 50ng/mL seul ou en association avec le rituximab (1µg/mL) en normoxie et en hypoxie (western blot représentatif de 4 expériences indépendantes).

Comme la voie NGF/TrkA a été montrée impliquée dans la sécrétion de VEGF dans le neuroblastome et que nos résultats (article 2) révèlent un fort effet inhibiteur du K252a sur cette sécrétion chez les SUDHL4, nous avons réalisé des dosages ELISA du VEGF produit par des cellules SUDHL4 et OCI-LY3 en culture en présence de l'anti-NGF seul ou en association avec le rituximab.

Les résultats (Figure 17) montrent une forte diminution de la sécrétion de VEGF avec rituximab uniquement pour les cellules SUDHL4, effet déjà observé dans nos précédentes expériences. La neutralisation du NGF endogène induit quant à elle une diminution plus modeste de la sécrétion de VEGF et aucun effet additif n'est observé avec celui du rituximab. Nous n'observons pas non plus d'effet des différents traitements sur les cellules de la lignée ABC testée (OCI-LY3).

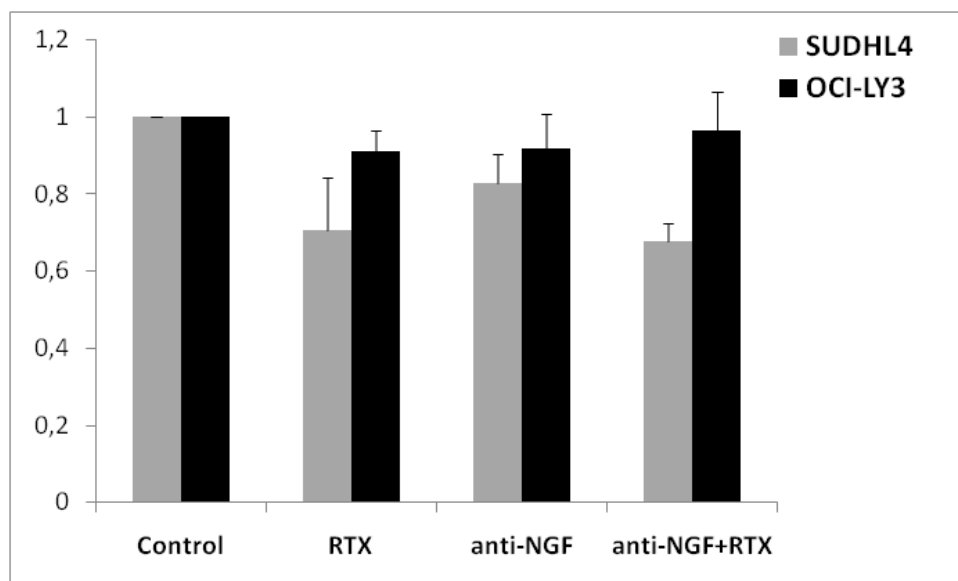


Figure 17 : Etude de la sécrétion de VEGF lors de la neutralisation du NGF endogène (anti-NGF 50ng/mL) en association ou pas avec le traitement des cellules par le rituximab (1µg/mL).

Les taux de VEGF issus du dosage ELISA sont exprimés en ratio par rapport au contrôle chez les SUDHL4 après 48h de traitement (n=3).

3.2 Mise en place des shRNA BDNF

3.2.1 Objectifs

Nous avons montré que les récepteurs Trk sont fonctionnels au sein des lignées de DLBCL puisque leur inhibition par le K252a induit une diminution de la viabilité cellulaire, une apoptose chez toutes les lignées ainsi qu'une diminution de la sécrétion de VEGF. La signalisation basale de ces récepteurs a aussi été confirmée pour TrkB par la mise en évidence dans toutes les lignées de la forme phosphorylée de TrkB, signe de son activation potentielle suite à sa liaison avec BDNF. De plus, le K252a augmente l'effet apoptotique du rituximab chez les lignées GCB et induit l'apoptose des lignées ABC plus résistantes au rituximab (figure 2, article 2). Les incubations avec du pro-BDNF exogène ou un anticorps neutralisant du BDNF montrent des effets sur la viabilité et l'apoptose cellulaire des lignées GCB. Il nous a donc paru important d'évaluer l'impact de l'inhibition de l'expression des NTs, et plus

particulièrement du BDNF, par la technique de shRNA. Le principe de cette technique consiste à délivrer aux cellules cibles un plasmide capable de s'insérer dans le génome. Le transgène code pour un ARN en forme d'épingle à nourrice (figure 19) qui sera mûré en ARN interférent : shRNA (short hairpin RNA) capable d'empêcher la traduction de la protéine d'intérêt. Notre étude préliminaire a été menée sur l'inhibition de la transcription de la protéine BDNF dans la lignée SUDHL4.

3.2.2 Matériel et méthodes

3.2.2.1 Matériel

Nous nous sommes procuré des plasmides possédant 3 clones shRNA (silencing hairpin RNA) différents ciblant le BDNF chez Sigma-Aldrich. Les informations concernant les séquences sont récapitulées dans le tableau 4. Le plasmide contenant le shRNA se nomme pLKO.1 puro et est représenté par la figure 18. Il s'agit d'un vecteur lentiviral ne pouvant pas se répliquer. Il peut être introduit dans les cellules cibles soit par transfection directe ou par infection à l'aide de particules lentivirales ciblant les lignées cellulaires à inactiver. Cette méthode est celle que nous avons choisie. Une fois l'infection effectuée, la sélection des cellules ayant intégré les particules lentivirales se fait grâce au gène de résistance à la puromycine exprimé par le pLKO.1.

	Numéro TRC	Identifiant du clone	Séquence
Clones de BDNF	TRCN0000058208	NM_001709.3-572s1c1	CCGGGCTCAGTAGTCAAGTGCCITTTCTCGAGAAAGGCCACTTGACTACTGAGCTTTTTG
	TRCN0000058209	NM_001709.3-821s1c1	CCGGGCAATACTTCTACGAGACCAACTCGAGTTGGTCTCGTAGAAGTATTGCTTTTTG
	TRCN0000058212	NM_001709.3-495s1c1	CCGGCTGTTGGATGAGGACCAGAACTCGAGTTTCTGGTCTCA TCCAACAGTTTTTG

Tableau 4: Caractéristiques des clones de BDNF.

3.2.2.1 Méthode d'amplification et de transfection

Dans un premier temps, le plasmide est inséré par choc thermique dans des bactéries compétentes DH5 α qui sont par la suite sélectionnées grâce à l'ampicilline. Après isolement et purification de l'ADN plasmidique (kit de Midi Prep, Quiagen), les particules lentivirales sont produites par des cellules HEK-293T préalablement transfectées par les vecteurs pLKO comportant le shRNA, le plasmide codant pour le « packaging system » du virion (PSPAX2) et le plasmide codant pour une enveloppe (VSVg). Les particules lentivirales produites sont alors récupérées et concentrées (Lenti-X Concentrator, Clontech).

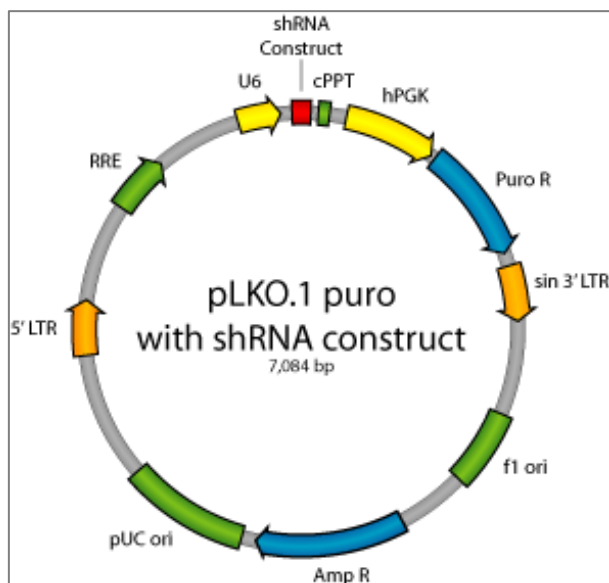


Figure 18 : Schéma de la construction du pLKO.1 puro.

Le plasmide est constitué de divers éléments : le promoteur U6 qui permet la transcription par l'ARN polymérase III pour la génération des transcrits shRNA, le cPPT (central polypurine tract) qui améliore l'efficacité de la transduction en facilitant l'import au noyau, le promoteur hPGK (human phosphoglycerate kinase) qui permet l'expression de la puromycine, le *Puro R*, gène de résistance à la puromycine, le sin3'LTR (3' Self-inactivating long terminal repeat), le f1 ori, origine de réplication bactérienne, l'*Amp R*, gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide, le pUC ori, origine de réplication bactérienne pUC, le 5'LTR (5' long terminal repeat) et enfin le RRE (Rev response element). Schéma d'addgene.org.

3.2.2.2 Principe et méthode de l'infection

Le principe de l'ARN interférence est basé sur les mécanismes de régulations post-transcriptionnels qui permettent à un ARN simple brin de guider un complexe de ribonucléoprotéines nommé RISC (RNA induced silencing complex) qui inhibe l'ARNm cible. Le processus de formation de ce complexe est détaillé dans la figure 19. Tout d'abord, l'ADN d'intérêt contenu dans le vecteur est transcrit grâce à l'ARN polymérase II. L'ARN simple brin obtenu présente le long de sa séquence des motifs partiellement complémentaires qui lui donnent une structure secondaire en forme d'épingle à cheveux comportant trois parties : le « corps », formé de séquences plus ou moins complémentaires qui s'apparient en vis-à-vis, la « tête » qui forme la boucle et enfin les « jambes » simples brins constituées par les séquences n'ayant pas trouvé de complémentarité. Cet ARN subit alors une première série de coupures par l'enzyme Drosha (ribonucléase de type III) qui le réduit en une épingle à cheveux d'une centaine de nucléotides amputée de ses « jambes » nommée shRNA (short hairpin RNA). Celle-ci est ensuite transportée dans le cytoplasme par l'exportine-5 (Exp5) et est clivée par une seconde ribonucléase de type III nommée Dicer. Cette enzyme élimine la « tête » de l'épingle pendant que d'autres protéines associées de type hélicases dissocient l'ARN double brin restant en deux ARN simple brin. De plus, elle sépare et clive les longs

ARN double brin des petits ARN interférents (siRNA= small interfering RNA) en morceaux d'une vingtaine de nucléotides. L'association du siRNA obtenu avec un complexe protéique permet la formation d'un nouveau complexe appelé RISC (RNA Induced Silencing Complex) qui s'apparie à l'ARNm cible. Si l'appariement est parfait (cas du siRNA), l'ARNm cible est détruit et il n'y a pas de traduction et les RISC restent fonctionnels, induisant la destruction d'autres ARNm cibles.

Les particules lentivirales du PLKO et de 3 shRNA de BDNF ainsi obtenues, nous avons infecté les cellules cibles (SUDHL4) et les avons sélectionnées avec du milieu contenant 2µg/mL de puromycine. Au bout de 15-30 jours de culture, la puromycine est retirée et le contrôle de l'extinction est effectué par un western blot. Nous avons effectué deux infections des SUDHL4 car la première ne nous a permis de garder les cellules en culture que quelques semaines. Celles-ci présentaient en effet des difficultés à proliférer et reentraient rapidement en apoptose.

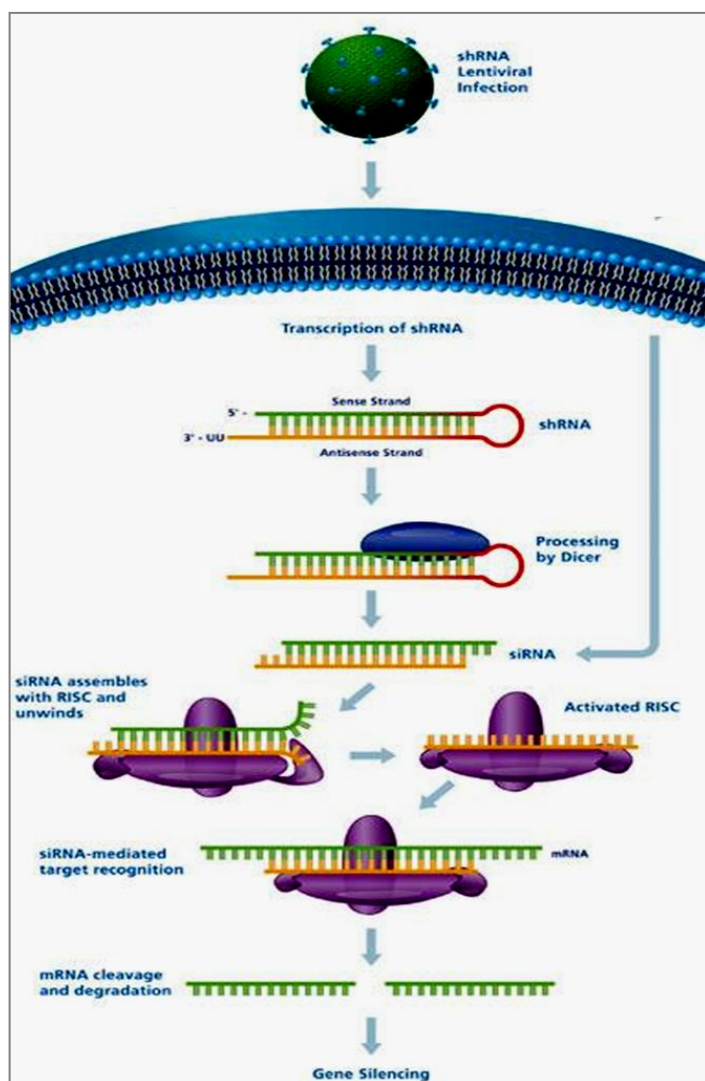


Figure 19: Schématisation de la formation du complexe RISC.
D'après <http://www.genengnews.com>

3.2.3 Résultats

3.2.3.1 Effet des shRNA de BDNF dans les cellules SUDHL4

L'inhibition de la synthèse de BDNF a été évaluée en Western Blot après 48h de culture. Lors de la première infection des SUDHL4, sur les 3 shRNA testés (nommés par la suite 208, 209 et 212), seuls les 208 et 209 ont permis la prolifération des cellules quelques semaines et seul le 208 a permis de diminuer l'expression de la protéine BDNF. Par la suite, nous avons tenté une autre infection pour laquelle les cellules infectées avec les shRNA 208 et 212 ont proliféré, cependant les cellules avec le shRNA 208 se sont avérées apoptotiques, ce qui a été confirmé ensuite par l'analyse du clivage de la PARP (Figure 20). Par conséquent, les résultats obtenus avec ce shRNA ne peuvent pas être pris en considération d'autant que nous n'observons pas de diminution sensible de l'expression de BDNF. Nous ne nous focaliserons donc que sur ceux obtenus avec le shRNA 212 (Figure 20).

Bien que l'inhibition de l'expression de BDNF par rapport aux cellules transfectées avec le PLKO vide reste modeste ($\approx 30\%$), il semble cependant qu'on observe des modifications de la signalisation d'Akt. En effet, l'inhibition de l'expression de BDNF induit lors de cette expérience une augmentation de l'expression d'Akt accompagnée d'une faible augmentation de la phosphorylation de la sérine 473. Cette modification de la voie Akt est conforme avec l'absence d'apoptose comme le montre l'analyse du clivage de la PARP (figure 20). Par contre aucune modification claire de l'expression des NTs ou de leurs récepteurs n'a pu être observée.

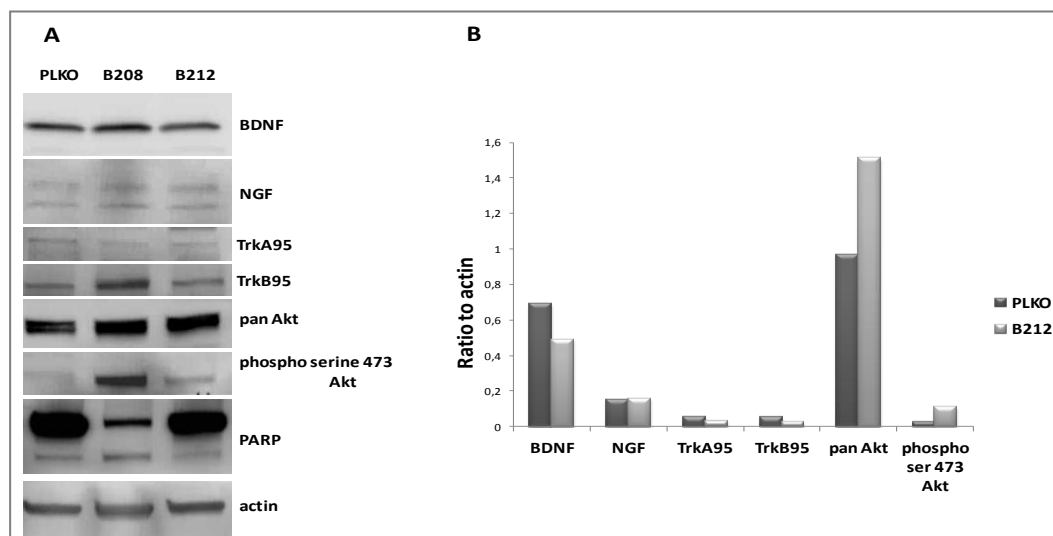


Figure 20 : Résultats obtenus lors de la transfection des cellules SUDHL4 par des shRNA ciblant le BDNF. (A) Analyse par western blot de l'expression de BDNF, NGF, TrkA et TrkB tronqués, les formes totales (pan) et phosphorylées de l'Akt (Ser 473) et le clivage de la PARP. (B) Quantification des résultats en référence avec l'expression de l'actine sur les cellules transfectées avec le PLKO vide et les shRNA B212.

3.2.3.2 Effet de l'inhibition de la synthèse du BDNF par shRNA sur la réponse des cellules SUDHL4 au rituximab et la sécrétion de VEGF.

Afin de déterminer le rôle de BDNF dans la réponse au rituximab, nous avons traité les cellules transfectées avec le PLKO vide et le shRNA 212 avec une dose de 1µg/mL de rituximab. Nous observons alors une nette augmentation du clivage de la PARP suite à l'inhibition de l'expression de BDNF. Cette apoptose, qui semble renforcée, s'accompagne aussi d'une diminution importante de l'expression du récepteur p75^{NTR}, diminution observée déjà dans les cellules transfectées en l'absence de rituximab (figure 21). Notons que la diminution d'expression de p75^{NTR} est aussi visible en présence de rituximab pour les cellules contrôles et transfectées par le vecteur vide. Ces résultats, bien que très préliminaires car issus d'une seule transfection, semblent confirmer ceux obtenus sur les mêmes cellules en présence d'anticorps neutralisants du BDNF (Figure 15) et qui montraient une potentialisation de l'action cytotoxique avec le rituximab.

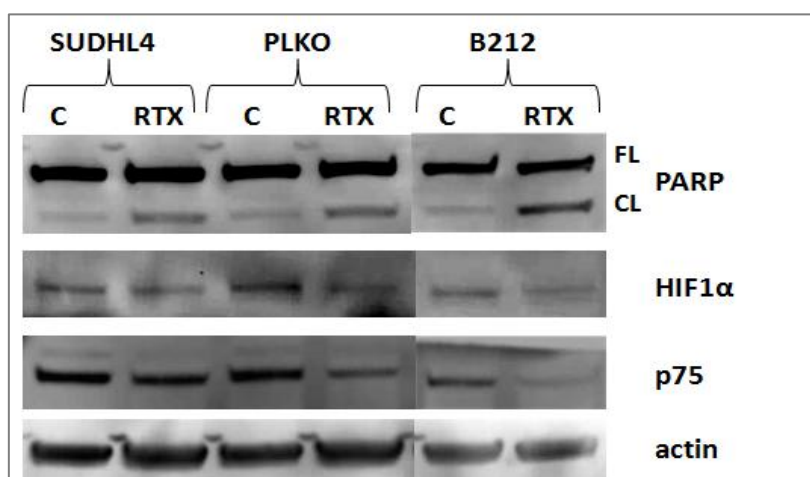


Figure 21 : Effets du rituximab sur les cellules SUDHL4 transfectées avec des shRNA ciblant le BDNF.
Résultats du western blot réalisé à partir après traitement pendant 48h au rituximab (1µg/mL) des SUDHL4 infectées avec le PLKO vide et le shRNA B212 de BDNF.

Comme la voie BDNF/TrkB est impliquée dans la modulation de la sécrétion du VEGF en stabilisant le facteur HIF1α (Nakamura et al., 2006) dans le cas des cellules d'origine neuronale, nous avons aussi recherché l'effet de l'inhibition de la synthèse de BDNF sur l'expression de ce facteur et sur la sécrétion de VEGF.

L'analyse par western blot de l'expression de l'HIF1 α (Figure 21) semble indiquer une baisse de son expression suite au traitement par le rituximab qui serait plus marquée lors de l'inhibition de la synthèse de BDNF.

Les résultats du dosage ELISA du VEGF produit par les cellules SUDHL4 (Figure 22) montrent que les cellules transfectées avec le shRNA 212 sécrètent moins de VEGF que celles infectées avec le PLKO vide. De plus, le traitement avec le rituximab induit une diminution plus importante de la sécrétion de VEGF par les SUDHL4 infectées avec le shRNA 212. Ces résultats, bien que devant être reproduits, sont conformes à ceux obtenus dans l'article 2 sur l'effet inhibiteur du rituximab sur la production de VEGF et pourraient aussi suggérer un lien entre la signalisation induite par la voie BDNF/TrkB et la production HIF1 α dépendante du VEGF dans les cellules de DLBCL.

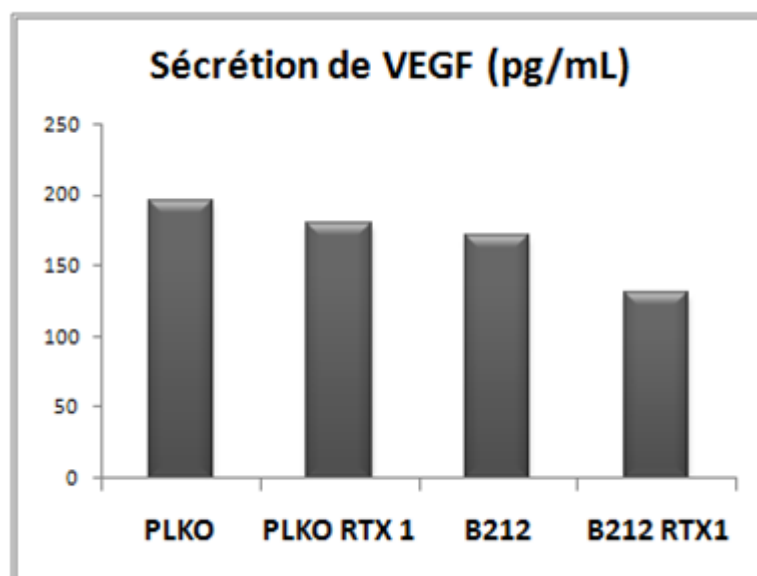


Figure 22 : Etude de la sécrétion de VEGF par les SUDHL4 infectées avec les shRNA B212 de BDNF ou le vecteur vide pLKO et traitées ou non pendant 48h au rituximab (1 μ g/mL).

3.3 Discussion/Conclusions

Les études menées avec le rituximab et le K252a ont montré l'implication des récepteurs Trk dans la résistance à l'apoptose induite par le rituximab. Les travaux présentés ci-dessus, bien que très préliminaires en ce qui concerne les shRNA, révèlent clairement l'implication du BDNF dans ce phénomène de sensibilité à l'apoptose induite par le rituximab dans le cas de la lignée GCB SUDHL4. En effet, l'ajout d'un anticorps bloquant du BDNF permet de potentialiser l'effet du rituximab sur la viabilité cellulaire. De plus, les shRNA du

BDNF corroborent ces résultats puisque l'inhibition bien que partielle de la synthèse de BDNF avec le shRNA 212 induit un fort clivage de la PARP lorsque ces cellules transfectées sont exposées au rituximab. Il est à noter que le traitement au rituximab induit également une diminution de l'expression d'HIF1 α et du récepteur p75^{NTR} chez les cellules transfectées avec le vecteur contrôle, avec un effet plus prononcé pour le shRNA 212. De manière intéressante, ce résultat est en étroite relation avec la sécrétion de VEGF qui diminue après traitement au rituximab, avec un effet plus fort dans le cas des cellules transfectées avec le shRNA 212. Il est également à noter que la sécrétion de VEGF par les cellules transfectées à l'aide du shRNA 212 est plus faible en condition basale que celle du contrôle PLKO vide ce qui suppose l'implication du BDNF dans la régulation de la sécrétion du VEGF.

Ainsi, on pourrait émettre l'hypothèse selon laquelle pour la lignée GCB SUDHL4, l'inhibition de la synthèse de BDNF pourrait déterminer une diminution de la stabilisation d'HIF1 α , lui-même responsable d'une diminution de la synthèse et de la sécrétion de VEGF. Le traitement des cellules par le rituximab en inhibant la voie PI3K/Akt amplifierait ce processus, aboutissant à une diminution encore plus forte de la sécrétion de VEGF comme nous l'avons observée dans cette expérience.

Concernant l'effet inhibiteur observé sur l'expression de p75^{NTR} il nous faudra confirmer s'il s'agit réellement d'une baisse d'expression ou d'un clivage de ce récepteur avant de conclure sur ce résultat.

L'étude menée avec les anticorps bloquants anti-NGF en normoxie révèle que la sécrétion de NGF n'est pas un mécanisme de résistance au rituximab suffisant pour que son blocage induise une augmentation de l'apoptose. En revanche, il semble que les modifications fonctionnelles induites par l'hypoxie permettent une meilleure sensibilisation à l'effet du blocage de la voie NGF/TrkA. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus dans le 2^e article sur l'effet potentialisateur de l'hypoxie sur la réponse des cellules de type GCB et ABC au rituximab et lors de l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent ces phénomènes restent à définir. De plus, les données préliminaires montrent que le NGF pourrait être impliqué dans la sécrétion de VEGF.

L'ensemble de ces travaux complémentaires confirme que les neurotrophines et leurs récepteurs sont impliqués dans la survie des lignées de DLBCL ainsi que dans leur réponse au rituximab.

4. Mise en place de modèles animaux

Les résultats obtenus sur les 33 patients ont révélé la pertinence des études réalisées *in vitro* avec les lignées cellulaires humaines de DLBCL. Par conséquent, ces lignées peuvent être utilisées comme modèle pour la mise en place et l'étude de tumeurs de DLBCL *in vivo*. Afin de tester *in vivo* l'effet de la neutralisation notamment par shRNA des neutrotrophines et/ou des récepteurs Trk et p75^{NTR}, nous avons démarré la mise en place de modèles animaux. Notre équipe présentait déjà une expertise sur la réalisation de xénogreffes de lignées tumorales (glioblastome, cancer colorectal) sur la membrane chorio-allantoïdienne de poulet (CAM). Ce système est une étape intermédiaire entre les cultures *in vitro* et les expériences *in vivo* sur animaux. Aussi, il nous a paru intéressant d'évaluer la pertinence de ce modèle avec des lignées de DLBCL, avant d'envisager la mise en place de xénogreffes tumorales sur des souris immunodéficientes.

4.1 Xénogreffes sur CAM

4.1.1 Objectif

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction bibliographique, le rôle de la néoangiogenèse tumorale dans le cas des DLBCL n'est actuellement pas connu. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence la forte expression du VEGF dans ces lymphomes et le fort niveau de VEGFR2 a été corrélé à un mauvais pronostic dans les tumeurs des patients traités au R-CHOP (Gratzinger et al, 2007 et 2008). Nos résultats (article 2) ont permis de montrer que les lignées GCB et ABC de DLBCL secrètent des quantités assez importantes de VEGF, comme cela a été décrit pour les cellules tumorales des patients, et que cette sécrétion est influencée par le rituximab dans les lignées sensibles à son effet cytotoxique. De plus, nous montrons un lien entre cette sécrétion et la signalisation des récepteurs Trk pour la première fois dans ces lymphomes, ce qui semble se confirmer par nos résultats très préliminaires obtenus lors de l'inhibition de la synthèse de BDNF par shRNA. Le modèle de la CAM est particulièrement intéressant pour des études visant à explorer la néoangiogenèse tumorale et notamment pour tester des substances anti-angiogéniques (Ribatti et al, 2000). Ainsi et dans l'objectif de tester la capacité des lignées DLBCL à s'agréger pour former une tumeur et à évaluer leur capacité à induire une néoangiogenèse, nous les avons greffées sur de la membrane chorio-allantoïdienne de poulet.

4.1.2 Matériel et méthode

Une fois les œufs fécondés reçus, ils sont mis en couveuses à 37°C. Au bout de 3 jours, une partie du blanc est aspirée et l'embryon est déposé dans des cupules de plastiques puis remis en couveuse jusqu'au 10^{ème} jour où les greffes de cellules sont effectuées (figure 23) : un anneau de silicone d'1cm de diamètre est déposé sur la membrane chorio-allantoïdienne au niveau des vaisseaux les plus fins au plus proche de l'embryon. Ceci permet à la circulation sanguine de ne pas perturber la mise en place des tumeurs. Les cellules issues des lignées DLBCL (500 000 ou 1 000 000) sont alors reprises dans 100µL de milieu complet et déposées seules ou sur un bout de compresse/éponge stérile à l'aide d'une pipette. L'embryon est alors remis en couveuse durant 5 jours au bout desquels il est sacrifié pour récupération de la partie de CAM sur laquelle ont proliféré les cellules.

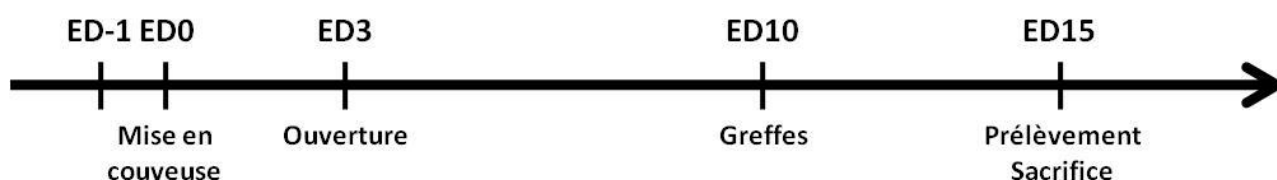


Figure 23 : Schéma représentant les différentes étapes permettant l'obtention de tumeurs lors de greffes de cellules SUDHL4 sur la membrane allantoïdienne de poulet. ED : Embryonic Day.

4.1.3 Résultats

Dans un premier temps, les cellules ont été greffées sur la CAM sans éponge ce qui a formé des tapis cellulaires et ne nous a pas permis d'obtenir des masses tumorales. Nous avons alors décidé de déposer les cellules sur une portion d'éponge d'environ 2mm³ afin de les garder concentrées et de leur fournir un support pour établir une masse tumorale.

Les résultats représentés figure 24 montrent des photos prises au dessus et au dessous de la CAM, à l'intérieur de l'anneau de silicone. Ainsi, on observe dans le cas du contrôle sans cellules de gros vaisseaux et peu de petits vaisseaux. En revanche, en ce qui concerne la greffe avec les SUDHL4 avec 500 000 ou 1 000 000 de cellules, on observe un tapis cellulaire brillant sur le dessus et la photo prise du dessous révèle la présence de micro-vaisseaux semblant pénétrer à l'intérieur de l'éponge où se trouvent probablement des cellules. Ces premiers résultats devront être complétés par des analyses sur la viabilité et le statut prolifératif des cellules ainsi que par une étude plus fine de la microvascularisation de la masse tumorale.

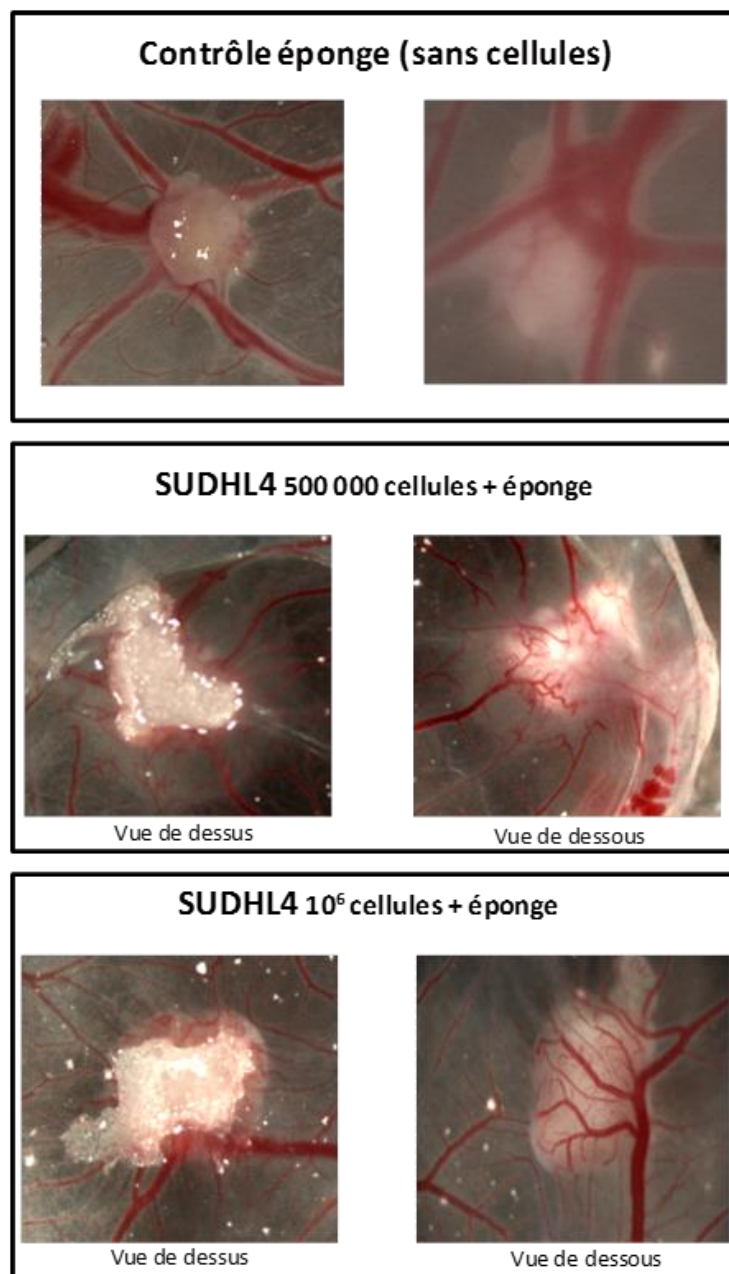


Figure 24 : Photos des vaisseaux entourant les tumeurs obtenues avec les SUDHL4 sur la CAM.

4.2 Xénogreffes sur souris SCID

4.2.1 Objectifs

Les lignées cultivées *in vitro* ne sont pas soumises aux mêmes paramètres environnementaux que dans les conditions *in vivo*. Aussi, nous avons choisi de les injecter à des souris SCID (SCID - Severe Combined Immuno Deficiency -, présentant un déficit en lymphocytes B et T mais avec des cellules NK) pour évaluer leur potentiel tumorigène et envisager ensuite des études sur la fonctionnalité des neurotrophines dans ce processus.

4.3 Méthodologie

4.3.1.1 Obtention des tumeurs

Les xénogreffes consistent à injecter 1×10^7 cellules tumorales de type GCB ou ABC en sous-cutané sur le flanc dorsal de souris SCID anesthésiées (kétamine/xylazine, 80:12 mg/kg) âgées de 4 semaines minimum. Leur suivi régulier permet de détecter toute modification de leur poids et de leur comportement ainsi que l'apparition des tumeurs. Une fois détectées, les tumeurs sont mesurées tous les trois jours au moyen d'un pied à coulisse électronique et leur volume évalué selon la formule longueur x largeur x épaisseur (Figure 26A). Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale lorsque la taille de la tumeur atteint $2,5\text{cm}^3$. Une fois récupérée, la tumeur est pesée puis coupée en deux morceaux : l'un est placé dans le formol en vue d'une inclusion en paraffine ce qui permet de réaliser des coupes histologiques pour les analyses immunohistochimiques, l'autre est placé à -80°C pour l'extraction protéique. Cette étude a reçu l'agrément du Comité Régional d'Ethique de l'Expérimentation Animale du Limousin (protocole N° 2-07-2012).

4.3.1.2 Immunohistochimie

Les tumeurs conservées dans le formol sont amenées au service d'anatomo-pathologie du CHU de Limoges où elles sont incluses dans des blocs de paraffine. Des coupes histologiques d'environ $4\mu\text{m}$ sont faites en vue des analyses en immunohistochimie. Une fois les lames récupérées, nous les avons déparaffinées et nous avons réalisé les marquages comme il est décrit dans l'article 2.

4.3.1.3 Extraction de protéines

Les morceaux de tumeurs conservés à -80°C sont tout d'abord décongelés puis découpés en petits échantillons (30mg) qui sont par la suite déposés dans un tube Eppendorff. 200 μL de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% Nonidet P40, 10% glycerol, 150 mM NaCl) supplémenté avec 1% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases (Sigma) sont ajoutés sur les morceaux de tissus qui sont alors vortexés et incubés dans la glace durant 45 minutes. Le tube est ensuite centrifugé à 14 000 rpm, à 4°C durant 45 minutes puis le surnageant est récupéré dans un nouveau tube. Les protéines sont alors dosées avec le réactif de Bradford dans le but d'effectuer un Western Blot dont le protocole est décrit dans les articles 1 et 2.

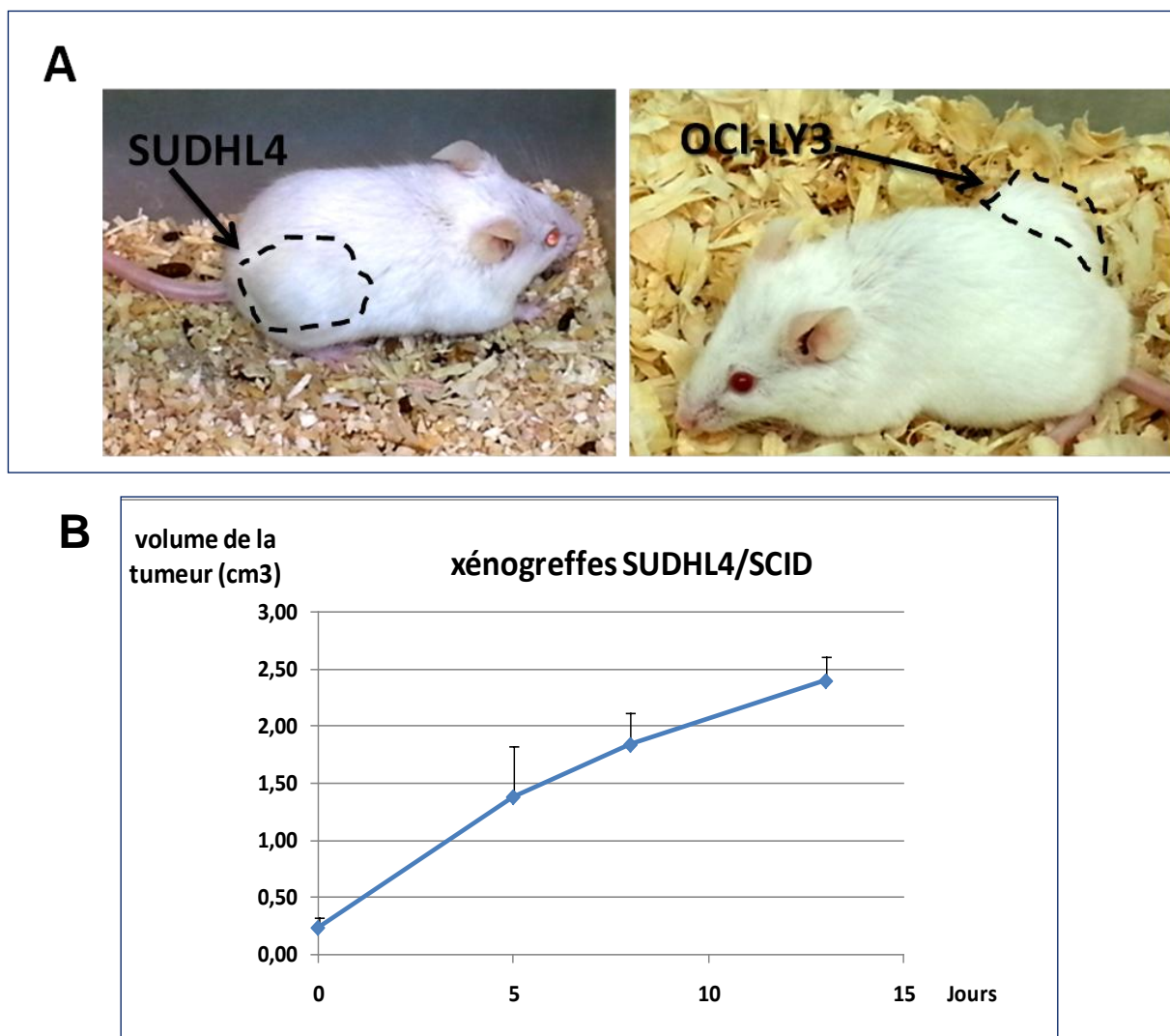


Figure 25 : (A) Photo des souris et localisation des tumeurs (traits en pointillés noirs) au bout de 30 à 40 jours après injection des SUDHL4 ou des OCI-LY3. (B) Courbe de croissance tumorale établie sur une durée de 15 jours pour des souris SCID 40j après avoir été greffées avec des cellules SUDHL4. Les résultats correspondent à la moyenne \pm ET de 3 souris.

4.3.2 Résultats

Nous avons obtenu au bout de 40 jours environ des tumeurs avec les cellules de la lignée SUDHL4 avec une croissance relativement rapide (Figure 25B) nous conduisant à sacrifier les souris après 15j. Aucune perte de poids n'a été observée par rapport au poids de départ. La lignée ABC OCI-LY3 nous a aussi permis d'obtenir des tumeurs chez des souris SCID (Figure 25A), bien que beaucoup plus difficilement par rapport à la lignée SUDHL4 et notamment plus tardivement (environ 2 mois). Aucune tumeur n'a pu être établie avec la lignée OCI-LY10. Nous avons confirmé l'origine humaine de ces tumeurs par le marquage du CD20 humain illustré sur la figure 26. De plus, nous avons recherché sur ces tumeurs l'expression d'un marqueur de prolifération, le Ki67, ainsi que la présence des neurotrophines

NGF, BDNF et leurs récepteurs. Les résultats présentés sur la figure 27 montrent la présence d'un fort marquage nucléaire du Ki67 révélant la capacité à proliférer des SUDHL4 au sein de la tumeur. On observe également une faible expression de NGF et de son récepteur de haute affinité TrkA. En revanche, BDNF est fortement exprimé et le récepteur p75^{NTR} est exprimé de manière inégale par les cellules.

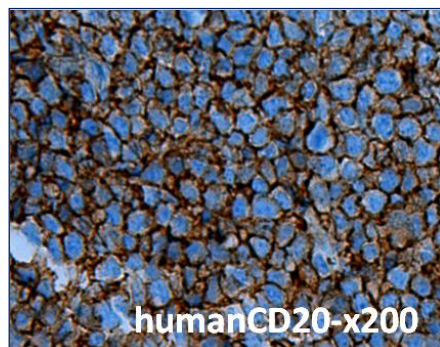


Figure 26: Marquage du CD20 humain en IHC sur une tumeur de DLBCL obtenue suite à la greffe de cellules SUDHL4 sur une souris SCID.

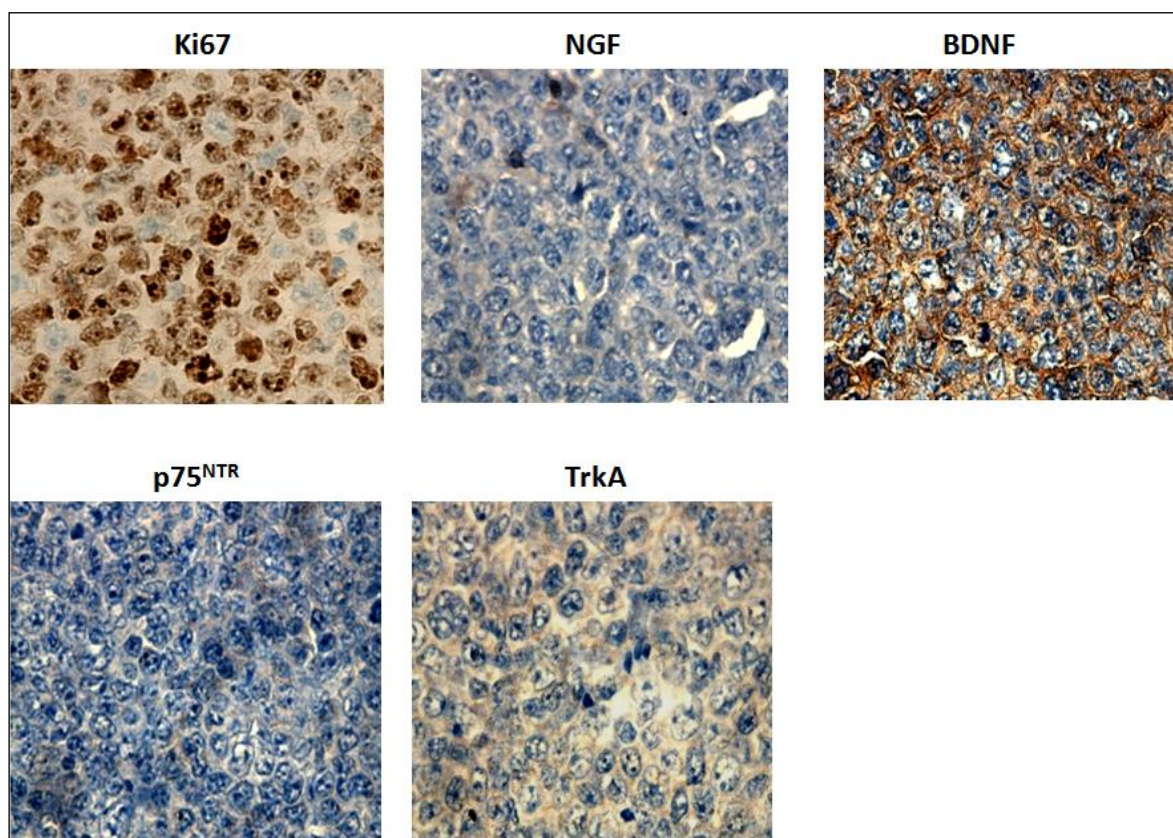


Figure 27 : Analyse en immunohistochimie de l'expression du Ki67, NGF, BDNF, TrkA et p75^{NTR} d'une tumeur issue d'une xénogreffe réalisée chez une souris SCID avec des SUDHL4 (x400).

4.4 Conclusions

Les résultats préliminaires obtenus avec la CAM suggèrent que les SUDHL4 sont capables de détourner des vaisseaux, ce qui pourrait être en lien avec leur sécrétion de VEGF. Néanmoins, ces résultats doivent être confirmés par des coupes permettant d'identifier les cellules tumorales et les potentielles cellules endothéliales des vaisseaux.

Les tumeurs développées par les souris SCID avec les SUDHL4 sont conformes à celles obtenues par diverses équipes ayant montré la pertinence de ce modèle (Schmidt-Wolf, et al., 1991 ; Yan, et al., 2009 ; Wang, et al., 2012). Les marquages effectués avec un anti-CD20 humain ont montré que ces tumeurs sont constituées par les SUDHL4 injectées et dont la capacité à proliférer est démontrée par la forte positivité du marquage du Ki67. De plus, les tumeurs « SUDHL4 » expriment dans ce nouvel environnement tumoral les neurotrophines et leurs récepteurs tout comme lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*.

La validation de ce modèle murin de DLBCL nous a donc permis par la suite de démarrer un protocole visant à évaluer les effets de l'inhibition des récepteurs Trk par le K252a.

5. Etude *in vivo* de l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk

5.1 Objectifs

Les études effectuées *in vitro* montrent l'importance de l'activation des récepteurs Trk pour la survie de la lignée SUDHL4 avec un effet cytotoxique du K252a atteignant celui du rituximab. Nous avons par conséquent envisagé dans un deuxième temps de tester *in vivo* cet inhibiteur pharmacologique des Trk. Cette étude fait suite à la mise au point des xénogreffes tumorales sur des souris SCID. Ainsi nous avons recherché l'impact d'injections de K252a sur la croissance tumorale lors de xénogreffes de cellules SUDHL4. De plus, nous avons analysé sur ces tumeurs l'expression des neurotrophines, de leurs récepteurs par western blot et par immunohistochimie. Nous avons de même évalué l'apoptose cellulaire par analyse du clivage de la PARP (western blot).

5.2 Protocole

Une fois la tumeur détectée (environ 7 semaines maximum après l'injection des SUDHL4), une injection intra-péritonéale de K252a dissout en solution physiologique (500 µg/kg) est réalisée tous les 3 jours pendant 2 semaines. Nous avons suivi le protocole décrit à propos de xénogreffes de lignée de choriocarcinome humain chez des souris athymiques *nude* où le traitement des souris avec cet inhibiteur a permis d'obtenir des régressions tumorales (Kawamura, et al., 2010). Des souris contrôles sont en parallèle traitées avec le solvant. Une fois que les tumeurs atteignent entre 2,5 et 3 cm³, les animaux sont sacrifiés et les tumeurs prélevées. Comme pour le protocole précédent un suivi régulier des animaux est effectué (poids et comportement).

5.3 Résultats

5.3.1 Croissance tumorale

La mesure régulière des tumeurs a permis l'élaboration de courbes de croissance tumorale révélant un ralentissement de la croissance des tumeurs des souris ayant été injectées avec le K252a (Figure 28). En effet, les tumeurs des souris traitées ont une taille inférieure à celle des souris témoins à partir du 6^e jour post traitement et leur croissance semble ralentie avec un écart atteignant 1,2cm³ en moyenne au 17^eme jour. Ces résultats ont été obtenus avec 3 souris traitées au K252a et 2 souris contrôles.

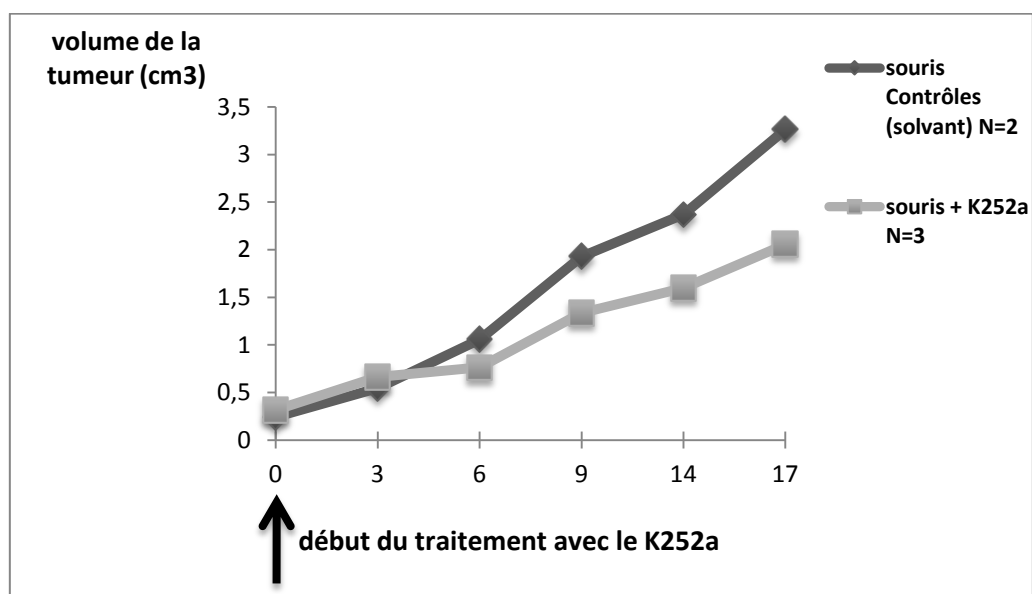


Figure 28 : Courbe de croissance tumorale sur une durée de 17 jours de souris injectées avec la lignée SUDHL4 et traitées avec le solvant ou avec le K252a.

5.3.2 Analyse de l'expression des neurotrophines et leurs récepteurs ainsi que des acteurs de la survie/apoptose

Des western blots ont été effectués à partir des tumeurs issues de souris contrôle et traitée au K252a. Les résultats, bien que très préliminaires, semblent montrer que l'injection *in vivo* du K252a induit une diminution de l'expression de la neurotrophine NGF, d'Akt total ainsi que de la forme phosphorylée du récepteur TrkB sur la tyrosine 817 (figure 29). De plus, et de façon intéressante, le clivage de la PARP est plus important dans le cas de la tumeur issue de la souris traitée au K252a. Ces derniers résultats pourraient suggérer un effet direct ou indirect de cet inhibiteur sur la croissance tumorale des SUDHL4 implantées dans cet hôte murin.

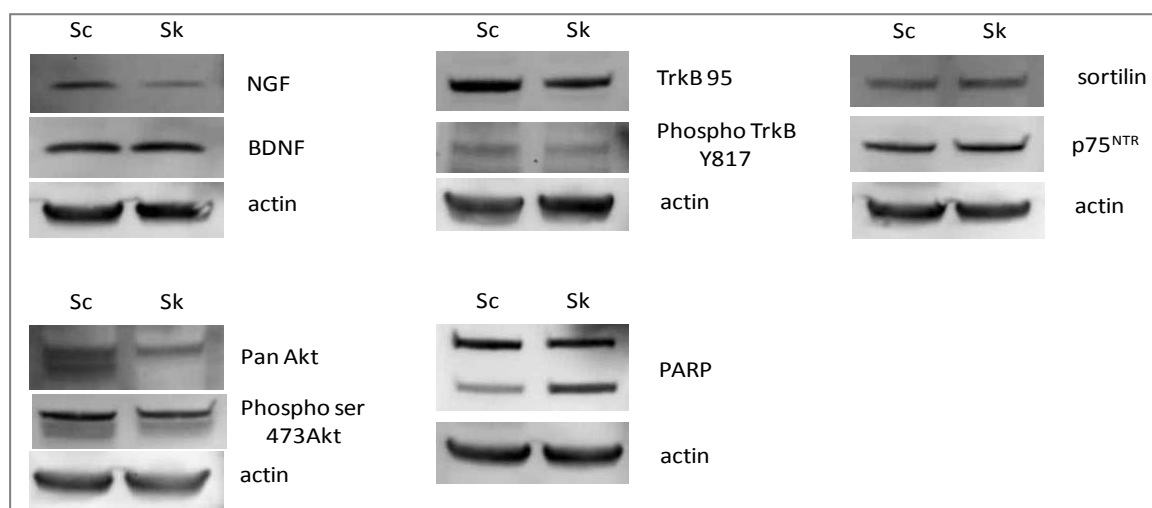


Figure 29 : Analyse de l'effet du traitement par le K252a chez des souris greffées avec des cellules SUDHL4. Western blot comparant l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs, les formes totales (pan) et phosphorylées de l'Akt (Ser 473) et le clivage de la PARP par des tumeurs prélevées sur une souris traitée (Sk) et contrôle (Sc)

5.4 Conclusions

Bien que le nombre de souris ayant fait l'objet de cette étude soit faible, les résultats obtenus avec l'injection de K252a sont conformes à ceux attendus quant à son effet sur les récepteurs Trk. En effet, la phosphorylation du récepteur TrkB semble plus faible dans le cas de la tumeur de la souris traitée au K252a et la voie PI3K/Akt semble affectée par le traitement. De plus, son effet pro-apoptotique sur les SUDHL4 est retrouvé comme le témoigne le clivage de la PARP, ce qui est aussi conforme aux résultats que l'on avait obtenus à partir des expériences *in vitro* lors du traitement des cellules SUDHL4 (et des lignées ABC) avec le même inhibiteur des Trk (article 2).

DISCUSSION GENERALE

♣ *Les neurotrophines sont elles impliquées dans la survie des lignées issues de DLBCL?*

La première partie de notre travail a permis de montrer l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs par les lignées GCB (SUDHL4/6) et ABC (OCI-LY3/10) ainsi que par 33 biopsies de patients. La fonctionnalité des récepteurs a été démontrée par l'utilisation du K252a en concordance avec les travaux menés par Sniderhan sur des lignées issues de DLBCL (Sniderhan, et al., 2009). Concernant la modulation des neurotrophines, nous avons mis en évidence l'implication de l'axe BDNF/TrkB/p75^{NTR} dans la survie des lignées GCB que ce soit par l'utilisation d'un anticorps bloquant le BDNF, de pro-BDNF exogène et d'un anticorps bloquant la liaison des ligands à p75^{NTR}. L'apoptose des lignées de type ABC semble seulement être observée avec l'anti-p75^{NTR}, suggérant un plus grand rôle de ce récepteur dans leur survie. Cette relative résistance des cellules de type ABC aux différentes stratégies visant à inhiber la signalisation de survie des NTs est sans doute en lien avec la forte expression constitutive de la voie NF- κ B contrairement aux cellules de lignée GCB. Un grand nombre d'études montrent que le récepteur p75^{NTR} possède de multiples facettes, ses signalisations pouvant entraîner la mort ou la survie. Ses réponses cellulaires sont également conditionnées par ses co-récepteurs. De plus, son clivage par des γ et α sécrétases lui permet d'interagir avec des partenaires intracellulaires variés à l'origine de l'activation de diverses voies de signalisation (LeMoan, et al., 2011). C'est pourquoi nous nous sommes intéressées à la nature de ses co-récepteurs en conditions basales de culture. Nous avons ainsi détecté son interaction avec les récepteurs TrkA et TrkB tronqués mais pas ou très faiblement avec la sortiline (articles 1 et 2), qui par contre est fortement exprimée en intracytoplasmique. Elle semble cependant être présente à l'état basal en faible quantité à la membrane et dimérisée avec le récepteur p75^{NTR} chez les lignées GCB puisque l'ajout de pro-BDNF induit une diminution de la viabilité des cellules SUDHL6 et l'apoptose des SUDHL4.

♣ *Les neurotrophines influencent-elles la réponse au rituximab des lignées?*

La résistance des lignées ABC au rituximab par rapport aux lignées GCB a pu être vérifiée. De manière intéressante, l'inhibition de l'activation des récepteurs Trk par le K252a dans ces lignées (article 2) permet de potentialiser l'apoptose induite par le rituximab comme nous l'avions précédemment montré pour les lignées GCB (article 1). Ces résultats mettent en évidence l'implication des signalisations de survie des NTs dans le phénomène de

sensibilisation et probablement de résistance thérapeutique. Cette hypothèse est soutenue par les résultats obtenus suite à la neutralisation du BDNF endogène par des anticorps bloquants, puisqu'ils permettent d'amplifier de façon significative l'effet cytotoxique du rituximab notamment sur la viabilité des cellules SUDHL4 (résultats complémentaires). De façon intéressante ces données semblent confirmées par celles, bien que préliminaires, obtenues avec les shRNA de BDNF puisque l'apoptose induite par le rituximab est plus importante chez les lignées après une inhibition même partielle de la synthèse du BDNF, par rapport aux lignées contrôles. De même, la réponse au rituximab des cellules tumorales semble associée à des équilibres différents entre les signalisations de survie et de mort des récepteurs des NTs. Ainsi, alors que le traitement par le rituximab induit une augmentation de la sécrétion de NGF dans les deux lignées SUDHL4 et SUDHL6 (article 1), l'expression de TrkA favorable à une boucle de survie NGF/TrkA est induite seulement chez les SUDHL4 plus résistantes au rituximab par rapport aux SUDHL6. La sensibilité des cellules tumorales à répondre au rituximab serait donc influencée par les voies de signalisations qu'elles mobilisent préférentiellement suite à cette exposition, sans doute en lien avec la distribution relative des différents récepteurs Trk/p75^{NTR}/sortiline qui varie comme nous l'avons vu en fonction des lignées. La mise en place d'une régulation négative des voies de survie NT/Trk favoriserait alors les voies de mort (p75^{NTR}/sortiline) et donc la réponse apoptotique des cellules en réponse au rituximab. Cet effet est ciblé par l'utilisation du K252a qui induit une inhibition des signalisations de survie des récepteurs Trk, comme la PI3K/Akt, voie commune aux mécanismes d'action du rituximab (Holgado-Madruga et al, 1997 ; Suzuki et al, 2007). Ainsi, la potentialisation d'un traitement associant l'inhibition des Trk au rituximab est évidente pour les lignées sensibles au rituximab comme, dans notre travail, les lignées de type GCB. Il est particulièrement intéressant aussi d'avoir une autre alternative pour des lignées plus résistantes à l'immunothérapie comme les lignées ABC étudiées dans ce travail (article 2). Ainsi ces lignées, comme les patients dont elles dérivent, sont caractérisées par l'activation constitutive d'une autre voie importante de survie, la voie NFκB, ce qui leur permet de résister davantage aux traitements thérapeutiques (Davis et al, 2001). Or l'inhibition des récepteurs Trk par le K252a permet de cibler la voie NFκB (Sniderhan et al, 2009) et de l'inhiber, ce qui aboutit comme on l'a clairement démontré (article 2) non seulement à une forte réponse apoptotique des cellules de type ABC mais aussi à une re-sensibilisation au rituximab lorsque le K252a lui est associé.

L'ensemble de nos résultats démontre l'intérêt à poursuivre les études ciblant l'inhibition des voies de survie régulées par les Trk en association avec les traitements conventionnels et notamment l'immunothérapie.

♣ ***L'expression des neurotrophines peut-elle constituer un outil biologique supplémentaire de diagnostic et/ou de pronostic des patients ?***

Les études menées sur les biopsies de patients (article 2) montrent que le récepteur TrkB est plus fortement exprimé chez les patients positifs pour l'IRF4, marqueur du sous-type ABC. De manière intéressante, l'expression du récepteur p75^{NTR} est quant à elle corrélée positivement à l'IPI, lui suggérant un rôle pro-survie comme il l'a été démontré *in vitro*. Ces données soulignent à nouveau, comme l'ont montré les études sur les lignées humaines, un rôle potentiel de la voie BDNF/TrkB dans l'agressivité de certaines tumeurs de DLBCL, et notamment le sous-type ABC. De plus, ces résultats en lien avec des paramètres anatomo-cliniques sont très prometteurs et suggèrent fortement que l'expression des récepteurs aux neurotrophines peut constituer, une fois confirmée sur une plus large cohorte de patients, des outils de diagnostic et notamment pour les patients atteints des formes les plus agressives.

Concernant la valeur pronostique de ces neuropeptides, des résultats préliminaires obtenus sur la cohorte des 33 patients (non montrés dans l'article 2) tendent à signifier qu'une forte expression de TrkB pourrait être associée à un plus mauvais pronostic sur la survie à 5 ans des patients traités au R-CHOP. Si cela était confirmé sur une population plus importante de patients, cela soulignerait de façon claire l'intérêt à associer aux traitements conventionnels des stratégies ciblant les récepteurs Trk, afin de contrer certaines résistances thérapeutiques comme nous l'avons envisagé au démarrage de toute cette étude.

♣ ***Les neurotrophines pourraient-elles être impliquées dans l'angiogenèse tumorale du DLBCL?***

Comme nous l'avons dit dans notre revue bibliographique, des études ont montré une corrélation positive entre les expressions d'HIF1 α et du VEGF dans le DLBCL et suggèrent, bien que paradoxalement, qu'HIF1 α est de bon pronostic pour les patients traités au rituximab. Nos travaux préliminaires menés sur la CAM montrent que les SUDHL4 semblent capables de détourner les vaisseaux. De plus, un grand nombre d'études montrent que les neurotrophines sont impliquées dans le processus angiogénique (Blais, et al., 2013), mettant en jeu la sécrétion de VEGF au cours de diverses pathologies telles que la rétinopathie (Elshaer, et al., 2013 ; Liu, et al., 2010), ainsi que dans divers cancers non neuronaux tels que

le cancer du sein (Romon, et al., 2010), le carcinome de la cavité buccale (Sasahira, et al., 2013), le carcinome hépatique (Lam, et al., 2011) ou encore le myélome multiple (Sun, et al., 2010). Par ailleurs, NGF et VEGF activent des voies communes de signalisation au sein des cellules endothéliales (figure 30), ce qui suppose que les NTs pourraient réguler directement, par des actions paracrines, le processus de néo-angiogenèse tumorale.

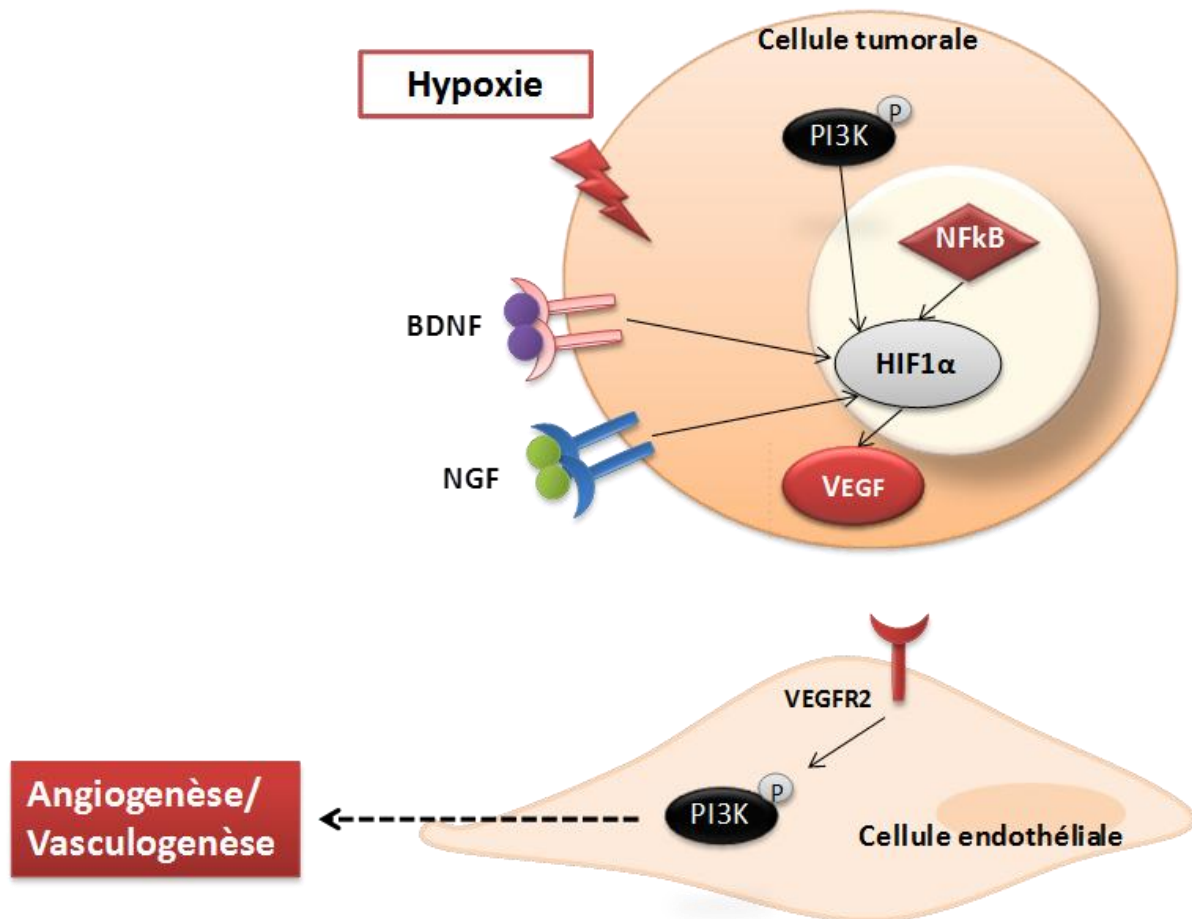


Figure 30: Schéma des mécanismes à l'origine de la synthèse de VEGF dans le cadre de la néo-angiogenèse. Schéma adapté d'après Nakamura et al., 2006 ; Saygili et al., 2011 et Nakamura et al., 2011.

Outre leurs voies de signalisation communes, le NGF peut induire l'expression du VEGF (Kim, et al., 2013) via l'induction d'HIF1 α dans des cellules neuronales (Saygili, et al., 2011 ; Nakamura, et al., 2011). Le BDNF permet quant à lui d'induire la migration de cellules endothéliales humaines micro-vasculaires via son interaction avec TrkB (Matsuda, et al., 2012 ; Sun, et al., 2009). De plus, tout comme le NGF, il induit la sécrétion de VEGF par les cellules de neuroblastome via l'induction d'HIF1 α (Nakamura, et al., 2006). Enfin, son inhibition par la technique de shRNA permet d'inhiber la croissance et l'angiogenèse du myélome multiple *in vivo* et ce, par une régulation négative de la sécrétion de VEGF par les cellules stromales (Zhang, et al., 2010). Bien que la modulation des neurotrophines avec

l'anti-BDNF, le pro-BDNF exogène ou encore l'anti-p75 n'aient pas d'impact significatif sur la sécrétion de VEGF-A par nos lignées DLBCL, nous avons montré que l'anti-NGF semblait diminuer cette sécrétion chez la lignée GCB SUDHL4. De plus, les résultats préliminaires obtenus avec les shRNA chez cette lignée suggèrent l'implication du BDNF dans ce phénomène. De manière intéressante, nous avons montré que les récepteurs Trk sont impliqués dans la sécrétion du VEGF-A puisque le K252a permet de la diminuer très fortement tant chez les lignées GCB que chez les lignées ABC. Les récepteurs aux neurotrophines sont donc impliqués dans la régulation de la sécrétion du VEGF-A par les lignées DLBCL. Il reste cependant à déterminer si cette sécrétion permet la mise en place de boucles autocrines/paracrines de survie via l'activation des récepteurs VEGFR2 exprimés par les cellules B tumorales du DLBCL (Giatromanolaki, et al., 2008) et/ou est à but angiogénique par recrutement de cellules endothéliales.

Le traitement au rituximab ne permet de diminuer la sécrétion de VEGF que chez les lignées du sous-type GCB sensibles à son action, suggérant un lien dans ces cellules entre les deux processus. L'inhibition par le rituximab de l'activation constitutive de la voie PI3K/Akt caractéristique de ce sous-type de DLBCL (Pfeifer et al, 2013) et menant à la stabilisation entre autre d'HIF1 α , pourrait expliquer ces résultats. De manière intéressante, les résultats menés avec les shRNA de BDNF sur la lignée SUDHL4 ont montré qu'en présence de rituximab, la diminution de la sécrétion de VEGF due à l'inhibition du BDNF était plus marquée et s'accompagnait d'une diminution de l'expression notamment d'HIF1 α , supposant aussi un lien entre ces 3 facteurs. La même observation a été faite lors de la neutralisation du NGF endogène pour la lignée GCB SUDHL4, où l'association du rituximab aux anti-NGF a permis de diminuer de façon plus forte la sécrétion de VEGF, effet non retrouvé chez la lignée OCI-LY3. Ces données sont conformes aux résultats attendus, les voies de survie activées par les NTs via les Trk (PI3K/Akt, MAPK...) étant aussi celles inhibées par le rituximab. Les travaux menés en hypoxie ont montré une efficacité plus forte du rituximab chez les lignées. Cette meilleure efficacité cytotoxique et même apoptotique en conditions hypoxiques a aussi été observée lors de l'inhibition pharmacologique des Trk avec le K252a ou lors de traitements combinés associant le rituximab et le K252a ou des anti-NGF (SUDHL4). Les lignées GCB et ABC montrent donc une différence de comportement vis-à-vis du rituximab, tant sur la réponse apoptotique via la modulation des neurotrophines, que sur la sécrétion de VEGF, et l'ensemble de nos résultats est encore une fois en faveur de l'agressivité du sous-type ABC. Les travaux menés par l'équipe d'Evans montrent que la forte expression d'HIF1 α par les cellules tumorales des patients traités au R-CHOP est associée à une meilleure survie

globale des malades, ce qui n'est pas le cas des patients traités au CHOP seulement. Parmi les mécanismes évoqués, cette meilleure efficacité du rituximab pourrait être due au fait qu'HIF1 α régule l'expression membranaire du CD20 (Evens, et al., 2008 ; Evens, et al., 2010). Nos résultats sont concordants avec ces données *in vivo* et supposent, quant à eux, que la modulation de l'expression d'HIF1 α pourrait aussi refléter la présence de zones hypoxiques tumorales qui, dans le cas de ces cancers, permettrait une meilleure efficacité thérapeutique.

PERSPECTIVES

Etude de la fonctionnalité et de l'implication des neurotrophines dans la survie des cellules B tumorales de DLBCL

Le rôle des neurotrophines dans la survie cellulaire doit être approfondi et plus particulièrement dans le cas des lignées ABC. Les études viseront notamment à préciser les sécrétions des neurotrophines, leur localisation par la méthode d'hybridation *in situ* ainsi que l'expression de leurs protéines de maturation, les MMPs, par la méthode de zymographie. De même, l'étude des partenaires du récepteur p75^{NTR} doit être poursuivie afin de déterminer son rôle dans la survie cellulaire en fonction des conditions de culture et plus précisément lors du traitement au rituximab. Le rôle de la sortiline devra également être approfondi, ainsi que l'identification de ses co-récepteurs dans les lignées ABC comparativement aux lignées GCB. Dans ce contexte, les travaux effectués avec les shRNA seront décisifs et devront être étendus aux récepteurs comme TrkB, p75^{NTR} et la sortiline. Ils permettront de valider nos travaux en évaluant l'impact de l'absence d'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs sur la survie des lignées GCB et ABC. Une fois établies, les lignées shRNA pourraient également être greffées à des souris SCID afin d'étudier l'implication des neurotrophines dans le processus de mise en place de la tumeur et/ou de la réponse au traitement.

En ce qui concerne les études sur les patients, les analyses doivent se poursuivre sur une cohorte plus importante d'individus afin de déterminer notamment si une corrélation peut-être faite entre l'expression des neurotrophines et la réponse au traitement.

Etude du rôle des neurotrophines dans l'angiogenèse dans le cas du DLBCL

Outre leur rôle dans la survie cellulaire, l'étude menée *in vitro* suggère l'implication des neurotrophines dans la régulation de la sécrétion du VEGF par un mécanisme qui reste à déterminer. Bien qu'il ait été décrit que l'interaction des neurotrophines avec leurs récepteurs de haute affinité Trk peut induire cette sécrétion par un mécanisme dépendant de la stabilisation d'HIF1 α , nous ne l'avons pas montré de manière directe. De même, le clivage du récepteur p75^{NTR} peut induire la stabilisation d'HIF1 α ce qui pourrait être à l'origine de la

sécrétion de VEGF. Les perspectives de cette étude sont donc nombreuses dans la mesure où les mécanismes mettant en lien tous ces facteurs doivent être plus clairement établis afin de définir le rôle potentiel des neurotrophines dans la néoangiogenèse tumorale. Ainsi, le clivage du récepteur p75^{NTR} devrait être étudié en concomitance avec la stabilisation d'HIF1 α et de la sécrétion de VEGF et ce, en fonction de diverses conditions de culture (basale, traitement au rituximab, inhibition des Trk, hypoxie). Là encore, l'établissement de xénogreffes avec des lignées shRNA ciblant les récepteurs ou les NTs permettraient de préciser les liens entre la signalisation des NTs, le VEGF et la néo-vascularisation des tumeurs. Dans ce contexte, les greffes sur CAM constituent un outil intéressant pour aborder ce rôle des NTs dans la formation de nouveaux vaisseaux. Globalement, ces résultats pourraient aussi apporter des éléments de réponse contribuant à une meilleure connaissance du rôle de l'angiogenèse dans ces tumeurs.

CONCLUSION

L'objectif de cette thèse était de préciser la fonctionnalité des neurotrophines (NGF, BDNF) dans la survie des cellules tumorales de DLBCL et leur résistance thérapeutique, de façon comparative entre le sous-type GCB et ABC.

L'implication des neurotrophines dans la survie et la sensibilité thérapeutique des cellules de DLBCL a été démontrée en utilisant des lignées humaines correspondant aux 2 sous-types de ces lymphomes par plusieurs approches pharmacologiques ou encore plus récemment par shRNA. Les lignées ABC, résistantes au rituximab, sont également moins sensibles à la modulation des neurotrophines, ce qui est probablement dû à leur activation constitutive de la voie de survie NFκB. Cependant et de manière intéressante, l'inhibition des récepteurs Trk par le K252a permet d'induire leur apoptose. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois dans ces lymphomes l'implication des neurotrophines dans la régulation de la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales. Nous avons également montré que le rituximab induit une diminution de la sécrétion de VEGF chez les lignées GCB alors qu'il reste sans effet sur les lignées ABC. Enfin, nous montrons l'intérêt potentiel à associer une inhibition des Trk avec l'immunothérapie.

Les travaux menés sur les biopsies de patients nous ont permis de mettre en évidence pour la première fois une corrélation positive entre la forte expression de NGF, du récepteur TrkB et de p75^{NTR} et des marqueurs anatomo-cliniques en lien avec l'agressivité des tumeurs. Ainsi, l'ensemble de nos travaux suggère fortement que les récepteurs Trk pourraient être une cible thérapeutique de choix pour traiter les patients résistants au rituximab ou dont la pathologie est caractérisée par une forte expression de VEGF.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Advani, Buggy, Sharman & Smith, 2013. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies.. *J Clin Oncol.* , pp. 31(1):88-94.

Advani, et al., 2009. Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma.. *J Clin Oncol.*, pp. 27(26):4371-7.

Akil et al., 2011. Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PlosOne.* 6(9):e25097

Alencar, et al., 2011. MicroRNAs are independent predictors of outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP.. *Clin Cancer Res.*, pp. 17(12):4125-35.

Alizadeh, et al., 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, pp. 403(6769):503-11.

Alizadeh, et al., 2011. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment.. *Blood*, pp. 118(5):1350-8.

Allen & Dawbarn, 2006. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors.. *Clin Sci (Lond)*., pp. 110(2):175-91.

Allman, et al., 1996. BCL-6 expression during B-cell activation.. *Blood*, pp. 87(12):5257-68.

Aloe, 2001. Neurotrophic factors and brain damage in hypoxic-ischemic encephalopathy: a role of nerve growth factor?. *Ann Ist Super Sanita*, pp. 37(4):573-80.

Aloe, 2011. Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor. *Arch Ital Biol.*, pp. 149(2):175-81.

Aloe, et al., 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*, pp. 91(22):10440-4.

Aloe, Manni, Sebastiani & Tuveri, 1999. Nerve growth factor in the synovia of patients with rheumatoid arthritis: correlation with TNF-alpha and IL-1 beta and possible functional significance. *Clin Exp Rheumatol.*, pp. 17(5):632-3.

Angelin-Duclos et al., 2000. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol.* 2000,165(10):5462-71.

Ansell, et al., 2009. Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma.. *Clin Cancer Res.*, pp. 15(20):6446-53.

Arévalo & Wu, 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises!. *Cell Mol Life Sci.*, pp. 63(13):1523-37.

Aukema, et al., 2011. Double-hit B-cell lymphomas.. *Blood*, pp. 117(8):2319-31.

Bahler & Levy, 1992. Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 89(15):6770-4.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bandtlow & Dechant, 2004. From cell death to neuronal regeneration, effects of the p75 neurotrophin receptor depend on interactions with partner subunits.. *Sci STKE*, p. 2004(235):pe24.
- Barde, Edgar & Thoenen, 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.. *EMBO J*, pp. 1(5):549-53.
- Barker & Shooter, 1994. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells.. *Neuron*, pp. 13(1):203-15.
- Barnes, Jacobsen, Feng & Freedman, 2013. Everolimus in combination with rituximab induces complete responses in heavily pretreated diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*, pp. 98(4):615-9.
- Barth et al., 2012. Ofatumumab demonstrates activity against rituximab-sensitive and -resistant cell lines, lymphoma xenografts and primary tumour cells from patients with B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 156(4):490-8
- Baxter, et al., 1997. Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2.. *J Neurosci* , pp. 17(8):2683-90.
- Bayas, et al., 2003. Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells.. *Neurosci Lett* , pp. 335(3):155-8.
- Beers, et al., 2010. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies.. *Semin Hematol*., pp. 47(2):107-14.
- Bellanger, et al., 2011. Endogenous Neurotrophins and Trk Signaling in Diffuse Large B Cell Lymphoma Cell Lines Are Involved in Sensitivity to Rituximab-Induced Apoptosis. *PLoS One*, p. 6(11):e27213.
- Benito-Gutierrez et al., 2006. Origin and evolution of the Trk family of neurotrophic receptors. *Mol Cell Neurosci*. 31(2):179-92
- Besser & 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* , pp. 162(11):6303-6.
- Beum, Lindorfer & Taylor, 2008. Within peripheral blood mononuclear cells, antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-opsonized Daudi cells is promoted by NK cells and inhibited by monocytes due to shaving.. *J Immunol*., pp. 181(4):2916-24.
- Bhakar, et al., 2003. Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad.. *J Neurosci*., pp. 23(36):11373-81.
- Bibel, Hoppe & Barde, 1999. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR.. *EMBO J* , pp. 18(3):616-22.
- Bilderback, Grigsby & Dobrowsky, 1997. Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae.. *J Biol Chem* , pp. 272(16):10922-7.
- Blais, Lévesque, Bellenfant & Berthod, 2013. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and glial-derived neurotrophic factor enhance angiogenesis in a tissue-engineered in vitro model.. *Tissue Eng Part A*., pp. 19(15-16):1655-64.

- Bonavida, 2007. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immuno-resistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions.. *Oncogene*, pp. 26(25):3629-36.
- Bonnet, et al., 2007. CHOP alone compared with CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma in elderly patients: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte.. *J Clin Oncol.*, pp. 25(7):787-92.
- Boross & Leusen, 2012. Mechanisms of action of CD20 antibodies.. *Am J Cancer Res.*, pp. 2(6):676-90.
- Bosly, et al., 2008. Achievement of optimal average relative dose intensity and correlation with survival in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with CHOP.. *Ann Hematol.*, pp. 87(4):277-83.
- Braun, 2000. Neurotrophins: a new family of cytokines. *Mod Asp Immunobiol.*
- Brodeur, et al., 2009. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas.. *Clin Cancer Res.* , pp. 15(10):3244-50.
- Brodie & Gelfand, 1992. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2.. *J Immunol.*, pp. 148(11):3492-7.
- Brodie & Gelfand, 1994. Regulation of immunoglobulin production by nerve growth factor: comparison with anti-CD40.. *J Neuroimmunol.* , pp. 52(1):87-96.
- Bronfman et al., 2003. Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome. *J Neurosci.* 15;23(8):3209-20.
- Brunet et al., 2001. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol.* 21(3):952-65
- Byrd, Blum, Burger & Coutre, 2011. Activity and tolerability of the Bruton's tyrosine kinase (Btk) inhibitor PCI-32765 in patients with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL): Interim results of a phase Ib/II study.. *Journal of Clinical Oncology*, p. 2011: 6508.
- Calado, et al., 2010. Constitutive canonical NF- κ B activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma.. *Cancer Cell*, pp. 18(6):580-9.
- Calame et al., 2003. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol.*;21:205-30.
- Caldwell, et al., 2001. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions.. *J Immunol.*, pp. 167(11):6140-9.
- Campbell, 2013. The Role of Radiation Therapy in the Treatment of Stage I-II Diffuse Large B-Cell Lymphoma.. *Curr Hematol Malig Rep.* , pp. 8(3):236-42.
- Campo, et al., 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications.. *Blood*, pp. 117(19):5019-32.
- Cang, Mukhi, Wang & Liu, 2012. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy.. *J Hematol Oncol.*, p. 5:64.

- Cantley & Neel, 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 96(8):4240-5.
- Carbone, et al., 1971. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification.. *Cancer Res.*, pp. 31(11):1860-1.
- Cardesa-Salzman, Colomo, Gutierrez & Chan, 2011. High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy.. *Haematologica*, pp. 96(7):996-1001.
- Cartron, et al., 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene.. *Blood*, pp. 99(3):754-8.
- Casaccia-Bonnel, Carter, Dobrowsky & Chao, 1996. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75.. *Nature*, pp. 383(6602):716-9.
- Chao, 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways.. *Nat Rev Neurosci.*, pp. 4(4):299-309.
- Chao & Bothwell, 2002. Neurotrophins: to cleave or not to cleave.. *Neuron*, pp. 33(1):9-12.
- Chao, et al., 1986. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor.. *Science*, pp. 232(4749):518-21.
- Chao & Hempstead, 1995. p75 and Trk: a two-receptor system.. *Trends Neurosci.*, pp. 18(7):321-6.
- Chen, et al., 2008. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma.. *Blood*, pp. 111(4):2230-7.
- Chen, et al., 2000. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells.. *Blood*, pp. 96(9):3181-7.
- Choi, Weisenburger, Greiner & Piris, 2009. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy.. *Clin Cancer Res.*, pp. 15(17):5494-502.
- Ciriaco, et al., 1996. Localization of Trk neurotrophin receptor-like proteins in avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius).. *J Neuroimmunol.*, pp. 69(1-2):73-83.
- Clynes, et al., 1998. Recent developments in drug resistance and apoptosis research.. *Crit Rev Oncol Hematol.*, pp. 28(3):181-205.
- Clynes, Towers, Presta & Ravetch, 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets.. *Nat Med.*, pp. 6(4):443-6.
- Coiffier, et al., 2002. Aggressive lymphoma: improving treatment outcome with rituximab.. *Anticancer Drugs*, pp. 13 Suppl 2:S43-50.
- Compagno, Lim, Grunn & Nandula, 2009. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma.. *Nature*, pp. 459(7247):717-21.
- Coppola & Tessarollo, 2004. Control of hyperphagia prevents obesity in BDNF heterozygous mice.. *Neuroreport.*, pp. 15(17):2665-8.

- Corazzelli, Capobianco, Arcamone & Ballerini, 2009. Long-term results of gemcitabine plus oxaliplatin with and without rituximab as salvage treatment for transplant-ineligible patients with refractory/relapsing B-cell lymphoma.. *Cancer Chemother Pharmacol.*, pp. 64(5):907-16.
- Cory, Huang & Adams, 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis.. *Oncogene*, pp. 22(53):8590-607.
- Coulson, et al., 2000. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death.. *J Biol Chem.* , pp. 275(39):30537-45.
- Cragg & Glennie, 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents.. *Blood*, pp. 103(7):2738-43.
- Cultrera & Dalia, 2012. Diffuse large B-cell lymphoma: current strategies and future directions.. *Cancer Control*, pp. 19(3):204-13.
- Czuczman, et al., 1999. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy.. *J Clin Oncol.*, pp. 17(1):268-76.
- Czuczman, Hess, Gadeberg & Pedersen, 2012. Chemoimmunotherapy with ofatumumab in combination with CHOP in previously untreated follicular lymphoma.. *Br J Haematol.* , pp. 157(4):438-45.
- Dasmahapatra, et al., 2013. The Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor PCI-32765 synergistically increases proteasome inhibitor activity in diffuse large-B cell lymphoma (DLBCL) and mantle cell lymphoma (MCL) cells sensitive or resistant to bortezomib.. *Br J Haematol.* , pp. 161(1):43-56.
- Davis, Brown, Siebenlist & 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.* ,pp. 194(12):1861-74.
- Dechant, Tsoulfas, Parada & Barde, 1997. The neurotrophin receptor p75 binds neurotrophin-3 on sympathetic neurons with high affinity and specificity.. *J Neurosci.* , pp. 17(14):5281-7.
- DeFreitas, McQuillen & Shatz, 2001. A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons.. *J Neurosci.*, pp. 21(14):5121-9.
- DePaepe & DeWolf-Peeters, 2007. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities.. *Leukemia*, pp. 21(1):37-43.
- De Pablo et al., 2008. Tyr-701 is a new regulatory site for neurotrophin receptor TrkA trafficking and function. *J Neurochem.* 104(1):124-39
- Dicou, Masson, Jabbour & Nerriere, 1993. Increased frequency of NGF in sera of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients.. *Neuroreport.* , pp. 5(3):321-4.
- Di Lisio et al., 2012. MicroRNA signatures in B-cell lymphomas. *Blood Cancer J.*;2(2):e57.
- Ding, et al., 2013. Single nucleotide polymorphisms of CD20 gene and their relationship with clinical efficacy of R-CHOP in patients with diffuse large B cell lymphoma.. *Cancer Cell Int.*, p. 13(1):58.
- DiStefano, Chelsea, Schick & McKelvy, 1993. Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo.. *J Neurosci.* , pp. 13(6):2405-14.

- Dobrowsky, et al., 1994. Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor.. *Science*, pp. 265(5178):1596-9.
- D'Onofrio, et al., 2000. Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes.. *Eur Cytokine Netw.*, pp. 11(2):283-91.
- Donovan, et al., 2000. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization.. *Development*, pp. 127(21):4531-40.
- Dudek, et al., 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt.. *Science*, pp. 275(5300):661-5.
- Edling, Nanavati, Johnson & Tuohy, 2004. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells.. *J Neurosci Res.*, pp. 77(5):709-17.
- Ehrhard, et al., 1994. Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation.. *J Immunol.*, pp. 152(6):2705-9.
- Eide, et al., 1996. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling.. *J Neurosci.*, pp. 16(10):3123-9.
- Elshaer, et al., 2013. Pronerve Growth Factor Induces Angiogenesis via Activation of TrkA: Possible Role in Proliferative Diabetic Retinopathy.. *J Diabetes Res.*, p. 2013:432659.
- Emmanouilides, 2002. Rituximab-mediated sensitization of B-non-Hodgkin's lymphoma (NHL) to cytotoxicity induced by paclitaxel, gemcitabine, and vinorelbine.. *Cancer Biother Radiopharm.* , pp. 17(6):621-30.
- Epa, Markovska & Barrett, 2004. The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation.. *J Neurochem.*, pp. 89(2):344-53.
- Erik, et al., 2013. Cell of origin associated classification of b-cell malignancies by gene signatures of the normal b-cell hierarchy.. *Leuk Lymphoma*.
- Esposito, et al., 2001. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor.. *J Biol Chem.* , pp. 276(35):32687-95.
- Esteban, et al., 2006. A kinase-deficient TrkC receptor isoform activates Arf6-Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin.. *J Cell Biol.*, pp. 173(2):291-9.
- Evens, et al., 2008. Hypoxia inducible factor-alpha activation in lymphoma and relationship to the thioredoxin family.. *Br J Haematol.*, pp. 141(5):676-80.
- Evens, et al., 2010. Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} expression predicts superior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP.. *J Clin Oncol.*, pp. 28(6):1017-24.
- Fauchais, et al., 2009. Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor correlate with T-cell activation in primary Sjogren's syndrome.. *Scand J Rheumatol.* , pp. 38(1):50-7.
- Fauchais, et al., 2008. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival.. *J Immunol.*, pp. 181(5):3027-38.

- Fauchais et al. 2013. Serum and lymphocytic neurotrophins profiles in systemic lupus erythematosus: a case-control study. *PlosOne*. 1;8(11):e79414
- Feng, Li, Liu & Wen, 2010. NRAGE is a negative regulator of nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells mediated through TrkA-ERK signaling.. *J Neurosci Res.*, pp. 88(8):1822-8.
- Fenner, 2012. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor.. *Cytokine Growth Factor Rev.*, pp. 23(1-2):15-24.
- Ferreri, Govi & Ponzoni, 2013. The role of Helicobacter pylori eradication in the treatment of diffuse large B-cell and marginal zone lymphomas of the stomach.. *Curr Opin Oncol.*, pp. 25(5):470-9.
- Feugier, Hoof, V., Sebban & Solal-Celigny, 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.*, pp. 23(18):4117-26.
- Flowers & Armitage, 2010. A decade of progress in lymphoma: advances and continuing challenges.. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* , pp. 10(6):414-23.
- Fontán & Melnick, 2013. Molecular Pathways: Targeting MALT1 paracaspase activity in lymphoma.. *Clin Cancer Res.* .
- Foss, et al., 1997. Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease.. *J Pathol.* , pp. 183(1):44-50.
- Francke, Martinville, d., Coussens & Ullrich, 1983. The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1.. *Science*, pp. 222(4629):1248-51.
- Frick, Dörken & Lenz, 2011. The molecular biology of diffuse large B-cell lymphoma.. *Ther Adv Hematol.*, pp. 2(6):369-79.
- Frick, Dörken & Lenz, 2012. New insights into the biology of molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma.. *Best Pract Res Clin Haematol.*, pp. 25(1):3-12.
- Friedberg, Sharman, Sweetenham & Johnston, 2010. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia.. *Blood*, pp. 115(13):2578-85.
- Fujii & Kunugi, 2009. p75NTR as a therapeutic target for neuropsychiatric diseases.. *Curr Mol Pharmacol.*, pp. 2(1):70-6.
- Ganjoo, et al., 2013. Bevacizumab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone in combination for patients with peripheral T-cell or natural killer cell neoplasms: an Eastern Cooperative Oncology Group study (E2404).. *Leuk Lymphoma*.
- Garcia-Suarez, et al., 2002. Massive lymphocyte apoptosis in the thymus of functionally deficient TrkB mice.. *J Neuroimmunol.* , pp. 129(1-2):25-34.
- García-Suárez, et al., 2000. Changes in the expression of the nerve growth factor receptors TrkA and p75LNGR in the rat thymus with ageing and increased nerve growth factor plasma levels.. *Cell Tissue Res.* , pp. 301(2):225-34.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gascoyne, 1997. Pathologic prognostic factors in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma.. *Hematol Oncol Clin North Am.*, pp. 11(5):847-62.
- Gatto & Brink, 2010. The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol.*, 126(5):898-907.
- Geetha, Kenchappa, Wooten & Carter, 2005. TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor.. *EMBO J.*, pp. 24(22):3859-68.
- Giatromanolaki, et al., 2008. Lactate dehydrogenase 5 expression in non-Hodgkin B-cell lymphomas is associated with hypoxia regulated proteins.. *Leuk Lymphoma*, pp. 49(11):2181-6.
- Giatromanolaki, et al., 2008. Phosphorylated VEGFR2/KDR receptors are widely expressed in B-cell non-Hodgkin's lymphomas and correlate with hypoxia inducible factor activation.. *Hematol Oncol.*, pp. 26(4):219-24.
- Gisselbrecht, 2013. Ofatumumab in diffuse large B cell lymphoma?. *Blood*, pp. 122(4):469-70.
- Golay, et al., 2001. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59.. *Blood*, pp. 98(12):3383-9.
- Gong, Cao, Yu & Jiang, 2008. Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex.. *Nature*, pp. 454(7205):789-93.
- Götz, et al., 1994. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family.. *Nature*, pp. 372(6503):266-9.
- Gratzinger, et al., 2007. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse large B-cell lymphoma subtypes.. *Am J Pathol.*, pp. 170(4):1362-9.
- Gratzinger, et al., 2008. Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy.. *Lab Invest.*, pp. 88(1):38-47.
- Grob, Ross, Koprowski & Bothwell, 1985. Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor.. *J Biol Chem.*, pp. 260(13):8044-9.
- Grønbaek, et al., 1998. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity.. *Blood*, pp. 92(9):3018-24.
- Gualco, Weiss & Bacchi, 2010. MUM1/IRF4: A Review.. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*, pp. 18(4):301-10.
- Guba, et al., 2002. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor.. *Nat Med.*, pp. 8(2):128-35.
- Gu, Casaccia-Bonofil, Srinivasan & Chao, 1999. Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation.. *J Neurosci.*, pp. 19(8):3043-9.
- Habermann, Weller, Morrison & Gascoyne, 2006. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma.. *J Clin Oncol.*, pp. 24(19):3121-7.

- Hagenbeek, Gadeberg, Johnson & Pedersen, 2008. First clinical use of ofatumumab, a novel fully human anti-CD20 monoclonal antibody in relapsed or refractory follicular lymphoma: results of a phase 1/2 trial.. *Blood*, pp. 111(12):5486-95.
- Hallbröök et al., 1991. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*. 6(5):845-58
- Hallböök, 1999. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families.. *Curr Opin Neurobiol.*, pp. 9(5):616-21.
- Hamanoue, et al., 1999. p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor.. *Mol Cell Neurosci.* , pp. 14(1):28-40.
- Hampe, Rezgaoui, Hermans-Borgmeyer & Schaller, 2001. The genes for the human VPS10 domain-containing receptors are large and contain many small exons.. *Hum Genet.* , pp. 108(6):529-36.
- Hannestad, et al., 1997. TrkA neurotrophin receptor protein in the rat and human thymus.. *Anat Rec.*, pp. 249(3):373-9.
- Hannestad, et al., 2000. Trk neurotrophin receptor-like proteins in the teleost *Dicentrarchus labrax*.. *Cell Tissue Res.*, pp. 300(1):1-9.
- Hans, Weisenburger, Greiner & Gascoyne, 2004. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray.. *Blood*, pp. 103(1):275-82.
- Harrington, Kim & Yoon, 2002. Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis.. *J Neurosci.* , pp. 22(1):156-66.
- Harris, et al., 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group.. *Blood*, pp. 84(5):1361-92.
- He & Garcia, 2004. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75.. *Science*, pp. 304(5672):870-5.
- Hempstead, 2002. The many faces of p75NTR.. *Curr Opin Neurobiol.* , pp. 12(3):260-7.
- Hempstead, et al., 1991. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor.. *Nature*, pp. 350(6320):678-83.
- Hermans, et al., 1995. International Prognostic Index for aggressive non-Hodgkin's lymphoma is valid for all malignancy grades.. *Blood*, pp. 86(4):1460-3.
- Hernandez-Ilizaliturri, et al., 2011. Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongermlinal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype.. *Cancer*, pp. 117(22):5058-66.
- Herrup & Shooter, 1973. Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 70(12):3884-8.
- Hohn, Leibrock, Bailey & Barde, 1990. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family.. *Nature*, pp. 344(6264):339-41.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Holgado-Madruga, et al., 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*, pp. 94(23):12419-24.
- Hondermark et al., 2012. Neurotrophins and their receptors in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23(6):357-65
- Horn, et al., 2013. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma.. *Blood*, pp. 121(12):2253-63.
- Huebner, et al., 1986. The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12-17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 83(5):1403-7.
- Hu, et al., 2006. [Correlation between brain-derived neurotrophic factor expression in the nerve system and erectile dysfunction in diabetic rats].. *Zhonghua Nan Ke Xue.*, pp. 12(12):1066-71.
- Hussell, Isaacson, Crabtree & Spencer, 1996. Helicobacter pylori-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue.. *J Pathol.* , pp. 178(2):122-7.
- Ichim, Tauszig-Delamasure & Mehlen, 2012. Neurotrophins and cell death.. *Exp Cell Res.* , pp. 318(11):1221-8.
- Iqbal, Meyer, Smith & Johnson, 2011. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab.. *Clin Cancer Res.*, pp. 17(24):7785-95.
- Jazirehi & 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*, pp. 24(13):2121-43.
- Jazirehi & Bonavida, 2011. Development of rituximab-resistant B-NHL clones: an in vitro model for studying tumor resistance to monoclonal antibody-mediated immunotherapy.. *Methods Mol Biol.*, pp. 731:407-19.
- Jazirehi, et al., 2003. Rituximab (anti-CD20) selectively modifies Bcl-xL and apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) expression and sensitizes human non-Hodgkin's lymphoma B cell lines to paclitaxel-induced apoptosis.. *Mol Cancer Ther.*, pp. 2(11):1183-93.
- Jazirehi, Vega & Bonavida, 2007. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy.. *Cancer Res.*, pp. 67(3):1270-81.
- Johnson, et al., 2012. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone.. *J Clin Oncol.*, pp. 30(28):3452-9.
- Jones & Reichardt, 1990. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 87(20):8060-4.
- Jung & Aguiar, 2009. MicroRNA-155 expression and outcome in diffuse large B-cell lymphoma.. *Br J Haematol.* , pp. 144(1):138-40.
- Jung, et al., 2003. Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor.. *J Biol Chem.*, pp. 278(43):42161-9.
- Kanning, et al., 2003. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability.. *J Neurosci.*, pp. 23(13):5425-36.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kaplan, et al., 1991. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor.. *Science*, pp. 252(5005):554-8.
- Kaplan & Miller, 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system.. *Curr Opin Neurobiol.* , pp. 10(3):381-91.
- Kawamura et al., 2010. Inhibition of Brain-Derived Neurotrophic Factor/Tyrosine Kinase B Signaling Suppresses Choriocarcinoma Cell Growth. *Endocrinology* 151: 3006–3014.
- Keating, O'Brien, Albitar & Lerner, 2005. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia.. *J Clin Oncol.*, pp. 23(18):4079-88.
- Kehrl, Riva, Wilson & Thévenin, 1994. Molecular mechanisms regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression.. *Immunol Today*, pp. 15(9):432-6.
- Kenchappa, et al., 2010. p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/ADAM17.. *J Biol Chem.*, pp. 285(26):20358-68.
- Kerschensteiner, et al., 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.* , pp. 189(5):865-70.
- Khatib & Geraldine, 2006. Growth Factors: To Cleave or not to Cleave. *Regulation of Carcinogenesis, Angiogenesis and Metastasis by the Proprotein Convertases* , pp. pp 121-135.
- Khoury, Saliba, Hosing & Okoroji, 2005. Concurrent administration of high-dose rituximab before and after autologous stem-cell transplantation for relapsed aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphomas.. *J Clin Oncol.* , pp. 23(10):2240-7.
- Khursigara, Orlinick & Chao, 1999. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6.. *J Biol Chem.*, pp. 274(5):2597-600.
- Kimata, 2005. Differential modulation of cerebrospinal fluid neurotrophins in patients with atopic dermatitis who attempted suicide.. *J Clin Psychiatry*, pp. 66(9):1193-4.
- Kim, et al., 2013. Nerve growth factor-mediated vascular endothelial growth factor expression of astrocyte in retinal vascular development.. *Biochem Biophys Res Commun.*, pp. 431(4):740-5.
- Klein & Dalla-Favera, 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy.. *Nat Rev Immunol.* , pp. 8(1):22-33.
- Klein, et al., 1991. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor.. *Cell*, pp. 65(1):189-97.
- Klein, et al., 1991. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3.. *Cell*, pp. 66(2):395-403.
- Klein et al., 2003. Transcriptional analysis of the B cellgerminal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;100(5):2639-44.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Klein et al., 2006. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol.*;7(7):773-82.
- Kolk, v. d. et al., 2001. Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment.. *Br J Haematol.*, pp. 115(4):807-11.
- Kraan, et al., 2013. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites.. *Blood Cancer J*, p. 3:e139.
- Krajewska, et al., 1998. TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues.. *Am J Pathol.* , pp. 152(6):1549-61.
- Krappmann, 2012. Attacking MALT1 for ABC-DLBCL therapy.. *Oncotarget*, pp. 3(12):1489-90.
- Kraus, Alimzhanov, Rajewsky & Rajewsky, 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer.. *Cell*, pp. 117(6):787-800.
- Kronfeld, Kazimirsky, Gelfand & Brodie, 2002. NGF rescues human B lymphocytes from anti-IgM induced apoptosis by activation of PKCzeta.. *Eur J Immunol.* , pp. 32(1):136-43.
- Kryl & Barker, 2000. TTIP is a novel protein that interacts with the truncated T1 TrkB neurotrophin receptor.. *Biochem Biophys Res Commun.*, pp. 279(3):925-30.
- Kuijpers, et al., 2010. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses.. *J Clin Invest.*, pp. 120(1):214-22.
- Küppers, 1999. Identifying the precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease: role of the germinal center in B-cell lymphomagenesis.. *J Acquir Immune Defic Syndr.* , pp. 21 Suppl 1:S74-9.
- Küppers & Dalla-Favera, 2001. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas.. *Oncogene*, pp. 20(40):5580-94.
- Küppers, et al., 2005. Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma.. *Eur J Haematol Suppl.* , pp. (66):26-33.
- Küppers, et al., 2002. Biology of Hodgkin's lymphoma.. *Ann Oncol.* , pp. 13 Suppl 1:11-8.
- Lai, Fu, Ip & Ip, 1998. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp.. *Mol Cell Neurosci.* , pp. 11(1-2):64-76.
- Lamballe, Klein & Barbacid, 1991. The trk family of oncogenes and neurotrophin receptors.. *Princess Takamatsu Symp.*, pp. 22:153-70.
- Lam, et al., 2008. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma.. *Blood*, pp. 111(7):3701-13.
- Lam, et al., 2011. Brain-derived neurotrophic factor promotes tumorigenesis via induction of neovascularization: implication in hepatocellular carcinoma.. *Clin Cancer Res.* , pp. 17(10):3123-33.
- Large, et al., 1989. Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system.. *Neuron*, pp. 2(2):1123-34.
- Lawrie, et al., 2007. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma.. *Int J Cancer*, pp. 121(5):1156-61.

- LeBien & Tedder, 2008. B lymphocytes: how they develop and function.. *Blood*, pp. 112(5):1570-80..
- Lech-Maranda, et al., 2013. Pretreatment levels of vascular endothelial growth factor in plasma predict a complete remission rate and time to relapse or progression in patients with diffuse large B-cell lymphoma.. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, pp. 61(2):165-74.
- Lee, Kermani, Teng & Hempstead, 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.. *Science*, pp. 294(5548):1945-8.
- Leibrock, et al., 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor.. *Nature*, pp. 341(6238):149-52.
- LeMoan, et al., 2011. Oxygen-dependent cleavage of the p75 neurotrophin receptor triggers stabilization of HIF-1 α .. *Mol Cell*, pp. 44(3):476-90.
- Lenz & Staudt, 2010. Aggressive lymphomas.. *N Engl J Med*, pp. 362(15):1417-29.
- Lenz, et al., 2008. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas.. *N Engl J Med*, pp. 359(22):2313-23.
- Lessmann, Gottmann & Malsangio, 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects.. *Prog Neurobiol.* , pp. 69(5):341-74.
- Levi-Montalcini & Booker, 1960. EXCESSIVE GROWTH OF THE SYMPATHETIC GANGLIA EVOKED BY A PROTEIN ISOLATED FROM MOUSE SALIVARY GLANDS.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 46(3):373-84.
- Levi-Montalcini & Hamburger, 1951. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo.. *J Exp Zool*, pp. 116(2):321-61.
- Levi-Montalcini, et al., 1996. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine.. *Trends Neurosci*, pp. 19(11):514-20.
- Li, et al., 2009. High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis.. *Blood*, pp. 113(9):2028-37.
- Liepinsh, Ilag, Otting & Ibáñez, 1997. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor.. *EMBO J.* , pp. 16(16):4999-5005.
- Li, et al., 2013. MYC/BCL2 Double-Hit High-Grade B-Cell Lymphoma. *Adv Anat Pathol*, pp. 20(5):315-26.
- Li et al., 2011. Expression of miR-9 in B lymphocytes and B cell lymphomas cell lines and its significance. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*.;32(4):249-53.
- Lin, et al., 2003. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor and neurotrophins on cultured major pelvic ganglia.. *BJU Int.* , pp. 92(6):631-5.
- Lin & Medeiros, 2013. The Impact of MYC Rearrangements and "Double Hit" Abnormalities in Diffuse Large B-Cell Lymphoma.. *The Impact of MYC Rearrangements and "Double Hit" Abnormalities in Diffuse Large B-Cell Lymphoma*., pp. 8(3):243-52.
- Liu, et al., 2010. Neuronal-driven angiogenesis: role of NGF in retinal neovascularization in an oxygen-induced retinopathy model.. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, pp. 51(7):3749-57.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Liu, et al., 2013. Identification of differentially expressed proteins in chemotherapy-sensitive and chemotherapy-resistant diffuse large B cell lymphoma by proteomic methods.. *Med Oncol.* , p. 30(2):528.
- Lossos, 2005. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma.. *J Clin Oncol.*, pp. 23(26):6351-7.
- Lossos & Morgensztern, 2006. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma.. *J Clin Oncol.* , pp. 24(6):995-1007.
- Luberg, Wong, Weickert & Timmusk, 2010. Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development.. *J Neurochem.* , pp. 113(4):952-64.
- Macor, et al., 2007. In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab.. *Cancer Res.* , pp. 67(21):10556-63.
- Maisonpierre, et al., 1990. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, pp. 247(4949 Pt 1):1446-51.
- Manches, et al., 2003. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, pp. 101(3):949-54.
- Mandelbaum, et al., 2010. BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma.. *Cancer Cell*, pp. 18(6):568-79.
- Martelli, et al., 2013. Diffuse large B-cell lymphoma.. *Crit Rev Oncol Hematol.*, pp. 87(2):146-71.
- Martin-Zanca, Hughes & Barbacid, 1986. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences.. *Nature*, pp. 319(6056):743-8.
- Matsuda, et al., 2012. Brain-derived neurotrophic factor induces migration of endothelial cells through a TrkB-ERK-integrin α V β 3-FAK cascade.. *J Cell Physiol.*, pp. 227(5):2123-9.
- Matucci-Cerinic, et al., 2001. Nerve growth factor and neuropeptides circulating levels in systemic sclerosis (scleroderma).. *Ann Rheum Dis.* , pp. 60(5):487-94.
- Mayerhofer, et al., 2002. BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1alpha, through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin.. *Blood*, pp. 100(10):3767-75.
- Mazzoni, et al., 1999. Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway.. *J Neurosci.* , pp. 19(22):9716-27.
- Melamed, Patel, Brodie & Gelfand, 1999. Activation of Vav and Ras through the nerve growth factor and B cell receptors by different kinases.. *Cell Immunol.* , pp. 191(2):83-9.
- Melamed, et al., 1995. Nerve growth factor triggers microfilament assembly and paxillin phosphorylation in human B lymphocytes.. *J Exp Med.*, pp. 181(3):1071-9.
- Metsis, 2001. Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation.. *Cell Mol Life Sci.*, pp. 58(8):1014-20.

- Meyer, Fu, Greiner & Smith, 2011. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab.. *J Clin Oncol.* , pp. 29(2):200-7.
- Micallef, Maurer, Wiseman & Nikcevich, 2011. Epratuzumab with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma.. *Blood*, pp. 118(15):4053-61.
- Middlemas, Lindberg & Hunter, 1991. trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors.. *Mol Cell Biol.* , pp. 11(1):143-53.
- Mi, et al., 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex..*Nat Neurosci.*, pp. 7(3):221-8.
- Miller, Dahlberg, Cassady & Adelstein, 1998. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma.. *N Engl J Med.*, pp. 339(1):21-6.
- Mills, 2010. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins.. *Nat Rev Cancer*, pp. 10(10):669-82.
- Mohammad, et al., 2002. Rituximab, Cyclophosphamide, Dexamethasone (RCD) regimen induces cure in WSU-WM xenograft model and a partial remission in previously treated Waldenstrom's macroglobulinemia patient.. *J Drug Target*, pp. 10(5):405-10.
- Morgan, et al., 1997. Changing trends in the incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Europe. Biomed Study Group.. *Ann Oncol.*, pp. 8 Suppl 2:49-54.
- Morschhauser, Leonard, Fayad & Coiffier, 2009. Humanized anti-CD20 antibody, veltuzumab, in refractory/recurrent non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II results.. *J Clin Oncol.* , pp. 27(20):3346-53.
- Morschhauser, Marlton, Vitolo & Lindén, 2010. Results of a phase I/II study of ocrelizumab, a fully humanized anti-CD20 mAb, in patients with relapsed/refractory follicular lymphoma.. *Ann Oncol.*, pp. 21(9):1870-6.
- Mounier, et al., 2003. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).. *Blood*, pp. 101(11):4279-84.
- Muramatsu, et al., 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem.*,274(26):18470-6.
- Muramatsu, et al., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase(AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.*,102(5):553-63.
- Muris, Ylstra, Cillessen & Ossenkoppele, 2007. Profiling of apoptosis genes allows for clinical stratification of primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Haematol.* , pp. 136(1):38-47.
- Nagorsen, et al., 2009. Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab.. *Leuk Lymphoma*, pp. 50(6):886-91.
- Nakagawara, et al., 2005. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2).. *Genomics*, pp. 25(2):538-46.

- Nakamura, et al., 2006. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells.. *Cancer Res.* , pp. 66(8):4249-55.
- Nakamura, Tan, Li & Thiele, 2011. NGF activation of TrkA induces vascular endothelial growth factor expression via induction of hypoxia-inducible factor-1a.. *Mol Cell Neurosci.*, pp. 46(2):498-506.
- Natkunam, et al., 2008. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab.. *J Clin Oncol.* , pp. 26(3):447-54.
- Ngo, Young, Schmitz & Jhavar, 2011. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma.. *Nature*, pp. 470(7332):115-9.
- Nilsson, Fainzilber, Falck & Ibáñez, 1998. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish.. *FEBS Lett.* , pp. 424(3):285-90.
- Nogai, Dörken & Lenz, 2011. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma.. *J Clin Oncol.*, pp. 29(14):1803-11.
- Nozaki, et al., 2013. Rituximab activates Syk and AKT in CD20-positive B cell lymphoma cells dependent on cell membrane cholesterol levels.. *Exp Hematol.*, pp. 41(8):687-696.e1.
- Nyborg, et al., 2006. Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates.. *Mol Neurodegener.*, p. 1:3.
- Nykjaer, et al., 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death.. *Nature*, pp. 427(6977):843-8.
- Nykjaer & Willnow, 2012. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function.. *Trends Neurosci.* , pp. 35(4):261-70.
- Nykjaer, Willnow & Petersen, 2005. p75NTR--live or let die.. *Curr Opin Neurobiol.* , pp. 15(1):49-57.
- Okuno, Saito, Hayashi & Chan, 2004. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia.. *J Neurosci.*, pp. 24(36):7879-87.
- Otten, Ehrhard & Peck, 1989. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 86(24):10059-63.
- Ozçelik, Rosenthal & Francke, 1991. Chromosomal mapping of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 genes in man and mouse.. *Genomics*, pp. 10(3):569-75.
- Pang, et al., 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity.. *Science*, pp. 306(5695):487-91.
- Pasqualucci, et al., 2006. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma.. *J Exp Med.*, pp. 203(2):311-7.
- Pasqualucci, et al., 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*, pp. 95(20):11816-21.

- Pasqualucci, Trifonov, Fabbri & Ma, 2011. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma.. *Nat Genet.*, pp. 43(9):830-7.
- Patapoutian & Reichardt, 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action.. *Curr Opin Neurobiol.* , pp. 11(3):272-80.
- Pearse, et al., 2005. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival.. *Blood*, pp. 105(11):4429-36.
- Pérez-Pérez, et al., 2003. p75NTR in the spleen: age-dependent changes, effect of NGF and 4-methylcatechol treatment, and structural changes in p75NTR-deficient mice.. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.*, pp. 270(2):117-28.
- Perry, et al., 2012. The incidence and repetition of hospital-treated deliberate self harm: findings from the world's first national registry.. *PLoS One*, p. 7(2):e31663.
- Persky & Miller, 2009. Localized large cell lymphoma: is there any need for radiation therapy?. *Curr Opin Oncol.*, pp. 21(5):401-6.
- Pezzolesi, Platzer, Waite & Eng, 2008. Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in Cowden syndrome.. *Am J Hum Genet.*, pp. 82(5):1141-9.
- Pfeifer, Grau, Lenze & Wenzel, 2013. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 110(30):12420-5.
- Pfreundschuh, Ho, Cavallin-Stahl & Wolf, 2008. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group. *Lancet Oncol.*, pp. 9(5):435-44.
- Pfreundschuh, Trümper, Osterborg & Pettengell, 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.* , pp. 7(5):379-91.
- Philippidou et al., 2011. Trk retrograde signaling requires persistent, Pincher-directed endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11;108(2):852-7
- Pica, et al., 2000. Autocrine nerve growth factor is essential for cell survival and viral maturation in HHV-8-infected primary effusion lymphoma cells.. *Blood*, pp. 95(9):2905-12.
- Polo, et al., 2007. Transcriptional signature with differential expression of BCL6 target genes accurately identifies BCL6-dependent diffuse large B cell lymphomas.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 104(9):3207-12.
- Porto, D. et al., 2004. B cell antigen receptor signaling 101.. *Mol Immunol.*, pp. 41(6-7):599-613.
- Putney & McKay, 1999. Capacitative calcium entry channels.. *Bioessays*, pp. 21(1):38-46.
- Qiao, et al., 2010. NF-κB mediates aberrant activation of HIF-1 in malignant lymphoma.. *Exp Hematol.* , pp. 38(12):1199-208.
- Reddy, et al., 2008. Immunomodulatory drugs stimulate natural killer-cell function, alter cytokine production by dendritic cells, and inhibit angiogenesis enhancing the anti-tumour activity of rituximab in vivo.. *Br J Haematol.*, pp. 140(1):36-45.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Reichardt, 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways.. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, pp. 361(1473):1545-64.
- Reimold et al., 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature.*;412(6844):300-7.
- Renné, et al., 2008. Autocrine NGFbeta/TRKA signalling is an important survival factor for Hodgkin lymphoma derived cell lines.. *Leuk Res.*, pp. 32(1):163-7.
- Rezvani & Maloney, 2011. Rituximab resistance.. *Best Pract Res Clin Haematol.*, pp. 24(2):203-16.
- Ribatti et al., 2000. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on anti-angiogenesis. *Curr Pharm Biotechnol.*;1(1):73-82.
- Rihl, et al., 2005. Involvement of neurotrophins and their receptors in spondyloarthritis synovitis: relation to inflammation and response to treatment.. *Ann Rheum Dis.*, pp. 64(11):1542-9.
- Rogers, et al., 2010. ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex.. *J Neuroimmunol.*, pp. 226(1-2):93-103.
- Romon, et al., 2010. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways.. *Mol Cancer*, p. 9:157.
- Rosenwald & Staudt, 2003. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma.. *Leuk Lymphoma*, pp. 44 Suppl 3:S41-7.
- Rosenwald, Wright, Chan & v, 2002. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma.. *N Engl J Med.* , pp. 346(25):1937-47.
- Rosini, et al., 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.* , pp. 279(14):14016-23.
- Rosini, et al., 2000. NGF withdrawal induces apoptosis in CESS B cell line through p38 MAPK activation and Bcl-2 phosphorylation.. *Biochem Biophys Res Commun*, pp. 278(3):753-9.
- Roux & Barker, 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor.. *Prog Neurobiol.* , pp. 67(3):203-33.
- Roux, Bhakar, Kennedy & Barker, 2001. The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway.. *J Biol Chem.*, pp. 276(25):23097-104.
- Ruan, Coleman & Leonard, 2009. Management of relapsed mantle cell lymphoma: still a treatment challenge.. *Oncology (Williston Park)*, pp. 23(8):683-90.
- Ruan, Hajjar, Rafii & Leonard, 2009. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in non-Hodgkin's lymphoma.. *Ann Oncol.*, pp. 20(3):413-24.
- Rubenstein, Fridlyand, Abrey & Shen, 2007. Phase I study of intraventricular administration of rituximab in patients with recurrent CNS and intraocular lymphoma.. *J Clin Oncol.* , pp. 25(11):1350-6.

- Ruberti, et al., 2000. Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy.. *J Neurosci.* , pp. 20(7):2589-601.
- Rydén & Ibáñez, 1996. Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC.. *J Biol Chem.*, pp. 271(10):5623-7.
- Salven, 2001. Angiogenesis in lymphoproliferative disorders.. *Acta Haematol.*, pp. 106(4):184-9.
- Santambrogio, et al., 1994. Nerve growth factor production by lymphocytes.. *J Immunol.* , pp. 153(10):4488-95.
- Santi, D., Annunziata, Sessa & Bramanti, 2009. Brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptor in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis.. *J Neurol Sci.*, pp. 287(1-2):17-26.
- Sasahira, et al., 2013. Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma.. *Clin Exp Metastasis*, pp. 30(2):165-76.
- Sato, 2008. VEGFR1 for lymphangiogenesis: an alternative signaling pathway?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* , pp. 28(4):604-5.
- Savage, et al., 2009. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy.. *Blood*, pp. 114(17):3533-7.
- Saygili, et al., 2011. Mechanical stretch of sympathetic neurons induces VEGF expression via a NGF and CNTF signaling pathway.. *Biochem Biophys Res Commun*, pp. 410(1):62-7.
- Schack, v. et al., 2001. Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system.. *Nat Neurosci.*, pp. 4(10):977-8.
- Schenone, Gill, Zacharias & Windebank, 1996. Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes.. *J Neuroimmunol.* , pp. 64(2):141-9.
- Schliemann, et al., 2009. Complete eradication of human B-cell lymphoma xenografts using rituximab in combination with the immunocytokine L19-IL2.. *Blood*, pp. 113(10):2275-83.
- Schmidt-Wolf, et al., 1991. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity.. *J Exp Med.*, pp. 174(1):139-49.
- Schuhmann, et al., 2005. A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development.. *J Neuroimmunol.* , pp. 163(1-2):15-23.
- Sehgal, Patil & Chao, 1988. A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene.. *Mol Cell Biol.* , pp. 8(8):3160-7.
- Sehn, 2012. Paramount prognostic factors that guide therapeutic strategies in diffuse large B-cell lymphoma.. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, pp. 2012:402-9.
- Sehn, et al., 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*, pp. 109(5):1857-61.
- Semac, et al., 2003. Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells.. *Cancer Res.* , pp. 63(2):534-40.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Semenza, 2001. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology.. *Trends Mol Med.* , pp. 7(8):345-50.
- Semenza, 2003. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders.. *Annu Rev Med.*, pp. 54:17-28.
- Semenza, 2007. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway.. *Sci STKE*, p. 2007(407):cm8.
- Semenza, 2010. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics.. *Oncogene*, pp. 29(5):625-34.
- Shaffer et al., 2002. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity.*;17(1):51-62.
- Shaknovich & Melnick, 2011. Epigenetics and B-cell lymphoma.. *Curr Opin Hematol.* , pp. 18(4):293-9.
- Shapiro-Shelef et al., 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity.*;19(4):607-20.
- Shapiro-Shelef & Calama, 2005. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol.* ,5(3):230-42.
- Shenkier, Voss, Fairey & Gascoyne, 2002. Brief chemotherapy and involved-region irradiation for limited-stage diffuse large-cell lymphoma: an 18-year experience from the British Columbia Cancer Agency.. *J Clin Oncol.*, pp. 20(1):197-204.
- Shipp, Ross, Tamayo & Weng, 2002. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning.. *Nat Med.*, pp. 8(1):68-74.
- Skaper, Pollock & Facci, 2001. Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins.. *Brain Res Mol Brain Res.* , pp. 97(2):177-85.
- Skeldal, Matusica, Nykjaer & Coulson, 2011. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR).. *Bioessays*, pp. 33(8):614-25.
- Sniderhan, et al., 2009. Neurotrophin signaling through tropomyosin receptor kinases contributes to survival and proliferation of non-Hodgkin lymphoma.. *Exp Hematol.* , pp. 37(11):1295-309.
- Staudt, 2010. Oncogenic activation of NF-kappaB.. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, p. 2(6):a000109.
- Staudt, Balasubramanian, Dunleavy & Crowley, 2011. The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor PCI-32765 Modulates Chronic Active BCR Signaling and. *National Cancer Institute*.
- Steinhardt & Gartenhaus, 2012. Promising personalized therapeutic options for diffuse large B-cell Lymphoma Subtypes with oncogene addictions.. *Clin Cancer Res.* , pp. 18(17):4538-48.
- Stewart, et al., 2002. Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma.. *Histopathology*, pp. 40(3):253-60.
- Stoilov, Castren & Stamm, 2002. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism.. *Biochem Biophys Res Commun.*, pp. 290(3):1054-65.
- Stommel, et al., 2007. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies.. *Science*, pp. 318(5848):287-90.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Stopeck, et al., 2009. A phase II trial of single agent bevacizumab in patients with relapsed, aggressive non-Hodgkin lymphoma: Southwest oncology group study S0108.. *Leuk Lymphoma*, pp. 50(5):728-35.
- Sun, et al., 2009. The effect of brain-derived neurotrophic factor on angiogenesis.. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* , pp. 29(2):139-43.
- Sun, et al., 2010. Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation, migration, and VEGF secretion in human multiple myeloma cells via activation of MEK-ERK and PI3K/AKT signaling.. *Tumour Biol.*, pp. 31(2):121-8.
- Suzuki, Umezawa & Bonavida, 2007. Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis.. *Oncogene*, pp. 26(42):6184-93.
- Swerdlow, Quintanilla-Martinez, Willemze & Kinney, 2013. Cutaneous B-cell lymphoproliferative disorders: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology workshop.. *Am J Clin Pathol.* , pp. 139(4):515-35.
- Tabata, Yasumizu, Tabata & Kojima, 2013. Double-Hit Lymphoma Demonstrating t(6;14;18)(p25;q32;q21), Suggesting Two Independent Dual-Hit Translocations, MYC/BCL-2 and IRF4/BCL-2.. *J Clin Exp Hematop.*, pp. 53(2):141-50.
- Tacconelli, et al., 2005. Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma.. *Future Oncol.* , pp. 1(5):689-98.
- Taniuchi, Johnson, Roach & Lawrence, 1986. Phosphorylation of nerve growth factor receptor proteins in sympathetic neurons and PC12 cells. In vitro phosphorylation by the cAMP-independent protein kinase FA/GSK-3.. *J Biol Chem.*, pp. 261(28):13342-9.
- Tapley, Lamballe & Barbacid, 1992. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors.. *Oncogene*, pp. 7(2):371-81.
- Ternant, et al., 2009. Development of a drug-disease simulation model for rituximab in follicular non-Hodgkin's lymphoma.. *Br J Clin Pharmacol.*, pp. 68(4):561-73.
- Tilly et al., 2012. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 23 Suppl 7:vii78-82
- Tomita, et al., 2013. Standard R-CHOP Therapy in Follicular Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma.. *J Clin Exp Hematop.*, pp. 53(2):121-5.
- Torcia, et al., 1996. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes.. *Cell*, pp. 85(3):345-56.
- Torcia, et al., 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.* , pp. 276(42):39027-36.
- Tsimberidou & Keating, 2009. Treatment of fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia.. *Cancer*, pp. 115(13):2824-36.
- Tsuboi, et al., 2000. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies.. *Leukemia*, pp. 14(3):449-56.

- Tsujimoto, Cossman, Jaffe & Croce, 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.. *Science*, pp. 228(4706):1440-3.
- Ujjani & Cheson, 2010. Monoclonal antibodies in advanced B-cell lymphomas.. *Oncology*, pp. 24(2):156-66.
- Valent, Danglot & Bernheim, 1997. Mapping of the tyrosine kinase receptors trkA (NTRK1), trkB (NTRK2) and trkC(NTRK3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence in situ hybridization.. *Eur J Hum Genet.*, pp. 5(2):102-4.
- Vega, et al., 2003. Neurotrophins and the immune system.. *J Anat.*, pp. 203(1):1-19.
- Vega, Huerta-Yepe, Martinez-Paniagua & Martinez-Miguel, 2009. Rituximab-mediated cell signaling and chemo/immuno-sensitization of drug-resistant B-NHL is independent of its Fc functions.. *Clin Cancer Res.* , pp. 15(21):6582-94.
- Velichutina, et al., 2010. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis.. *Blood*, pp. 116(24):5247-55.
- Viatour, et al., 2003. NF- kappa B2/p100 induces Bcl-2 expression.. *Leukemia*, pp. 17(7):1349-56.
- Wang, Fei, Vanderlaan & Song, 2004. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro.. *Angiogenesis*, pp. 7(4):335-45.
- Wang, et al., 2012. [SUDHL-4 cell culture in vitro and establishment of mouse tumor model].. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* , pp. 20(2):329-34.
- Wang, Hu, Zhang & Sun, 2008. Brain derived neurotrophic factor induces endothelial cells angiogenesis through AKT and ERK1/2 signal pathway.. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.*, pp. 16(1):175-80.
- Wang, et al., 2002. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp.. *Nature*, pp. 420(6911):74-8.
- Wang, et al., 2004. Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo.. *Blood*, pp. 104(9):2893-902.
- Wang, Xu & Zhang, 2013. Bortezomib in combination with thalidomide or lenalidomide or doxorubicin regimens for the treatment of multiple myeloma: a meta-analysis of 14 randomized controlled trials.. *Leuk Lymphoma*.
- Weiner, 2010. Rituximab: mechanism of action.. *Semin Hematol.* , pp. 47(2):115-23.
- Weisenburger, 1992. Pathological classification of non-Hodgkin's lymphoma for epidemiological studies.. *Cancer Res.*, pp. 52(19 Suppl):5456s-5462s; discussion 5462s-5464s.
- Welcher, Bitler, Radeke & Shooter, 1991. Nerve growth factor binding domain of the nerve growth factor receptor.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 88(1):159-63.
- Weng & Levy, 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma.. *J Clin Oncol.*, pp. 21(21):3940-7.
- Wiernik, Lossos, Tuscano & Justice, 2008. Lenalidomide monotherapy in relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma.. *J Clin Oncol.*, pp. 26(30):4952-7.

- Witzig, et al., 2011. An international phase II trial of single-agent lenalidomide for relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma.. *Ann Oncol.*, pp. 22(7):1622-7.
- Wong & Garner, 2012. Evidence that truncated TrkB isoform, TrkB-Shc can regulate phosphorylated TrkB protein levels.. *Biochem Biophys Res Commun.*, pp. 420(2):331-5.
- Wong, et al., 2002. A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein.. *Nat Neurosci.* , pp. 5(12):1302-8.
- Wooten, et al., 2001. Nerve growth factor stimulates multisite tyrosine phosphorylation and activation of the atypical protein kinase C's via a src kinase pathway.. *Mol Cell Biol.* , pp. 21(24):8414-27.
- Wright, et al., 2003. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 100(17):9991-6.
- Xiao, et al., 2008. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes.. *Nat Immunol.* , pp. 9(4):405-14.
- Yacoubian & Lo, 2000. Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth.. *Nat Neurosci.* , pp. 3(4):342-9.
- Yamashita & Tohyama, 2003. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI.. *Nat Neurosci.*, pp. 6(5):461-7.
- Yan, et al., 2009. Establishing SCID mouse models of B-cell non-Hodgkin's lymphoma.. *Ai Zheng*, pp. 28(2):181-3.
- Yano & Chao, 2000. Neurotrophin receptor structure and interactions.. *Pharm Acta Helv.*, pp. 74(2-3):253-60.
- Yano et al., 2001. Association of Trk neurotrophin receptors with components of the cytoplasmic dynein motor. *J Neurosci.* 1;21(3):RC125
- Yano & Chao, 2004. Mechanisms of neurotrophin receptor vesicular transport. *J Neurobiol.* 58(2):244-57
- Ye, et al., 1993. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma.. *Science*, pp. 262(5134):747-50.
- Ye, et al., 1997. BCL-6 proto-oncogene controls germinal centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet.*, 16(2):161-70.
- Yoon, Casaccia-Bonnet, Carter & Chao, 1998. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival.. *J Neurosci.*, pp. 18(9):3273-81.
- Zampieri, Xu, Neubert & Chao, 2005. Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains.. *J Biol Chem.*, pp. 280(15):14563-71.
- Zhang et al., 2000. Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation.. *J Neurosci.* 1;20(15):5671-8.
- Zhang, et al., 2010. Lentiviral shRNA silencing of BDNF inhibits in vivo multiple myeloma growth and angiogenesis via down-regulated stroma-derived VEGF expression in the bone marrow milieu.. *Cancer Sci.*, pp. 101(5):1117-24.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zhang, et al., 2013. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 110(4):1398-403.

Zhou, Hu & Qin, 2008. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy.. *Oncologist*, pp. 13(9):954-66.

Zhu et al., 2001. Modulation of expression of ribosomal protein L7a (rpL7a) by ethanol in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 69(1):29-38.

Ziepert, et al., 2010. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era.. *J Clin Oncol.* , p. J Clin Oncol.

Ziller, et al., 2005. Controlling complement resistance in cancer by using human monoclonal antibodies that neutralize complement-regulatory proteins CD55 and CD59.. *Eur J Immunol.*, pp. 35(7):2175-83.

Zupan, et al., 1989. Identification, purification, and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor.. *J Biol Chem.* , pp. 264(20):11714-20.