

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *DI'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Cancérologie*

Présentée et soutenue par *Samar KHEIRALLAH*
Le 27 septembre 2010

Titre : *Implication de la signalisation du BCR dans le ciblage thérapeutique des lymphomes folliculaires*

JURY

Pr. Guy Laurent (président du jury)
Dr. Marcel Deckert (rapporteur)
Pr. Hervé Watier (rapporteur)
Pr. François-Xavier Mahon (examineur)
Dr. Christine Bezombes (directrice de thèse)

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies de Toulouse*
Unité de recherche : *INSERM U563*
Directeur(s) de Thèse : *Dr. Christine Bezombes*
Rapporteurs : *Dr. Marcel Deckert, Pr. Hervé Watier*

Je dédie cette thèse à l'homme de ma vie, Tonton Giorgio

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail de thèse durant la période estivale de l'année.

*Merci pour le **Dr. Marcel Deckert** d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse, merci pour vos conseils et vos remarques constructives.*

*Merci pour le **Pr. Hervé Watier** d'avoir concasché autant de temps et d'attention au manuscrit, merci pour vos corrections minutieuses et pertinentes.*

*Merci pour le **Pr. François-Xavier Mahon** d'avoir examiné mon manuscrit même si les circonstances n'étaient pas de notre côté le 27 septembre. Surtout, merci pour vos conseils et vos encouragements pour ma vie future.*

*Je remercie le **Pr. Guy Laurent**, pour les heures de discussion scientifique intense, pour les week-ends de rédaction d'article et de discussion philosophique. Merci pour chaque nouvelle hypothèse qui m'a empêché de me noyer au fond de mon désespoir. Enfin, j'espère que dans les années futures je saurai être un médecin aussi consciencieux et un chercheur aussi passionné que vous.*

*Je remercie le **Dr. Christine Bezombes**, tout d'abord pour la relation de confiance que nous avons eu pendant ces 4 années. Je te remercie de m'avoir donné une confiance et une liberté dans le travail. Merci de m'avoir remonté le moral à chaque fois que tu as senti la déprime s'approcher de moi et les manips ratées attaquer ma patience. J'ai beaucoup apprécié ton côté serviable, battante et « fonçeuse » ainsi que ton côté psychothérapeute improvisé !!! J'espère avoir été supportable malgré mon caractère de têtue que tu as pu constater. Mais ma mémoire d'éléphant pourrait peut être me sauver ? ;-) Je te souhaite une très bonne route tant sur le plan professionnel que personnel et espère avoir de tes nouvelles régulièrement.*

*Je remercie le **Dr. Jean-Jacques Fournié** de m'avoir accueilli dans son équipe. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail pendant ces 4 années de thèse. Merci pour*

vosre disponibilité, vos conseils et votre humour lors des repas à la cantine. Merci de nous avoir fait partager tant d'expériences de voyage et de découverte de pays lointains.

*Je remercie **Pierre Caron**, pour le stage exemplaire que tu as effectué avec nous. Pour ton intelligence, ta gentillesse, ta politesse et ton courage. J'espère que c'était une bonne expérience pour toi aussi et je te souhaite tout le succès que tu mérites.*

*Je remercie le **Dr. Anne Quillet-Mary** pour l'aide et les conseils que vous m'avez apporté, pour les discussions intéressantes en particulier sur le Liban et les gastronomies étrangères. J'ai toujours été impressionnée par votre capacité de travail inouïe et votre passion pour la recherche. Je vous souhaite un avenir florissant et vous remercie encore.*

*Je remercie **Mme Catherine Trichard**, pour ton aide technique mais pas seulement. Pour ton agréable compagnie lors des « délicieux » repas de la cantine. Pour toutes les discussions qu'on a eu, sur la révolution de mai 68, sur l'évolution des mentalités et le rôle de la femme, sur les relations humaines très compliquées. C'était un réel plaisir de te connaître, toi qui est passionné de beaucoup de chose, de livre, de cinéma et de... Clint. Je t'embrasse et espère aller déguster le Gaillac avec toi pendant que tu profites pleinement de ta retraite.*

Côté étudiant je remercie toute la bande de la pause thé : Emilie Gross, Emilie Laprévotte, Emili-Fleur Gautier, Séverine Fruchon, Cécile Liffraud et Pauline Gravelle.

***Emilie Gross**, ma copine de galère, on est arrivé ensemble au labo, on a eu du mal à démarrer nos projets, on a eu beaucoup de souci de manip, mais on a eu de super discussions tous les soirs dans le bureau des étudiants. Après on est devenu cop's en dehors du labo, on s'est fait des resto, des ptites bouffes, du yoga, des pierrades, du béton à Lacépède, de la danse africaine et des cours d'arabe... il faut quand même que je note que tu étais ma meilleure élève. Je suis ravie d'avoir fait ta connaissance et j'espère que ni médecine ni la Californie nous empêchera de se voir et de se parler. Bon, même si je comprendrai si tu dois te faire 3 thés, 4 siestes et 5 « to do list » avant de m'appeler. Et puis, on aura toujours des choses à se raconter même quand tu seras à San Diego, San Francisco, Los Angelos ou même l'Allemagne (pardon l'Alsace) et maintenant que tu es copine avec toute ma famille on pourra se voir aussi au Liban quand tu veux. Je te souhaite que de bonne chose, tout d'abord la fin de la galère et le début d'une vie aussi joyeuse que tu le mérites.*

Emilie Laprévotte, Mme AU TAQUET, grâce à toi je sais compter maintenant !!!! je ne confond plus 6 tubes avec 60 tubes !!! Grâce à toi j'ai aussi découvert que je suis des fois tête en l'air ce que je ne savais pas (sérieusement), même si les résultats du classement ne sont toujours pas publiés et que je pense être juste après toi dans le taquet ;-))) Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, ton aide à des moments très critiques comme les demandes de financements et les impressions stressantes. Merci pour d'autres moments un peu moins glorieux comme le flash mob...Merci d'avoir fait le déplacement au Liban où j'ai pu voir d'autres côtés de toi (pas trop au taquet, décontractée et très ouverte...). Je te souhaite une vie pleine de bonnes choses que tu aimes (fromage, musique de Michael, Nancy, Los Angeles...) et j'espère qu'on va rester en contact, je te promets de venir chez toi visiter la plus belle place d'Europe.

Parce que Gaillac c'est mieux peut être ?!

Emilie-Fleur Gautier, FLOWER, la fille la plus gentille et la plus serviable que je n'ai jamais rencontrée !!!! J'ai été ravie de te connaître, la fille au baby-face qui venait d'hémato, qui travaille jusqu'à 3h du mat et qui est là tous les we. J'ai partagé avec toi le bureau et l'ordi avec un grand plaisir, j'espère que la colocation s'est bien passée pour toi aussi. Bien sûr, on ne parle pas du risque de mort par écrasement que tu m'infligeais avec tes tas de cahiers et de classeurs suspendus ;;---))) Je tiens à te dire que j'ai été très touché parce que tu as fait le déplacement au Liban sans hésitation, je t'en remercie et j'espère aller te voir dans ton pays : le Tarn.

Séverine Fruchon, je te remercie pour toutes les discussions intéressantes qu'on a eues, la cuisine, l'alimentation, l'écologie..., je te remercie pour les bons et les mauvais moments qu'on a partagés ensemble (je suis d'accord avec toi que le western blot est une technique de m...). Merci pour les conseils et les encouragements que tu m'as donnés dans les moments difficiles. Organisée, logique, sincère et ferme sont quelques unes de tes qualités que j'ai particulièrement appréciées. Pour toutes ces raisons et bien d'autres encore je te remercie. Je remercie aussi Alan pour sa bonne humeur et son amitié. A quand vous voulez sur Bordeaux pour faire le tour des châteaux !!!

Cécile Liffraud, un passage bref mais intense. Je te remercie pour les petites chansons et danses improvisées pour faire marcher les westerns blots, pour ta bonne humeur flagrante et ton sourire radieux. Je te souhaite tout l'épanouissement que tu mérites.

Pauline Gravelle, même si nous n'avons pas pu beaucoup se connaître, j'ai apprécié ta gentillesse et ton intelligence. Je te souhaite beaucoup de courage pour braver les difficultés de la thèse et je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite famille.

*Un grand merci au soleil de l'étage : **Yovan**, merci pour la bonne humeur, le parfum du Sud et l'accent chantant que tu distribues dans les couloirs! C'était un grand plaisir de connaître le multiculturel que tu es et de partager la passion pour l'Italie avec toi.*

Loic Ysebeart, LE personnage! Merci pour toutes les discussions intéressantes, ton partage de tes connaissances et ta générosité. Merci pour ton humour et pour le repas mémorable à San Francisco chez le chinois ! Qu'est ce qu'il dit ????

*Merci aussi pour **Christine Jean**, pour ta gentillesse et pour toutes les discussions bricolage qu'on a eues toutes les deux, j'ai toujours la truelle et la spatule!*

*Merci pour **Amandine Blanc**, ta bonne humeur, ton humour et ta fraîcheur. Merci pour toutes les « déconnades » qu'on a pu avoir ensemble. Bonne chance pour tout dans la vie.*

*Je n'oublie pas toutes les autres personnes de l'équipe, **Marie et Rémy Poupot, Emilie Decaup, Aude-Hélène Capietto, Nicolas Dauguet** ainsi que les anciens de l'équipe, **Ludivine Leseux et Julie Gertner**.*

*Sans les équipes voisines, ces années n'auraient pas été aussi riches, alors je remercie l'équipe du **Pr. Delsol/Pr. Brousset**, l'équipe du **Pr. Peyrastra** et l'équipe du **Dr. Dupré** pour leur collaboration et pour toutes les discussions avec les chercheurs, les post-docs et les étudiants de ces équipes. En particulier, merci à **Julie** pour le papotage au bureau et pour le partage de tes passions (danse, Michael, cop copine...;-) à **Gema Malet** pour les quelques soirées et pause thé bien agréables avec toi, **Emilie Dejean** pour les discussions philosopho-scientifiques autour d'un article le soir, **Wilfried** pour ta gentillesse et ta disponibilité,*

***Etienne** pour ton humour que je ne comprenais pas toujours ;-)
Cathy pour ta gentillesse, ta maturité et ta disponibilité, **Julien** et **Charlotte** pour votre humour et gentillesse...*

Un énorme merci pour mes amis 'hors du labo', qui sont toujours là malgré tout. Merci à Gaëlle et à Lilou, mes amies du DEUG, merci pour votre amour, votre disponibilité immédiate... pour votre amitié. Merci à mes cousines Maya, Carole, Diana et tout le groupe Z ;-)

En plus du soutien des collègues et des amis je n'oublie pas le soutien incomparable de ma famille, sans ce soutien je ne serais jamais venue en France et je n'aurais jamais fait de longues études. Je dois cette thèse à ma famille et en particulier à

***Téta Violette**, ma merveilleuse grand-mère qui n'est plus là pour savourer avec moi cette réussite mais à qui je dois beaucoup de chose dans la vie. Je te remercie téta pour ta sagesse et ton intelligence, pour toutes les valeurs que tu m'a transmises et pour ton amour si exceptionnel.*

***Mon papa Joseph** qui m'a toujours appris à être forte et à communiquer avec les gens. Je te remercie papa pour tout ce que tu m'as appris et pour ton soutien psychologique, émotionnel et matériel que tu ne cesses de m'apporter.*

***Ma mamounette Soad** qui dépasse sa tristesse de me voir vivre aussi loin d'elle et m'encourage à réussir. Je suis fière de toi maman. Je te remercie pour l'amour immense que tu éprouves pour moi et j'espère pouvoir être bientôt près de toi et compenser toutes ces années de séparation.*

***Ma grande sœur Viviane**, la plus gentille et la plus généreuse. Je te remercie pour ton amour, ton soutien et ta bonté. J'espère partager avec toi les petites joies de la vie plus souvent. Je te souhaite une vie épanouie à côté de ta petite famille merveilleuse. **Chady**, merci pour les moments inoubliables passés en boîte de nuit et à la plage à chaque fois que je vais me ressourcer au Liban, merci pour ton esprit de la fête et ta bonne humeur. Merci à mes neveux **Naya** et **Lipo** qui sèment la joie dans mon cœur. J'espère que votre marraine sera un peu plus présente pour vous dans les prochaines années.*

*Mon frère Christian, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Je te remercie pour tous les efforts que tu as fournis pour me permettre d'arriver jusque là. Merci pour ta grande responsabilité de la famille et pour ta générosité. Je ne peux pas oublier ta femme merveilleuse **Jacky** pour le soutien, l'encouragement et l'aide qu'elle m'a offert. Je remercie aussi mes nièces merveilleuses : **Nour, Lynne** (et **le prochain bébé**) qui m'ont toujours donné le sourire et la joie même à travers le téléphone.*

Soha, ma petite sœur chérie, avec qui j'ai passé mes journées et mes soirées pendant 18 ans. La séparation fût très difficile il y a maintenant 10 ans. Quand j'ai quitté le Liban tu avais 12 ans, maintenant je retrouve une belle jeune femme forte et pleine d'ambition. Je te remercie pour tous les bons moments qu'on passe ensemble même au téléphone, merci pour tes blagues qui me remontent le moral, merci pour ton soutien moral et pour la complicité exceptionnelle qu'on partage ensemble. Tu pourras toujours compter sur moi Ohayo!

*Merci aussi pour tous les autres membres de ma famille au Liban : pour ma tante **Joséphine**, tonton **Ignas, Victoria, Doris, Philippe**, mon **grand père yousef** et tous mes **oncles, tantes et cousins** qui me soutiennent de loin.*

*Un grand merci à Toronto, merci **tonton Tony** pour ton soutien, ton aide et tes soins qui m'ont permis de passer des moments difficiles. Merci pour ta disponibilité incomparable, ton amour pour la famille et tes encouragements. J'espère pouvoir profiter plus de ta présence dans le futur.*

*Un énorme merci à ma famille adoptive à Bordeaux, merci **tonton Samir** d'avoir été toujours là pour moi. Merci pour tes conseils avisés, pour ta discrétion et ta grande sagesse. Merci pour ma maman française **Nadine**, Je ne pourrai jamais décrire le soutien et l'aide que tu m'a apporté pendant toutes ces années. Je te remercie du fond du cœur parce que tu es une femme généreuse du fond du cœur. Je vous souhaite un avenir serein et heureux à tous les deux. Merci aussi à **Shady et Houda** pour vos encouragements et votre bonne humeur.*

*Merci pour ma belle famille, les Semperes. Merci **Christian, Babeth, sophie, Renaud, David et Mélissa** de m'avoir adopté dans votre famille qui est pleine d'amour, d'entraide et de sincérité. Je suis heureuse de faire partie de votre famille et je vous remercie pour tout le soutien que vous m'avez apporté. Sans votre aide je n'aurais jamais pu écrire une thèse,*

*préparer un mariage (heu 2 mariages), un déménagement, un aménagement et une soutenance en même temps. Je n'oublie pas les piliers de cette famille que sont les grands-parents, alors un grand merci à **Embrun** et à **Pertuis**.*

*Enfin Merci mon chéri **Sébastien**, pour ces 6 années merveilleuses passées ensemble. Pour les moments exceptionnels qu'on a vécu malgré les difficultés. Je te remercie d'avoir supporté mes humeurs, consolé mes chagrins et encouragé mes projets. Je te remercie tout simplement pour l'amour qu'on partage et que j'espère partager encore longtemps avec toi.*

Sommaire

SOMMAIRE.....	10
INTRODUCTION GENERALE	13
I. LE DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES B.....	14
A. GENERALITES SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	14
1. Réponse spécifique de l'immunité adaptative	14
2. Lignée lymphocytaire : morphologie et schéma général de différenciation	15
B. LES CELLULES B, HISTOIRE D'UNE VIE	17
1. Naissance des cellules B dans la moelle osseuse	18
2. Les points de contrôle de la cellule pré-B.....	19
3. Cellule B immature, étape critique de l'adolescence.....	26
4. Cellules B transitionnelles, entre adolescence et maturité	27
5. Cellules B matures	30
6. Cellules stromales et présentation de l'antigène	32
7. Le centre germinatif, berceau de la mutation hypersomatique et de la commutation de classe.....	33
8. Différenciation post-CG.....	35
II. LE BCR	38
A. LES EVENEMENTS MOLECULAIRES.....	38
1. L'adressage du BCR à la membrane plasmique	38
2. Les événements précoces de l'activation de la signalisation du BCR.....	39
3. La signalisation du BCR.....	43
4. Le co-récepteur CD19 et l'amplification du signal.....	48
5. Rétrocontrôle négatif du signal BCR.....	49
6. Implication de l'isotype de l'Ig dans la signalisation du BCR.....	51
7. Internalisation du BCR et présentation de l'antigène.....	52
B. LE BCR TONIQUE	54
1. Preuve du concept.....	54
2. Modèles proposés.....	55
C. BCR ET PATHOLOGIES.....	58
1. BCR et maladies auto-immunes	58
2. BCR et lymphomagenèse.....	59
III. LE LYMPHOME FOLLICULAIRE.....	62
A. LES LNHS: GENERALITES.....	62
B. LE LYMPHOME FOLLICULAIRE: EPIDEMIOLOGIE	62
C. CLASSIFICATION ET PRONOSTIC.....	63

D.	ORIGINE ET PHENOTYPE DES CELLULES FOLLICULAIRES LYMPHOMATEUSES	64
E.	TRANSLOCATION T (14 ;18) ET LYMPHOMAGENESE	66
1.	<i>Mécanismes de la translocation</i>	66
2.	<i>La t(14 ;18) n'est pas la seule coupable</i>	67
F.	BCR ET LYMPHOME FOLLICULAIRE.....	68
G.	LE LYMPHOME FOLLICULAIRE ET SON MICROENVIRONNEMENT	69
H.	TRAITEMENT DES LYMPHOMES FOLLICULAIRES	70
I.	NOUVEAUX AGENTS ET APPROCHES FUTURES	71
IV.	LE RITUXIMAB	74
A.	DECOUVERTE ET FABRICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX	74
B.	ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES	75
1.	<i>La progression vers les anticorps monoclonaux thérapeutiques</i>	75
2.	<i>Le rituximab, un anticorps monoclonal chimérique</i>	76
C.	LE CD20: LA CIBLE DU RITUXIMAB	78
1.	<i>La structure du CD20</i>	78
2.	<i>La régulation de l'expression du CD20</i>	79
3.	<i>La fonction du CD20</i>	81
4.	<i>CD20 et BCR</i>	81
D.	MECANISMES DE DEPLETION DES CELLULES B PAR LE RITUXIMAB.....	82
1.	<i>La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps</i>	83
2.	<i>La cytotoxicité dépendante du complément</i>	85
3.	<i>Effet direct du rituximab sur les cellules cibles tumorales</i>	87
4.	<i>L'effet "vaccinal" du rituximab</i>	92
E.	RITUXIMAB ET MALADIES AUTO-IMMUNES.....	93
F.	EFFETS SECONDAIRES	94
G.	MECANISMES DE RESISTANCE AU RITUXIMAB	95
1.	<i>Résistance due au niveau et à la localisation du CD20</i>	95
2.	<i>Résistance relative à l'ADCC et à la CDC</i>	96
3.	<i>Résistance due à la signalisation intracellulaire</i>	97
H.	NOUVELLE GENERATION D'ANTI-CD20.....	97
V.	L'ENZASTAURINE	100
A.	LES PROTEINES KINASES C	100
1.	<i>Les PKC comme cibles anti-tumorales</i>	100
2.	<i>PKC et BCR</i>	101
B.	L'ENZASTAURINE, STRUCTURE ET UTILISATION	102
C.	MECANISMES D'ACTION	103
1.	<i>Action anti-angiogénique</i>	103
2.	<i>Action anti-tumorale directe</i>	104
D.	ESSAIS CLINIQUES EN COURS	106

RESULTATS-PARTIE I.....	110
RESULTATS- PARTIE II	126
DISCUSSION	146
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	156
ANNEXES	175

Introduction générale

Parmi les cellules du système immunitaire, les lymphocytes B constituent des acteurs essentiels de la réponse spécifique aux antigènes. Leurs fonctions sont largement liées à l'expression et au bon fonctionnement d'un récepteur aux antigènes exprimé à leur surface cellulaire, le BCR (B cell receptor). Plusieurs pathologies peuvent concerner les lymphocytes B, comme les lymphomes de type B et les maladies auto-immunes. Les lymphopathies B sont souvent liées à des aberrations génétiques telles que les translocations chromosomiques conduisant à la dérégulation de l'expression de certaines protéines. Cependant, l'efficacité des anticorps dirigés contre des épitopes de surface dans le traitement de certains lymphomes a toutefois mis en évidence l'importance que pouvait représenter les molécules membranaires dans la biologie ainsi que dans le ciblage thérapeutique des lymphopathies B.

La molécule qui met en jeu une multitude d'événements allant de la membrane plasmique jusqu'au noyau et qui permet d'assurer les fonctions biologiques du lymphocyte B est le BCR. L'altération du signal du BCR a été décrite dans certains types de lymphome et les connaissances concernant l'implication du BCR dans la biogenèse des pathologies B s'élargissent. Ainsi, le ciblage de cette molécule et de la signalisation qui en dépend a constitué le centre de mes travaux de thèse. Je me suis tout d'abord intéressée à l'effet potentiel du rituximab sur la signalisation du BCR, puis au ciblage de cette signalisation par l'enzastaurine dans le lymphome folliculaire.

Ainsi, pour introduire ce travail, je décrirai le développement normal des lymphocytes B dans le but de mettre la lumière sur les fonctions que jouent le BCR tout au long de leur maturation. Puis, je m'intéresserai aux événements moléculaires qui régissent l'activation du signal BCR. Dans un troisième temps, je décrirai l'anticorps monoclonal qui a bouleversé le traitement des lymphopathies B : le rituximab. Enfin, pour terminer, je présenterai l'enzastaurine, une molécule thérapeutique prometteuse dans le ciblage du signal BCR des lymphopathies B.

I. Le développement des lymphocytes B

Ce premier chapitre transcrit de manière non exhaustive la bibliographie concernant le développement des lymphocytes B, dans le but d'évoquer le rôle que joue le BCR à chaque étape de la maturation de ces cellules.

A. Généralités sur le système immunitaire

Parmi les cellules immunitaires, seuls les lymphocytes T et B ont à leur surface des récepteurs d'antigène (Ag), le TCR (T-cell receptor) ou le BCR respectivement qui leur permettent d'assurer l'immunité spécifique ou adaptative. Cependant, un grand nombre d'autres cellules hématopoïétiques participent directement à l'induction, la régulation et l'expression de la réponse immunitaire spécifique, en même temps qu'elles assurent l'immunité non spécifique de mise en jeu rapide. Il s'agit des polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), des mastocytes, des plaquettes et des cellules de la lignée monocyte/macrophage. Certaines cellules non hématopoïétiques interviennent dans l'induction ou l'expression des réactions immunitaires. C'est le cas notamment des cellules dendritiques folliculaires des organes lymphoïdes périphériques, des cellules endothéliales et de certains épithéliums (1).

1. Réponse spécifique de l'immunité adaptative

La réponse immunitaire spécifique est caractérisée par la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et B dont le TCR ou le BCR est susceptible de se lier à l'antigène natif ou dégradé. Les récepteurs d'antigène, dont le site de liaison s'appelle paratope, se répartissent en deux familles portées par deux types différents de lymphocytes :

Les récepteurs des lymphocytes T (TCR $\alpha\beta$) interagissent, pour la plupart d'entre eux, avec un peptide (fragment d'un Ag protéique) associé au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), localisé à la surface d'une cellule présentatrice d'Ag (CPA) parmi lesquelles les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. Les TCR n'interagissent pas avec les molécules d'Ag en solution.

Les récepteurs des lymphocytes B (BCR) sont des immunoglobulines de membrane (mIg). Le lymphocyte B se différencie en plasmocyte qui sécrète des Ac dont la structure est proche de celle du BCR du lymphocyte B dont il est issu. BCR et Ac interagissent par leur paratope avec l'Ag en solution ou fixées sur les membranes cellulaires des CPA, telles que les cellules folliculaires dendritiques et les cellules réticulaires fibroblastiques (1).

2. Lignée lymphocytaire : morphologie et schéma général de différenciation

Les lymphocytes T et B se différencient en deux étapes: l'une centrale, dans le thymus (T) ou la moelle osseuse (B) qui permet la formation des lymphocytes T ou B. L'autre périphérique, dans les organes lymphoïdes secondaires qui permet l'adaptation du système immunitaire aux stimulations de l'environnement par l'expansion clonale et la différenciation de ces lymphocytes en cellules effectrices.

Les lymphocytes sont des cellules arrondies de petite taille (7 à 9 μ de diamètre) avec un grand noyau à chromatine dense et un anneau mince de cytoplasme contenant des ribosomes mais très peu de lysosomes et de mitochondries. Cet aspect morphologique correspond à des cellules en phase G0 du cycle cellulaire. Les grands lymphocytes granuleux (LGL) représentent environ 5% des lymphocytes du sang. Ils ont un cytoplasme plus abondant que celui des petits lymphocytes. Cette population est constituée de cellules cytotoxiques différenciées contenant des médiateurs cytotoxiques préformés, ce sont les lymphocytes NK (Natural Killer) et les lymphocytes Tc (T cytotoxiques).

Les lymphocytes T et B se différencient à partir des cellules souches hématopoïétiques, en passant par un stade intermédiaire commun de cellule souche lymphoïde non encore identifiée. Ces deux lignées lymphocytaires sont caractérisées, à la différence des autres cellules de l'organisme, par une différenciation en deux phases. La première indépendante des stimulations de l'environnement, la seconde soumise à une activation des lymphocytes matures par des Ag ou des interactions idiotypiques, ce qui permet l'adaptation de la réponse immunitaire spécifique aux stimulations de l'organisme par l'environnement antigénique (1).

Mon travail de thèse ayant porté sur les mécanismes d'action d'agents anti-tumoraux dans le lymphome folliculaire, nous allons à ce stade abandonner les lymphocytes T et autres cellules immunitaires pour découvrir l'histoire du lymphocyte B sans pour autant oublier le rôle que peuvent jouer les différents types cellulaires dans le cycle de vie du lymphocyte B.

B. Les cellules B, histoire d'une vie

A partir de la cellule souche hématopoïétique en passant par les progéniteurs lymphoïdes, les précurseurs pré-pro-B, pro-B, pré-B, les cellules B immatures, transitionnelles, matures, jusqu'à la cellule B mémoire ou le plasmocyte, la vie des cellules B est constituée d'une multitude d'étapes et de points de contrôle qui garantissent le bon fonctionnement de l'un des acteurs principaux de l'immunité qu'est le lymphocyte B (Figure 1).

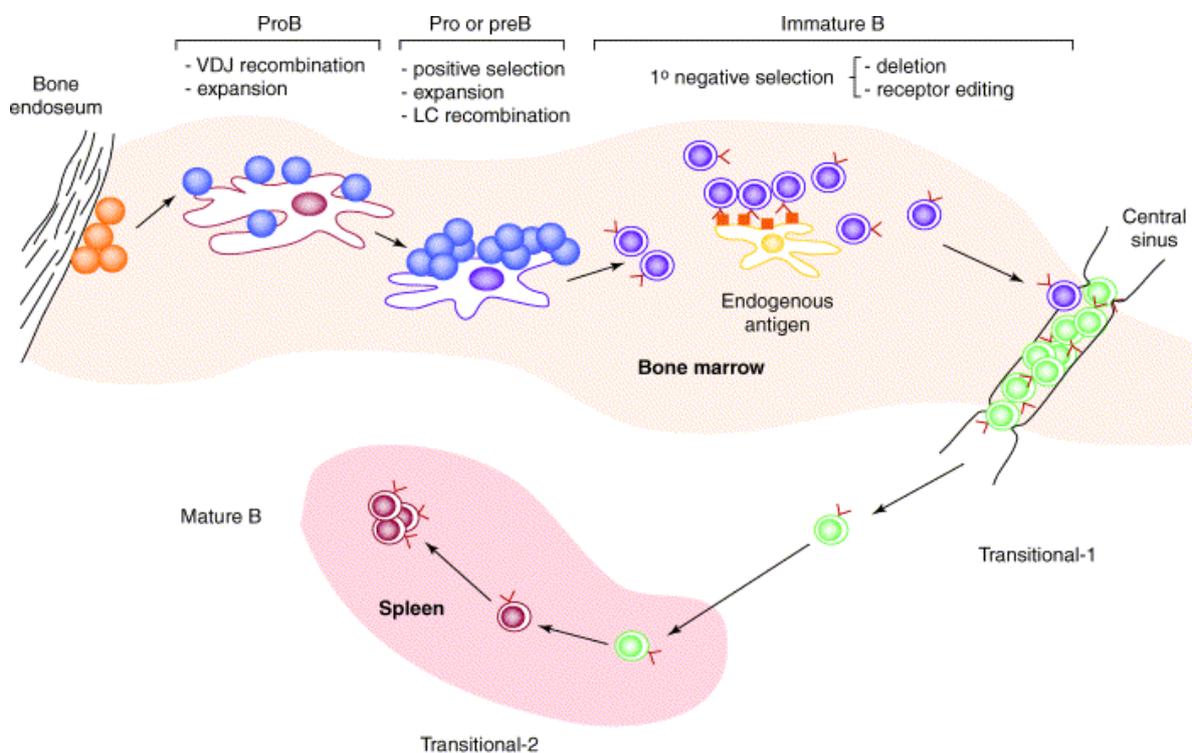


Figure 1 : Les différentes étapes du développement du lymphocyte B (2). A chaque stade de différenciation (Pro-B, pré-B, B immature, transitionnelles T1, T2, mature...), le pré-BCR ou le BCR acquiert des caractéristiques fonctionnelles précises qui garantissent l'avancement de la différenciation du lymphocyte B. Par exemple, les événements moléculaires qui ont lieu dans la moelle osseuse (bone marrow) sont : la recombinaison VDJ, la sélection positive, l'expansion clonale, la recombinaison de la chaîne légère de l'immunoglobuline (LC) et la délétion ou la révision du récepteur (receptor editing). Les cellules B immatures seront qualifiées de transitionnelles lors de leur passage de la moelle osseuse jusqu'à la rate (spleen) où elles deviennent matures.

1. Naissance des cellules B dans la moelle osseuse

La moelle osseuse occupe les cavités médullaires des os et constitue un microenvironnement complexe pour l'hématopoïèse précoce. La connaissance de l'organisation spatiale des cellules hématopoïétiques et de leurs interactions avec le microenvironnement de la moelle osseuse est d'une importance cruciale afin de comprendre les mécanismes régulateurs de l'hématopoïèse précoce. La moelle osseuse contient des cellules adhérentes connues sous le nom de cellules stromales, qui créent la niche microenvironnementale. Ces cellules jouent un rôle majeur puisqu'elles maintiennent la viabilité des cellules hématopoïétiques et fournissent les facteurs requis pour leur développement.

Les précurseurs des cellules B sont parmi les précurseurs hématopoïétiques les mieux caractérisés. Les études ont montré que les cellules B sont générées à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC : hematopoietic stem cell) et se développent dans la moelle osseuse avant de migrer vers le sang pour atteindre les organes lymphoïdes périphériques. *In fine*, la boucle se termine quand les plasmocytes, cellules dérivées du lymphocyte B mature cruciales pour assurer la réponse immunitaire humorale, reviennent et colonisent la moelle osseuse. De nombreuses zones d'ombre subsistent concernant le développement de la cellule HSC vers le précurseur précoce de la cellule B, en particulier l'identité des précurseurs intermédiaires. Selon différentes études réalisées chez la souris, les HSC donneraient naissance aux LMPP (lymphoid-primed multipotent progenitors) (3). Le LMPP représenterait le premier pas vers le lineage lymphoïde et se différencierait vers un progéniteur lymphoïde commun, le CLP (common lymphoid progenitor). Le CLP étant capable de générer des cellules T ou B (4).

Les précurseurs des cellules B sont caractérisés par la présence de certains marqueurs de lignées B mais par l'absence du récepteur à l'antigène, le BCR. Selon l'expression de certains marqueurs de surface durant leur développement dans la moelle osseuse, on peut distinguer quatre catégories de cellules précurseurs B: les pré-pro-B, les pro-B, les pré-B et les B immatures (Figure 2). Les cellules B immatures, alors munies d'un BCR, quittent la moelle osseuse, empruntent la voie sanguine pour aller dans la rate. A ce stade, les cellules B sont qualifiées de transitionnelles: T1, les cellules T1 se différencient en cellules T2 dans la rate. La rencontre avec l'antigène transforme les T2 en cellules B matures qui peuvent se différencier en cellules B du follicule (qui donnent par la suite soit des cellules B mémoires,

soit des plasmocytes) ou des cellules de la zone marginale qui peuvent se différencier en plasmocytes.

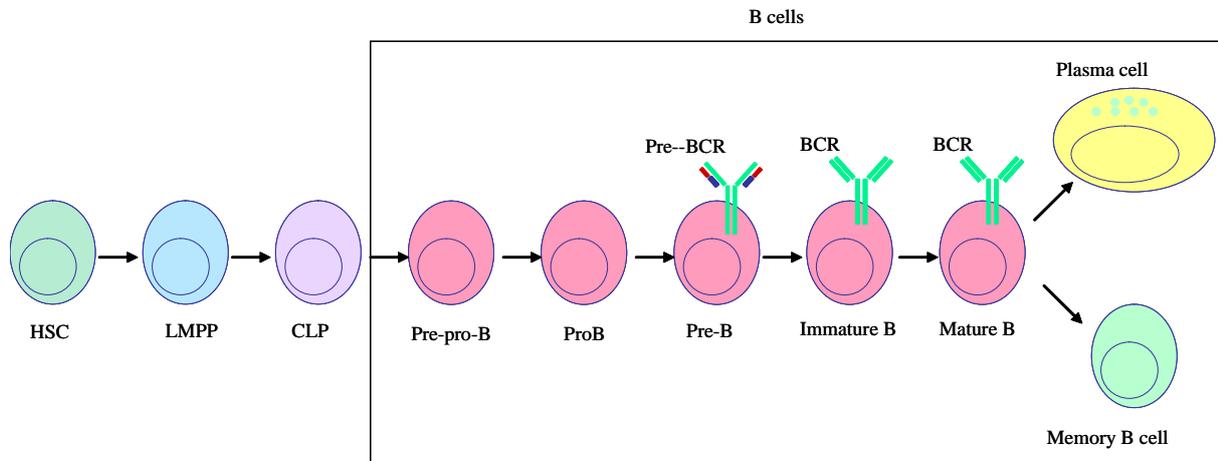


Figure 2 : Schéma simplifié de la différenciation des cellules B : HSC: *hematopoietic stem cell*, LMPP: *lymphoid-primed multipotent progenitor*, CLP: *common lymphoid progenitor*. A partir du stade pré-B, les cellules expriment un pré-BCR. Le BCR est exprimé à partir du stade B immature. La cellule B mature peut se différencier en plasmocyte ou en cellule B mémoire.

2. Les points de contrôle de la cellule pré-B

Le développement des cellules B est caractérisé par l'expression de marqueurs protéiques mais surtout par l'expression de l'immunoglobuline de surface qui servira de récepteur à l'antigène. Le récepteur des précurseurs B passe par 5 points de contrôle qui assurent l'acheminement des lymphocytes B normaux de la moelle osseuse vers la périphérie.

a) La recombinaison VDJ

Il y a 25 ans, Tonegawa et ses collègues ont démenti l'un des principes de base de la biologie moléculaire qui est la structure rigide du génome et ont donc résolu une énigme fondamentale en immunologie: la génération de la diversité des récepteurs à l'antigène (5). Leur travail a démontré que le gène complet d'une immunoglobuline est généré à partir de séquences issues de plusieurs segments de gènes à travers une série de recombinaison sur des sites spécifiques de l'ADN. Ce phénomène est connu sous le nom de recombinaison V (D) J pour variable (diversity) joining. La décennie qui a suivi ce travail a été marquée par l'élucidation des structures des loci réarrangés des récepteurs à l'Ag (immunoglobuline μ , κ et λ) et l'identification des séquences spécifiques de l'ADN essentielles pour la recombinaison, les RSS (recombination signal sequences). Puis, deux gènes spécifiques aux lymphocytes,

RAG1 et RAG2 (recombination-activating gene) codant pour les composants de la recombinase ont été découverts (6).

La recombinaison du gène de l'immunoglobuline est initiée par RAG1 et RAG2, qui génèrent des cassures double brin dans l'ADN, entre les segments de gène et les séquences RSS. Les cassures sont réparées par les protéines du système de réparation NHEJ (non-homologous end-joining). Le réarrangement du gène de l'immunoglobuline médié par RAG est tout d'abord initié sur le locus de la chaîne lourde IgH (Heavy chain immunoglobulin) du progéniteur lymphoïde commun (CLP) ou de la cellule pro-B nouvellement formée. A ce stade, le réarrangement concerne les segments D_H et J_H . Au stade pro-B tardif se produit le réarrangement entre le segment V_H et DJ_H (Figure 3).

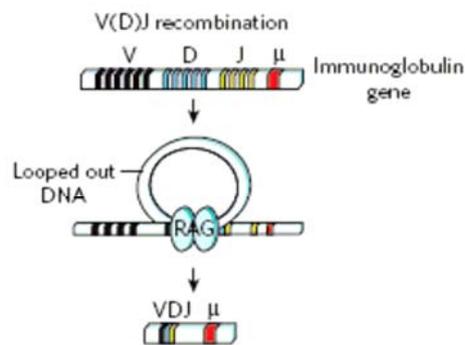


Figure 3 : La recombinaison VDJ de l'immunoglobuline, figure adaptée de la référence (7) : Le gène de l'immunoglobuline est composé de plusieurs segments *Variable (V)*, *Diversity (D)* et *joining (J)*. L'enzyme RAG (*recombination-activating gene*) génère l'excision de fragments d'ADN entre les segments D et J, puis entre les segments V et DJ.

Le produit de cette recombinaison VDJ est la chaîne $Ig\mu$ qui constitue une partie du pré-BCR exprimé par les cellules pré-B. Le pré-BCR comprend 2 chaînes lourdes $Ig\mu$ et 2 chaînes SLC (surrogate light chain) associées à deux sous-unités protéiques de signalisation $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. Contrairement à la chaîne légère IgL du BCR, la SLC du pré-BCR est un hétérodimère composé de 2 protéines invariantes, $VpreB$ et $\lambda 5$ (Figure 4) (8).

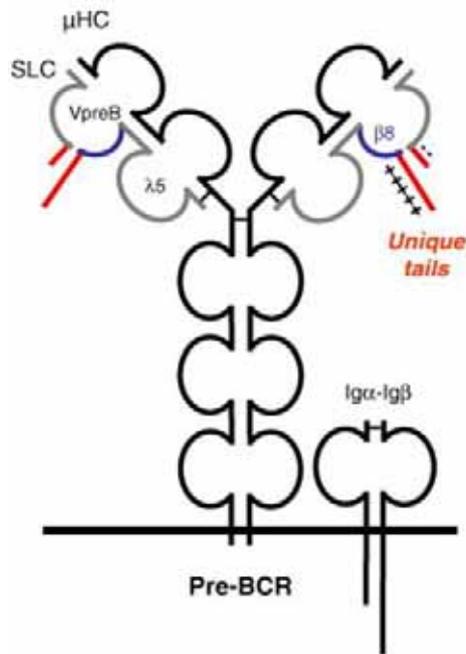


Figure 4: La structure du pré-BCR (9): μ HC : μ Heavy Chain : $Ig\mu$; SLC : Surrogate Light Chain. Le pré-BCR est composé des 2 chaînes lourdes $Ig\mu$, de 2 SLC et de l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$.

b) Pré-BCR et sélection positive

Malgré son expression transitoire, le pré-BCR marque un point de contrôle important dans le développement des lymphocytes B. En effet, seules les cellules pré-B qui expriment un récepteur compétant de point de vue structural sont autorisées à suivre leur maturation. Ainsi, une délétion dans la région transmembranaire de l' $Ig\mu$, une absence de chaîne $Ig\alpha$ ou $Ig\beta$ ou encore une déficience de la composante $\lambda 5$ de la SLC induisent un blocage de la transition pro à pré-B dans la moelle osseuse ce qui résulte en une diminution du nombre des cellules B matures en périphérie. Donc, une cellule pré-B est positivement sélectionnée et échappe à la mort cellulaire grâce à l'expression d'une $Ig\mu$ fonctionnelle, capable de se lier à la SLC et ainsi s'exprimer à la surface cellulaire, c'est donc ce qu'on appelle la sélection positive des cellules pré-B (8). La signalisation des premiers pré-BCR ainsi exprimés à la surface induit une diminution de l'expression du gène $\lambda 5$ et ainsi achève l'expression de la SLC (10). Le pré-BCR active une boucle de régulation négative qui a pour rôle d'arrêter sa propre expression. Environ 15% à 30% des cellules pré-B sont sélectionnées. Cependant, au moins 50% des $Ig\mu$ réarrangées sont incapables de se lier à la SLC et donc d'induire la prolifération des cellules pré-B. Pour autant, ces cellules ne sont pas éliminées et continuent

leur différenciation. Par contre, étant donné que ces cellules pré-B ne prolifèrent pas, leur contribution dans le développement du compartiment des cellules B reste très mineure (11).

c) Pré-BCR et exclusion allélique

Un autre rôle important de la signalisation du pré-BCR est d'inhiber la recombinaison VDJ sur le deuxième allèle de l'IgH afin d'assurer l'exclusion allélique (6, 12). L'exclusion allélique est une étape intégrale de la différenciation B et un mécanisme qui assure l'expression à la surface d'un BCR à spécificité unique. L'exclusion allélique est régie par deux procédés, l'activation monoallélique et l'inhibition par rétrocontrôle (13). L'activation monoallélique consiste en l'activation du réarrangement d'un allèle avant l'autre. Le choix de l'allèle qui subit en premier le réarrangement dépend de facteurs épigénétiques comme la méthylation de l'ADN, la modification des histones, l'hétérochromatisation, la contraction du locus et la position du locus dans le noyau. Ces modifications épigénétiques sont en grande partie médiées par le signal du pré-BCR (8). Aussitôt et grâce à ce signal pré-BCR, le niveau de RAG1 et RAG2 est diminué pour empêcher la recombinaison du deuxième allèle. Mais qu'est ce qui empêche la recombinaison simultanée des deux allèles ? Depuis 20 ans, différentes études pointent du doigt l'inefficacité du système de recombinaison l'empêchant d'effectuer 2 recombinaisons simultanées (14, 15). Les allèles seraient donc en compétition pour l'accessibilité aux facteurs nécessaires pour la recombinaison.

Ce modèle stochastique a été récemment remis en cause par la notion de biais de la recombinaison, dû au décalage temporel de la réplication. Par exemple, dans les cellules pro-B, un allèle de l'IgH se réplique plus tôt dans la phase S que l'autre allèle (16) ce qui lui fournit une structure chromatinienne plus favorable à la recombinaison. Il est à noter qu'une fraction de cellules B (environ 4%) réarrange les deux allèles, un sur deux étant fonctionnel et exprimé à la surface cellulaire.

L'inhibition par rétrocontrôle met fin aux réarrangements une fois qu'une recombinaison valable a eu lieu en mettant à contribution encore une fois le signal du pré-BCR. La contribution du signal du pré-BCR dans ce phénomène n'est pas encore très claire. Cependant, les souris PLC γ 1^{+/-} PLC γ 2^{-/-} ne présentent pas d'exclusion allélique sur le locus IgH suggérant que cette phospholipase joue un rôle clé dans ce phénomène (17). En revanche, la délétion de ERK1/2 n'affecte pas l'exclusion allélique. La délétion de SYK et de Zap70

induit l'échec de l'exclusion allélique alors que la délétion de Syk seule ne l'affecte que partiellement (18).

Ainsi, l'existence et l'importance de l'exclusion allélique sont largement démontrées, mais les mécanismes qui régulent ce phénomène restent complexes, controversés et en cours d'exploration (6).

d) La signalisation du pré-BCR et l'expansion clonale

Alors que la signalisation du BCR a été largement étudiée, celle du pré-BCR reste encore moins caractérisée. Différentes études montrent que les deux récepteurs utilisent les mêmes composantes et voies de signalisation. La différence principale entre ces deux récepteurs est la façon par laquelle le signal est initié. Contrairement à l'initiation du signal dépendante du ligand dans le cas du BCR, ce n'est encore pas clair si le signal du pré-BCR dépend d'un ligand ou s'il est le résultat d'une agrégation autonome en complexe des molécules de pré-BCR à la surface cellulaire. Certains ligands possibles ont été identifiés sur les cellules stromales, mais les études ont montré que la prolifération et la différenciation des cellules pré-B ne dépendent pas de l'environnement de la moelle osseuse ou du foie foetal *in vitro* (19). L'étude de Ohnishi et Melchers en 2003 a montré que la portion non-immunoglobuline de la composante $\lambda 5$, chargée positivement est fondamentale pour l'initiation de l'agrégation des pré-BCR et du signal (20). De plus en plus d'études montrent que cette portion de $\lambda 5$ est polyréactive et donc permet au pré-BCR d'interagir avec différents substrats comme, l'ADN, l'insuline, le lipopolysaccharide, les galectines (21) et l'héparane sulfate (22). De plus, contrairement au BCR, l'exposition du pré-BCR à des anticorps reconnaissant l'Ig μ ou la SLC n'induit aucun signal et n'affecte pas le développement des cellules pré-B. Au final, l'agrégation autonome du pré-BCR et la liaison de ce dernier aux antigènes du soi fonctionnent de façon synergique et ne sont probablement pas mutuellement exclusives. L'activation du pré-BCR requiert la phosphorylation des motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) de l'Ig α et l'Ig β et la formation d'un complexe de signalisation associé aux radeaux lipidiques membranaires (23). Ce complexe comprend les tyrosines kinases, Lyn, Syk et Btk, la protéine adaptatrice SLP65 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 65kDa) (ou BLNK), la PI3Kinase, Vav et la PLC $\gamma 2$. Syk est fortement activée suite à sa liaison avec les ITAMs phosphorylés et joue le rôle d'une enzyme initiateur du rétrocontrôle positif du signal pré-BCR (24). Les membres de la famille Src,

Lyn, Fyn et Blk semblent augmenter la phosphorylation de l'Igβ et de Syk. Syk est impliquée dans l'activation de la voie Ras/Raf/MEK/ERK qui est essentielle pour induire la prolifération des cellules pré-B (25). De plus, l'activation de Syk induit une activation de la voie PI3K/AKT favorisant également la prolifération cellulaire. Ainsi, ces cellules qui sont en phase d'expansion clonale et de taille plus importante sont nommées grandes cellules pré-B. Cette phase de prolifération est achevée grâce au signal du pré-BCR. En effet, Syk joue aussi un rôle important dans la mise en place du rétrocontrôle négatif *via* l'activation de SLP65. SLP65 est une protéine adaptatrice qui, une fois phosphorylée par Syk, fournit un site de liaison à Btk, PLCγ2 et Grb2 (26). Le recrutement de ce complexe par SLP65 active le signal calcique et la voie NFκB (Figure 5). Il est démontré que le signal médié par SLP65 oriente la cellule pré-B de la prolifération à la différenciation. En effet, des souris *Slp65*^{-/-} développent des leucémies de cellules pré-B (27). L'effet suppresseur de tumeur de SLP65 en coopération avec Btk a été démontré par Kersseboom et al (28). Cet effet de rétrocontrôle négatif du signal prolifératif du pré-BCR est dû en partie à l'inhibition de la voie PI3K/AKT par SLP65 (29).

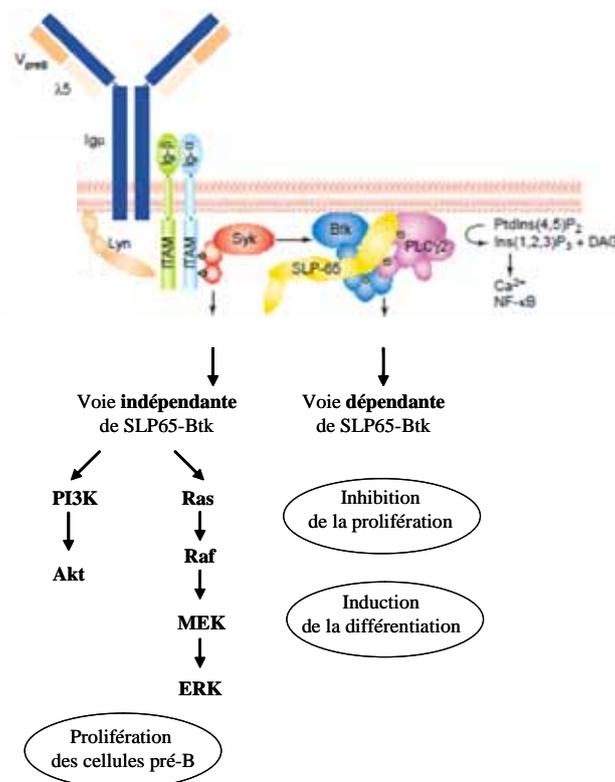


Figure 5: *SLP65 au carrefour de la prolifération et la différenciation, figure adaptée de la référence (29).* La PLCγ2 transforme le phosphatidylinositol 4 ;5 diphosphate (Ptdns(4,5)P₂) en inositol (1,2,3) triphosphate (Ins(1,2,1)P₃) et en diacylglycérol (DAG).

e) La recombinaison de la chaîne légère

On peut spéculer que l'induction du réarrangement de la chaîne légère IgL qui va remplacer la SLC pour obtenir un BCR soit simplement le fruit de la terminaison du signal prolifératif du pré-BCR. Mais de plus en plus de données montrent que le signal pré-BCR est impliqué dans l'initiation du réarrangement de l'IgL. C'est encore la protéine SLP65, activée par Syk, qui diminue l'expression de la $\lambda 5$ signant ainsi la fin de l'expression de la SLC, et qui active la recombinaison du gène de la chaîne κ de l'IgL (30). L'expression de l'IgL requiert l'activité du complexe RAG, l'atténuation du cycle cellulaire et l'activation transcriptionnelle du gène $Ig\kappa$ (31). La réexpression de RAG1 et RAG2 ainsi que l'inhibition du cycle cellulaire semblent être médiés par l'activation du facteur de transcription FOXO-1 induite par SLP65. En effet, SLP65 empêche Akt (AKT) d'induire la dégradation de FOXO-1 et assure donc la mise en route de la machinerie de recombinaison (Figure 6, modèle proposé par Herzog S, (8)). La transcription de l' $Ig\kappa$ est assurée par le facteur de transcription IRF4 (interferon-regulatory factor 4) (32) dont l'expression est aussi sous le contrôle de SLP65 (30).

Comment le complexe dépendant de SLP65 permet-il quelques cycles de prolifération avant l'induction du réarrangement IgL et l'activation de la différenciation ? On peut concevoir que les molécules impliquées dans la prolifération soient constitutivement exprimées alors que l'expression du complexe de pro-différenciation dépend de l'activation de SLP65 et donc du signal pré-BCR.

La recombinaison de la chaîne légère est aussi sujette à l'exclusion allélique. Un des mécanismes qui régule l'exclusion allélique du locus $Ig\kappa$ est la méthylation asymétrique qui rendrait un des deux allèles $Ig\kappa$ plus accessible au réarrangement VJ_{κ} (33).

A ce stade, la cellule exprime un BCR avec deux chaînes lourdes et deux chaînes légères réarrangées et donc passe du stade pré-B au stade B immature. L'expression de ce BCR à la surface va permettre à la cellule B de sortir de la moelle osseuse pour subir sa maturation dans la rate.

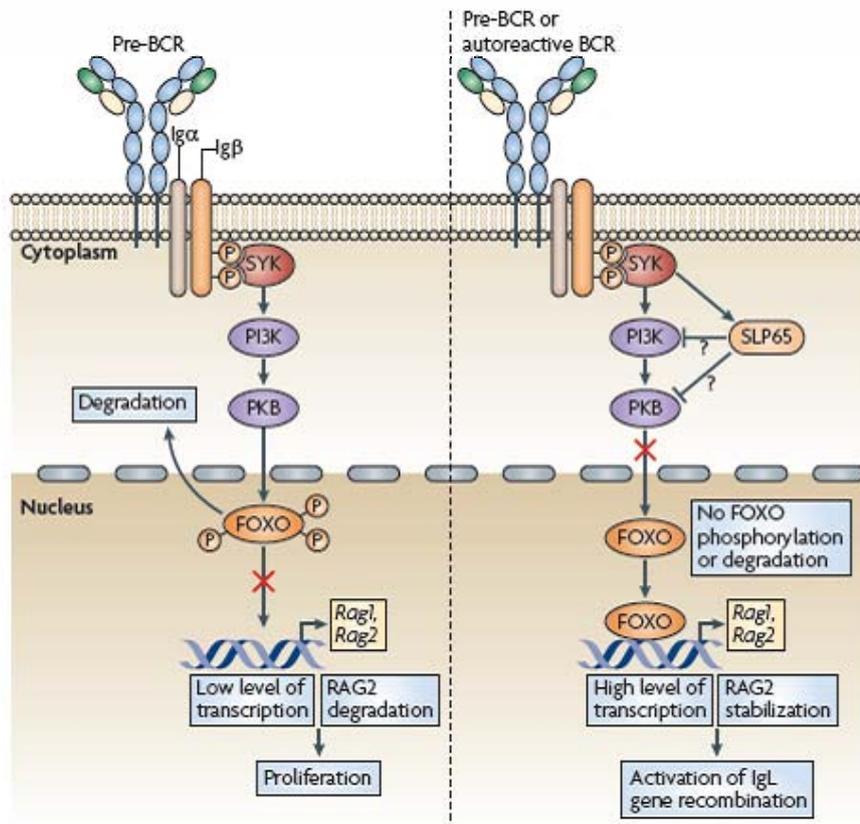


Figure 6 : *Modèle de la régulation de la recombinaison IgL (8).* L'arrêt de la phase de prolifération et l'activation de la recombinaison de l'IgL (chaîne légère de l'Ig) sont régulés par la protéine SLP65. SLP65 est activée par Syk et active le facteur de transcription FOXP1 à travers l'inhibition de la voie PI3K/Akt.

3. Cellule B immature, étape critique de l'adolescence

Le réarrangement de la région variable et la région joining de la chaîne légère achève la formation du BCR et signe la transition des cellules pré-B en cellules B immatures. Les cellules B immatures sont les premières à exprimer un BCR de surface d'isotype IgM, ces cellules restent dans la moelle osseuse 3,5 jours en moyenne avant de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (34). Cependant, le procédé de fabrication de la diversité des cellules B peut générer des cellules B immatures auto-réactives (qui reconnaissent des antigènes du soi). On estime que plus de la moitié des BCR nouvellement formés sont capables de se lier à un auto-antigène (35). Ainsi, un des rôles majeurs du BCR à ce stade est d'éliminer ces cellules à risque. Trois procédés sont envisageables :

- La sélection négative à travers l'induction de l'**apoptose**.
- L'inactivation qui donne lieu à des cellules B **anergiques**: la faible affinité du BCR à l'auto-antigène est insuffisante pour induire un signal de délétion par apoptose et maintient

donc les cellules en un état anergique (36). Ces cellules ont une demie-vie courte comparable à celle des cellules B matures naïves : 2 à 4 jours et pourraient subir la mort induite par les lymphocytes T CD4 dans l'interface splénique (37).

- La **révision du récepteur**: l'expression membranaire d'un BCR auto-réactif conduit à l'internalisation de ce dernier et à l'activation d'un signal intracellulaire qui conduit à la réexpression de RAG1 et RAG2, l'arrêt de la différenciation et l'initiation du réarrangement d'une nouvelle région V κ pour remplacer le V κ J κ original. Contrairement à l'anergisation et à la délétion, la révision du récepteur est un mécanisme de tolérance qui permet aux cellules B d'échanger leur récepteur et donc leur spécificité.

Dans le cas où ces BCR auto-réactifs ne sont pas éliminés d'une manière ou d'une autre, il y a de forte chance que ces cellules soient à l'origine de maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique ou la polyarthrite rhumatoïde. Néanmoins, tous les BCR auto-réactifs ne sont pas délétères pour l'organisme. Par exemple, une certaine proportion de BCR peut se lier aux auto-antigènes avec une très faible affinité ce qui ne permet pas la mise en place de réponse auto-immune. Par contre, ces mêmes BCR peuvent se lier avec une affinité élevée aux pathogènes et exercer ainsi une réponse de défense immunitaire. De plus, le répertoire de BCR généré comprend un nombre non négligeable (6%) de BCR qui défie le dogme de « **un** BCR, une liaison à **un** antigène spécifique ». Ce type de BCR se lie à plusieurs antigènes et/ou auto-antigènes et il est qualifié de « polyréactif » (38).

4. Cellules B transitionnelles, entre adolescence et maturité

Parmi les 2×10^7 cellules B (IgM⁺) qui se développe dans la moelle osseuse murine chaque jour, seulement 10% sortent pour atteindre les organes périphériques. Un tiers de ces émigrés progresse jusqu'au stade de cellules B matures (2). Les cellules B immatures qui quittent la moelle osseuse sont ainsi nommées cellules B transitionnelles et partagent des caractéristiques phénotypiques avec les cellules de la moelle comme la susceptibilité à la sélection négative et l'expression de marqueurs de surface bien définis (39). Loder et *al.* ont été les premiers à proposer une partition des cellules transitionnelles en deux sous populations : T1 et T2 en se basant sur leur phénotype et leur fonction (40). Depuis, d'autres groupes ont confirmé l'existence de ces 2 groupes et ont amélioré leur caractérisation. Les

cellules T1 sont $IgM^{high}IgD^{-}CD21^{-}CD23^{-}$, alors que les cellules T2 sont $IgM^{high}IgD^{+}CD21^{+}CD23^{+}$ (41). Contrairement aux autres isotypes, l'IgD est exprimé grâce à l'épissage de l'ARN, ceci préserve le locus $Ig\mu$ et permet à la cellule B de co-exprimer l'IgM et l'IgD. Le CD21 étant le récepteur au complément et le CD23 le récepteur II au fragment $Fc\epsilon$. Allman et *al.* ont décrit une troisième population non-proliférante appelée T3 qui exprime de faible niveau d'IgM (42). Des études récentes démontrent que cette population cellulaire T3 constitue un compartiment de cellules B anergiques retenues par les auto-antigènes de la rate (43). La localisation géographique diffère entre les 2 populations cellulaires suivant la réponse du BCR et la sensibilité aux chimiokines.

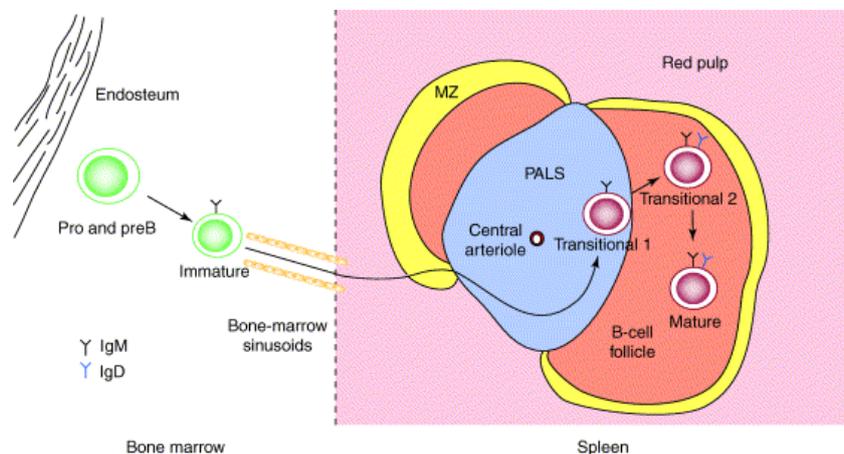


Figure 7: Le trajet des cellules B de la moelle osseuse à la rate (2). A partir de la pulpe rouge (*red pulp*) de la rate, les cellules pénètrent dans la zone marginale (MZ) pour atteindre la zone du PALS (*periarteriolar lymphoid sheath*). Les T1 restent limitées au PALS alors que les T2 migrent vers les follicules (*B-cell follicle*).

Des différences fonctionnelles entre les sous-populations de cellules B transitionnelles marquent l'acquisition progressive de la compétence immunitaire. Alors que les cellules T1 n'arrivent pas à proliférer et rentrent en apoptose suite à une stimulation de leur BCR, la réaction des cellules T2 face à ce signal, reste contestée. Certaines études indiquent que les T2 ont la même réaction que les T1 face à l'engagement du BCR (41, 42), d'autres équipes suggèrent que les cellules T2 sont capables de proliférer et sont résistantes à l'apoptose induite par le signal BCR (40, 44). Ces différences fonctionnelles contradictoires peuvent provenir de la différence des stratégies d'isolement de ces cellules entre les laboratoires.

Néanmoins, certaines de ces études montrent une augmentation de l'expression des protéines de survie dans la population T2. Les études qui montrent que ces cellules T2 prolifèrent fortement et sont sauvées de l'apoptose induite par le signal BCR, pointent l'importance de l'aide apportée par les signaux dépendants des lymphocytes T, comme l'IL4 et le CD40 (41). Ces résultats suggèrent que les cellules T2 sont plus sensibles à la pression de sélection positive que les cellules T1. Les études utilisant le BrdU démontrent qu'il y a une perte de 40 à 50% de cellules entre le stade T1 et T2 et que la proportion de cellules B matures constitue seulement 5% des cellules B immatures formées dans la moelle (42). Cette perte pouvant être due à la sélection négative des cellules T1 mais aussi à la possible migration de ces cellules vers d'autres organes lymphoïdes (45).

Un procédé de sélection impliquant le facteur BAFF (B-cell activating factor, de la famille du TNF) joue un rôle important dans la progression des cellules B transitionnelles. Ainsi, le blocage de la fonction de BAFF avec des inhibiteurs ou en sous exprimant son récepteur (BAFFR), prévient la transition des cellules T1 en T2 (46). Le mécanisme moléculaire de ce blocage est inconnu mais l'inhibition de la voie non canonique de NFκB ainsi que la régulation de l'expression du BCR par BAFF pourrait rendre compte de ce défaut de maturation (47).

Néanmoins, la maturation des cellules transitionnelles est largement dépendante du signal BCR. En effet, la perturbation des différentes composantes de la signalisation du BCR induit des blocages à différents stades du développement des cellules B transitionnelles. Ainsi, les souris déficientes en Lyn (*Lyn*^{-/-}) ne présentent pas de défaut de développement dans la moelle osseuse mais présente un nombre limité de cellules B périphériques avec un blocage entre le stade immature et le stade T1 (48). Des souris dont l'Igα est déficiente de sa queue cytoplasmique (40) ou des souris déficientes en Syk (*Syk*^{-/-}) (49) présentent un blocage en stade T1. De plus, des souris *c-rel*^{-/-} *rela*^{-/-} (composantes de la voie NFκB) ont les mêmes défauts de maturation et présentent un faible niveau de Bcl-2 et un taux élevé d'apoptose qui signe l'échec de la transition T1 à T2 (50). Par contre, des souris *CD45*^{-/-} accumulent les cellules T2 et les souris *CD45*^{-/-} x *SHP-1*^{-/-} conduisent au déblocage des cellules T2 et leur progression en cellules B matures suggérant que ces deux phosphatases exercent un rôle positif et négatif respectivement dans le développement des cellules B (51). Les souris déficientes en SLP-65 présentent un blocage important mais néanmoins incomplet au stade pré-B. Le petit nombre de cellules qui atteint la périphérie est ensuite bloqué au stade T2 (52). Enfin, les défauts en PLCγ, en la sous-unité p85α de la PI3K, en vav, en BCAP (B cell

adaptor for PI3K) ou en Btk empêchent les cellules T2 de progresser vers le stade B mature (2). Cette similitude dans les effets soutient le concept selon lequel PLC γ se trouve au centre de la régulation d'un « signalosome » regroupant toutes ces protéines appartenant à différentes voies de signalisation.

Contrairement aux cellules B matures, les cellules B transitionnelles ne co-agrègent pas leur BCR avec les radeaux lipidiques après stimulation. Ceci indique que l'organisation spatiale du signalosome du BCR est un phénotype acquis, associé à la maturité des cellules B et pouvant constituer un pré-requis pour appartenir à la population de cellules B matures.

En résumé, il est clair que les défauts dans les protéines impliquées dans la signalisation du BCR conduisent à des défauts majeurs dans la transition des cellules B immatures aux cellules B matures.

5. Cellules B matures

Alors que l'effet de la sélection négative est validé en tant que mécanisme principal pour la différenciation des cellules B immatures, un processus de sélection positive semble prédominer pour la différenciation en cellules matures. En effet, ces cellules ne semblent pas être simplement le résultat d'un échappement à la sélection négative mais sont sélectionnées pour être fonctionnelles. Bien que le mécanisme exact de ce processus de tri positif soit sous investigations, il semble que le signal BCR et la spécificité antigénique lui soient intimement associés. En effet, la spécificité du BCR confère à la cellule B mature un avantage compétitif vis-à-vis des facteurs de survie.

Les cellules transitionnelles T2 peuvent se différencier en cellules B folliculaires ou en cellules B de la zone marginale. La majorité des événements de différenciation se fait dans la rate et dépend en partie de la force du signal BCR mais aussi de la participation de Notch2. De plus, la voie canonique NF κ B joue un rôle crucial dans cette étape (53).

Si la différenciation induit la formation d'une cellule de la zone marginale, cette cellule migre vers une nouvelle localisation dans la rate où elle est retenue et acquiert la capacité d'auto-renouvellement et de survie indéfinie. Quant à la cellule B folliculaire, elle a une durée de vie limitée mesurée en semaines. La décision entre les deux sorts est dictée par la force du signal BCR. Un signal faible du BCR induit la formation des cellules de la zone marginale alors qu'un signal fort est requis pour le développement des cellules folliculaires dites de type I (FO-I). Un signal BCR excessivement fort induit la mort des cellules B FO-I.

D'ailleurs, les cellules B folliculaires de type I sont $IgD^{hi}IgM^{low}CD21^{mid}$ et constituent la majorité des cellules matures folliculaires. L'autre population de cellules $IgD^{hi}IgM^{hi}CD21^{mid}$ est appelée cellules folliculaires de type II. Ces cellules FO-II constituent un réservoir pour les cellules de la zone marginale vu leur capacité à reconstituer ce compartiment quand il est déplété par les pathogènes portés par le sang (Figure 8). La grande différence qui sépare les deux populations de cellules folliculaires est la dépendance à l'antigène. En effet, les cellules FO-II se développent à partir de signal BCR « tonique », indépendant de l'antigène contrairement aux FO-I (53).

Plusieurs articles ont montré que toute mutation ou défaut moléculaire induisant une augmentation du signal BCR (déficience en CD22 ou Aiolos...) (54, 55) défavorise la différenciation des cellules de la zone marginale au profit des cellules folliculaires FO-I. Inversement, la formation de cellules FO-I est diminuée dans des souris présentant des défauts dans les voies de signalisation activatrice du BCR (Btk, PLC γ 2, CD45...) (51, 56, 57).

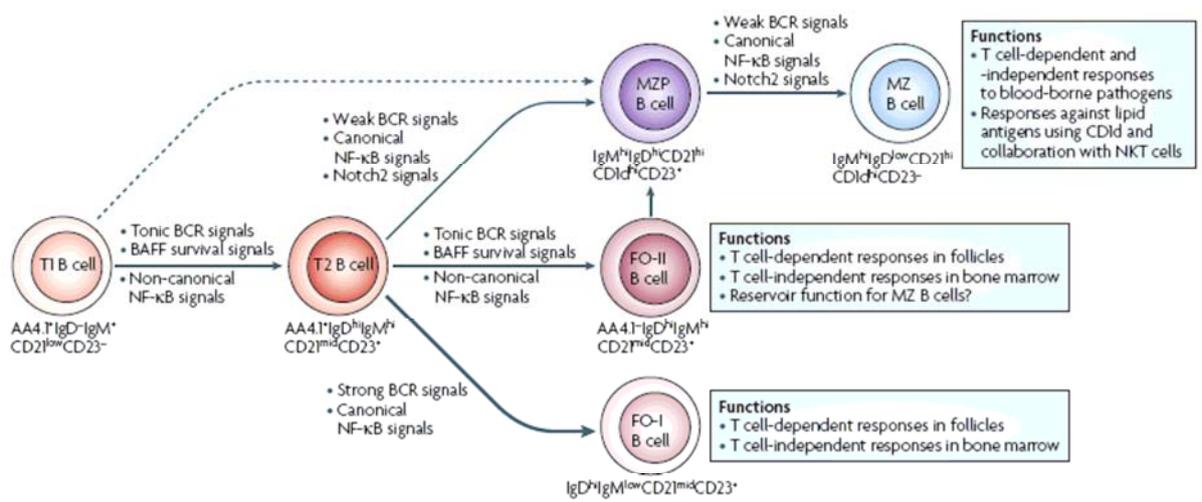


Figure 8 : *Les choix de maturation des cellules B transitionnelles (53):* Les cellules B transitionnelles se différencient en cellules folliculaires de type 1 (FO-I), de type II (FO-II) ou en cellules B de la zone marginale (MZ) en passant par le stade de précurseur des cellules B de la zone marginale (MZP). La force du signal BCR, son indépendance à l'antigène (tonic), le signal de survie BAFF, les voies de NF κ B ainsi que la voie Notch conditionne l'orientation des cellules T1 et T2. AA4.1 est une protéine transmembranaire de type C-type lectin-like présente au niveau des cellules B transitionnelles murines.

6. Cellules stromales et présentation de l'antigène

La suite du développement des cellules B est sous l'influence de deux procédés intimement interconnectés : la rencontre des cellules B avec l'antigène amené aux organes lymphoïdes périphériques (la rate, les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer et les amygdales) à travers le système lymphatique ou sanguin et l'interaction des cellules B avec des cellules stromales ainsi qu'avec des cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T auxiliaires ou les macrophages. La structure des organes lymphoïdes est d'une importance capitale puisqu'elle permet la coopération entre ces différents types de cellules. De façon semblable à l'architecture de la rate, les ganglions lymphatiques sont composés de 3 zones : la medulla, le paracortex (semblable au PALS) et les follicules. Les principales cellules stromales impliquées dans l'initiation et le maintien d'une réponse immunitaire efficace sont les cellules folliculaires dendritiques (FDC) et les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC). Les FDC sont exclusives aux follicules et permettent la migration des cellules B et leur différenciation à travers divers facteurs de survie incluant le signal du BCR, certaines chimiokines, cytokines et molécules d'adhésion. La sélection des cellules B repose sur la compétition pour la liaison de haute affinité avec l'antigène, présenté par les FDC sous forme de complexe immun. Seules les cellules B qui présentent un BCR à haute affinité reçoivent un signal de survie des FDC, capturent l'antigène, l'internalisent et le présentent aux cellules T CD4⁺ qui délivrent à leur tour des signaux de survie et de maturation pour le lymphocyte B (58). Les FRC sont beaucoup moins caractérisées que les FDC. Elles sont majoritairement présentes dans le paracortex où elles constituent grâce à différents composants de la matrice extracellulaire un réseau de conduits qui connecte les vaisseaux lymphatiques afférents aux vénules endothéliales. Ce système permet le transport rapide d'antigènes solubles de la périphérie aux cellules dendritiques (DC). Comme les cellules B rentrent dans le ganglion lymphatique à travers les vénules endothéliales du paracortex, elles peuvent elles aussi migrer tout au long de ces FRC avant d'être attirées vers le follicule de façon dépendante des chimiokines. De façon générale, ces cellules B activées migrent vers le follicule et induisent la formation du centre germinatif (CG) (59).

7. Le centre germinatif, berceau de la mutation hypersomatique et de la commutation de classe

La présentation de l'antigène par les cellules dendritiques provoque l'expression de récepteurs aux cytokines qui vont attirer les cellules B vers une zone de l'organe lymphoïde riche en cellules T (T-cell zone) (60). L'interaction avec les cellules T active pleinement les lymphocytes B qui donnent lieu aux précurseurs-CG et ainsi initie la formation du CG. A ce stade, le follicule se qualifie de primaire et contient des cellules IgM^+IgD^+ parmi un réseau de FDC. Ces cellules B se mettent à proliférer rapidement et induisent la formation d'un follicule secondaire: la zone du manteau autour du futur CG. Après quelques jours d'intense prolifération, la structure du CG apparaît. Celui-ci est composé d'une zone sombre et dense, contenant les cellules proliférantes nommées **centroblastes** et d'une zone claire comprenant des cellules plus petites non proliférantes, les **centrocytes** parmi les FDC, les cellules T et les macrophages. Les études récentes utilisant la microscopie en temps réel *in vivo* ont montré que les cellules de la zone sombre migrent vers la zone claire et inversement. En plus de leur grande capacité à proliférer, les cellules du CG présentent une capacité accrue à répondre aux signaux apoptotiques, ceci pourrait être expliqué par l'absence de protéine de la famille anti-apoptotique Bcl-2 et l'expression élevée de protéines pro-apoptotiques. Le bénéfice majeur de cette nature pro-apoptotique est l'élimination rapide de cellules B à BCR non fonctionnel (61).

Afin d'assurer la suite de la maturation des cellules B, deux phénomènes majeurs touchent les deux régions du CG: la mutation hypersomatique (MHS) et la commutation de classe (CC).

a) La mutation hypersomatique

La mutation hypersomatique (MHS) est un processus qui consiste à modifier la séquence du gène codant pour la région variable réarrangée de l'immunoglobuline (IgV). La MHS constitue la base de la maturation de l'affinité de la réponse immunitaire dépendante de l'anticorps. En effet, la MHS génère un répertoire diversifié d'anticorps et induit une maturation de l'affinité du BCR. Ce procédé requiert l'activité d'une enzyme clé : AID (activation-induced cytidine deaminase) qui catalyse l'événement initiateur de ce processus en désaminant les cytidines de l'ADN conduisant à des cassures double brin de l'ADN (62). Puis, le système de réparation non fidèle « error-prone » répare ce défaut en introduisant des mutations somatiques. Le taux d'échange de nucléotides est de 10^{-3} / paire de base/génération. L'importance fonctionnelle des

centroblastes devient évidente quand on sait que ces cellules du CG sont le berceau de la MHS. En effet, la MHS se produit majoritairement dans la zone sombre du CG où les centroblastes expriment AID.

Il a été démontré, dans des cellules de CG de donneurs sains, que la MHS peut concerner des gènes non-immunoglobuline comme celui de BCL-6. Néanmoins, le rôle fonctionnel de cette mutation n'est pas encore clair (63).

La zone claire du CG est le site de trois principaux procédés de différenciation des cellules B: la sélection des cellules qui produisent des anticorps de haute affinité, la commutation de classe et l'initiation de la différenciation des centrocytes en plasmocytes ou en cellules B mémoires. En effet, un BCR nouvellement muté a besoin d'être testé pour sa capacité à lier l'antigène, ce test se fait dans la zone claire et est médié par des types cellulaires spécifiques à cette zone. La stimulation du BCR associée à d'autres signaux transmis par les cellules T fournit un signal de survie à la cellule B. Par contre, l'échec de la reconnaissance de l'antigène par le BCR induit la mort par apoptose (Figure 9).

b) La commutation de classe

La commutation de classe (CC) est un mécanisme de recombinaison somatique irréversible par lequel les cellules B peuvent échanger leur immunoglobuline de classe IgM et IgD par une IgG, IgA ou IgE, qui ont des fonctions effectrices distinctes. La CC requiert l'expression de AID (64), des domaines différents de cette protéine semblent être impliqués dans la MHS et dans la CC. La combinaison de cytokines spécifiques et de signaux co-stimulateurs détermine la nature de la classe d'immunoglobuline qui va résulter de la CC. En plus du rôle critique de l'interaction CD40-CD154, d'autres récepteurs de surface fournissent des signaux d'induction de la CC comme ICOS (inducible T-cell co-stimulator) et les récepteurs de BAFF : TACI et BAFFR. De plus, le facteur de transcription IRF4 semble réguler indirectement l'expression de AID. Un signal CD40-NF κ B pourrait être à l'origine de la régulation d'IRF4 (61).

Enfin, la CC est activée dans des localisations différentes au sein de la zone claire (Figure 9) du CG, n'est pas temporellement liée à la MHS et ne semble pas conditionner la différenciation en cellules B mémoires ou en plasmocytes.

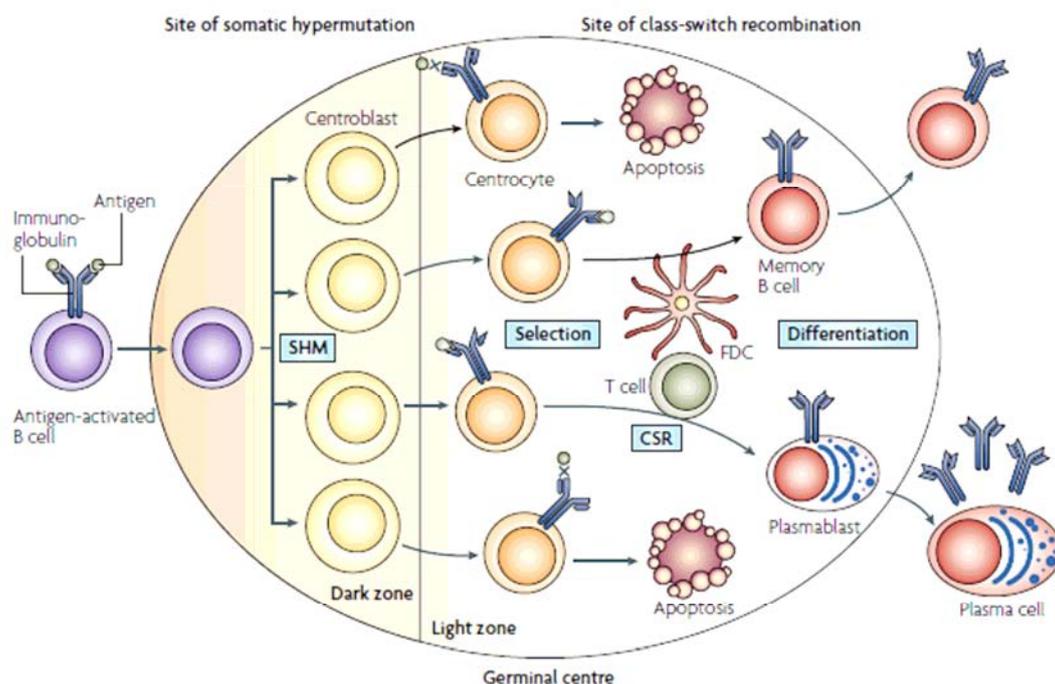


Figure 9 : Représentation des événements se déroulant dans le centre germinatif (61) : SHM: mutation hyper somatique ; CSR : commutation de classe, FDC : cellules folliculaires dendritiques.

8. Différenciation post-CG

Outre le signal du BCR, les signaux requis pour qu'une cellule du CG se différencie en plasmocyte ou en cellule B mémoire sont encore mal connus. Néanmoins, il est connu que l'inactivation du facteur de transcription Pax5 est requise pour la formation des plasmocytes. En effet, Pax5 est essentiel pour maintenir l'identité des cellules B matures comprenant les naïves, les CG et les cellules B mémoires (65). L'inhibition de Pax5 représente le premier pas vers la différenciation plasmocytaire qui résulte en la formation d'un pré-plasmablaste qui sécrète de faibles niveaux d'anticorps. Le deuxième événement requis pour la différenciation post-CG est la diminution de l'expression de Bcl-6. L'engagement du BCR et du CD40 induit l'extinction de Bcl-6 dans les centrocytes (66).

Les événements qui conduisent à la différenciation des cellules B mémoires sont moins connus. La phosphorylation de STAT5 semble réguler la formation des cellules B mémoires à travers la régulation de Bcl-6 (67). Outre l'importance de la présence de Pax5, le rôle de la stimulation du CD40 dans la différenciation d'une cellule CG en cellule B mémoire a été démontré *in vitro* (68) (Figure 10).

Ainsi, les réactions qui se déroulent dans le CG sont essentielles pour l'acquisition de la réponse secondaire. Cette réponse repose donc sur la mémoire immunologique assurée par les cellules B mémoires et les plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Après leur génération dans le CG, les cellules B mémoires rejoignent la population de cellules B circulantes, migrent vers différents tissus et colonisent les sites drainant l'Ag tels que la zone marginale de la rate. La durée de vie des plasmocytes dépend de leur localisation. Le microenvironnement de la moelle osseuse ainsi que l'action des cytokines semblent allonger de plusieurs années la durée de vie des plasmocytes qui sont retournés dans la moelle osseuse.

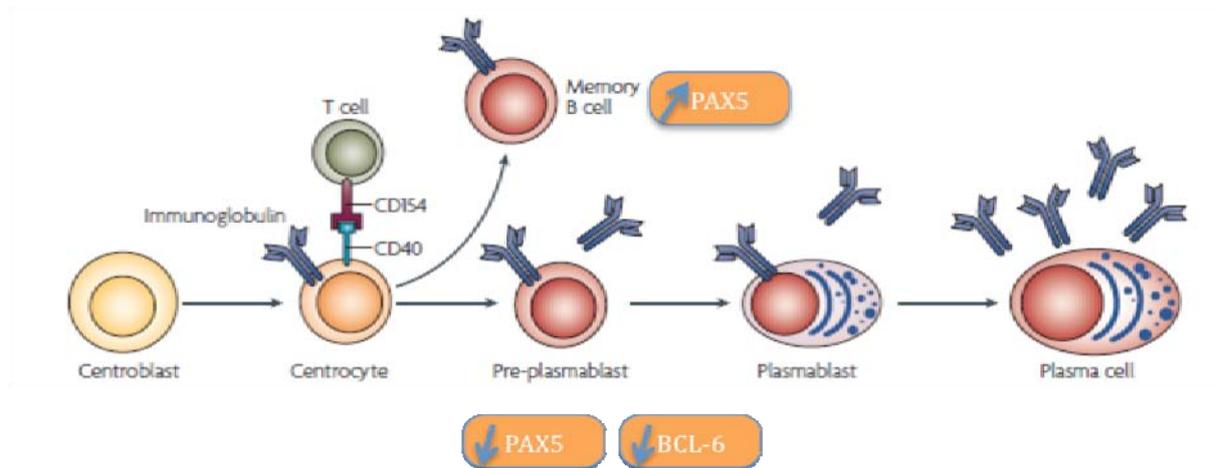


Figure 10 : Le choix entre les cellules B mémoires et les plasmocytes (61).

L'importance capitale de l'expression du BCR dans la survie et la différenciation du lymphocyte B a été démontrée tout au long de ce chapitre. Néanmoins, le rôle que joue le BCR repose sur plusieurs événements cellulaires allant de son expression à la surface, à l'organisation de la plateforme de signalisation jusqu'à son internalisation et la présentation de l'Ag. L'essentiel de ces étapes ainsi que l'implication du BCR dans les pathologies seront présentés dans le chapitre suivant.

II. Le BCR

A. Les événements moléculaires

1. L'adressage du BCR à la membrane plasmique

Comme cela a été décrit précédemment, le BCR est un complexe protéique comprenant la forme membranaire de l'immunoglobuline associée de façon non covalente avec les deux chaînes $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. L'expression de ce complexe est finement régulée au niveau transcriptionnel tout au long de la différenciation du lymphocyte B. Néanmoins, l'expression de ce complexe à la surface cellulaire est aussi contrôlée par des mécanismes post-transcriptionnels. En effet, outre la régulation de la traduction de l'ARNm qui code la forme membranaire de l' $Ig\mu$, le BCR requiert des étapes de repliement et d'assemblage indispensables à son transport et à son insertion membranaire. Ces procédés se déroulent majoritairement dans le réticulum endoplasmique (RE) où les protéines sont généralement modifiées (clivage de signal peptidique, N-glycosylation, formation de ponts disulfure) et repliées avant de passer dans l'appareil de Golgi où se termine leur maturation.

Si l'assemblage et la maturation sont défectueux, le système de contrôle de qualité empêche la production de ces protéines non-natives. Elles seront alors retenues dans le RE où les protéines chaperones prennent en charge leur remaniement afin qu'elles se retrouvent dans une conformation correcte. Parmi les protéines chaperonnes connues pour leur association avec les composants du complexe BCR, on retrouve la calnexine, la calreticuline, BiP (Ig heavy chain binding protein ou GRP78 glucose-regulated protein 78) et la GRP94 (69). Si malgré le contrôle dans le RE, les protéines restent mal assemblées, elles sont alors sélectionnées et envoyées au cytosol où elles seront dégradées par le système ubiquitine protéasome (70). Les chaînes $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ sont aussi essentielles pour l'assemblage correct et le trafic du BCR vers et depuis la membrane plasmique. En effet, des mutations dans des domaines précis de l' $Ig\alpha$ empêchent la liaison de l'Ig au complexe $Ig-\alpha\beta$. Le BCR se retrouve alors incapable de franchir les points de contrôle pour atteindre la membrane, il est très rapidement dégradé par le protéasome (71).

2. Les événements précoces de l'activation de la signalisation du BCR

En l'absence d'antigène, les molécules de BCR paraissent dispersées dans la membrane plasmique. Les études de FRET (fluorescence resonance energy transfer) ont démontré que les BCR sont essentiellement monomériques. Suite à l'engagement par l'antigène, les BCR forment des "clusters" microscopiques puis recrutent la première kinase responsable de la phosphorylation des ITAMS, Lyn. Durant ces dernières années, nous avons acquis beaucoup de connaissances concernant la nature du complexe de signalisation du BCR et comment les composantes du complexe sont reliées aux événements moléculaires en aval. Cependant, les mécanismes qui s'opèrent dans les secondes qui suivent l'engagement du BCR et qui induisent les événements précoces de l'activation de la cellule B restent mal connus. En particulier, il n'existe aucune certitude concernant la façon par laquelle la liaison de l'antigène à l'Ig du BCR transmet cette information à travers la membrane pour induire la phosphorylation des ITAMs de l'Ig α - β par Lyn. Les avancées des techniques d'imagerie de haute résolution appliquées aux cellules vivantes et aux organes intra-vitaux fournissent des outils incomparables pour comprendre ces phénomènes initiateurs.

Traditionnellement, l'étude de l'activation des cellules B s'effectue en utilisant un antigène soluble *in vitro*. Cependant, de nombreuses études ont montré que la cellule B rencontre l'antigène *in vivo* sur la surface des CPA et que le contact entre les cellules B et ces CPA constitue une étape clé dans l'activation de la cellule B. Cet antigène peut être présenté à la surface des CPA à travers des récepteurs qui reconnaissent les complexes immuns tel que les FcR ou les récepteurs au complément.

F. Batista et *al.* ont été les premiers à démontrer que les cellules B sont activées de manière efficace par un antigène natif exprimé sur les CPA *in vitro*. Ils observent que, suite à la rencontre de l'Ag, les cellules B s'étalent en remodelant leur cytosquelette pour augmenter la surface de contact avec l'Ag, puis se contractent et forment une synapse immunologique hautement organisée (Figure 14). Le niveau d'étalement et de contraction cellulaire est proportionnel à la force de l'affinité à l'antigène. La synapse ultimement formée est caractérisée par la présence de plusieurs molécules de BCR (50 à 500 molécules) agrégées en "cluster" central, le cSMAC (central supramolecular activation cluster), entourées par un anneau de molécules d'adhésion comme les intégrines formant le pSMAC (peripheral supramolecular activation cluster) (72) (73). A l'évidence, cette synapse immuologique joue

un rôle majeur dans l'activation de la cellule B. Cependant, l'activation du flux calcique suite à l'engagement du BCR, s'opère plus rapidement que la formation de la synapse, suggérant que cette dernière n'induit pas l'initiation du signal (74).

Plus récemment, la même équipe a analysé l'activation du BCR suite à la rencontre d'un antigène contenu dans une bicouche lipidique fluide. Ils ont démontré que cette bicouche comprenant l'antigène était capable d'induire la formation de "microclusters" de BCR qui migrent par la suite suivant un réseau de cytosquelette d'actine et d'eitrine vers le centre de la zone de contact où ils se concentrent pour former la synapse immunologique (75) (76). Ils ont montré que l'initiation du signal se situe après la formation des microclusters et avant la formation de la synapse immunologique. En effet, le recrutement de molécules de signalisation comme les src kinases, et Syk, suivi par l'activation de PLC γ 2 et vav, joue un rôle majeur dans la promotion de l'étalement cellulaire à travers la régulation du cytosquelette d'actine (77) (Figure 11). La bicouche lipidique mime la membrane des CPA et ce modèle expérimental est actuellement utilisé par d'autres équipes pour étudier les événements précoces de l'activation du BCR.

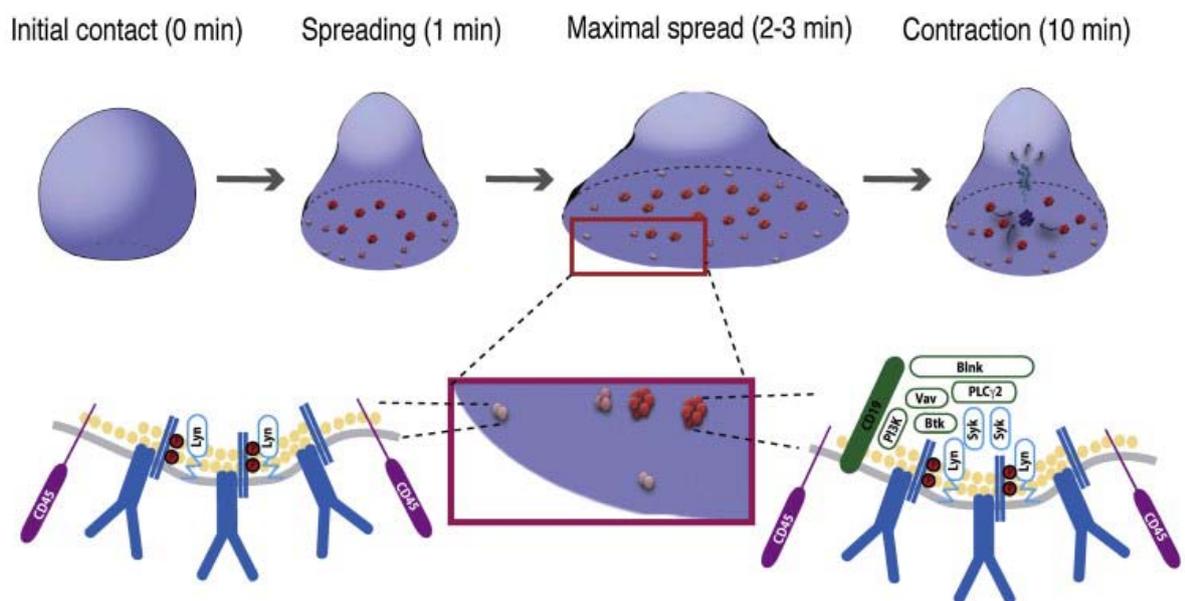


Figure 11: Formation des "signalosomes" de BCR (75): Au repos, les molécules de BCR sont monomériques. La stimulation des BCR induit un étalement de la cellule B (*spreading*) qui augmente la surface de contact de la cellule avec l'antigène. Les molécules de BCR s'agrègent (points rouges). Sous les molécules de BCR agrégés (du côté intracytoplasmique) s'organise un complexe de signalisation comprenant plusieurs acteurs comme Lyn, Syk, PLC γ 2, Vav, PI3K, BLNK (SLP65) et CD19.

Malgré l'avancée remarquable que fournissent ces études sur la compréhension des événements proximaux de l'activation du signal BCR, il reste à savoir par quels mécanismes ces "microclusters" se forment suite à la reconnaissance de l'antigène par la partie extracellulaire de l'Ig. Weber et *al.* suggèrent que la formation de ces "microclusters" est indépendante de la signalisation du BCR puisque des cellules B déficientes en Lyn sont encore capables de former ces "clusters" (77). Cependant, ce phénomène est totalement inhibé après un traitement aux inhibiteurs de la polymérisation de l'actine, démontrant sa dépendance envers le cytosquelette cellulaire (73). D'autres facteurs semblent intervenir dans ce processus. En effet, l'équipe de SK. Pierce a démontré que les régions constantes C μ 4 des IgM sont capables de s'agréger, suggérant que ce domaine est essentiel pour la formation de "microclusters" de BCR (78). Cette agrégation des domaines C μ suivrait une étape d'accumulation des BCR dans des domaines confinés de la membrane plasmiques. Certaines équipes, comme celle de SK. Pierce, postulent que ces domaines confinés sont constitués de radeaux lipidiques alors que d'autres équipes comme celle de F. Batista pointent du doigt l'importance du remodelage du cytosquelette d'actine qui favoriserait le confinement des BCR avant leur "clusterisation" (79).

Ainsi, les premiers événements qui conduisent à l'agrégation des BCR en "microclusters", puis à l'assemblage du complexe de signalisation restent controversés et adhèrent à deux modèles différents:

- Le modèle de **changement conformationnel et translocation dans les radeaux lipidiques** qui postule que l'engagement de l'Ig par l'Ag (présenté par les CPA) conduit à un changement de conformation de l'Ig lui permettant de se lier aux autres Ig (Figure 12). Les domaines transmembranaires des Ig qui constituent les "microclusters" ainsi formés, présenteraient une préférence à l'environnement fourni par les lipides saturés des radeaux lipidiques. En effet, l'équipe de SK. Pierce a largement démontré que le BCR devient associé aux radeaux lipidiques quelques secondes après sa stimulation (80-82). Cette association est transitoire et permet la phosphorylation des ITAMs par Lyn. De plus, la co-stimulation des co-récepteurs activateurs CD19/CD21 prolonge l'association du BCR avec les radeaux lipidiques alors que le co-engagement du co-récepteur inhibiteur Fc γ RIIB bloque cette association (83). Cette même équipe a démontré que la translocation du BCR dans les radeaux lipidiques après stimulation est un phénomène spécifique des cellules B matures. En effet, le

pré-BCR est constitutivement présent dans les radeaux lipidiques et le BCR des cellules immatures ne subit pas de translocation dans les radeaux lipidiques après stimulation (84).

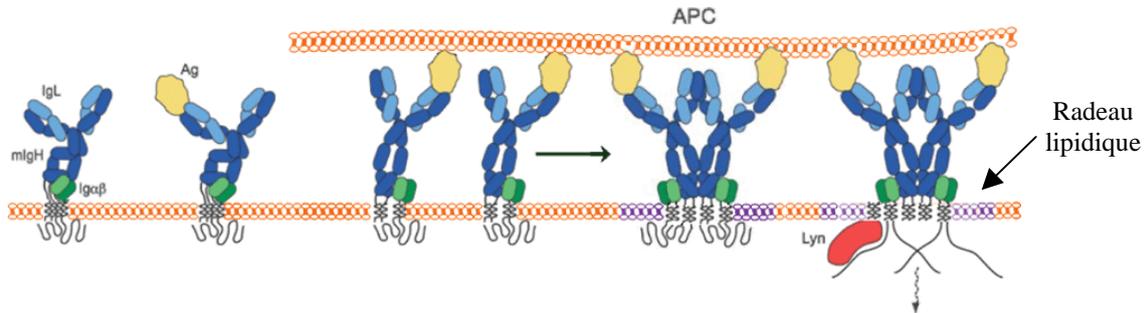


Figure 12: *Modèle de changement conformationnel du BCR et translocation dans les radeaux lipidiques (85):* L'engagement du BCR par un antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigène (APC) induirait un changement de sa conformation. Ce changement lui permettrait de s'autoagréger dans les radeaux lipidiques (en bleu). La kinase Lyn présente au niveau de ces radeaux initie le signal intracellulaire. mIgH (chaîne lourde de l'Ig membranaire); IgL (chaîne légère de l'Ig), Ag (antigène).

- Le modèle de **cinétique de ségrégation** qui a été proposé pour le TCR et qui consiste à décrire le BCR en diffusion libre dans la membrane en absence de stimulation où il peut être phosphorylé ou déphosphorylé selon les liaisons qu'il rencontre avec les kinases ou les phosphatases. La proximité d'une CPA établit la formation d'une zone de contact fermée à travers les molécules d'adhésion et le cytosquelette d'actine. Le BCR serait retenu dans ces zones de contact où les phosphatases CD45 et CD148 seraient exclues, ceci permettant l'activation du signal (Figure 13).

Différentes études apportent des éléments de soutien ou de contradiction aux deux modèles, il est donc probable que l'engagement du BCR induit des changements de conformation de l'Ig lui permettant de s'agrégier grâce à un remodelage du cytosquelette, dans des domaines membranaires à composition lipidique spécifique où la concentration de src kinases et l'exclusion des phosphatases permettent l'activation de la signalisation.

1. Cellule B « au repos »

2. Rencontre avec l'antigène

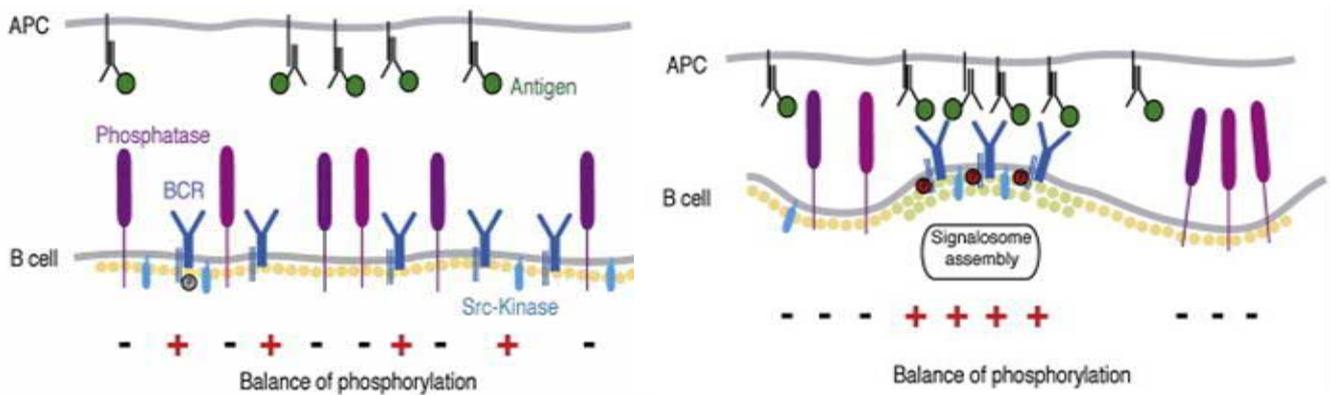


Figure 13: Le modèle de la cinétique de ségrégation du BCR (75): Au repos, le BCR est parmi les protéines phosphatases (batonnet violet) et les protéines kinases (bleu clair), ce qui le maintient en état d'équilibre de signalisation. La liaison de l'antigène (cercle vert) induit une agrégation des BCR dans des domaines riches en protéines kinases et pauvres en protéines phosphatases ce qui permet l'amorçage du signal. Cette ségrégation se fait notamment grâce aux molécules d'adhésion et au cytosquelette d'actine.

3. La signalisation du BCR

La signalisation du BCR est essentielle pour diriger le lymphocyte B au cours de sa différenciation, mais cette signalisation contrôle aussi la réponse immunitaire aux antigènes et permet la survie des cellules B matures. L'information concernant la rencontre du BCR avec l'antigène est envoyée au cytoplasme grâce à l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$, ce qui active la signalisation intracellulaire. L'activation du signal repose essentiellement sur deux protéines tyrosines kinases: Lyn et Syk.

Lyn est une protéine qui appartient à la famille des Src kinases. Elle est palmitoylée et myristoylée en région N-terminal, ce qui permet son ancrage parmi les lipides membranaires. Elle contient également un domaine Src-homology 3 (SH3), un domaine SH2, un domaine kinase catalytique et un domaine régulateur en partie C-terminale (Figure 14). Son activité est régulée par phosphorylation sur des résidus tyrosines (Y). La phosphorylation en Y416 dans le domaine catalytique est activatrice, la phosphorylation en Y527 dans le domaine régulateur est inhibitrice. La phosphorylation en Y527 induit une association intramoléculaire du domaine SH2 et du domaine régulateur conduisant à une conformation inactive de Lyn. La Y416 semble être phosphorylée par autophosphorylation ou par transphosphorylation par les

Src kinases. La Y527 est déphosphorylée par la phosphatase CD45 et phosphorylée par Csk (COOH-terminal Src kinase) (Figure 14) (86). Bien que l'événement initiateur pour l'activation de Lyn soit inconnu, il est fort probable que le rapprochement des différentes molécules de Lyn suite à l'agrégation du BCR stimulé induise l'autoactivation de Lyn par trans-phosphorylation sur le site Y416.

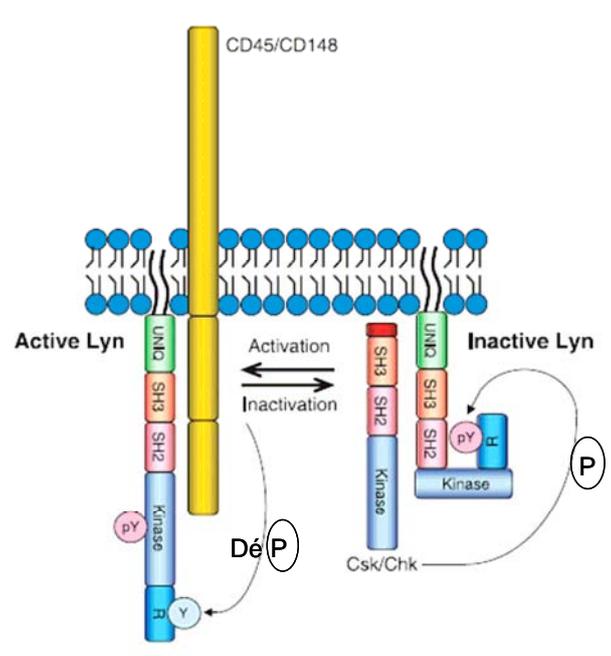


Figure 14: Mode de régulation de Lyn (86): UNIQ (domaine inique); pY (phosphorylation sur tyrosine; P (phosphorylation); déP (déphosphorylation), R (domaine régulateur).

L'activation de Lyn induit très rapidement la phosphorylation des motifs ITAMs de l'Ig α /Ig β . Lyn se lie préférentiellement à l'Ig α à travers le site Y182 qui est un résidu essentiel pour la phosphorylation des ITAMs (87). Les motifs conservés ITAMs jouent un rôle primordial puisqu'ils constituent des sites de liaison pour les tyrosines kinases de la famille Src et de la famille Syk/Zap-70 (88).

Syk est une tyrosine kinase composée de deux domaines SH2 en partie N-terminale séparés par un interdomaine A, et d'un domaine catalytique séparé des domaines SH2 par un interdomaine B. La phosphorylation des ITAMs crée un site de liaison à la tyrosine kinase Syk. Cette liaison entre les tyrosines phosphorylées de l'ITAM et les domaines SH2 de Syk transforme la conformation de Syk et la rend active (Figure 15). L'activation de Syk a pour conséquence le déclenchement d'une cascade d'autophosphorylation qui ont pour rôle de recruter des protéines de signalisation telles que Vav1 et PLC γ 2 (sur Y342), la sous unité

p85 α de la PI3K (sur Y317, 342 et 346) et SLP65 (sur Y624) (89) mais aussi de maintenir l'activation du signal à travers un rétrocontrôle positif de Syk sur les ITAMs (24) (Figure 15).

Ainsi, la phosphorylation des ITAMs dépendantes de Lyn a pour conséquence l'activation de Syk et de la cascade de signalisation qui en dépend. Cependant, certaines études démontrent que Syk peut être activée dans des cellules déficientes en Lyn (90). Les auteurs proposent un modèle selon lequel une partie de Syk est liée à l'hétérodimère I α /I β (91). L'agrégation du BCR suite à la liaison à l'antigène induirait l'activation de Syk qui phosphoryle à son tour les ITAMs. Cette phosphorylation recruterait d'avantage de protéines Syk et permettrait la trans/auto-phosphorylation de cette kinase. Néanmoins, même si Syk est capable d'être activée en l'absence de Lyn, l'effet positif de Lyn sur Syk est largement démontré et reste le mode d'activation le plus largement admis.

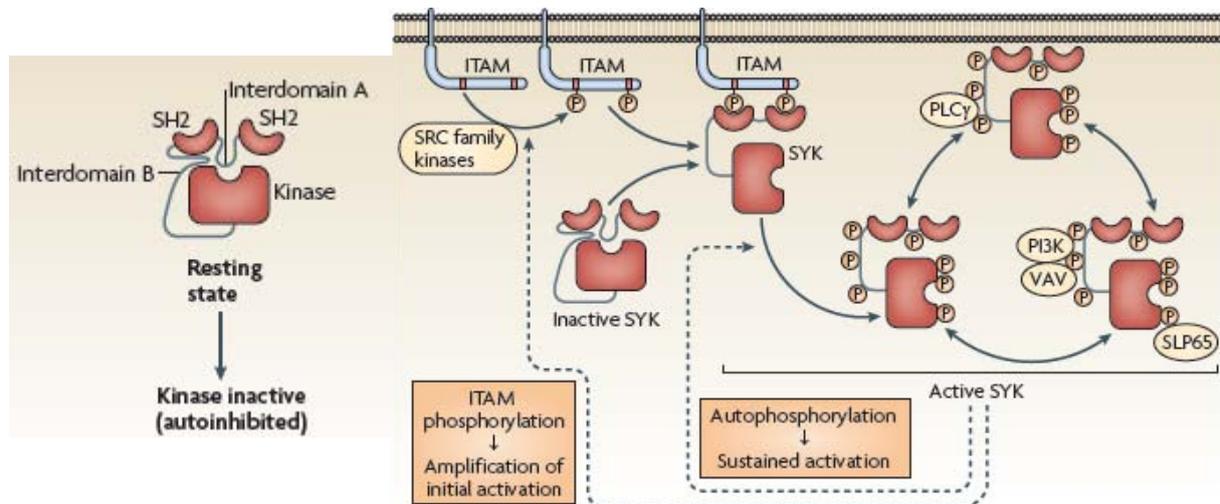


Figure 15: *Mode d'activation de Syk (89):* La phosphorylation des ITAMs par les Src kinases (en particulier par Lyn) permet le recrutement et le changement de conformation et l'activation de Syk. Différents sites de phosphorylation sur tyrosines dans les interdomaines et dans le domaine kinase permettent la liaison aux protéines de signalisation. Cet état d'activation optimale a aussi pour effet la phosphorylation directe des ITAMs par Syk afin d'augmenter le signal BCR.

Les actions concertées de Lyn et Syk sont requises pour l'activation de la protéine Btk. L'activation de Btk propage le signal en aval du BCR, en particulier vers la voie PLC γ 2/calcium (Figure 16).

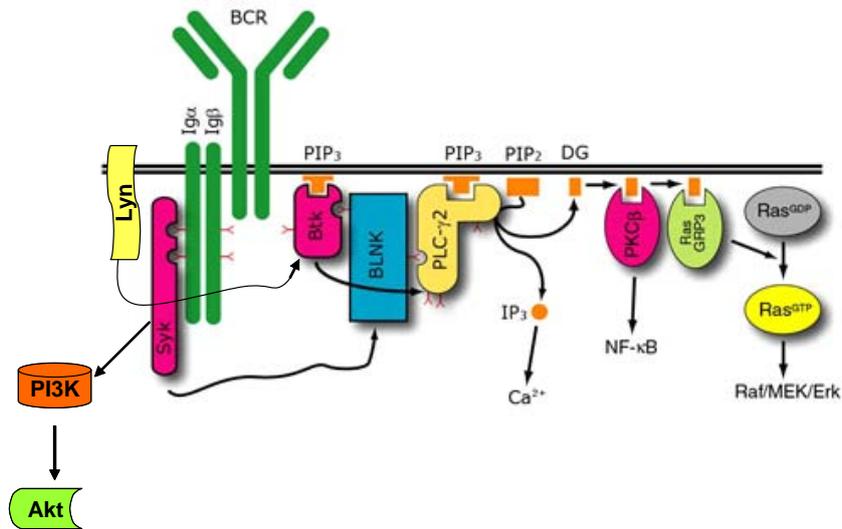


Figure 16 : La cascade d'activation des protéines kinases proximales, figure adaptée de (92): Lyn active Btk par phosphorylation. Syk active phosphoryle SLP65 (BLNK), et la PLC γ 2 ce qui induit la formation d'un complexe sous-membranaire comprenant Btk, SLP65, et PLC γ 2. PIP3 (phosphatidylinositol triphosphate); PIP2 (phosphatidylinositol diphosphate); DG (diacylglycérol), IP3 (inositol triphosphate). La PLC γ 2 fournit du DG et de l'IP3. Le DG participe à l'activation des PKC et donc de la voie Ras/Raf/MEK/ERK et de la voie NF κ B. L'IP3 induit le relargage du calcium intracellulaire. D'autre part, Syk active la voie de prolifération PI3K/Akt.

La PLC γ 2 a besoin d'une autre molécule pour être activée, SLP65 ou (BLNK) qui est un substrat direct de Syk. En fait, SLP65, activée par Syk, fournit un site de liaison à Btk et à la PLC γ 2, ainsi Btk peut phosphoryler PLC γ 2 et l'activer pleinement (93). La protéine Cbl est connue pour réguler négativement Syk en induisant son ubiquitination et sa dégradation. Outre l'effet de cette protéine sur Syk, Cbl agit aussi comme régulateur négatif de PLC γ 2 en inhibant son association avec SLP65 (94). La PLC γ 2 hydrolyse les phospholipides de la membrane plasmique et génère de l'IP3 (inositol triphosphate) et du DAG. L'IP3 se lie à ses récepteurs au niveau du RE et induit ainsi la fuite du calcium du RE. Cette déplétion calcique des stocks intracellulaires est couplée à un flux calcique provenant de l'extérieur de la membrane plasmique. L'élévation du niveau de calcium dans la cellule active, entre autre, la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase qui facilite la translocation nucléaire du facteur NFATc. De plus, un des effets de l'activation de PLC γ 2 est l'activation de la protéine Ras qui active la voie des MAPK et en particulier ERK1/2.

L'activation de Syk et PLC γ 2 a des conséquences importantes sur la voie NF κ B à travers l'activation des PKC (protéines kinase C), en particulier la PKC β qui régule le complexe BCL10/MALT1/CARMA/IKK et ainsi active NF κ B (Figure 16).

En résumé, la signalisation enclenchée par l'engagement du BCR met en jeu une multitude de molécules et de voies de signalisation allant de la membrane plasmique

jusqu'aux facteurs de transcription. Ces voies de signalisation sont bien souvent interconnectées et exercent entre elles des réactions de rétro-contrôle finement régulées. Un schéma représentant la complexité de cette signalisation est présenté dans la Figure 17.

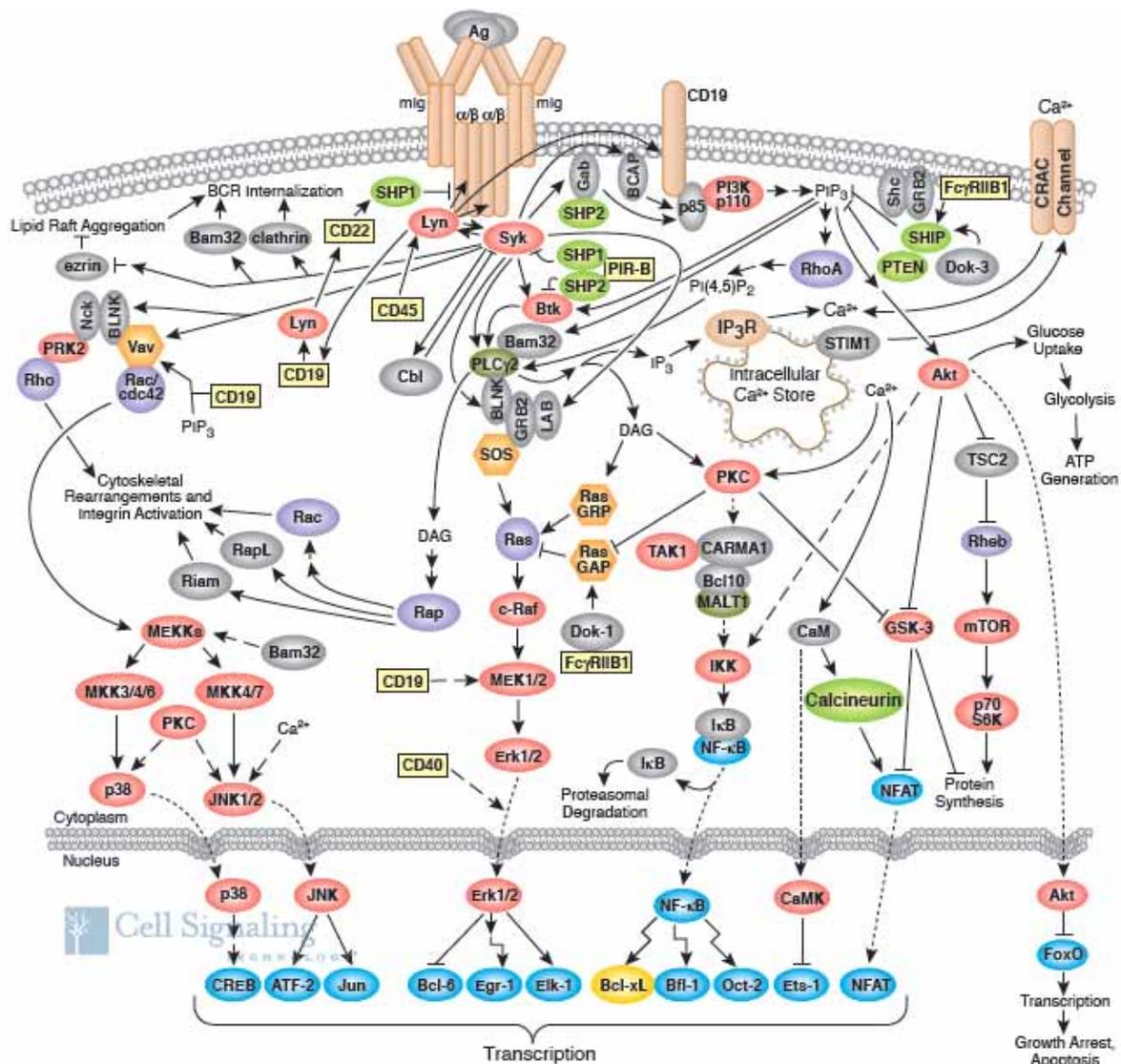


Figure 17 : La complexité de la signalisation du BCR (95) : Ce schéma a pour but de représenter et de manière non exhaustive la complexité de la signalisation du BCR qui met en jeu toute sorte d'acteurs protéiques. Les protéines kinases (rouge), les protéines phosphatases (vert), les protéines adaptatrices (gris), les GTPases (violet), les facteurs de transcription (bleu), les co-recepteurs membranaires (carré jaune), les GTPases activating proteins et les guanines exchange factors (hexagone orange). Toute cette signalisation a pour but de transmettre le signal de la stimulation antigénique au noyau. La transcription de certains gènes va orienter la cellule B vers la prolifération, l'apoptose ou la différenciation. L'autre rôle de cette signalisation complexe est la mise en place d'une régulation fine de l'intensité du signal BCR.

4. Le co-récepteur CD19 et l'amplification du signal

A côté des protéines cytoplasmiques et sous-membranaires, des protéines de signalisation transmembranaires (PST) participent à l'activation du signal BCR et à sa propagation. La PST qui joue le rôle le plus important est le co-récepteur CD19, une glycoprotéine exprimée depuis le stade pré-B jusqu'au stade plasmocytes. Le CD19 est présent à proximité du BCR parmi un complexe comprenant les co-recepteurs CD21, CD81 et leu-13. CD21 est le récepteur du produit clivé du complément (C3d). Lorsque le complexe CD19/CD21 est co-engagé avec le BCR par un antigène couplé à C3d, le seuil d'activation du BCR est réduit de 10^4 fois (96). Le CD19 est ainsi rapidement phosphorylé et régule le signal BCR en amplifiant l'activation des tyrosines kinases et des effecteurs moléculaires en aval. En effet, suite à l'engagement du BCR, Lyn se lie à la queue cytoplasmique de CD19 et la phosphoryle, cette liaison lève l'auto-inhibition de Lyn et la rend complètement active, ce qui a pour conséquence l'amplification du signal BCR. La queue cytoplasmique phosphorylée du CD19 recrute les protéines Vav ainsi que la sous-unité p85 de la PI3Kinase. Vav, une protéine de la famille des facteurs d'échange de guanine est responsable de l'activation de RAC1, une molécule impliquée dans le remodelage du cytosquelette mais aussi dans l'activation de p38MAPK. La PI3K génère du PIP3 contribuant à l'accumulation de Btk, Vav et PLC γ 2 à la face interne de la membrane plasmique. Cette augmentation de la concentration de protéines localisées au niveau des radeaux lipidiques constituerait une boucle d'amplification par laquelle le seuil d'activation des molécules de BCR des cellules matures serait réduit (26). Cependant, l'affinité entre le co-récepteur CD19/CD21 et les radeaux lipidiques est très faible. Pour stabiliser cette association, CD81, un élément du complexe, serait palmitoylé en conséquence de la co-ligandation du BCR et du couple CD19/CD21. L'interaction entre CD81 et CD19 l'emmène dans les radeaux lipidiques et optimise ainsi l'activation du signal BCR (97).

Bien que contradictoire selon le stade de maturation du lymphocyte B, le rôle de la phosphatase membranaire CD45 est établi en ce qui concerne sa participation à l'activation de PI3K, ERK1/2 et NF κ B après stimulation du BCR (98). En effet, cette phosphatase contribue à la régulation positive du signal BCR dans les cellules B matures en agissant sur les phosphorylations inhibitrices des src kinases contrairement aux cellules B immatures où elle exerce un effet inhibiteur sur les protéines tyrosines kinases et en particulier sur Lyn (99).

5. Rétrocontrôle négatif du signal BCR

La réponse immunitaire exagérée des cellules B et la sécrétion d'auto-anticorps sont observées dans des cas de mutations de perte de fonction dans les gènes qui codent des molécules impliquées dans la régulation négative du signal BCR. Au niveau cellulaire, deux différents modes de régulation négative peuvent être observés : le rétrocontrôle négatif immédiat qui s'opère quelques minutes après la perception du signal et le rétrocontrôle négatif retardé qui met en jeu une synthèse *de novo* de régulateurs négatifs.

Concernant la réponse rapide, divers exemple de régulation peuvent être cités parmi lesquels la capacité que a la PKC β à réguler négativement Btk qui est à l'origine de l'activation des PKC après l'engagement du BCR. Mais la boucle de régulation négative la plus connue est celle qui agit directement sur le couple ITAM/Syk. Cette boucle met en jeu la tyrosine phosphatase SHP-1 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase) qui se lie aux motifs ITIMs des co-récepteurs du BCR, le CD22, le CD72 ou PIR-B (paired immunoglobulin like receptor-B) (100). En effet, les PST qui entourent le BCR possèdent soit des motifs ITAMs qui recrutent des protéines kinases pesant en faveur de l'augmentation du signal BCR, soit des motifs ITIMs qui recrutent des phosphatases comme SHP-1 et SHIP agissant en faveur d'une inhibition du signal. A ce jour, il a été recensé plus de PST négatifs que positifs pour la régulation du BCR. Les PST négatifs sont le récepteur FC γ RIIB1, une molécule d'adhésion CD22, le récepteur PIR-B, CD5, CD72 et PD-1 (Figure 18).

De façon surprenante, il a été montré que Lyn exerce un effet de rétrocontrôle négatif du signal BCR à travers ces PST. La dualité fonctionnelle de Lyn a été illustrée par les phénotypes des souris déficientes pour Lyn. En effet, les souris « knock-out » Lyn $^{-/-}$ présentent un développement normal des cellules pro-B dans la moelle mais un déficit en cellules B matures périphériques (48). Ce résultat confirme le rôle positif qu'exerce Lyn sur le BCR. Cependant, de façon inattendue, les quelques cellules B périphériques formées dans ces souris produisent des auto-anticorps et les souris développent des glomérulonéphrites. La production d'auto-anticorps provient de cellules B auto-réactives qui ont échappé à la sélection négative médullaire. En effet, dans une cellule B immature Lyn $^{+/+}$, la stimulation du BCR conduit à l'apoptose alors que dans les cellules B Lyn $^{-/-}$, le BCR est incapable de déclencher cette signalisation appropriée pour éviter l'auto-réactivité. Ces études révèlent donc que Lyn peut exercer un effet inhibiteur sur le BCR, illustré par son rôle d'augmentation du seuil d'activation du BCR dans les cellules B immatures. Il a été compris plus tard que Lyn

exerçait son rôle de rhéostat à travers la phosphorylation des motifs ITAMs et ITIMs des PST (101).

Ainsi, Lyn phosphoryle les motifs ITIMs du FC γ RIIB1 qui recrute SHIP ce qui induit le blocage de la voie PI3K/Akt. Lyn phosphoryle aussi le motif ITIM du CD22 qui recrute SHP-1, qui déphosphoryle Syk ainsi que les ITAMs de l'Ig α /Ig β induisant l'extinction du signal BCR depuis son sommet. SHP-1 est capable d'enlever un groupement phosphate sur un ITAM plus rapidement que Syk ne peut en mettre (102). Néanmoins, pour permettre l'initiation du signal positif, l'engagement du BCR est très rapidement suivi d'une production massive de H₂O₂ (en partie dépendante du flux calcique) qui induit une oxydation réversible des tyrosines phosphatases et empêche alors SHP-1 d'agir négativement sur les ITAMs (103). PIR-B exerce aussi son effet inhibiteur sur la voie PLC γ 2 *via* le recrutement de SHP-1 (104). Enfin, les mécanismes d'inhibition qu'utilisent CD5, CD72 et PD-1 ne sont pas parfaitement connus.

L'exemple de régulation négative retardée concerne la dégradation du facteur de transcription Bcl-6 qui favorise l'expression des gènes codant pour des protéines de la signalisation du BCR comme Btk, PKC β , Lyn, Syk, CD45 et CD21. La dégradation de Bcl-6 se fait grâce à sa phosphorylation dépendante de ERK (105).

Ainsi, la nature des protéines recrutées par les PST sur les motifs ITAMs ou ITIMs fait basculer la signalisation du BCR vers l'activation ou l'inhibition respectivement.

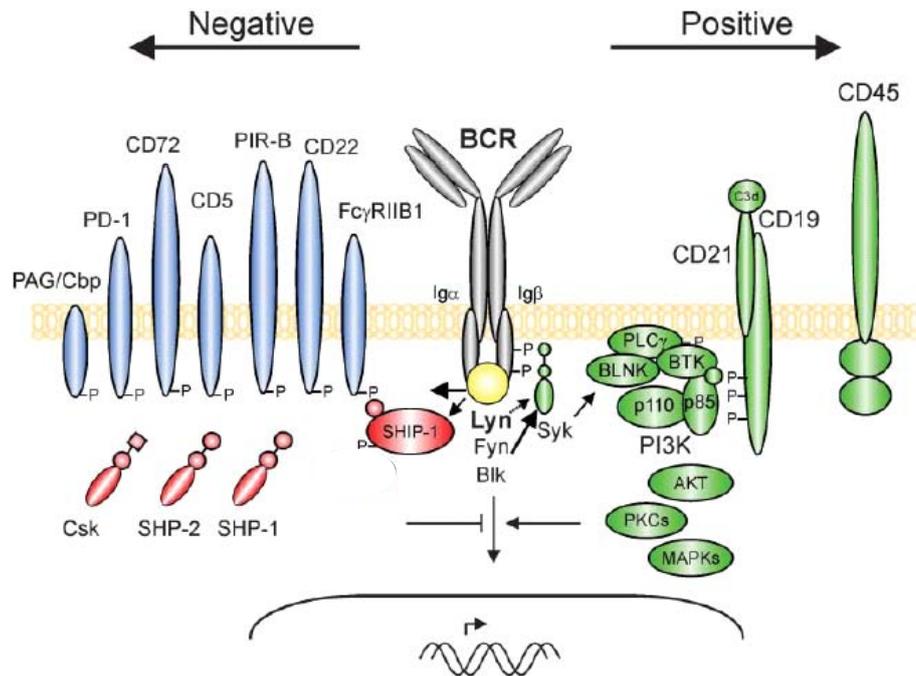


Figure 18: Les PST ou co-récepteurs du BCR (101): Les PST qui participent à l'activation du signal sont en vert au niveau de la membrane plasmique. Les PST qui participent à l'inhibition du signal sont en bleu. Lyn exerce un rôle duel en phosphorylant les ITAMs dans un premier temps puis les ITIMs pour inhiber le signal. Les phosphatases SHP-1, SHP-2 et SHIP-1 sont recrutées aux motifs ITIMs des PST (comme CD22 et FcγRIIB1) ce qui les active. L'activation des phosphatases exerce un effet inhibiteur très puissant sur la signalisation du BCR en déphosphorylant les ITAMs mais aussi les protéines kinases activatrices du signal. L'inactivation de Lyn par Csk requiert son interaction avec PAG/Cbp au niveau membranaire. P : représentation schématique des sites de phosphorylation des PST négatifs et de l'ITAM du CD19.

6. Implication de l'isotype de l'Ig dans la signalisation du BCR

Comme il a été déjà décrit dans le chapitre précédent, l'IgM et l'IgD subissent une commutation de classe dans le CG qui échange leur IgM et leur IgD en une IgG, IgE ou une IgA. Ces isotypes diffèrent au niveau structural par la taille de leurs domaines intracytoplasmiques. L'IgM et l'IgD possèdent seulement 3 acides aminés (aa) en partie intracytoplasmique et transmet le signal à travers l'hétérodimère Igα/Igβ. L'IgE et les différentes sous-classes d'IgG possèdent 28 aa. L'IgA en possède 14. La queue cytoplasmique qui caractérise l'IgG, l'IgE et l'IgA est hautement conservée et possède un résidu tyrosine qui a toujours été suspecté pour jouer un rôle important dans la signalisation du BCR. La nature des différences de signalisation entre les différents isotypes est restée longtemps inconnue. La manipulation génétique des isotypes BCR de souris a démontré que l'expression de la partie cytoplasmique de l'IgG confère un signal BCR plus fort que celui fournit par l'IgM (flux calcique et activation de ERK supérieurs) (106). De plus, il a été

récemment démontré que la partie intracytoplasmique de l'IgG fournit un signal plus fort en évitant la régulation par le CD22. La phosphorylation du CD22 par Lyn habituellement observée dans les cellules exprimant une IgM ou une IgD n'est pas observée dans les cellules exprimant une IgG. De fait, le recrutement de la protéine phosphatase SHP-1 ne s'effectue pas et l'inhibition du signal est ainsi fortement affectée (106). De plus, Engels et *al.* ont démontré que la tyrosine conservée dans le partie intracytoplasmique est phosphorylée suite à la stimulation antigénique et ainsi recrute une protéine adaptatrice Grb2 qui participe à l'amplification du signal (107). En résumé, malgré l'utilisation de la même machinerie de signalisation, des différences existent entre le signal d'une IgM et celui d'une IgG et des études plus approfondies sont nécessaires pour éclaircir la fonction exacte de chacune de ces différences.

7. Internalisation du BCR et présentation de l'antigène

Bien que nécessaire pour l'activation du lymphocyte B, la signalisation du BCR n'est pas suffisante à elle seule pour induire la prolifération et la différenciation des cellules B. La réponse de la cellule B envers la grande majorité des antigènes requiert l'interaction avec des lymphocytes T spécifiques de l'antigène (108). Cette interaction dépend de la transformation de l'antigène en petits peptides, le "processing", et de la présentation de l'antigène par les cellules B aux cellules T. De plus en plus d'études montrent que la signalisation et la présentation de l'antigène sont deux fonctions interconnectées du BCR. La reconnaissance de l'antigène par le BCR induit une internalisation rapide du récepteur engagé, un "processing" de l'antigène et sa présentation au CMH de classe II (109) (Figure 19). L'internalisation semble aussi réguler la signalisation puisque les BCR internalisés sont dégradés. En effet, le niveau de signalisation du BCR augmente dans des souris exprimant une Ig β portant une mutation dans son motif responsable de son internalisation (110). Les BCR non engagés sont continuellement recyclés à travers une internalisation dépendante des puits de clathrine. Cette internalisation dépend des motifs ITAMs de l'Ig α /Ig β . Ces BCR internalisés sont rapidement recyclés dans les endosomes précoces pour être réexprimés à la surface cellulaire. Les BCR engagés forment des agrégats à la surface, ce phénomène est décrit sous le nom de "capping" et sont ensuite internalisés de façon dépendante ou indépendante des puits de clathrine quelques minutes après la rencontre avec l'antigène. Comme déjà décrit précédemment, la liaison du BCR est très rapidement suivie par sa translocation dans des domaines membranaires riches en cholestérol (111) et un remodelage important du cytosquelette

d'actine (112). Cependant, la localisation du BCR dans les radeaux lipidiques n'est pas suffisante pour induire l'internalisation mais fournirait un environnement favorable pour l'association du BCR avec le cytosquelette et une souplesse pour l'invagination membranaire (82). Ainsi, les événements initiateurs de l'internalisation du BCR dépendent de la collaboration entre les trois éléments suivants: la localisation dans les radeaux lipidiques, la signalisation et le cytosquelette d'actine mais aussi de la nature de l'antigène qui se lie au BCR. En effet, des études décrivant l'internalisation du complexe BCR/antigène ont fourni des résultats contradictoires avec d'autres équipes qui elles, ont décrit l'internalisation du complexe BCR/ anticorps anti-BCR.

Suite à son internalisation dans les endosomes précoces, le BCR transite vers les endosomes tardifs qui sont enrichis avec le complexe CMH de type II. Ces compartiments Lamp-1⁺ sont riches en cathepsine, thiol reductase et d'autres molécules requises pour le "processing" de l'antigène (109), c'est-à-dire la réduction de l'antigène en petits peptides. Le CMH se lie à l'antigène "processé" et est exporté à la surface cellulaire vers des domaines membranaires optimaux pour la reconnaissance par les lymphocytes T (Figure 19).

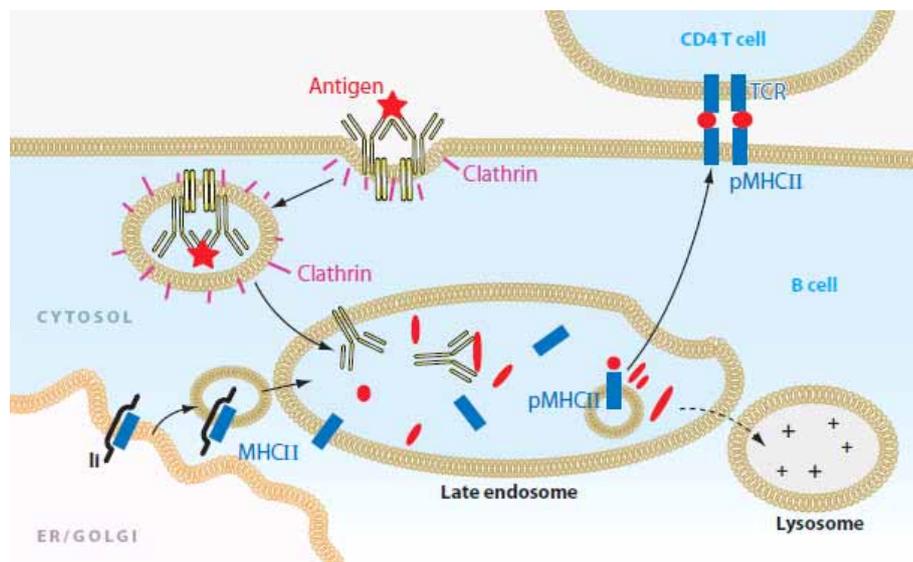


Figure 19 : *L'internalisation du BCR et la présentation de l'antigène (113)*. La stimulation du BCR induit son internalisation, en partie grâce à la formation de puits de clathrine. Ensuite le BCR est véhiculé vers les endosomes tardifs où l'antigène est réduit en petits peptides. Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHCII) est aussi transporté vers les endosomes tardifs et a comme rôle de transporter les peptides antigéniques vers la membrane plasmique afin d'être reconnu par le récepteur à l'antigène des lymphocyte T CD4.

B. Le BCR Tonique

1. Preuve du concept

L'idée du BCR silencieux en absence de ligand a toujours été trop simpliste aux yeux des spécialistes du domaine (114) jusqu'au jour où l'équipe de Michael Reth a démontré par une expérience simple l'existence d'un bruit de fond de signalisation en l'absence de ligand. Cette étude a démontré la génération d'un profil de phosphotyrosine identique à celui observé après stimulation du BCR grâce à un traitement des cellules B avec l'orthovanadate, un inhibiteur de phosphatase (115). Cette expérience a ainsi démontré que le BCR existe dans un complexe qui génère constitutivement un signal basal qui est stabilisé par les tyrosines phosphatases. Pour confirmer l'indépendance potentielle au ligand du pré-BCR, d'autres études utilisant des constructions d'Ig incapables de se lier à un ligand, ont montré que le complexe pré-BCR/Ig α -Ig β génère un signal indépendamment de ligand conventionnel (116, 117). Afin d'exclure la possibilité d'une interaction entre l'ectodomaine de l'Ig α /Ig β et un ligand extracellulaire, Bannish et *al.* ont généré des cellules qui expriment une forme d'Ig α /Ig β qui est capable de s'insérer dans la partie interne de la membrane plasmique. Ce complexe n'a donc pas la capacité de se lier à des ligands extracellulaires mais, une fois exprimé *in vivo* dans des souris qui présentent un défaut de différenciation du stade pro-B au stade pré-B, ce complexe permet la différenciation jusqu'au stade transitionnel périphérique (118). Ces résultats, ainsi que d'autres (119), démontrent que le signal tonique existe et qu'il requiert la localisation membranaire du complexe Ig α /Ig β . L'ablation de l'Ig α ou de l'Ig β ou de leur motif ITAM compromet la survie indépendante du ligand des cellules B (120) (121). Par la suite, l'équipe de H. Jumaa a démontré que la chaîne lourde μ HC de l'Ig est capable d'induire un signal autonome indépendant du ligand et que ce signal est inhibé par la chaîne légère de l'Ig suggérant que l'Ig et non seulement l'Ig α / β est capable d'initier un signal tonique du BCR (122). La question est de savoir si le signal tonique est directement lié à la survie cellulaire ou s'il opère indirectement en maintenant l'expression de certaines molécules de survie. En 2008, l'équipe de M. Cancro a démontré que le signal tonique du BCR induit la production de p100, substrat de NF κ B, requis pour la survie des cellules B, induite par le récepteur BAFFR (123).

L'augmentation du niveau de la signalisation tonique du BCR à travers l'altération des processus quantitatifs et/ou qualitatifs qui initie ce signal, pourrait engendrer un signal

semblable à celui dépendant du ligand et dévier la fonction propre au signal tonique qui semble nécessaire pour la survie des cellules B.

2. Modèles proposés

Trois modèles sont proposés pour expliquer le mécanisme de génération du signal tonique du BCR (124).

- **L'auto-agrégation et l'oligomérisation constitutive stable** (Figure 20a) : ce modèle suggère la présence du BCR sous forme oligomérique grâce à des interactions entre résidus conservés de la partie transmembranaire de l'Ig. En effet, des mutations dans ces parties de l'Ig affecte le signal tonique du BCR. Néanmoins, les études qui ont suivies ont indiqué, grâce aux analyses de FRET, que les complexes contenant l'IgM ou l'IgD existent sous forme monomérique (125) et que des agrégats d'Ig α -Ig β n'existent pas en absence de ligand (126).

- **La localisation constitutive dans les radeaux lipidiques** (Figure 20b) : l'hypothèse selon laquelle le BCR serait constitutivement localisé dans les radeaux lipidiques, ce qui induirait un signal tonique, a été proposée. Guo et *al.* décrivent que 20 à 30% de l'Ig μ sont constitutivement associés aux radeaux lipidiques dans les cellules pré-B (23). Mais ce résultat est à considérer avec précaution puisque ce chiffre englobe toutes les Ig μ incluses dans la fraction insoluble aux détergents et donc pourrait contenir les Ig μ qui sont dans les radeaux lipidiques du RE et du Golgi. D'autre part, la responsabilité d'une localisation stable dans les radeaux lipidiques dans la génération du signal tonique est peu probable compte tenu que les cellules B exprimant les constructions codant pour les parties cytoplasmiques d'Ig α /Ig β , ciblées soit vers les compartiment radeaux lipidiques ou non-radeaux lipidiques, montrent un signal tonique de la même amplitude (118). Même si le BCR est retrouvé associé aux radeaux lipidiques indépendamment de la présence d'un ligand, cette localisation ne semble pas être nécessaire pour la mise en place du signal tonique.

- **L'équilibre entre les activités des tyrosines kinases et des tyrosines phosphatases** (Figure 20c): le mécanisme probablement responsable de l'initiation et de la régulation du signal tonique du BCR repose sur l'équilibre de l'état de phosphorylation des ITAMs de l'Ig α /Ig β associé au BCR mature. Cet équilibre, qualifié par John G. Monroe

d'homéostatique, est basé sur la balance entre les activités des kinases et des phosphatases associées au BCR. En effet, la déficience en SHP-1 ou en CD22 est associée à une hyperactivité du BCR même en absence d'antigène qui témoigne de son activation chronique (100). Le signal tonique serait généré pendant l'intervalle entre la phosphorylation stochastique de l'Ig α/β et la déphosphorylation par les phosphatases de ce complexe. Le résultat de ce cycle serait une activation aléatoire et transitoire du signal, indépendante de la présence d'un ligand.

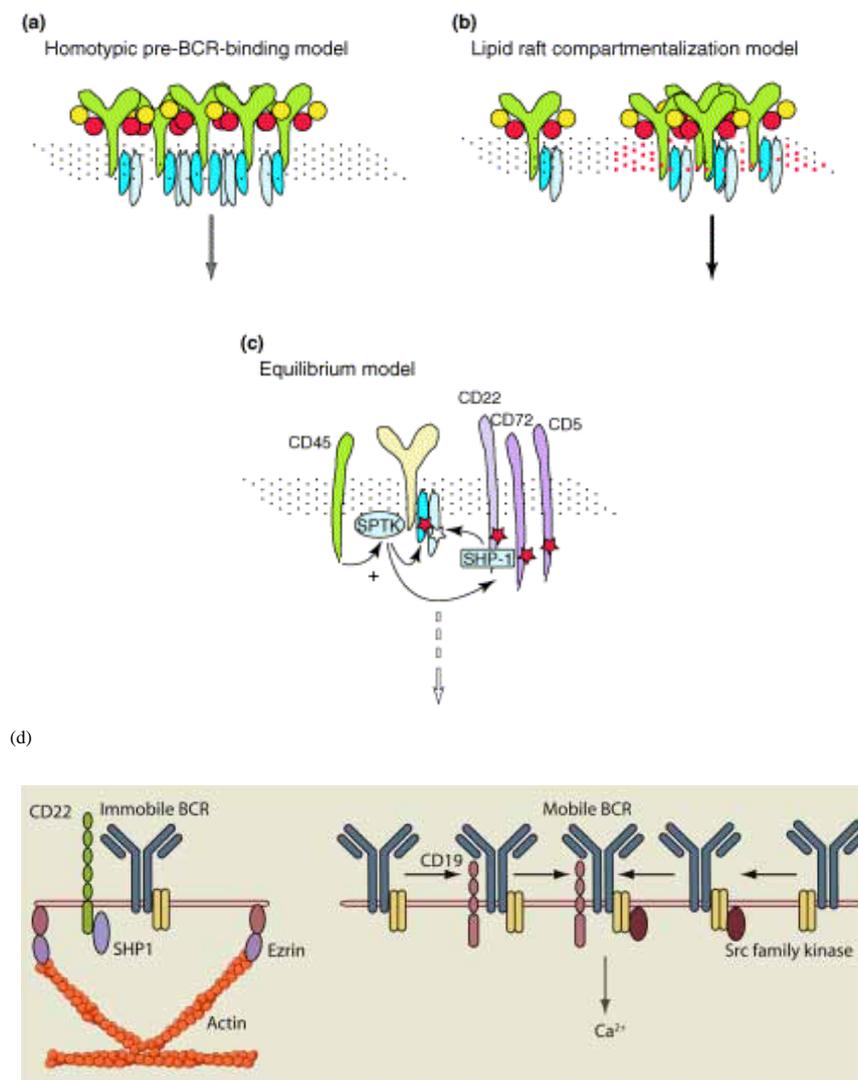


Figure 20 : *Modèles proposés pour la génération du signal tonique du BCR* (a) : Ce modèle suggère l'agrégation des molécules BCR grâce à des domaines transmembranaires des Ig, ce qui induirait un signal de base indépendant du ligand. (b) : le modèle de présence constitutive dans les radeaux lipidiques (points rouges) a aussi été proposé. (c) : le modèle le plus probable est celui qui propose que le signal tonique provient d'un équilibre entre les phosphorylations activatrices fournies par les kinases (SPTK, src protein tyrosine kinase) en coopération avec les PST positifs comme CD45 et les déphosphorylations réalisées par les phosphatases telle que SHP-1 en coopération avec les PST négatifs (CD22, CD72 et CD5) (114). (d) le modèle de diffusion membranaire qui propose que la séquestration du BCR grâce au cytosquelette d'actine le maintient inactif. La diffusion membranaire du BCR permet la rencontre avec les kinases ce qui induit son signal tonique (127).

Ainsi, les molécules de BCR à signalisation tonique seraient dispersées dans la membrane plasmique faute d'agrégation induite par le ligand. Cette dispersion les expose de manière aléatoire et asynchrone à des événements de phosphorylation mais les rend aussi accessibles aux phosphatases créant ainsi un signal basal qualifié de « tonique ». Cette idée de dispersion a été très récemment appuyée par une étude de l'équipe de Batista à l'issue de laquelle les auteurs proposent le modèle de diffusion dynamique du BCR. Ils observent que certaines molécules de BCR sont hautement mobiles dans la membrane plasmique alors que d'autres ont une diffusion très restreinte. Cette mobilité est intimement liée au réseau d'actine qui limite la diffusion du BCR à travers les barrières riches en actines et en ezrine (Figure 20d). Les traitements affectant ce cytosquelette engendrent une diffusion du BCR et une augmentation du flux calcique et de l'activation de Akt et de ERK. Ainsi, cette étude suggère que l'augmentation de la diffusion membranaire du BCR mime un signal tonique et que la mobilité du BCR est probablement responsable de l'existence du signal tonique (79).

Ainsi, l'étude et la compréhension de la régulation de ce signal indépendant du ligand sont primordiales. En effet, le signal tonique du BCR joue un rôle dans le maintien de la survie des cellules B, conditionne le choix de maturation des cellules B naïves et semble être un acteur important dans la promotion de la survie des cellules B lymphomateuses.

C. BCR et pathologies

L'équilibre moléculaire qui assure les fonctions du BCR et la biologie des lymphocytes B se retrouve parfois altéré conduisant à des situations pathologiques. Ainsi, le dérèglement du BCR et de sa signalisation est souvent impliqué dans les pathologies des lymphocytes B mais aussi dans des maladies où le rôle des cellules B reste encore mal connu.

1. BCR et maladies auto-immunes

Les souris transgéniques ou déficientes pour les molécules qui régulent la signalisation du BCR nous ont beaucoup appris sur le rôle que peut jouer cette signalisation dans les pathologies impliquant les lymphocytes B. De plus, des aberrations génétiques et des polymorphismes dans les gènes qui codent Fc γ RIIb, PD-1, CD22, SHP-1, Lyn, CD19 et CD45 ont été retrouvés chez des patients atteints de maladies auto-immunes (128). L'essentiel des travaux qui ont traité la question du BCR et des maladies auto-immunes ont porté sur le lupus érythémateux disséminé (LED) et la polyarthrite rhumatoïde.

Le LED est une maladie auto-immune complexe, caractérisée par la présence d'auto-anticorps. Il a été montré ces dernières années que les cellules B participent activement à l'apparition de cette maladie. En effet, les cellules B des patients atteints de LED présentent des défauts de signalisation qui peuvent expliquer les caractéristiques d'hyperactivité des cellules B. La signalisation du BCR chez les patients atteints de LED présente un flux calcique et un taux de phosphorylation des protéines cytosoliques exagérés, une diminution du signal inhibiteur Fc γ RIIb, une diminution de l'expression de la tyrosine kinase Lyn et une augmentation de l'expression du facteur de stimulation et de survie des cellules B, BAFF (129). En plus des défauts d'expression et d'activation des molécules régulatrices du signal BCR, des études ont démontré des défauts de localisation de ces molécules chez ces patients. En effet, Lyn n'est plus retrouvée dans les radeaux lipidiques alors que la phosphatase CD45 y est présente de façon anormale (130). L'interconnexion entre ces événements paraît évidente, mais à ce jour on ne connaît pas l'élément initial qui engendre ces défauts de signalisation du BCR qui conduisent à l'échappement de la tolérance immunitaire et ainsi à l'apparition de la pathologie.

L'autre maladie auto-immune dans laquelle les cellules B semblent jouer un rôle important est la polyarthrite rhumatoïde. La présence d'auto-anticorps caractérise aussi cette

maladie qui se manifeste par une atteinte inflammatoire des articulations. Le ciblage pharmacologique de la protéine kinase Syk dont la signalisation est liée au BCR mais aussi au récepteur Fc γ RIIb diminue les symptômes de la polyarthrite rhumatoïde chez ces patients (131). De plus, il a été montré que l'expression de l'IgM de surface joue un rôle majeur dans cette maladie. L'absence de l'IgM rend les souris résistantes à l'arthrite induite (132).

Ainsi, les études démontrant le rôle des cellules B et du BCR dans la biologie de certaines maladies auto-immunes s'accumulent. Ces données permettront une meilleure compréhension de ces maladies et donc une meilleure prise en charge des patients.

2. BCR et lymphomagenèse

La contribution essentielle du BCR dans la pathologie humaine concerne les lymphomes. Les cancers affectant le lignage B comprennent au moins 15 types de lymphomes qui diffèrent par leurs caractéristiques cliniques, leurs phénotypes biologiques ainsi que leurs pronostics. Néanmoins, tous les types de lymphomes partagent deux caractéristiques communes: **les translocations** chromosomiques impliquant le gène de l'immunoglobuline et un autre proto-oncogène et **l'expression du BCR**. Les translocations de l'Ig sont générées par l'un des trois processus responsables du remodelage de l'Ig au cours du développement B à savoir, la recombinaison de la région variable, l'hypermuation somatique ou la commutation isotypique. Malgré la translocation, l'expression du BCR est assurée par le deuxième allèle, témoignant de l'intérêt que porte la cellule à exprimer le BCR malgré les défauts génétiques qui surviennent. En effet, de plus en plus d'études démontrent que le BCR promeut la survie des cellules B lymphomateuses (133). En 2005, l'équipe de Efremov a montré que la stimulation du BCR exerce un effet positif sur l'expansion du clone malin de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) à travers l'induction de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (134). L'équipe de R. Levy a publié un travail en 2006 décrivant une signalisation altérée du BCR dans les cellules de lymphome folliculaire (LF) comparativement aux cellules normales issues du même ganglion. En effet, cette signalisation représentée par le taux de phosphorylation des protéines Syk, Btk, Erk et p38, est plus activable et plus durable dans le temps que celle des lymphocytes B normaux (135). Le groupe de FK. Stevenson a démontré la présence d'une glycosylation dans les régions variables du BCR chez près de 80% des patients atteints de LF. Cette glycosylation

favoriserait l'interaction du BCR avec des lectines du microenvironnement du CG et maintiendrait ainsi une stimulation chronique du BCR (136). Par la suite, Cozma et *al.* ont démontré que le facteur de transcription Pax5 promeut la lymphomagenèse B à travers l'activation du signal BCR tonique et que cet effet de Pax5 est complètement aboli par l'expression ectopique du co-récepteur inhibiteur, le CD22 (137). En 2007, M. Shipp et *al.* ont décrit l'importance du signal BCR **tonique** dans un groupe de patients atteints de lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) appelé « DLBCL de type BCR ». De plus, un inhibiteur de Syk induit la mort de ces cellules et promet un traitement ciblé pour ce groupe de patients (138). Très récemment, une élégante étude de l'équipe de LM. Staudt a démontré un nouveau concept de signal BCR **chronique**. Ce signal chronique est requis pour la survie des cellules de DLBCL de type "ABC-like" (Activated B cell) à travers l'activité des protéines CARD11 et NFκB. Contrairement au BCR tonique, le BCR chronique requiert le "clustering" du BCR de façon comparable au "clustering" dépendant de l'antigène des cellules B normales. Ce concept démontré de façon spécifique au DLBCL de type ABC présente un nouveau mécanisme de pathogenèse impliquant encore une fois le BCR (139).

Notre équipe s'intéresse depuis quelques années aux altérations des signaux intracellulaires ainsi qu'aux cibles thérapeutiques dans les lymphomes et en particulier dans le LF. En considérant l'accumulation des données bibliographiques qui démontrent l'implication du BCR dans la lymphomagenèse, je me suis intéressée, durant ma thèse, à la compréhension des mécanismes de ciblage pharmacologique dans les cellules de LF. Ainsi, je tâcherai de résumer les données bibliographiques concernant le LF dans le chapitre suivant.

III. Le lymphome folliculaire

A. Les LNHs: généralités

Chez l'Homme, nous différencions deux types de proliférations lymphomateuses malignes : la maladie de Hodgkin ou lymphome Hodgkinien, caractérisée par la présence de cellules de Reed-Sternberg, et les lymphomes non Hodgkiniens (LNHs). Les LNHs se situent au sixième rang chez l'homme (après les cancers de la prostate, du colorectum, du poumon, du mélanome et du cancer de la vessie) et au cinquième rang chez la femme (après les cancers du sein, du colorectum, du mélanome et du cancer du poumon). Ces LNHs représentent 90% des tumeurs hématopoïétiques.

Entre 1970 et 1990, l'incidence des LNHs a fortement augmenté (3 à 4% par an). Depuis, et même si le taux d'accroissement s'est stabilisé autour de 1 à 2%, l'incidence des LNHs dans la population ne cesse d'augmenter et atteint actuellement un taux de 14/100.000 aux Etats-Unis (140). En Europe, 62.300 cas ont été diagnostiqués en 2004 contre 72.800 en 2006. Les LNHs représentaient 3,2% des cancers en Europe en 2006, ce qui les placent en 10^{ème} cause de décès par cancer (141).

B. Le lymphome folliculaire: épidémiologie

Le lymphome folliculaire (LF) est le plus fréquent des LNHs de bas grade avec une survie médiane sans plateau de 8 à 12 ans (142). Il représente 30 à 40% des hémopathies lymphoïdes B avec une incidence de 4 pour 100.000 habitants par an en France (143). Son évolution suit une succession de réponses aux traitements et de rechutes avec une durée médiane de survie de 4 à 5 ans après la première rechute. La survie globale estimée à 10 ans est de 49% (144). L'incidence des LF a augmenté de 4,6% de 1985 à 1992 en Europe, et les facteurs favorisants restent actuellement mal connus malgré de fortes suspicions des facteurs environnementaux. En effet, de nombreuses études ont démontré une association entre l'exposition aux pesticides, solvants et benzène et l'apparition ou la promotion de lymphomes chez l'animal. Les études épidémiologiques chez l'Homme ont trouvé une corrélation entre ces facteurs environnementaux et l'apparition du LF mais le débat reste à conclure (140).

C. Classification et pronostic

En fonction du nombre et de la localisation des organes atteints par le lymphome, le LF peut appartenir à quatre stades:

Stade I : la maladie est présente dans un seul groupe de ganglions lymphatiques ou plus rarement dans un organe non lymphoïde.

Stade II : le lymphome est présent dans deux groupes de ganglions lymphatiques ou plus, mais situés du même côté du diaphragme. Un organe non lymphoïde proche des ganglions lymphomateux peut être atteint.

Stade III : atteinte des ganglions lymphatiques des deux cotés du diaphragme ou atteinte d'un organe adjacent ou de la rate.

Stade IV : le foie, la moelle osseuse, les poumons ou d'autres organes loins des ganglions atteints sont aussi touchés.

La réponse au traitement et la survie dépendent de facteurs de mauvais pronostic comme, un âge supérieur à 60 ans, un stade III à IV de la classification Ann Arbor, une atteinte de quatre aires ganglionnaires ou plus, un taux de LDH supérieur à la normale et un taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/L. Ces facteurs définissant le score FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index). Ce score permet d'identifier trois groupes à risque : le groupe à faible risque (facteur 0-1), celui à risque intermédiaire, (facteur 2) et le groupe à risque élevé (facteur 3 à 5). Les survies à 10 ans étant de 71%, 51% et 36% respectivement (144).

D'autres facteurs ont également été avancés: un taux de β 2-microglobulinémie supérieur à 3 mg/L, un taux d'albuminémie inférieur à 35 g/L et l'absence de réponse au traitement (142).

L'âge médian au diagnostic est compris entre 55 et 60 ans, avec une atteinte diffuse dans deux tiers des cas, dont 50% d'atteinte médullaire. La transformation en lymphome de haut grade fait partie de l'évolution du LF avec une incidence de 70% environ. Le plus souvent, le LF se transforme en DLBCL à variante centroblastique ou immunoblastique, plus rarement en lymphomes de type Burkitt ou lymphoblastique.

Le pronostic des lymphomes transformés reste sombre avec un taux de survie de 36% à dix ans. Les facteurs de mauvais pronostic à la transformation sont : un âge avancé, une atteinte ganglionnaire diffuse, une infiltration médullaire, la présence de localisations extraganglionnaires, une altération de l'état général, un taux de LDH élevé, un nombre élevé de chimiothérapies antérieures et l'absence de réponse au traitement (145).

D. Origine et phénotype des cellules folliculaires lymphomateuses

A l'exception de certains sous-types de lymphomes du manteau ou de rares lymphomes lymphoblastiques, tous les LNHS présentent une mutation somatique des gènes IgV indiquant qu'ils dérivent de cellules B qui sont bloquées dans le CG ou qui y ont transité (146) (147). De plus, le génome de ces cellules lymphomateuses présente des translocations chromosomiques et des mutations hypersomatiques aberrantes qui représentent des erreurs ou des dysfonctionnements des mécanismes de remodelage du gène de l'immunoglobuline. Ces lésions génétiques touchent souvent le gène de l'Ig mais peuvent aussi toucher d'autres gènes comme BCL6, PRDM1 et MYC. Ces aberrations génétiques participent fortement à l'apparition des lymphomes dans le CG (Figure 21).

Les caractéristiques architecturales et cytologiques des LF évoquent celles du CG. Les cellules de LF sont histologiquement différenciées. L'architecture de leur croissance ressemble à celle du CG des organes lymphoïdes secondaires. Les follicules malins contiennent des centroblastes mais aussi des centrocytes tumoraux, des cellules T normales, des FDC et quelques macrophages. L'analyse des gènes codant les régions variables des chaînes lourdes et légères du BCR des cellules de LF confirme leur issu du CG. Les gènes Ig(V) des cellules de LF présentent des mutations somatiques similaires à celles observées dans les cellules normales qui ont rencontré l'antigène. Les cellules de LF peuvent exprimer l'isotype IgM ou l'isotype IgG. La commutation de classe étant un phénomène qui peut aussi toucher les cellules de LF. Il a été rapporté quelques cas des cellules de LF exprimant à la fois l'isotype IgM et l'isotype IgG témoignant de l'hétérogénéité clonale qui peut caractériser certains cas de LF (148).

L'immunophénotypage des prélèvements ganglionnaires, médullaires ou autres révèle que les marqueurs de surface exprimés dans le LF sont : l'immunoglobuline de surface exprimée avec une prédominance pour l'isotype IgM suivi par l'IgG et enfin l'IgA, les molécules CD10, CD19, CD20, CD38 et Bcl-6 avec un défaut d'expression des marqueurs CD5 et CD23. La surexpression du proto-oncogène BCL-2, suite à une translocation chromosomique, est caractéristique des cellules folliculaires lymphomateuses (149). Plusieurs autres aberrations génétiques touchant les gènes P53, MDM2, FCGR2B, REL, BCL6, P73, CDK4...ont été identifiées dans les LF, certaines d'entre elles ont une valeur pronostique établie (150).

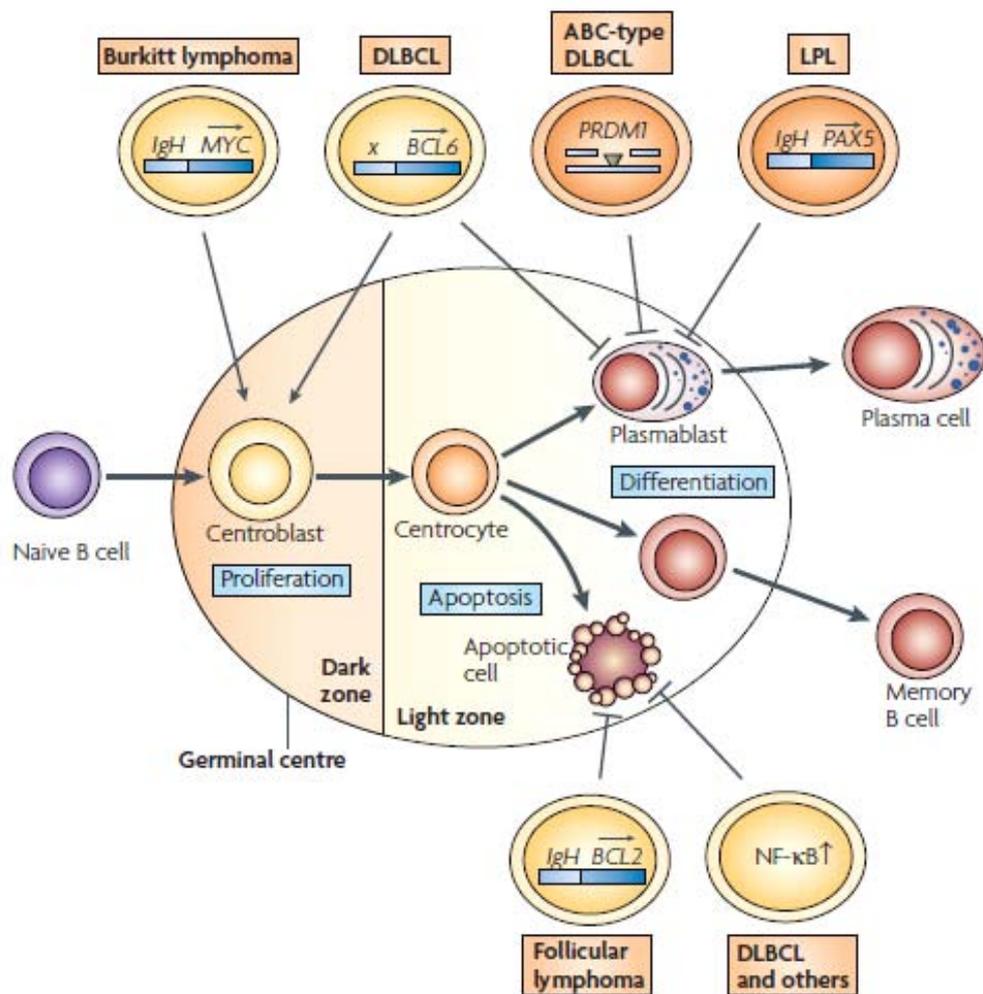


Figure 21: *Altérations moléculaires et apparition des lymphomes (61)* : Les altérations moléculaires survenues lors de la maturation des cellules B constituent parfois des obstacles au bon déroulement de la différenciation dans le CG. Par exemple les translocations chromosomiques concernant les gènes IgH, MYC ou BCL-6 induisent une prolifération accrue des centrocytes conduisant au lymphome de Burkitt ou au lymphome B diffus à grandes cellules (*DLBCL*). Les aberrations génétiques affectant les gènes PRDM1 ou PAX5 inhibent la différenciation plasmocytaire et participent à l'apparition du *DLBCL* de type ABC ou du LPL (*lymphoplasmatic lymphoma*). La suractivation de la voie NFκB ainsi que la translocation chromosomique affectant l'IgH et BCL-2 empêchent l'apoptose des centrocytes. Ces défauts moléculaires sont impliqués dans l'apparition du lymphome folliculaire ou du *DLBCL*.

E. Translocation t (14 ;18) et lymphomagenèse

1. Mécanismes de la translocation

Le LF est associé à une anomalie chromosomique retrouvée dans 85 à 90% des cas : la translocation t(14 ; 18) (q32, q21). Il est maintenant connu que les machineries de la recombinaison V(D)J, de la MHS et la CC sont instrumentalisées pour la génération d'altérations chromosomiques. La translocation t(14;18) est réciproque et équilibrée avec un échange de matériel entre les chromosomes 14 et 18. Elle juxtapose l'oncogène BCL-2 situé en 18q21 et la région codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines en 14q32 (IgH, segment JH) aboutissant à la surexpression du gène et de la protéine Bcl-2. Le point de cassure se situant en dehors de la région codante en 18q21, la protéine Bcl-2 synthétisée correspond à la protéine physiologique mais produite en quantité anormale (151) (152). Récemment, il a été montré que la translocation t(14 ;18) survient dans la moelle osseuse lors de la recombinaison V(D)J puisque les régions majeures de cassure situées dans le gène BCL-2 acquièrent une structure susceptible au clivage médié par Rag (153).

Dans 18 % des cas, la translocation n'est pas détectable par les techniques conventionnelles (cytogénétique et biologie moléculaire) en raison d'un réarrangement au niveau du cadre de lecture de BCL-2. Des résultats peuvent ainsi être faussement négatifs en raison d'un échec de technique, de l'absence de sélection d'une population tumorale détectable ou de points de cassure inconnus. Cette translocation est retrouvée dans 90% des LF, 20% à 30% des DLBCL (*de novo*) et 50% d'autres types histologiques de lymphomes (lymphomes du manteau et de la zone marginale, maladie de Hodgkin), sans association pronostique identifiée. Elle est conservée lors de la transformation du LF en lymphome de haut grade.

La résultante fonctionnelle de cette translocation est le déséquilibre de la balance entre la survie et la mort cellulaire. En effet, Bcl-2 est une protéine transmembranaire mitochondriale qui intervient dans la régulation de la mort cellulaire en inhibant le phénomène d'apoptose (voie mitochondriale). Elle est contrôlée négativement par d'autres molécules comme Bak, Bax et Bad, (protéines mitochondriales pro-apoptotiques). La protéine Bcl-2 étant produite en quantité excessive, les systèmes de régulation de cette protéine sont dépassés aboutissant à un défaut de mort cellulaire.

Comme déjà évoqué précédemment, les cellules du CG se caractérisent normalement par une capacité accrue à répondre aux signaux apoptotiques afin d'éliminer les cellules B dont le BCR n'est pas fonctionnel. Ainsi, il est facile d'imaginer le dérèglement qu'apporte la t(14;18) dans cette étape où les protéines anti-apoptotiques sont normalement absentes au profit des protéines pro-apoptotiques.

2. La t(14 ;18) n'est pas la seule coupable

Cette translocation est considérée comme une altération essentielle, mais elle est insuffisante à elle seule pour développer le LF. Ceci est illustré par le fait que des souris transgéniques pour BCL-2, dans lesquelles la transcription de BCL-2 est sous le contrôle de l'enhancer E_μ, ne développent pas de lymphome. Par contre, la surexpression de Bcl-2 fournit un avantage de survie prolongée à ces lymphocytes B, ce qui augmente la probabilité d'acquisition d'autres altérations comme par exemple la translocation qui touche le gène pro-prolifératif MYC (154). De plus, environ 5% des LF ne portent pas la translocation t(14 ;18) mais présentent d'autres anomalies génétiques comme la t(3 ;14) qui amène à la dérégulation du répresseur transcriptionnel Bcl-6 requis pour la formation du CG (155). Ces LF présentent une morphologie centroblastique particulière et sont classés dans le grade IIIB de la classification de l'OMS.

De façon inattendue, le réarrangement BCL-2/IgH a été retrouvé par PCR dans le sang périphérique chez des sujets âgés sains ainsi que dans les amygdales et la rate de sujets sains de tout âge sans pathologie lymphomateuse sous-jacente (156). Ce fait démontre que cette translocation ne suffit pas à elle seule pour induire la transformation des cellules B en cellules lymphomateuses. Il a été admis pendant des années que cette translocation retrouvée chez des sujets sains est portée par des lymphocytes B matures naïfs. Cependant, Roulland et al. ont montré que ces cellules ont subi la commutation de classe, un procédé qui se déroule dans le CG en réponse à la stimulation antigénique. Ce qui démontre que les cellules positives pour la translocation t(14 ;18) ne sont pas naïves et sont capables de répondre à un stimulus antigénique exogène ou à un auto-antigène.

Comment font les cellules B normales portant une translocation t(14 ;18) pour se transformer et conduire à l'apparition d'un LF? Cet événement est rare puisque cette translocation peut être détectée chez 50% des sujets sains alors que l'incidence du LF est de 1 cas pour 25.000 par an. Cependant, un clone de lymphocyte B normal portant la translocation

peut persister jusqu'à 3 ans chez un individu sain (157). L'équipe de B. Nadel a démontré que ces cellules portant la translocation chez les sujets sains ont un phénotype proche de celui des cellules de LF, ce qui pourrait constituer une étape intermédiaire avant la transformation (158). En effet, il est maintenant admis qu'une cellule portant la translocation t(14;18) qui subit une lésion oncogénique supplémentaire conduit à la transformation en LF (Figure 22).

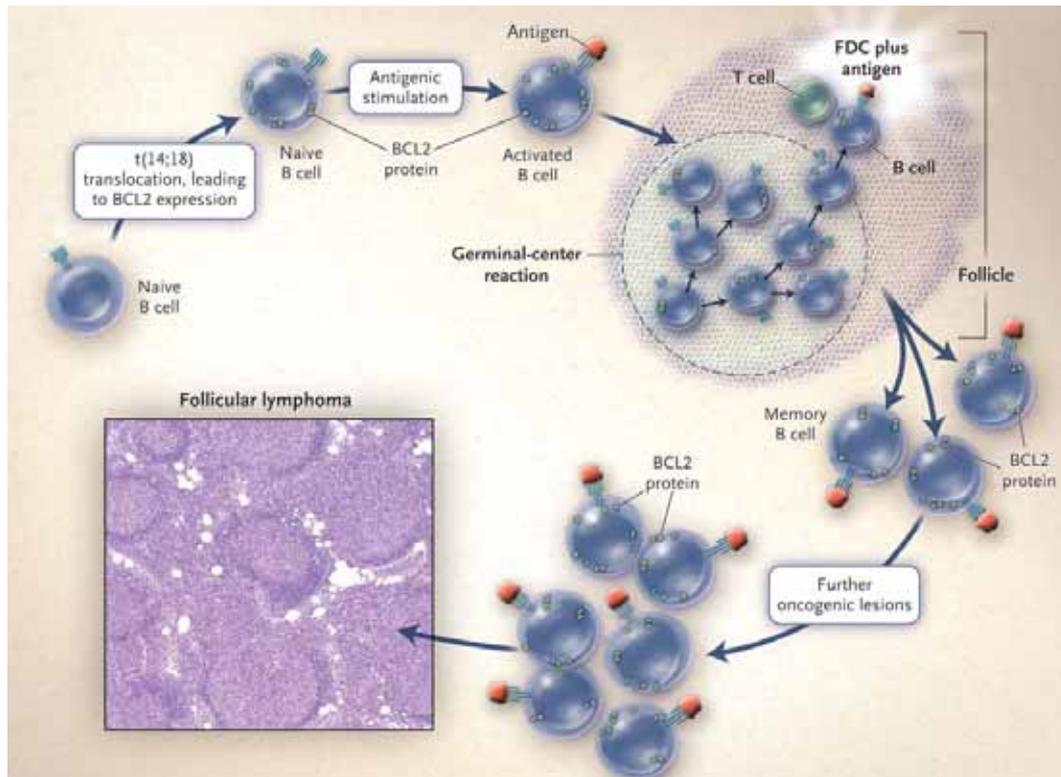


Figure 22: Accumulation des lésions avant l'apparition du LF (159) : La translocation t(14;18) conduisant à la surexpression de Bcl-2 confère un avantage de survie aux cellules B qui se retrouvent dans les follicules du centre germinatif. Cet avantage de survie permettrait aux cellules d'accumuler d'autres lésions oncogéniques au cours des remaniements intenses qui ont lieu dans le CG. L'accumulation des lésions oncogéniques donnerait lieu au LF.

F. BCR et lymphome folliculaire

La nature de la lésion supplémentaire qui conduit à l'apparition du LF reste imprécise mais plusieurs études pointent du doigt le rôle de la stimulation du BCR dans l'initiation de la transformation. En effet, la plupart des cellules de LF maintiennent l'expression de l'immunoglobuline de surface IgM. Ainsi, il est possible que la stimulation du BCR des cellules qui portent la translocation leur confère un avantage de survie et contribue à la

transformation maligne de ces cellules (159). Une étude en faveur de cette hypothèse montre que les traitements anti-viraux donnés à des patients atteints par le virus de l'hépatite C éliminent les cellules B portant la translocation t(14 ;18) (160). De plus, il est connu que l'infection aux virus tels que l'EBV ou le HIV constitue un facteur de risque pour le développement des lymphomes. L'équipe de Stevenson a démontré que 79% des LF portent une mutation dans la région IgV_H générant des sites de N-glycosylation. Ce taux de mutation est significativement plus élevé dans les LF que dans les DLBCL (41%), les LLC (13%), les myélomes multiples (8%) ou les B normaux (9%) (161). La N-glycosylation pourrait augmenter le signal tonique du BCR ou induire des interactions spécifiques ou non avec des structures autologues présentes dans le microenvironnement. La dérégulation de la signalisation du BCR dans les LF a été démontrée dans différentes études appuyant ainsi le rôle que peut jouer ce récepteur dans l'ontogénie du LF. L'étude de l'équipe de R. Levy a effectivement démontré une signalisation du BCR plus intense et plus durable dans les LF comparativement aux cellules B normales (135). Notre équipe a déjà démontré la surexpression de la tyrosine kinase Syk dans les LF et l'activation excessive de la voie mTOR conduisant à une prolifération accrue de ces cellules (162). Enfin, plusieurs études ont démontré la sous-expression dans les LF de la protéine phosphatase SHP-1, protéine majeure pour l'inhibition du signal BCR et considérée comme suppresseur de tumeur. Cette sous-expression est due à l'hyperméthylation du promoteur de son gène (163).

G. Le lymphome folliculaire et son microenvironnement

De façon intéressante, les gènes qui définissent le mieux la signature pronostique du LF sont exprimés par les cellules T, les macrophages ou les cellules dendritiques. Ceci indique que, contrairement au DLBCL ou au lymphome du manteau par exemple, l'agressivité du LF est aussi déterminée par son microenvironnement cellulaire et non seulement par ses caractéristiques moléculaires intrinsèques. Le CG d'un patient atteint de LF ressemble histologiquement et structurellement à celui d'un individu sain. Les interactions observées entre les cellules B du follicule et les lymphocytes T, les FDC et les macrophages sont conservées dans le LF. La dépendance des cellules de LF à leur microenvironnement est appuyée par le fait que ces cellules sont très difficiles à cultiver *in vitro* en absence de cellules stromales ou de stimulation du récepteur CD40, qui est la voie de signalisation principale

entre les cellules B et les cellules T (164). Les FDC expriment des molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM1, ces molécules membranaires interagissent avec LFA-1 et VLA-4 présentes sur les cellules de LF. Les FDC présentent aussi l'Ag aux cellules de LF et leur fournissent des molécules stimulatrices comme l'IL-15, BAFF et le HGF (hepatocyte growth factor) qui pourraient toutes jouer un rôle dans la promotion de l'expansion des cellules folliculaires dans le CG. A l'inverse, les cellules B permettent aussi le développement des cellules stromales, comme les FDC et les FRC en sécrétant du TNF et de la lymphotoxine α et β . De plus, Calvo et *al.* ont démontré que l'IL-4 est une cytokine surexprimée dans le microenvironnement du LF et que cette surexpression pourrait expliquer la suractivation constitutive de ERK, AKT et Stat-6 dans les LF (165). Ces interactions bilatérales contribuent donc fortement au soutien des cellules de LF et à la promotion de leur croissance (166, 167).

H. Traitement des lymphomes folliculaires

Pour les patients asymptomatiques avec une progression lente de la maladie, la stratégie "wait and watch" est recommandée. Quand les symptômes apparaissent, la radiothérapie localisée est le traitement de choix pour un LF de stade I à II avec un taux de rémission complète de 50% pour les stades I et de 25% pour les stades II (168). Le taux cumulatif de rechute est de 54% à 15 ans. Une association à des molécules de chimiothérapie augmente le taux de réponse mais pas la survie. La survie à long terme varie de 40 à 50% (169). 80% des patients diagnostiqués présentent une forme étendue de la maladie (stade III ou IV) avec une atteinte médullaire dans environ 50% des cas (170). Il y a plusieurs options de traitements disponibles qui sont plus au moins utilisées en fonction de l'état du malade et de la stratégie du centre de soin. Les différentes possibilités de traitement d'un LF sont:

- Chimiothérapie par voie orale ou intraveineuse
- Chimiothérapie et immuno-thérapie (anticorps monoclonal)
- Transplantation de moelle osseuse ou de cellules souches
- Radio-immunothérapie

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

du GELA (groupe d'étude des lymphomes de l'adulte) démontre que les résultats en terme de réponse, de survie globale sans événement sont supérieurs aux autres molécules testées en première ligne telles que la fludarabine (171). Malgré l'exploration de différents protocoles de chimiothérapie, la médiane de survie n'a pas changé durant ces vingt dernières années jusqu'à l'arrivée de nouvelles stratégies de traitement. Ces nouvelles modalités incluent la transplantation de cellules souches autologues (ASCT) ou l'utilisation des anticorps monoclonaux (172).

En effet, l'arrivée du premier anticorps monoclonal thérapeutique, le rituximab (Mabthera^R) a apporté des résultats significatifs aux patients atteints de LF qui présentaient des meilleures réponses par rapport aux autres LNHs. L'absence de résultats spectaculaires avec le rituximab seul (27% de réponse partielle), probablement due à l'atteinte médullaire des patients traités, a suggéré l'intérêt potentiel d'une combinaison avec la chimiothérapie (172). La combinaison de chimiothérapie cytotoxique, CHOP (cyclophosphamide, hydroxydaunomycin, Oncovin et prednisonel) associée au rituximab chez des patients atteints de LNHs de bas grade, produit une réponse globale de 95% avec 55% de réponse complète. L'étude a montré que 7 patients sur 7 présentent une réponse complète et la PCR révèle que leurs cellules deviennent négatives pour BCL-2 (173). Suite à ces études, la combinaison R-CHOP est actuellement largement utilisée dans le traitement des LF.

I. Nouveaux agents et approches futures

La radiosensibilité inhérente des LF et l'expression d'antigènes cibles à la surface cellulaire ont permis le développement d'anticorps monoclonaux radiomarqués. La majorité de ces anticorps est dirigée contre le CD20. La lyse des cellules induite par ces anticorps touche non seulement la cellule cible mais aussi les cellules adjacentes de la tumeur grâce à l'effet de la radiation. Ceci pourrait être avantageux pour traiter les tumeurs non suffisamment vascularisées pour avoir accès à l'anticorps mais aussi celles qui présentent une hétérogénéité antigénique. Par exemple le ¹³¹I-tositumomab induit 95% de réponse avec 75% de réponse complète en thérapie de première ligne dans les LF. Bien que les patients traités dans cette étude présentent un bon pronostic, le fait que, plus que la moitié des réponses complètes se maintiennent après 4 ans suggère que cette approche mérite des études supplémentaires pour

évaluer l'utilité de ces anticorps radiomarqués seuls ou en combinaison avec la chimiothérapie (174).

Un autre champ d'investigation est la vaccination idiotypique. En effet, l'immunoglobuline clonale de la cellule tumorale exprimée à la surface cellulaire, appelée idiotype, a été ciblée en tant qu'antigène spécifique de la tumeur par les stratégies de vaccinations thérapeutiques. Plusieurs études cliniques ont établi l'innocuité du vaccin idiotypique dans le LF. L'efficacité biologique de la vaccination consiste en sa capacité à induire une réponse immunitaire spécifique contre la tumeur, son efficacité clinique réside dans la capacité à induire un effet anti-tumoral *in vivo* et le bénéfice clinique est visible sur l'amélioration de la survie des patients. Néanmoins, des études plus importantes chez l'Homme sont indispensables pour conclure sur l'efficacité et les résultats de cette stratégie de traitement (175). Bien que prometteuse, cette approche qui consiste donc en une thérapie sur mesure est très difficile à mettre en place en pratique.

D'autres molécules sont en cours d'études cliniques afin d'évaluer leurs efficacités, seules ou en combinaison avec les traitements actuels. La liste comprend les anticorps monoclonaux anti-CD20 (autres que le rituximab), anti-CD40, anti-CD80, anti-CD22, conjugués ou non à des molécules cytotoxiques ou radioactives. L'anti-CD22 (epratuzumab) démontre une bonne tolérance et présente des bénéfices cliniques dans le LF (176). Cette activité anti-tumorale pourrait impliquer le signal BCR. En effet, comme il a été évoqué auparavant, le CD22 fait partie des régulateurs principaux du signal BCR, le ciblage de cette molécule par des anticorps monoclonaux pourrait engendrer une diminution du signal de survie fourni par le BCR. Dans ce cas, l'anti-CD22 aurait une action agoniste sur CD22 qui, une fois activé, recrute des phosphatases qui inhibent le signal BCR à travers la déphosphorylation de Syk mais aussi des ITAMs de l'Ig α /Ig β . De plus, l'engagement du CD22 induit son internalisation rapide. Ainsi, le couplage des anti-CD22 à des molécules toxiques ou à des radioéléments représente une stratégie non négligeable pour induire la cytotoxicité cellulaire du LB. En effet, l'epratuzumab radiomarqué fait l'objet d'essais cliniques et démontre des résultats encourageants chez des patients de LF réfractaires au traitement (177). D'autres molécules comme l'inhibiteur de Syk (le Fostamatinib D ou R406) ou l'inhibiteur du protéasome, le Bortezomib, font l'objet d'intenses études pré-cliniques et cliniques dans le LF.

La compréhension des mécanismes d'action des traitements actuels est indispensable pour l'amélioration de la réponse des patients mais aussi pour l'application de ces traitements dans d'autres pathologies. Dans ce contexte, je me suis intéressée à la compréhension des mécanismes d'actions mis en jeu par l'Ac monoclonal qui a révolutionné le traitement des LNHS, le rituximab. Je développerai les données bibliographiques concernant le Rituximab et ses modes d'actions dans le chapitre suivant.

IV. Le rituximab

A. Découverte et fabrication des anticorps monoclonaux

La fabrication des anticorps monoclonaux (AcM) a été rendue possible grâce aux bases conceptuelles et technologiques qui ont permis la fabrication des hybridomes et à l'immunologie, qui a analysé la nature et la structure des anticorps.

Les premières cellules hybrides ont été obtenues en 1960 par Georges Barski et ses collaborateurs à Villejuif, ainsi que par Boris Ephrussi et ses collaborateurs à l'institut Pasteur (178). Ces généticiens ont obtenu des cellules hybrides provenant de cellules d'espèces différentes. En 1964, John Littlefield a mis au point une méthode de sélection des cellules hybrides (179). Dans les années 1970, les immunologistes tentaient d'élucider la structure fine des anticorps ainsi que les règles gouvernant leur synthèse et l'association des chaînes lourdes (H) et légères (L). Ils ont cherché à créer des cellules hybrides en utilisant des cellules tumorales B dérivées de myélome de souris. Ces cellules étaient utiles pour étudier la structure des anticorps mais n'avaient pas d'intérêt ni diagnostique, ni clinique puisque les anticorps produits par ces cellules n'avaient pas de spécificité prédéfinie. Ce n'est qu'en 1975, que César Milstein et Georges Köhler ont appliqué la technique de fusion cellulaire et de sélection des cellules hybrides aux lymphocytes B. La fusion de lymphocytes B normaux de souris immunisées par des globules rouges de mouton avec des cellules de myélome leur a permis d'obtenir des cellules hybrides produisant un anticorps monoclonal dirigé contre les globules rouges du mouton (180). De telles cellules hybrides héritent de deux propriétés : elles se multiplient indéfiniment *in vitro* comme les cellules du myélome et elles fabriquent des anticorps comme les lymphocytes B murins. Après fusion et sélection, les cellules hybrides se mettent à proliférer. Il faut alors déterminer quels sont les hybridomes qui produisent les anticorps désirés, les cloner et les sous-cloner (181). Chaque clone de cellule fille produit le même anticorps, c'est la naissance de l'anticorps monoclonal.

B. Anticorps monoclonaux thérapeutiques

1. La progression vers les anticorps monoclonaux thérapeutiques

La découverte des AcM suscita de grands espoirs thérapeutiques. En effet, l'utilisation des AcM en cancérologie par exemple permet le ciblage spécifique des cellules tumorales à travers la fixation de l'anticorps sur l'antigène exprimé par la cellule maligne. La fixation de l'anticorps induit ainsi une réaction immunitaire qui détruit la cellule cible. Cependant, alors que la découverte des AcM permit des avancées considérables dans le domaine de la recherche fondamentale et du diagnostic, d'importants problèmes surgirent lors de leur utilisation chez les patients. L'utilisation d'AcM de souris ou de rat chez l'Homme induit dans la plupart des cas l'apparition d'anticorps humains anti-anticorps de souris, HAMA (Human Anti-Mouse Antibody), conduisant à une diminution de l'efficacité et à des effets secondaires indésirables dus à la formation de complexes immuns. Malgré de nombreuses tentatives de manipulations des hybridomes pour résoudre ces problèmes, aucune technique d'ingénierie cellulaire fiable, reproductible, facile d'emploi, ne put être mise en place pour obtenir des AcM à l'échelle industrielle (182).

Malgré ces tentatives infructueuses, des efforts très importants ont été consentis depuis 25 ans pour générer par ingénierie moléculaire des anticorps ayant une meilleure affinité, une immunogénicité réduite et des propriétés effectrices optimales. Ces efforts ont porté leurs fruits grâce aux progrès considérables de la biologie moléculaire au cours des années 1980. La manipulation des AcM par génie génétique a commencé au début des années 1980. Les principaux objectifs de ces manipulations ont été l'obtention d'anticorps chimériques, humanisés ou humains. De plus, ces avancées ont permis la modification de l'affinité des AcM ou l'expression sous forme de fragments ou de protéines de fusion. L'apport de ces techniques moléculaires a permis l'émergence sur le marché d'anticorps thérapeutiques chimériques (183), humanisés (184) et enfin, totalement humains (Figure 23).

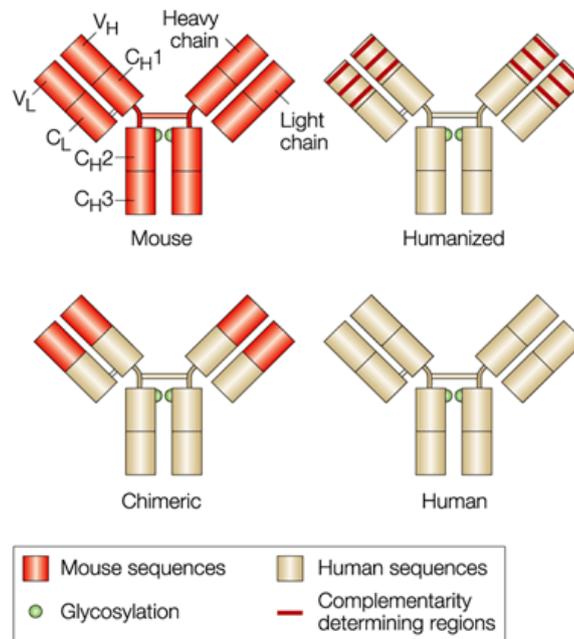


Figure 23 : *Les différents types d'anticorps monoclonaux (185)* : V_H et V_L : région variable de la chaîne lourde ou légère respectivement ; C_H et C_L : région constante de la chaîne lourde ou légère respectivement. Trait rouge : région déterminant la complémentarité.

2. Le rituximab, un anticorps monoclonal chimérique

La construction d'un anticorps chimérique consiste à isoler l'ADN codant pour le domaine V_H et le domaine V_L d'un anticorps monoclonal de souris et à le lier à l'ADN codant pour les domaines constants H et L d'une immunoglobuline humaine. Une telle construction génétique permet de produire un anticorps hybride dont la partie constante, humaine, n'est pas immunogène chez l'Homme (il s'agit en général de la région constante d'une IgG1 humaine et la région C_k humaine). De tels anticorps sont humains à environ 66 % et moins immunogéniques que les anticorps de souris car les épitopes immunodominants interspèces de l'IgG sont principalement localisés dans les domaines CH2 et CH3. Dans la plupart des cas, la spécificité et l'affinité des anticorps chimériques restent identiques à celles des anticorps murins d'origine. Des vecteurs d'expression eucaryotes ont été construits pour la production industrielle d'anticorps chimériques (182).

L'un des premiers anticorps chimériques mis sur le marché est le rituximab (Figure 24), dirigé contre la protéine transmembranaire CD20, et est utilisé pour le traitement des LNHS ainsi que de certaines maladies auto-immunes. Le rituximab, aussi connu sous le nom de Mabthera®, est le premier AcM utilisé en oncologie qui a reçu l'autorisation de mise sur le marché en 1997 aux Etats-Unis et en 1998 en Europe. Ces dix dernières années d'expériences

cliniques ont confirmé l'efficacité du rituximab dans le traitement du LF mais aussi des lymphomes agressifs. Actuellement, la majorité des patients atteints de lymphomes reçoivent le rituximab à un moment donné de leur traitement. Utilisé en monothérapie, il fournit des réponses partielles chez environ la moitié des patients souffrant de LNH en rechute (186) (187). Cependant, l'intérêt du rituximab est visible surtout en combinaison avec la chimiothérapie conventionnelle comme la CHOP. Dans cette configuration, le rituximab améliore significativement la survie des malades (188). Cette combinaison a eu un impact positif même sur le traitement des lymphomes agressifs comme le DLBCL (189). Après plusieurs études cliniques, la cure standard de rituximab adoptée consiste en une injection par semaine de $375\text{mg}/\text{m}^2$ durant 4 semaines. Contrairement à son homologue murin (l'ibritumomab), le rituximab a une demi-vie prolongée, 76h après une injection unique et 206h après la cure de 4 injections (190).

Après le traitement par Rituximab, une chute spectaculaire du nombre des lymphocytes B, qu'ils soient normaux ou tumoraux, est observée. Cette déplétion est considérée comme responsable en grande partie de l'effet anti-tumoral du rituximab. Ainsi, l'utilisation du rituximab a largement dépassé les indications initiales prévues et s'applique à différents types de pathologies impliquant le lymphocyte B exprimant le CD20.

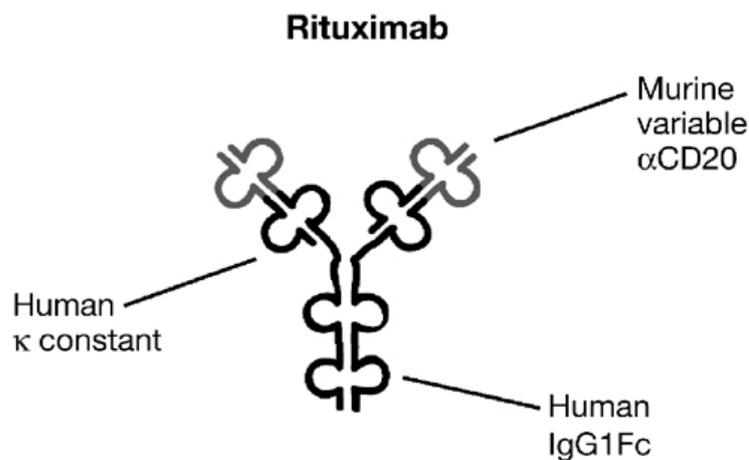


Figure 24 : Structure chimérique du rituximab (191).

C. Le CD20: la cible du rituximab

1. La structure du CD20

Le CD20 ou MS4A1 (membrane-spanning 4-domain, group A, member 1) est une protéine non glycosylée, exprimée à la surface des lymphocytes B. Elle contient 4 domaines transmembranaires et les queues amino- et carboxy-terminales sont localisées du côté intracytoplasmique. Ces queues intracellulaires sont riches en résidus thréonine et sérine contenus dans des sites consensus de phosphorylation, ce qui résulte en 3 isoformes de la protéine différemment phosphorylées, une de 33, une de 35 et une de 37 kDa (192) (193). Un segment de 43 aa entre le 3^{ème} et le 4^{ème} segment transmembranaire constitue la grande boucle du côté extracellulaire (194). Un segment court de 7 aa constitue la petite boucle extracellulaire (194). Un segment court de 7 aa constitue la petite boucle extracellulaire (Figure 25). Cette structure permet un ancrage solide du CD20 dans la membrane et permet en théorie d'éviter les phénomènes dits de "shedding", qui consistent à décrocher les molécules de la membrane. Malgré cet ancrage, on observe des formes solubles du CD20 dans certains cas de figure comme chez des patients atteints de LLC (195).

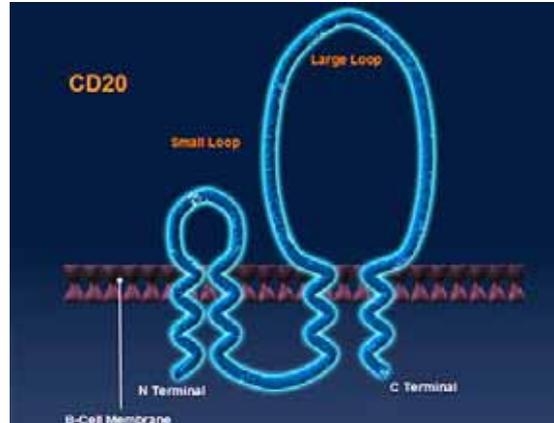


Figure 25: Schéma de la structure transmembranaire du CD20 (196) : Le CD20 présente deux boucles extracellulaires (petite et grande boucle) et les queues N-terminale et C-terminale au niveau intracytoplasmique.

Les connaissances dont on dispose sur la structure et le rôle du CD20 proviennent essentiellement de l'équipe de JP. Deans. En effet, cette équipe a démontré que le CD20 humain partage 73% de similitude de séquence avec le CD20 murin. Le domaine extracellulaire diffère de 16 aa sur les 43 résidus de la grande boucle extracellulaire, ce qui peut expliquer en partie l'inefficacité de liaison du rituximab sur le CD20 de souris (197).

Jusqu'à récemment, il a été admis que les boucles extracellulaires du CD20 comportaient seulement 2 groupes d'épitopes, un reconnu par la majorité des anticorps anti-CD20 (comme le B1, le 2H7 et le rituximab) qui induisent un effet anti-prolifératif sur les cellules B, et un autre épitope reconnu par l'anticorps 1F5, ayant d'autres propriétés activatrices (198). Depuis, l'équipe de JP. Deans a démontré un degré élevé de diversité de reconnaissance des épitopes parmi les AcMs anti-CD20, ce qui pourrait expliquer les différences des effets biochimiques et biologiques de ces anticorps. En effet, l'alanine 170 et la proline 172 de la grande boucle extracellulaire sont critiques pour la détermination de l'épitope reconnu par le rituximab (197).

Le CD20 ne semble pas être exprimé sous forme monomérique dans la membrane plasmique, mais s'organise en complexe supramoléculaire de dimères ou de tétramères (199). Ce complexe oligomérique semble aussi jouer un rôle dans la reconnaissance du CD20 par les AcMs. De plus, le CD20 est associé à d'autres protéines membranaires comme Cbp (200), CD40 et CMH II (201). Le ciblage du CD20 par des AcMs pourrait interférer avec ces associations protéiques et leurs fonctions biologiques.

2. La régulation de l'expression du CD20

Le gène MS4A1 qui code la protéine CD20 est localisé sur le chromosome 11q12-13. La transcription de ce gène est activée au stade pré-B, il reste exprimé tout au long de la maturation des lymphocytes B et s'éteint durant la différenciation plasmocytaire (Figure 26). L'expression du CD20 à des stades précis de la différenciation permet le ciblage thérapeutique des maladies qui affectent le lymphocyte B à ces stades. Etant donné que le CD20 n'est pas exprimé par les plasmocytes, son ciblage n'affecte pas de façon significative les concentrations sériques en immunoglobulines. De plus, le CD20 n'étant pas exprimé par les cellules souches hématopoïétiques, le nombre de lymphocyte B chez les patients traités revient à la normale 9 à 12 mois après la cure conventionnelle de 4 doses de rituximab.

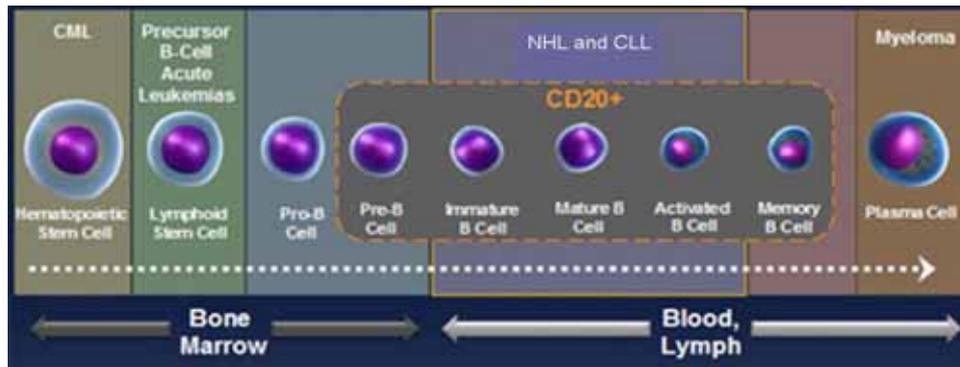


Figure 26 : L'expression spatiotemporelle du CD20 (196) : Le CD20 est exprimé du stade pré-B au stade B mémoire. Les cellules de lymphome non Hodgkiniens (NHL) et de leucémie lymphoïde chronique (CLL) expriment le CD20 contrairement aux cellules de leucémies myéloïdes chroniques, de leucémies aiguës et de myélome multiple.

Afin d'assurer l'expression spatiotemporelle spécifique du CD20, la transcription du gène MS4A1 est finement régulée par les facteurs de transcription Oct-1 et Oct-2 mais surtout par le couple PU.1/Pip. De plus, il a été récemment montré que l'expression du CD20 dépend aussi de facteurs épigénétiques. Ainsi, la 5-azacytidine qui inhibe la méthyltransférase de l'ADN ou la trichostatine A qui module l'acétylation des histones, augmentent l'expression de l'ARNm et de la protéine CD20 dans des lignées de lymphome B (202).

Au niveau post-transcriptionnel, le traitement des cellules B avec l'activateur des protéines kinases PKCs, le PMA (phorbol myristate acetate) augmente la phosphorylation du CD20 et sa mobilité, de la membrane vers l'espace intracellulaire (203) et diminue donc son expression à la surface. Le CD20 est aussi régulé par ubiquitination. Très récemment, J. Bil et *al.* ont démontré que le traitement des lignées cellulaires de NHL avec l'inhibiteur du protéasome, le Bortezomib, induit une augmentation du niveau d'expression du CD20 (204). Bien que le mécanisme d'action soit inconnu, l'expression du CD20 peut être régulée par des cytokines comme le GM-CSF, l'IL-4 ou le TNF- α dans des cellules lymphomateuses *in vitro* (205). De plus, le prednisone (206), la bryostatine-1 (207), les radiations ionisantes (208) et les espèces réactives d'oxygène (209) ont été décrits pour augmenter le niveau du CD20 dans des cellules B normales ou tumorales. D'un autre côté, le lenalidomide (210) ou la liaison du CD40 diminuent son expression (211).

3. La fonction du CD20

Le CD20 n'a pas de ligand connu et sa structure ne présente pas les caractéristiques classiques d'un récepteur. Les souris déficientes en CD20 ne présentent pas de défaut du développement des lymphocytes B (212). En 1993, Bubien et *al.* ont démontré que l'expression du CD20 induit un flux calcique transmembranaire, suggérant que le CD20 pourrait jouer le rôle d'un canal calcique (199). De plus, l'équipe de JP. Deans a démontré que l'expression ectopique du CD20 associé aux radeaux lipidiques dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), induit un flux calcique spectaculaire attestant que le CD20 est une composante de la voie calcique (213). Dans les cellules B, le siRNA de CD20 diminue l'entrée du calcium induite par la stimulation du BCR. Cette équipe a aussi démontré que le CD20 est constitutivement localisé dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique grâce à 7 résidus cytoplasmique de sa séquence (214). La déplétion du cholestérol ou la délétion de ces 7 résidus inhibe la fonction de canal calcique du CD20, démontrant que la fonction de canal calcique du CD20 est dépendante de sa localisation dans les radeaux lipidiques (213). Le rôle du CD20 dans l'induction du flux calcique a été confirmé *in vivo* chez la souris par Uchida et *al.* En effet, cette équipe a démontré que les souris CD20^{-/-} présentent un défaut du flux calcique après stimulation du CD19 ou de l'IgM. De plus, ces souris présentent une diminution du niveau d'expression de l'IgM sans pour autant avoir un défaut de signalisation en aval du BCR (215).

Les autres études qui ont analysé les événements et les signaux activés par le CD20 sont basées sur l'utilisation d'anticorps anti-CD20. Bien qu'artificielle, cette méthode a démontré que la liaison du CD20 régule le cycle cellulaire (216). Ceci est suggéré par le fait que l'AcM 1F5 induit la transition G0/G1 du cycle (217) alors que l'AcM B1-like inhibe la progression de la phase G1 aux phases S/G2/M du cycle.

4. CD20 et BCR

Plusieurs études suggèrent que le CD20 exerce une fonction en relation avec celle du récepteur le plus important du lymphocyte B, le BCR. Tout d'abord, Bourget et *al.* ont démontré que le traitement par un anti-CD20 (B1) diminue l'expression de l'IgM à la surface et suggèrent un mécanisme dépendant des PKCs (218). En 2002, il a été montré que le rituximab et d'autres anti-CD20 inhibent la prolifération et induisent l'apoptose en activant les mêmes signaux que le BCR (219). Ces résultats ont été confirmés par Mimori et *al.* qui

ont démontré que le CD20 et le BCR exercent un effet synergique pour induire l'apoptose des cellules de lymphome de Burkitt (220). Puis, l'équipe de JP. Deans a décrit la dynamique de localisation de ces 2 molécules: le CD20 et le BCR co-localisent dans les radeaux lipidiques des cellules au repos, la stimulation du BCR le dissocie du CD20. Cette dissociation est ralentie par l'agent déplétant du cholestérol, la M β CD (méthyl-beta-cyclodextrine). Les deux molécules se séparent tout en étant dans des radeaux lipidiques différents, puis le BCR s'internalise (221). Cette étude est étayée par une autre qui démontre que la stimulation du BCR améliore l'accès des anticorps anti-CD20, cette accessibilité corrèle avec une relocalisation du CD20 dans les radeaux lipidiques et est dépendante du cholestérol (222). Récemment, l'équipe de JP. Deans a montré que la dissociation du CD20 et du BCR après stimulation du dernier est suivie par une association du CD20 avec des phosphoprotéines et la Cbp (calmodulin-binding protein). Ce résultat fournit une évidence supplémentaire que le CD20 fait partie de la signalisation du BCR (223). Enfin, l'équipe de MS. Cragg a démontré par FRET que l'engagement du CD20 induit l'association du CD20 avec le BCR. En l'absence du BCR, le CD20 est incapable d'induire un flux calcique suite à son engagement par le rituximab et le CD20 utilise la signalisation du BCR pour remplir cette fonction de flux calcique. Inversement, le CD20 agit en tant que canal SOC (Store-operated cation) et participe ainsi à l'activation du flux calcique provoqué par la stimulation du BCR (224). Bien que parfois contradictoires, ces études montrent que le CD20 exerce une fonction intimement liée à celle du BCR.

D. Mécanismes de déplétion des cellules B par le rituximab

Plusieurs équipes se sont intéressées à la compréhension des modes d'actions possibles du rituximab qui peuvent rendre compte de son efficacité thérapeutique. L'ADCC, la CDC et l'apoptose sont les trois mécanismes majeurs (Figure 27) dont les contributions et les limites sont discutées ci-dessous.

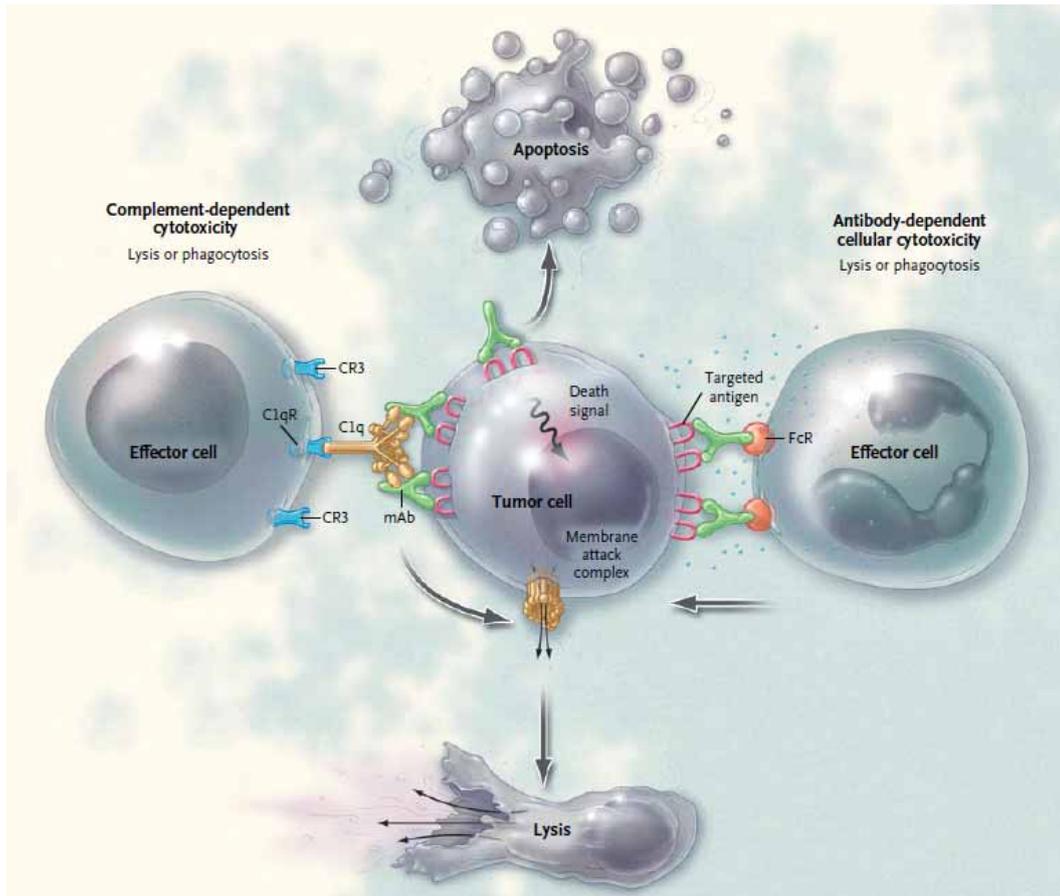


Figure 27: Les mécanismes de déplétion des cellules tumorales par les AcM (225) : la liaison du rituximab (mAb en vert) sur la cellule cible à travers la reconnaissance du CD20 (rose) induit différents modes de neutralisation de la cellule tumorale. 1. La reconnaissance de la queue Fc du rituximab par son récepteur (FcR, boule orange) exprimé par les cellules effectrices induit la sécrétion de molécules cytotoxiques qui ont pour effet la lyse de la cellule tumorale. 2. La liaison de la partie Fc du rituximab avec la composante (C1q) du complément permet la liaison du récepteur au complément (C1qR en bleu) à cette dernière ce qui génère un complexe d'attaque membranaire qui lyse la cellule tumorale. 3. Le rituximab lié au CD20 induit une signalisation intracellulaire qui a pour effet d'activer l'apoptose de la cellule tumorale.

1. La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps

Le CD20 n'est pas connu pour être décroché de la membrane plasmique par "shedding" ni pour s'internaliser après son engagement par un anticorps. De plus, il est fortement exprimé à la surface des cellules B comparativement à d'autres molécules cibles (environ 250.000 molécules/cellule). Le CD20 est donc une cible idéale pour le recrutement des cellules effectrices qui expriment les récepteurs au fragment Fc de l'IgG, les FcγRs. La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) est un mécanisme effecteur

important pour l'éradication des pathogènes intracellulaires et des cellules tumorales. La liaison de l'IgG à l'antigène de la cellule cible permet le recrutement des cellules effectrices comme les NK, les neutrophiles et les macrophages qui expriment les récepteurs FcRs (Table 1). Les récepteurs FcRs peuvent être divisés en deux groupes : les récepteurs activateurs (FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIc et FcγRIIIa) qui signalent *via* un motif ITAM et les récepteurs inhibiteurs (FcγRIIb) qui signalent à travers le motif ITIM (226). L'engagement des récepteurs activateurs par une IgG induit une phosphorylation en tyrosine de l'ITAM par les kinases de la famille Src ou Syk, ce qui active des cascades de signalisation qui conduisent à la sécrétion par la cellule effectrice de modulateurs immunologiques inflammatoires ou cytotoxiques voire les deux. Les molécules sécrétées peuvent être des cytokines, des chimiokines, des protéases ou des espèces réactives d'oxygène. L'engagement du FcγRIIb par une IgG induit la phosphorylation de son motif ITIM, l'activation des phosphatases et l'inhibition du signal activateur. Le niveau de l'activation des cellules effectrices est dicté par la balance entre les signaux provenant des récepteurs activateurs et celles provenant des récepteurs inhibiteurs (227). Le ratio de liaison d'un anticorps aux deux types de récepteurs est dépendant du niveau d'expression de ces FcRs sur les cellules effectrices et de l'affinité que présente l'anticorps pour ces FcRs. Des études de liaison relative aux FcRs en fonction de l'affinité de l'anticorps ont démontré que le ratio de liaison aux récepteurs activateurs et inhibiteurs corrèle avec l'activité ADCC induite par l'anticorps *in vivo* (228).

	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIc	FcγRIIIa	FcγRIIIb
Monocytes/ macrophages	+	+	+	—	+	—
NK cells	—	—	—	+	+	—
Neutrophils	+/-	+	—	—	—	+
B lymphocytes	—	—	+	—	—	—
Dendritic cells	+	+	+	—	+	—
Mast cells	+/-	+	+	—	—	—
Platelets	—	+	—	—	—	—

Table 1: Expression des FcγR par les différentes cellules du système immunitaire (226).

Les études *in vitro* ont démontré que le rituximab induit une ADCC dans des lignées cellulaires de lymphomes (226). De plus, la délétion de tous les FcγR activateurs annule

l'activité thérapeutique du rituximab dans les modèles de xénogreffes chez la souris (229). Inversement, la délétion du récepteur inhibiteur FcγRIIb favorise l'activité de certains anticorps thérapeutiques. Ceci supporte l'idée que des cellules effectrices autre que les NK jouent un rôle primordial dans le processus thérapeutique de l'ADCC, puisque les NK n'expriment pas le FcγRIIb (230). En effet, la phagocytose induite par les monocytes/macrophages semble être très importante pour la déplétion des cellules tumorales par les anticorps anti-CD20. Comme je l'ai évoqué ci-dessus, l'affinité des récepteurs FcRs constitue un point majeur dans l'induction de l'ADCC. A ce sujet, HR. Koene et *al.* ont démontré l'existence d'un polymorphisme nucléotidique au sein du gène FCGR3A codant pour le récepteur activateur FcγRIIIa. Le polymorphisme sur le nucléotide 559 engendre la traduction d'une valine (V) ou d'une phénylalanine (F) en position 158 de la protéine (231). Ce polymorphisme joue un rôle très important dans la réponse au traitement par le rituximab. En effet, G. Cartron et *al.* ont montré l'existence d'une corrélation entre le génotype du FCGR3A et la réponse clinique et moléculaire au rituximab chez des patients atteints de LF. Les patients homozygotes pour FcγRIIIa-158VV présentant les meilleures réponses cliniques (232). Depuis, d'autres équipes ont confirmé ces résultats et ainsi démontré que l'ADCC est un des mécanismes d'action du rituximab *in vivo* (233). Très récemment, une étude a démontré qu'une mutation dans la chaîne gamma du récepteur FcR affectant le signal, inhibe l'effet thérapeutique du rituximab *in vivo*, démontrant encore une fois que l'ADCC représente un mécanisme essentiel pour l'immunothérapie des tumeurs lymphoïdes par le rituximab (234).

2. La cytotoxicité dépendante du complément

Contrairement aux voies des lectines et à la voie alternative, la voie classique du complément requiert l'immunoglobuline. La première étape de l'activation de cette voie est la liaison de la composante C1q au fragment Fc de l'anticorps. Cette liaison active une cascade protéolytique qui génère une grande quantité de C3b, la molécule effectrice majeure du système du complément. La molécule de C3b agit par opsonisation mais se lie aussi à la C3 convertase pour former de la C5 convertase, ce qui génère la formation de complexe d'attaque membranaire (MAC) induisant la mort de la cellule cible (Figure 28). C3b peut aussi se lier au récepteur du complément présent sur les cellules effectrices comme les granulocytes, les macrophages ou les NK et induire une lyse cellulaire ou une phagocytose. Ce phénomène

s'appelle la cytotoxicité cellulaire dépendante du complément médiée par les cellules effectrices (CDCC).

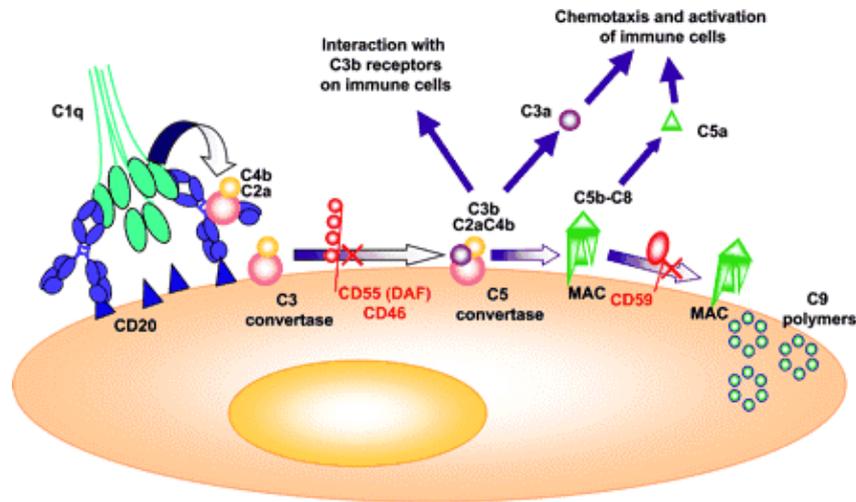


Figure 28: Les mécanismes moléculaires de la cytotoxicité dépendante du complément (226) : La liaison de la composante C1q du complément à la partie Fc du Rituximab induit l'activation d'une cascade protéolytique qui résulte en la génération de quantité importante de C3b. Les molécules C3b agissent en tant qu'opsonine mais se lie aussi à la C3 convertase pour former du C5 convertase ce qui induit la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC), qui provoque la lyse de la cellule cible.

Le rôle du complément dans la thérapie par anticorps monoclonal reste controversé. Les résultats des études *in vivo* dépendent du modèle animal. Plusieurs études chez la souris ont démontré que le système classique du complément est nécessaire. L'inactivation du système du complément chez la souris SCID réduit l'activité thérapeutique des anticorps anti-CD20 (235). Le rituximab est efficace dans un modèle murin de lymphome uniquement si la souris exprime un système du complément intact. Les souris déficientes en C1q ne présentent pas une activité anti-tumorale liée au rituximab (236). Cependant, d'autres groupes ont démontré que le système du complément n'est pas requis pour l'activité du rituximab en utilisant des souris déficientes en C3 ou C4 (227).

Contrairement aux études chez la souris, l'activation du complément par le rituximab est évidente dans des lignées cellulaires humaines de lymphomes B et dans des cellules fraîches de lymphomes issues de patients (237) (238). La sensibilité des cellules à la CDC est dépendante du niveau d'expression du CD20 (237) et peut être différente en fonction du type

de lymphome. Par exemple, le LF et le lymphome du manteau présentent des meilleures réponses à la CDC que la LLC (226).

La capacité des différents anticorps anti-CD20 à activer le complément dépend de leur capacité à induire une translocation du CD20 dans les radeaux lipidiques (239), cet effet dépend de l'épitope du CD20 reconnu par l'anticorps. Au final, l'augmentation des produits d'activation du complément après le traitement au rituximab et la corrélation de cette activation avec l'apparition des effets secondaires (240) confirme que le complément est activé par le rituximab chez le patient. De plus, un des rôles du complément semble résider dans sa capacité à promouvoir une cascade d'inflammation amenant à l'activation des cellules immunitaires effectrices (241). Ceci rend encore plus complexe l'étude de la participation du complément dans l'effet thérapeutique indépendamment des autres mécanismes de déplétion.

En résumé, des données supplémentaires sont requises pour prouver la relation entre l'activation du complément et l'efficacité thérapeutique du rituximab.

3. Effet direct du rituximab sur les cellules cibles tumorales

Outre les effets induits par la reconnaissance du fragment Fc du rituximab par le complément et par les cellules effectrices du système immunitaire, la cible même du rituximab semble jouer un rôle important dans l'effet anti-tumoral de l'anticorps. Comme je l'ai déjà évoqué précédemment, en l'absence de ligand connu du CD20, la compréhension des signaux activés par le CD20 passe par l'étude des effets induits par les anticorps anti-CD20. Avant le rituximab, l'effet de plusieurs autres anticorps anti-CD20 (B1, 1F5, 2H7) sur la signalisation intracellulaire a été caractérisé. Parmi ces effets figurent l'augmentation de c-myc et l'activation des cellules B, l'agrégation homotypique des cellules B, la diminution du niveau de l'IgM membranaire, le "shedding" du CD23, l'augmentation de l'expression du CMH de classe II et des molécules d'adhésion, l'échappement ou l'induction de l'apoptose (242). De plus, JP. Deans et *al.* ont démontré que l'engagement du CD20 par un anticorps augmente le calcium intracellulaire et que le CD20 est associé aux kinases de la famille src, suggérant ainsi l'implication du CD20 dans la signalisation transmembranaire. Par ailleurs, les cellules malignes proliférantes présentent un CD20 hautement phosphorylé inversement aux cellules B non proliférantes, indiquant que le CD20 pourrait être à l'origine d'une signalisation cellulaire régulant la prolifération et l'apoptose cellulaire (192). Cette

signalisation est amorcée par l'événement de translocation du CD20 vers les radeaux lipidiques (243). La localisation du CD20 dans les radeaux lipidiques dépend d'une courte séquence cytoplasmique (résidus 219-225) et de la concentration des radeaux lipidiques en cholestérol (214). Cette translocation est médiée par les anticorps anti-CD20 de type I y compris le rituximab.

L'engagement du CD20 par le rituximab le localise dans les radeaux lipidiques où il devient associé à des tyrosines kinases comme Lyn, Fyn ou Lck qui s'activent et activent à leur tour la PLC γ 2 induisant alors un flux calcique suivi par une activation des caspases et une augmentation de l'apoptose (244) (245) (246). L'équipe de JP. Deans a démontré par la suite que le CD20 est constitutivement présent dans les radeaux lipidiques (247) mais que l'engagement par un anticorps induit un rapprochement et une agrégation des radeaux lipidiques, responsable de l'activation des src kinases et de l'induction du signal. Sans traitement, le CD20 est associé avec PAG (ou Cbp : Csk-binding protein), une protéine adaptatrice hautement phosphorylée sur tyrosines et exclusivement localisée dans les radeaux lipidiques. PAG recrute Csk pour maintenir les kinases de la famille Src inactives. L'engagement du CD20 par le rituximab rapproche les radeaux lipidiques, permet l'activation des protéines kinases src et l'induction du signal. La composition lipidique de la membrane semble donc être importante pour l'effet du rituximab. En effet, en plus de la translocation du CD20 et de l'agrégation des radeaux lipidiques, le cholestérol conditionne la mobilisation du calcium et l'apoptose induite par le rituximab (248). De plus, le traitement aux statines (inhibiteurs de la synthèse du cholestérol) inhibe l'effet anti-tumoral du rituximab *in vitro* en affectant la conformation du CD20 (249). Chez les patients atteints de LLC, une corrélation entre le taux de GM1, ganglioside majeur des radeaux lipidiques, et la réponse au rituximab a été retrouvée (250) mais le traitement aux statines ne semble pas affecter la réponse au traitement R-CHOP (251). L'activation des kinases Src et le flux calcique semblent aussi jouer un rôle majeur dans la signalisation induite par le CD20 puisque le traitement avec des inhibiteurs des src kinases ou des chélateurs de calcium empêche l'effet apoptotique du rituximab (245).

D'autres groupes ont décrit l'apoptose induite par le rituximab mais en démontrant des événements moléculaires contradictoires à ceux cités ci-dessus. Par exemple, Semac et *al.* ont démontré que l'engagement du CD20 par le rituximab induit bien une agrégation des radeaux lipidiques dont les sphingolipides deviennent plus résistants. Ce changement de structure des radeaux lipidiques affecte l'interaction entre Lyn et PAG conduisant à l'inhibition de Lyn (252). En accord avec ces travaux, notre équipe a démontré que le rituximab affecte la

structure des radeaux lipidiques en activant la sphingomyélinase acide qui hydrolyse la sphingomyéline du côté externe de la membrane plasmique. Le céramide issu de cette hydrolyse permet une coalescence des radeaux lipidiques et induit une signalisation qui amène à l'inhibition de la prolifération *via* la régulation de la voie MAPK/p27(Kip1) (253). Par la suite, l'équipe a montré que le traitement au rituximab inhibe la prolifération en inhibant la PKC ζ (une cible du céramide) et ainsi inactive la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) qui est suractivée dans les lymphomes (254) (162) (Figure 30). D'autres études ont montré que l'effet apoptotique du rituximab ne provient pas d'une voie apoptotique indépendante des caspases, sans mettre en évidence les événements moléculaires de ce phénomène alternatif (255) (256).

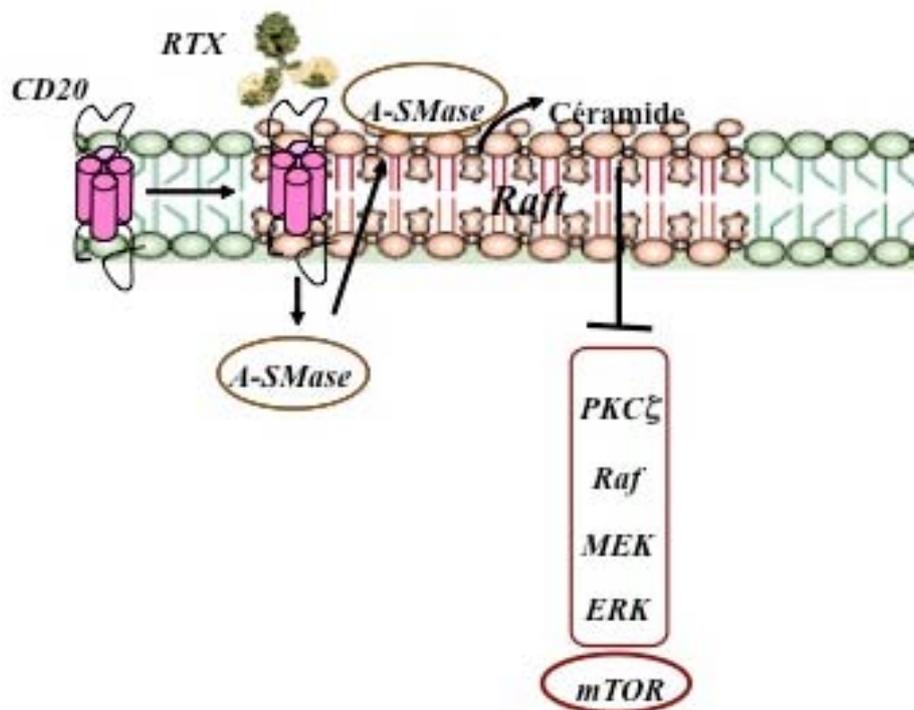


Figure 30: *Evénements membranaires et inhibition de la signalisation par le Rituximab d'après (253) et (254) : L'engagement du CD20 par le rituximab induit sa translocation dans les radeaux lipidiques et l'activation de la sphingomyélinase acide (A-SMase). La A-SMase mobilisée au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique hydrolyse la sphingomyéline en céramide. Le céramide est un médiateur lipidique qui inhibe la prolifération la survie cellulaire contrôlées par la voie PKC zeta/ERK/mTOR.*

L'équipe de B. Bonavida a largement étudié la signalisation intracellulaire induite par le rituximab et a montré l'inhibition de la p38 MAPK, de la voie de survie NF κ B, de ERK1/2 et de AKT. Ces événements induisent l'inhibition de la voie IL-10/Stat-3 et provoquent la diminution de la transcription des gènes codant pour Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 (Figure 30). De

plus, le rituximab inhibe l'expression du facteur de transcription YY1 (Yin Yang 1) qui régule négativement l'expression de Fas et DR5 (Figure 31). Au final, ces effets ont pour conséquence la chimiosensibilisation des cellules et donc la facilitation de l'effet anti-tumoral de la combinaison R-CHOP (257). De plus, l'augmentation de l'expression de Fas et du DR5 nous permet d'envisager une augmentation de l'apoptose induite par des anticorps monoclonaux comme l'anti-Fas ou l'anti-TRAIL utilisés en combinaison avec le rituximab. La même équipe a démontré que ces événements moléculaires sont dépendants du CD20 puisque les mêmes résultats sont obtenus en traitant les cellules avec le fragment Fab'2 du rituximab (258).

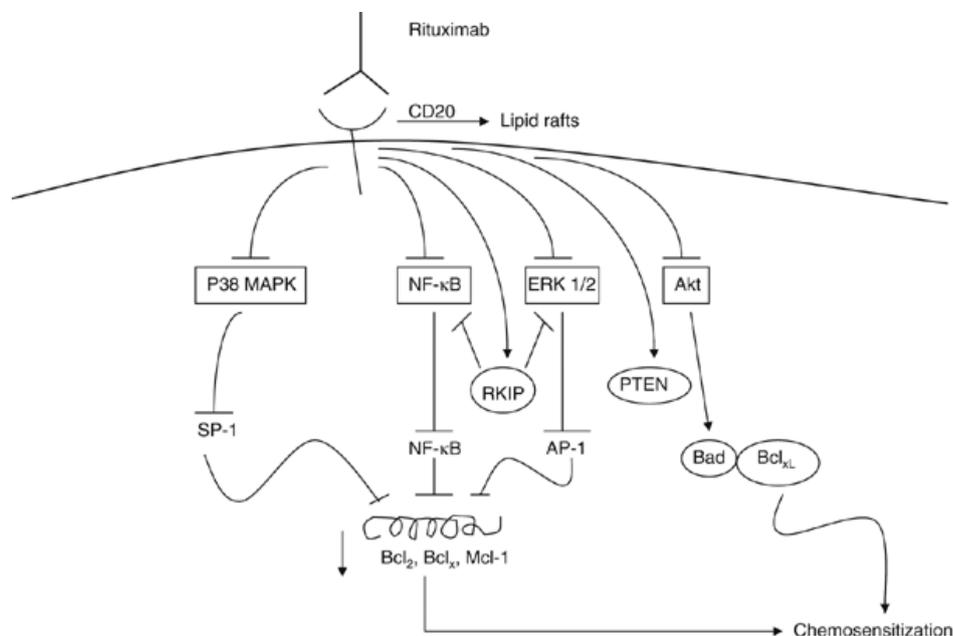


Figure 30: *Inhibition de l'expression des protéines anti-apoptotiques par le rituximab (257) :* La signalisation induite par l'engagement du CD20 induit une inhibition des voies p38MAPK, NFκB et ERK qui régule les facteurs de transcription SP-1, NFκB et AP-1. Cela a pour conséquence une inhibition de la transcription des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, BclL et Mcl-1. L'inactivation d'Akt lève l'inhibition de la protéine pro-apoptotique Bad. Tous ces événements pourraient contribuer à l'effet chimiosensibilisateur du rituximab.

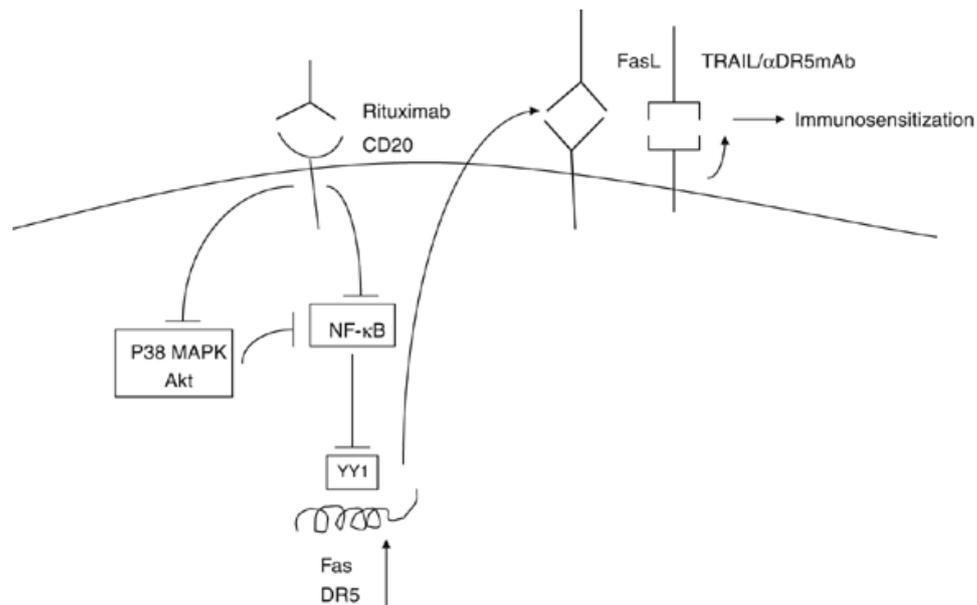


Figure 31: *Effet du rituximab sur l'apoptose dépendante de Fas (257)* : l'inhibition de la voie NFκB par le rituximab inhibe la répression transcriptionnelle de Fas et DR5 par Yin Yang 1 (YY1). L'augmentation de l'expression de Fas et de DR5 permettrait une augmentation de l'apoptose induite par le ligand de Fas (FasL) ou par TRAIL (ligand de DR5). L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-Fas ou anti-DR5 en combinaison avec le rituximab pourrait améliorer l'effet anti-tumoral.

Les effets pro-apoptotiques ou anti-prolifératifs du rituximab (et des anti-CD20 en général) observés dans ces études, dépendent de plusieurs paramètres: la concentration d'anticorps utilisée, le temps de traitement, le modèle cellulaire et surtout l'utilisation de l'anticorps seul ou "cross-linké" (XL) avec un anticorps secondaire. Le XL permet l'amplification de l'effet du rituximab en agrégeant les molécules de CD20 (Figure 32). Ceci pourrait se produire *in vivo* via les récepteurs Fc (259). Tous ces paramètres pourraient rendre compte de la complexité de l'interprétation de ces résultats. Le tableau 2 résume les effets des anticorps anti-CD20 sur l'induction de l'apoptose en fonction des modèles cellulaires et illustre la nécessité d'exploration des mécanismes moléculaires mis en jeu par le rituximab pour induire un effet anti-tumoral *via* la signalisation du CD20.

En conclusion, les données bibliographiques montrent que le rituximab est capable d'induire des événements moléculaires conduisant à une perturbation de la balance apoptose/prolifération cellulaire. Néanmoins, le niveau de contribution de ces événements dans l'effet anti-tumoral chez le patient reste à déterminer.

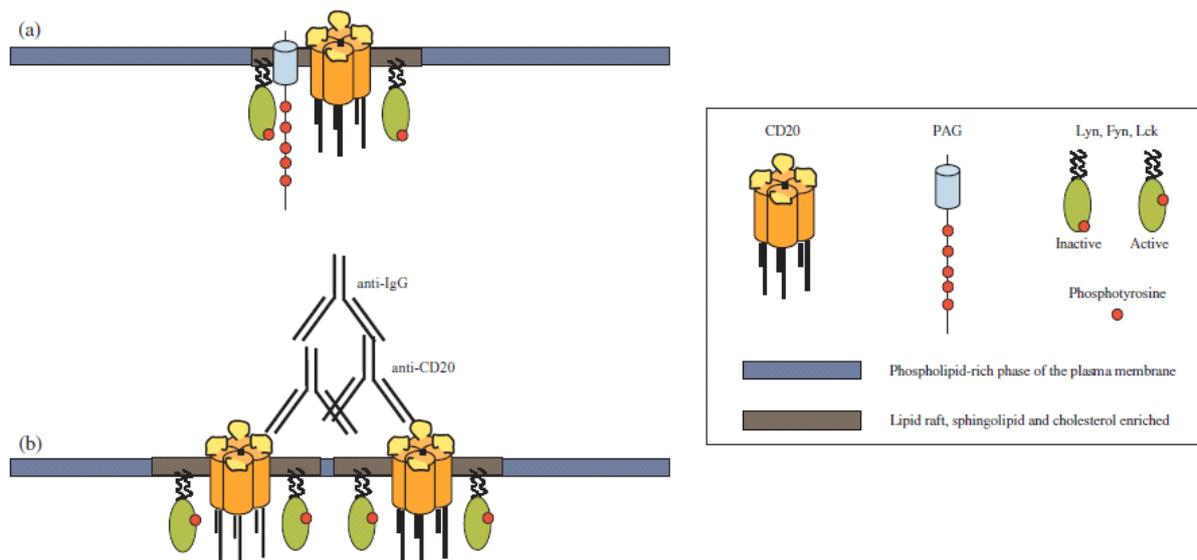


Figure 32 : L'effet du "crosslinking" du rituximab sur les signalosomes du CD20 (242) : PAG (Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid-enriched microdomains) est une protéine adaptatrice qui participe, avec la protéine Csk, à l'inactivation de Lyn. Le « crosslinking » (l'utilisation d'un anti-IgG humaine qui va reconnaître les parties Fc du rituximab et créer un complexe d'anticorps) en (b) induit l'agrégation des CD20 et augmente l'activation des src kinases (Lyn, Fyn ou Lck).

CD20 mAb	Apoptosis without XL	Apoptosis with XL	Cells
B1	no	yes	Ramos
	yes	enhanced	Ramos, Raji
	yes	no additional effect	BALL-1, DHL-4, Daudi
1F5	no	yes	Ramos
2H7	no	yes	Ramos
Ritux	no	NT	DHL-4, DOHH2, WSU-NHL, Karpas 422, JVM3, SLE005, HOR
	no	no	Daudi, BJAB
	no	yes	Ramos, Raji, Daudi, BALL-1, DHL-4, Namalwa, primary B-CLL
	yes	enhanced	Ramos, BL-60, DHL-4
	yes	no additional effect	DHL-4, Ramos
	yes	NT	Raji, Daudi, Jok-1, WT-100, DHL-4

XL, hyper-cross-linking; NT, not tested.

Table 2: Synthèse des effets apoptotiques des anti-CD20 (242).

4. L'effet "vaccinal" du rituximab

Des études ont indiqué que la réponse clinique au rituximab atteint son maximum quelques mois après l'injection, indiquant que les mécanismes de cytotoxicité rapide comme l'ADCC, la CDC et l'apoptose ne sont pas les seuls impliqués. Après la lyse de la cellule tumorale par ces mécanismes, les cellules dendritiques pourraient présenter des peptides dérivés de la cellule tumorale induisant ainsi la formation de lymphocytes T cytotoxiques

spécifiques (260). Il est difficile de démontrer l'existence de ce genre de réaction immunitaire chez l'Homme, mais les études chez la souris ont clairement montré que l'immunothérapie par les anticorps monoclonaux peut induire une immunité anti-tumorale spécifique dirigée contre des antigènes tumoraux encore inconnus (261) (262). L'induction de cette immunité spécifique requiert les cellules dendritiques suggérant que des thérapies adjuvantes qui stimulent ces cellules (GM-CSF, Flt3L, IFN α) peuvent être bénéfiques. Dans ce contexte, il est important de noter que la combinaison rituximab/GM-SCF a donné des résultats prometteurs chez des patients en rechute ou réfractaires au traitement (263). De plus, le retraitement des patients en rechute avec le rituximab ou la thérapie de maintenance donnée aux patients déjà répondeurs au rituximab augmente les taux de réponse (264) (265). Ces résultats suggèrent que le rituximab pourrait avoir un effet "vaccinal". La confirmation de l'existence de cet effet permettrait d'envisager l'utilisation du rituximab plus fréquemment en thérapie de maintenance. Des études cliniques randomisées sont nécessaires pour confirmer l'impact clinique de cette approche.

E. Rituximab et maladies auto-immunes

Le rationnel d'utilisation du rituximab dans le traitement des maladies auto-immunes était très faible étant donné l'absence de modèles murins, le rôle inconnu du CD20 dans la maturation et la différenciation des cellules B et l'absence d'expression spécifique du CD20 sur les cellules B autoréactives. Mais d'un autre côté, le dogme des cellules B passives a été renversé par les travaux de Lanzavecchia qui a démontré que les cellules B sont aussi des CPA (266). Cette découverte a été suivie par d'autres qui ont démontré d'autres fonctions des cellules B comme leur capacité à promouvoir et à activer les cellules T, à médier une auto-immunité indépendante de l'anticorps, à produire des cytokines (TNF α , IL-4 et IL-10) et des molécules co-stimulatrices des cellules T. Toutes ces fonctions jouent un rôle dans les maladies auto-immunes et peuvent être neutralisées par la déplétion des cellules B par le rituximab (267). La première évidence clinique de l'efficacité du Rituximab dans les maladies auto-immunes vient de l'observation d'un patient atteint à la fois de lymphome B et de polyarthrite rhumatoïde (PR). Le traitement du lymphome de ce patient par le rituximab a induit une rémission des symptômes de la PR (268). Cette observation clinique a ouvert la voie pour l'utilisation du rituximab chez d'autres patients souffrant de PR et aussi d'autres maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé, le syndrome de Sjögren et

la sclérose en plaques ou encore, le purpura idiopathique thrombocytopénique, la granulomatose de Wegener et l'anémie hémolytique auto-immune (269) (270). Alors que l'utilisation du rituximab s'étend encore à d'autres maladies autoimmunes et que son efficacité est mesurée surtout par le taux de déplétion des cellules B, les mécanismes d'action exacts de cet anticorps dans ce type de maladie restent non déterminés. Les études portant sur la compréhension du rôle des lymphocytes B dans la biologie de ces maladies et des mécanismes d'action du rituximab permettront une meilleure compréhension de cette efficacité, amenant ainsi à l'amélioration des traitements des malades.

F. Effets secondaires

Malgré le fait que le rituximab soit en général très bien toléré, la première injection peut être compliquée par des effets secondaires. Ces effets secondaires sont observés dans les heures qui suivent l'injection. Ils incluent : fièvre, vertiges, nausées, fatigue, hypotension, prurit, inflammation de la gorge et des bronchospasmes transitoires (271). Ces symptômes font partie du syndrome de "cytokine-release". Leur fréquence corrèle avec le nombre de cellules malignes circulantes au moment de l'injection. L'activation du complément pourrait être en partie responsable de ces effets secondaires.

Une autre toxicité provient de la déplétion rapide des lymphocytes B normaux du sang, de la moelle osseuse et des ganglions lymphatiques et qui dure entre 3 et 6 mois après l'administration du rituximab. Dans le cas de traitement court, cette toxicité ne met pas en danger l'immunité puisque le taux des immunoglobulines ne décroît pas rapidement et les patients ne présentent pas de risques élevés d'infection (272) malgré quelques exceptions d'infection à l'herpès virus, le cytomégalovirus ou le virus de l'hépatite B. La thérapie de maintenance, en particulier après transplantation autologue, est associée à une diminution des immunoglobulines et à une toxicité tardive (271). Des événements toxiques rares comme la neutropénie et les réactions pulmonaires sont parfois observés. La neutropénie apparaît 1 à 6 mois après l'injection, elle est transitoire et rarement associée à une infection (273).

G. Mécanismes de résistance au rituximab

Malgré l'avancé considérable qu'a apporté le rituximab au traitement des LNHs, ces maladies restent incurables. Environ 50% des patients atteints de LF en rechute ne répondent pas au traitement par le rituximab (186) et près de 60% des patients déjà traités ne présentent pas de bénéfice après retraitement avec l'anticorps (264). Administré seul ou en combinaison, le rituximab est limité par des mécanismes de résistance. Il est donc urgent de savoir si cette résistance est innée ou acquise, quelles sont les prédispositions des patients à la réponse au traitement ou comment les cellules développent ces résistances. Une meilleure connaissance de ces mécanismes de résistance permet de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les événements moléculaires qui déterminent l'efficacité du rituximab dépendent du patient ainsi que de la cellule tumorale elle-même. Outre la pharmacocinétique du rituximab qui est différente entre les patients et qui peut influencer son efficacité (274), les variations dans les mécanismes qui assurent l'effet anti-tumoral influencent aussi la cytotoxicité du rituximab.

1. Résistance due au niveau et à la localisation du CD20

L'altération du CD20 et de son niveau d'expression est considérée comme une des premières causes de résistance au rituximab. En effet, contrairement au dogme admis depuis des années, les travaux démontrant l'implication de la variation du niveau du CD20 dans la résistance au rituximab commencent à s'accumuler. La réponse au traitement peut être influencée par le taux initial du CD20 qui est différent entre les différentes maladies lymphoprolifératives. En effet, les cellules de LLC par exemple expriment faiblement le CD20 en comparant avec celles du lymphome du manteau ou du DLBCL (275). L'acquisition de la résistance au rituximab par les lignées cellulaires *in vitro* corrèle avec une diminution de l'expression du gène et de la protéine CD20 (276) (277). Des mutations dans la partie C-terminale du CD20 ont été retrouvées chez des patients atteints de LNHs qui reçoivent du rituximab. La présence de ces mutations corrèle avec une diminution de l'expression du CD20 (278). H. Junji et *al.* ont montré que le niveau de l'ARNm codant pour le CD20 ainsi que le niveau de la protéine diminue fortement chez des patients atteints de LNH traités par R-CHOP. L'extinction du CD20 semble provenir d'un phénomène

épigénétique puisque le traitement de ces cellules avec la 5-azacytidine restaure l'expression du CD20 (279). NA. Johnson et *al.* ont analysé le niveau du CD20 chez des patients atteints de DLBCL et ont montré que, contrairement à l'immunohistochimie, la cytométrie en flux permet de détecter une baisse du niveau du CD20, corrélée avec une survie inférieure des patients (280). Récemment, la présence d'une isoforme de CD20 issue d'un épissage alternatif a été mise en évidence dans des cellules B issus de patients. Cette isoforme, absente dans les cellules B du sang périphérique des donneurs sains, est intracellulaire et sa présence corrèle avec la résistance des patients au rituximab (281). Enfin, un phénomène de saturation des fonctions effectrices pour éliminer les cellules B recouvertes de rituximab a été observé chez des patients atteints de LLC et de lymphome du manteau. La dose élevée de 750 mg de rituximab semble être responsable du phénomène qui engendre un "arrachement" du CD20 lié au rituximab par les cellules effectrices à travers un mécanisme de "shaving" (282). Cette perte du CD20 permettrait aux cellules de LLC de survivre malgré la présence du rituximab. Le "shaving" peut être atténué en utilisant des faibles doses de rituximab (283) et en bloquant le Fc γ RI (282).

Bien que le rôle que joue la localisation du CD20 dans les radeaux lipidiques dans l'effet anti-tumoral *in vivo* reste à élucider, quelques données bibliographiques montrent que des altérations dans la composition lipidique des radeaux lipidiques (comme le taux de GM1) pourraient participer à la résistance au rituximab (250). Des études plus approfondies sont évidemment nécessaires pour confirmer ces observations.

2. Résistance relative à l'ADCC et à la CDC

Les variations des molécules intervenant dans les mécanismes de cytotoxicité médiés par le rituximab participent aussi à la résistance. Le taux de cellules effectrices, le ratio des récepteurs FcR activateurs sur les récepteurs inhibiteurs (228) ainsi que les polymorphismes de ces récepteurs participent à la résistance des patients au rituximab (232). De plus, les cytokines comme l'IL-2, l'IL-12, l'IFN α et le GM-CSF sont connues pour améliorer l'activité ADCC et la phagocytose en stimulant l'activité ou l'expansion des cellules NK et des macrophages (284) (285). L'expansion des cellules NK médiée par l'IL-2 corrèle avec l'activité du rituximab chez les patients atteints de LNH (286). Ainsi, certaines de ces cytokines utilisées en combinaison avec le rituximab améliorent le traitement, ce qui suggère que leur absence intrinsèque peut constituer un obstacle à l'effet du rituximab.

En ce qui concerne la CDC, les molécules inhibitrices du complément comme CD35, CD46, CD55 ou CD59 peuvent aussi jouer un rôle dans la mise en place de la résistance au rituximab. En effet, les cellules Ramos devenues résistantes au rituximab surexpriment les molécules CD55 et CD59 (287). De plus, l'anticorps antagoniste anti-CD59 sensibilise les cellules à la cytotoxicité du rituximab (288). Enfin, un polymorphisme du C1q [276A/G] a été retrouvé chez des patients atteints de LF et l'homozygotie A corrèle avec une bonne réponse au traitement (289).

3. Résistance due à la signalisation intracellulaire

Que le rituximab induise directement de l'apoptose *in vivo* ou qu'il induise une sensibilisation des cellules tumorales à l'effet de la chimiothérapie, la dérégulation des cascades de signalisation pourrait contribuer à la résistance envers le rituximab. En effet, l'équipe de Bonavida a démontré que les cellules résistantes au rituximab présentent une activation constitutive des voies NFκB et ERK1/2 amenant à la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 (277). La protéine Bcl-X_L est aussi surexprimée dans les modèles de cellules résistantes au rituximab *in vitro* et *in vivo* (277) (290). Une surexpression du facteur de transcription YY1, une diminution des protéines pro-apoptotiques Bax, Bad et Bak par rapport aux protéines Bcl-2 et Mcl-1 peuvent aussi rendre compte de la résistance des cellules (291). Notre équipe a démontré que le rituximab inhibe la prolifération des cellules de LF *via* l'inhibition du module PKCζ/ERK/mTOR. L'expression d'un variant constitutivement actif de la PKCζ empêche l'effet inhibiteur du rituximab sur la voie de prolifération mTOR, montrant que l'état d'expression et d'activation des PKC peut conditionner la résistance au rituximab (254). Enfin, comme j'ai évoqué ci-dessus, l'équipe de Cragg a démontré que le niveau d'expression du BCR conditionne aussi la réponse cellulaire au rituximab *in vitro* (224).

H. Nouvelle génération d'anti-CD20

Suivant les effets biologiques engendrés, les anti-CD20 ont été classés en deux types. Le type I ou rituximab-like, induit la translocation du CD20 dans les radeaux lipidiques,

active le complément, et présente de faible taux d'apoptose. Le type II ou Bexxar-like qui n'induit pas de translocation du CD20 dans les radeaux lipidiques, n'active pratiquement pas le complément, mais engendre un niveau élevé d'apoptose. Les deux types sont capables d'activer l'ADCC. Malgré ces propriétés fonctionnelles distinctes, on ignorait les raisons pour lesquelles ces deux types étaient différents, jusqu'aux travaux de P. Umana et *al.* portant sur une nouvelle génération d'anti-CD20, le GA101. Le GA101 est un anticorps totalement humanisé de type II sélectionné pour son effet accru sur l'induction de l'ADCC et de l'apoptose. Il a été développé à partir d'un anticorps murin d'isotype IgG1 le B.ly1. qui ne présentait pas de capacité à initier efficacement l'apoptose. Une des différences structurales qu'apporte le GA101 est la présence dans sa partie Fc d'un groupement d'oligosaccharide non fucosylé. Cet anticorps glycosylé présente une meilleure affinité aux récepteurs Fc et donc induit une meilleure ADCC. La séquence codant pour la partie variable V_H comporte une valine à la position 11 essentielle pour l'effet pro-apoptotique de cet anticorps (292). De façon surprenante, le GA101 ne stabilise pas le CD20 dans les radeaux lipidiques comme le fait le rituximab. Cet anticorps est actuellement en cours d'essai afin d'évaluer son efficacité potentiellement supérieure à celle du rituximab.

La compréhension progressive des modes d'action du rituximab permet non seulement le développement de nouveaux anticorps plus performant mais ouvre la voie vers des possibilités de combinaison thérapeutique avec des molécules ciblant les voies de résistance développées par les cellules pour échapper à la thérapie anti-tumorale. Dans ce contexte, je me suis aussi intéressée à l'étude des effets de nouveaux agents anti-tumoraux tels que l'enzastaurine (inhibiteur des PKC) dans les LF. Une synthèse bibliographique concernant l'enzastaurine et ses cibles moléculaires est présentée dans le dernier chapitre de l'introduction.

V. L'enzastaurine

L'enzastaurine (LY317615.HCl) est un inhibiteur des protéines kinases C (en particulier la PKC β) et de la voie PI3K/Akt développé par les laboratoires Eli Lilly (293).

A. Les protéines kinases C

1. Les PKC comme cibles anti-tumorales

La famille des Protéines Kinases C (PKC) correspond à des sérine/thréonine kinases cytoplasmiques qui régulent de nombreux processus physiologiques parmi lesquels la prolifération, la différenciation, l'angiogenèse, la survie cellulaire ou encore la migration cellulaire (294). Dans ces cas, l'activation des PKC est régulée à la fois en amplitude et dans la durée, garantissant le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Neuf gènes ont été identifiés chez l'Homme. Ils codent 12 isoenzymes différentes classées en trois groupes : les PKC classiques (cPKC : PKC α , PKC β I, PKC β II et PKC γ) dont la régulation dépend du calcium et de cofacteurs lipidiques (dont le Diacylglycérol, DAG), les nouvelles PKC (nPKC : PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC μ , PKC θ et PKC ν) indépendantes du calcium, et les PKC atypiques (aPKC : PKC ζ et PKC λ) dont l'activité ne dépend ni du calcium, ni des cofacteurs lipidiques (294) (295). En fonction de la spécificité de substrat, de l'isoforme mise en jeu, du mode d'activation et de la localisation subcellulaire de l'enzyme, l'activation des PKC conduit préférentiellement à une réponse cellulaire spécifique.

L'activation des PKC est de longue date reconnue comme un facteur de carcinogénèse associée à l'exposition à différents agents chimiques. La PKC β a été impliquée dans les processus pro-tumoraux de nombreux cancers, dont les cancers du colon, du poumon ou du sein par exemple, et son expression est altérée dans certaines tumeurs, parfois en corrélation avec le stade et la progression tumorale (294) (296). Un niveau élevé de PKC β est associé à la transformation maligne de nombreuses lignées cellulaires *in vitro*. Cependant, *in vivo*, son rôle est plus ambigu et complexe (295). Dans le cancer du colon par exemple, l'augmentation de l'expression de la PKC β II (le 2^{ème} variant d'épissage du gène codant pour la PKC β) est un événement précoce dans la carcinogénèse et la favorise, comme en atteste un modèle murin transgénique surexprimant PKC β II, qui montre une hyperprolifération de l'épithélium

colique, et une carcinogenèse accrue (294). A l'inverse, une surexpression de PKC β I (premier variant d'épissage) dans le cancer du sein semble induire un phénotype moins agressif (295).

Par ailleurs, les PKC sont activées en réponse à de nombreux signaux essentiels à la progression tumorale. Les PKC β en particulier jouent un rôle pertinent dans l'angiogenèse. Des expériences, utilisant un modèle de cornée murin montrent que les souris knock-out (KO) pour PKC β ont une moindre néovascularisation en réponse à l'hypoxie, tandis que les souris surexprimant PKC β II ont une néovascularisation augmentée dans les mêmes conditions (294) (296).

2. PKC et BCR

Les PKC jouent des rôles divers dans les hémopathies malignes, en particulier dans les lymphopathies B. La PKC β est la principale isoforme exprimée dans les lymphocytes B (LB), normaux ou malins. Les souris KO pour PKC β présentent un défaut de prolifération des LB en réponse à divers stimuli (297). La PKC β , ainsi que d'autres isoformes de PKC, participent à l'homéostasie des LB à travers leur activation en aval du BCR.

En effet, plusieurs études ont montré que les PKC appartiennent à diverses voies de signalisation activées par l'engagement du BCR et participent ainsi à la régulation de la prolifération, l'apoptose ou la différenciation des LB. La stimulation du BCR active plusieurs kinases qui activent la PLC γ 2 ce qui induit un flux calcique, nécessaire à l'activation de certaines PKC. La génération du flux calcique est dépendent de la localisation membranaire et de l'activation de la protéine Btk (298). La stimulation du BCR induit la translocation du complexe IKK/PKC β aux domaines lipidiques radeaux lipidiques puis l'activation de la voie NF κ B, ce qui démontre le rôle de la PKC β dans la survie des LB dépendante du BCR (299). D'autres isoformes de PKC ont été décrites pour agir en aval du BCR. Par exemple, la PKC δ s'associe avec le BCR (300) et son activation *via* Syk promeut la survie des cellules de LLC à travers la régulation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (301). La PKC ζ tient sa place en tant que protéine régulatrice de la survie et de la prolifération des LB à travers son rôle dans la signalisation du BCR, en particulier *via* la régulation des voies ERK, NF κ B et mTOR (254) (302). Ces résultats placent les PKC au centre d'une boucle de signalisation nécessaire pour l'activation du signal BCR et la survie des LB et démontrent qu'un défaut d'expression ou d'activation des PKC pourrait participer à la transformation des LB.

Dans les LB malins, la PKC β est surexprimée, entre autres, dans la LLC, le LF et le DLBCL, où elle est corrélée avec un mauvais pronostic en terme de survie (303) (304). Plus de 90% des échantillons issus de lymphomes du manteau et de LF expriment fortement la PKC β (305). La présence de la PKC β dans des souris transgéniques TCL1 est essentielle pour le développement d'une LLC chez ces souris (306). De plus, l'expression de la protéine kinase ZAP-70 dans les cellules de LLC, induit l'augmentation du recrutement de la PKC β II dans les radeaux lipidiques et augmente ainsi la résistance à l'apoptose de ces cellules (307).

Il est donc clairement établi que les PKC modulent différents aspects de la carcinogénèse, et que, parmi les PKC, la PKC β pourrait avoir un rôle clé dans la promotion et la progression tumorale. Ainsi, dans le contexte actuel de recherche de thérapies ciblées, les PKC apparaissent comme cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement du cancer. Différents inhibiteurs de PKC sont en cours de développement et parmi eux, l'enzastaurine qui montre des résultats prometteurs.

B. L'enzastaurine, structure et utilisation

L'enzastaurine est un bisindolymaleide acyclique analogue de la staurosporine.

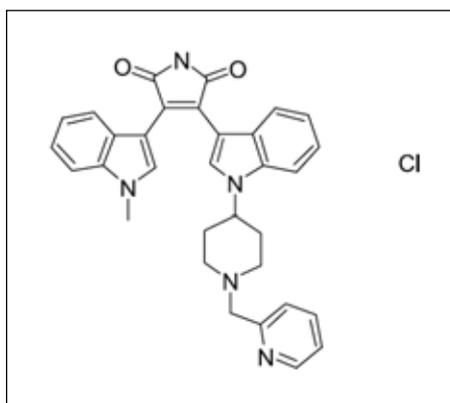


Figure 33 : Structure chimique de l'enzastaurine (308).

L'enzastaurine a initialement été développée pour inhiber la PKC β en entrant en compétition avec l'adénosine triphosphate (ATP) au niveau de son site de liaison sur l'enzyme, empêchant ainsi sa phosphorylation et son activation. L'IC₅₀ (concentration

inhibitrice 50) de la PKC β *in vitro* est de 6 nmol/l. A des concentrations plus élevées, de l'ordre du μ mol/l, l'enzastaurine inhibe également d'autres sérine/thréonine kinases, notamment les autres PKC (PKC classiques et la PKC atypique ζ) (296, 308).

En clinique, l'enzastaurine est administrée par voie orale à raison de 500 mg par jour. L'élimination de l'enzastaurine et de ses métabolites se fait principalement par voie biliaire (309). Il est à noter que la concentration plasmatique d'enzastaurine après administration orale présente une grande variabilité interindividuelle. L'enzastaurine présente un profil de toxicité favorable, et est généralement bien tolérée par les patients. Les effets indésirables les plus fréquents sont une chromaturie (coloration des urines en orange, due aux excipients colorant le comprimé) et une asthénie.

C. Mécanismes d'action

L'action anti-tumorale de l'enzastaurine passe à la fois par des mécanismes directs (inhibition de la prolifération et/ou induction de l'apoptose des cellules tumorales) et indirects (action sur le microenvironnement tumoral : inhibition de la néo-angiogenèse).

1. Action anti-angiogénique

Lorsqu'une tumeur grossit, les cellules situées en son centre se retrouvent éloignées des vaisseaux sanguins, ce qui génère de l'hypoxie et une carence en nutriments. En réponse à cette hypoxie, de nombreuses tumeurs sont capables de sécréter du VEGF, un agent pro-angiogénique, qui, en se fixant sur son récepteur (VEGFR), va engendrer la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Ceci aboutit à la formation de néo-vaisseaux sanguins, qui vont pouvoir irriguer la tumeur et lui permettre ainsi de poursuivre sa croissance. Ce phénomène, appelé néo-angiogenèse, est une étape cruciale au développement tumoral et est aujourd'hui la cible de diverses stratégies thérapeutiques.

La PKC β est un acteur critique de la voie de signalisation en aval du VEGFR, et au vu de son action inhibitrice de la PKC β , l'enzastaurine a initialement été développée comme agent anti-angiogénique. Elle empêche ainsi la prolifération et la mobilité des cellules endothéliales et donc la formation des néo-vaisseaux (Figure 34).

Dans un modèle d'angiogenèse *in vivo* chez le rat, l'implantation dans la cornée, normalement avasculaire d'un disque imprégné de VEGF, génère la formation de micro-vaisseaux autour de ce disque 7 à 10 jours après son implantation. L'administration de

l'enzastaurine par voie orale aux animaux deux fois par jour pendant dix jours après l'implantation du disque induit une diminution drastique de l'apparition de cette néo-vascularisation, témoignant de l'activité anti-angiogénique de ce médicament (293). Cette activité a également été confirmée au cours d'études pré-cliniques dans des modèles murins. La prise d'enzastaurine par voie orale diminue le taux plasmatique de VEGF chez des souris porteuses de xénogreffes de tumeurs humaines, et induit une diminution de la densité des micro-vaisseaux dans ces tumeurs (296).

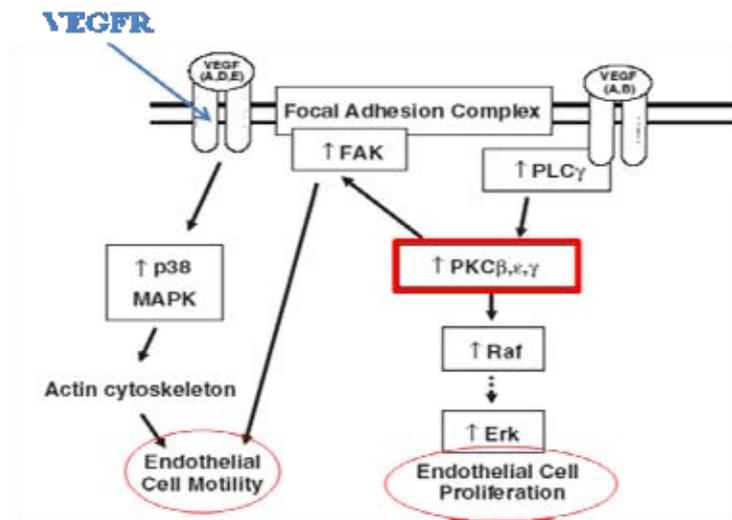


Figure 34 : Schéma simplifié du rôle de la PKCβ dans la signalisation en aval du VEGFR (à partir de (293)) : La reconnaissance du VEGF par son récepteur présent sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins induit l'activation de la PLCγ et donc des PKC. L'activation des PKC est centrale parce qu'elle est au carrefour de l'activation des voies prolifératives comme Raf/ERK et des voies de mobilité et migration cellulaire impliquant la kinase FAK (Focal adhesion kinase). Ces actions concertées provoquent la formation de vaisseaux sanguins qui servent à irriguer la tumeur.

2. Action anti-tumorale directe

L'activité de l'enzastaurine n'est pas limitée au microenvironnement. Il a été décrit que l'enzastaurine agit aussi directement sur les cellules tumorales, et est capable d'inhiber leur prolifération et d'induire leur apoptose.

L'enzastaurine possède une action anti-proliférative et/ou pro-apoptotique sur de nombreuses lignées cellulaires en culture (lignées de leucémies, mélanomes, cancer du poumon non à petites cellules, cancer de l'ovaire, de la prostate...) à des concentrations de l'ordre du micromolaire, correspondant aux concentrations retrouvées dans le plasma des

patients au cours des essais cliniques (2-8 μM). Les études ont vite montré que l'enzastaurine inhibe aussi la voie de survie PI3K/AKT dans les cultures cellulaires, ainsi que dans les tissus tumoraux provenant de xéno greffes de tumeurs du colon ou de glioblastomes. L'enzastaurine provoque une diminution des phosphorylations activatrices de AKT (thréonine 308) et de ses principaux substrats, la Glycogène Synthase Kinase 3 bêta (GSK3 β) (sérine 9) et la protéine ribosomale S6 (sérines 240 et 244) (308). Ceci suggère que l'effet anti-tumoral observé passe par une suppression de la signalisation de la voie AKT. Les études ont donc montré que l'enzastaurine provoque la diminution de la phosphorylation inhibitrice de GSK3 β dans les tumeurs xéno greffées ainsi que dans le sang périphérique des souris, ce qui place GSK3 β comme biomarqueur de l'activité de l'enzastaurine *in vitro* et *in vivo* (308). Ainsi, la diminution de la phosphorylation activatrice d'AKT et de celles de ses substrats ont été démontré dans les cellules de cancer de colon, de glioblastome (308), de myélome multiple (310) (311) et de macroglobulémie de Waldenstrom (312). De même, l'enzastaurine inhibe la prolifération et induit l'apoptose dépendante des caspases des lignées de lymphomes T cutanés *via* une inhibition de la voie AKT (313) (Figure 35). Dans les cellules de cancer gastrique, l'enzastaurine exerce un effet anti-tumoral à travers l'inhibition d'AKT et de p90RSK et l'activation de l'apoptose dépendante des caspases *via* l'activation de Bad (314)

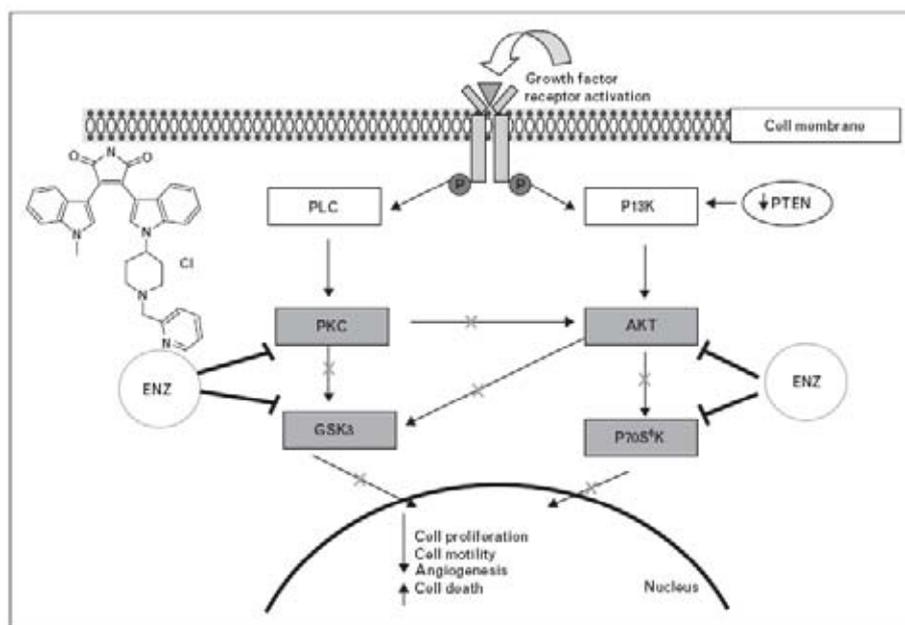


Figure 35: Principales cibles moléculaires de l'enzastaurine (ENZ) (296) : Les cibles classiquement décrites de l'enzastaurine sont les PKC et AKT qui régulent l'activité de la sérine/thréonine kinase GSK3 β à travers la phosphorylation sur sérine 9. AKT régule aussi la protéine p70S6kinase. L'inhibition de ces voies de signalisation diminue la prolifération, la mobilité et l'angiogenèse et augmente le taux de mort cellulaire.

Des tests de clonogénicité en agar montrent une inhibition de croissance en réponse au traitement par l'enzastaurine pour plusieurs lignées tumorales et plusieurs types de tumeurs primaires (dont des tumeurs de la tête et du cou, du sein, du pancréas, de la thyroïde, des cancers du poumon non à petites cellules et des mélanomes) (315).

Concernant les hémopathies lymphoïdes, le mécanisme d'action de l'enzastaurine n'a pas encore été exploré. Notre équipe a récemment démontré que l'enzastaurine exerce un effet anti-tumoral sur les cellules de patients atteints de LLC. Cette étude démontre que les cellules de LLC pourraient bénéficier d'un effet anti-prolifératif de l'enzastaurine, probablement à travers une activation de la phosphatase PP2A (Liffraud C, soumis Oncogene 2010, voir annexe). Très récemment, l'équipe de S. Sacchi a montré que l'enzastaurine induit de l'apoptose ainsi qu'une inhibition des PKC, de AKT et de p90RSK dans des lignées de lymphomes B (316).

En résumé, l'action de l'enzastaurine passe par une inhibition de l'activité PKC, mais également par une suppression de la signalisation de la voie PI3K/AKT. L'inhibition des PKC est à l'origine de l'effet anti-angiogénique observé, tandis que les effets anti-tumoraux directs semblent être davantage en lien avec l'inhibition de la voie AKT, et parfois, une activation de l'apoptose dépendante des caspases. L'ensemble de ces effets confère à l'enzastaurine une activité anti-tumorale élevée, *in vitro* et *in vivo*, vis-à-vis d'un nombre important de tumeurs, solides ou hématologiques.

D. Essais cliniques en cours

Une étude multicentrique de **phase I** a été menée chez des patients présentant différents cancers (les cancers du poumon et de la tête et du cou étant les plus représentés dans la cohorte des patients inclus) à des stades avancés. Ces études ont permis de définir une dose optimale de 525 mg/jour, suffisante pour inhiber la totalité des PKC de l'organisme et qui ne présente pas de toxicité remarquable (296).

De nombreuses études de **phase II** sont en cours, dans divers types de tumeurs, tant solides qu'hématologiques. Toutes ces études soulignent la bonne tolérance de l'enzastaurine.

En ce qui concerne les tumeurs solides, l'enzastaurine est à l'essai dans le traitement du glioblastome multiforme, seule ou en association avec la radiothérapie ou la chimiothérapie (296) ainsi que dans le cancer du sein métastatique (317, 318).

Compte tenu de son expression et de son rôle dans le développement du cancer du poumon, la PKC β pourrait être une cible thérapeutique dans ce type de cancer. Par ailleurs, l'activité de la voie PI3K/AKT est élevée dans les tumeurs du poumon, en corrélation avec un mauvais pronostic et son inhibition a été décrite pour radiosensibiliser les lignées cellulaires de cancer du poumon non à petites cellules. Sur la base de ces observations, l'utilisation d'enzastaurine est en cours d'essai en monothérapie ou en association avec des polychimiothérapies ou avec l'erlotinib (inhibiteur du récepteur à l'Epidermal Growth Factor, EGFR) (318).

Dans le domaine des tumeurs hématologiques, une étude a été menée chez 55 patients présentant un DLBCL réfractaire ou en rechute. En effet, la PKC β est surexprimée dans cette pathologie. Cette surexpression corrèle avec un mauvais pronostic et une diminution de la survie (319) (303). Cette étude montre que le traitement par enzastaurine est bien toléré et qu'il allonge la survie sans progression chez un petit nombre de patients réfractaires ou en rechute. D'autres études seront menées quant à l'utilisation de l'enzastaurine dans cette pathologie (319).

Un essai de phase II a également été mené chez 60 patients atteints de lymphome du manteau réfractaire ou en rechute. Chez 37% des patients, la maladie n'a pas progressé après 3 cycles de 28 jours de traitement, ce qui est considéré comme un bon résultat étant donné le mauvais pronostic de ces patients (320).

En ce qui concerne le LF, aucune étude clinique n'a été menée jusqu'à la publication d'un résumé d'une étude qui a été présentée au congrès de l'EHA (European Hematology Association) le 10 juin 2010 à Barcelone. Cette étude clinique de phase II est en cours et a pour objectif d'évaluer le taux de réponse et la survie sans progression des patients atteints de LF de grade 1 ou 2 traités avec l'enzastaurine. Après une première dose de 1125mg, les patients reçoivent une dose journalière de 500 mg pendant 3 ans. En fonction de leur score FLIPI, certains patients ont présenté une réponse au traitement (voir les résultats dans la table 3). Ces résultats préliminaires montrent que l'enzastaurine présente une activité clinique chez les patients atteints de LF et qu'elle est bien tolérée (321). La conclusion finale de cet effet

ainsi que d'autres études cliniques sont indispensables pour prouver le bénéfice clinique de cet inhibiteur dans le traitement du LF.

	N	Responders, n(%)	95% CI
FLIPI score			
Low (0-1)	8	1 (12.5)	0.3-52.7
Intermediate (2)	34	10 (29.4)	15.1-47.5
High (3-5)	22	5 (22.7)	7.8-45.4
Prior chemotherapy			
Chemonaive	44	10 (22.7)	11.5-37.8
Prior therapy	20	6 (30.0)	11.9-54.3
CI=confidence interval; N=total number of evaluable patients; n=number of patients			

Table 3: Résumé des résultats de l'essai clinique de phase II en cours concernant l'utilisation de l'enzastaurine chez des patients atteints de LF(321).

Un essai de **phase III** visant à comparer l'enzastaurine *versus* lomustine (agent alkylant) dans le traitement du glioblastome multiforme est actuellement en cours depuis Mars 2006 (318). Les résultats définitifs de cette étude ne sont pas encore publiés.

Depuis Juin 2006, une étude a débuté pour évaluer l'impact d'une prise quotidienne d'enzastaurine (*versus* prise d'un placebo) dans la prévention des rechutes chez les patients atteints de DLBCL. Il s'agit de l'essai PRELUDE (Prevention of Relapse in Lymphoma using Daily Enzastaurin) (318) auquel participe le Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse Purpan.

Objectifs du travail

L'amélioration du traitement des LNHs en général, et du LF en particulier, représente un enjeu majeur dans la mesure où ces lymphopathies restent incurables. L'objectif de ce travail était de mieux comprendre les mécanismes d'action du traitement actuel, le rituximab, afin de mieux appréhender les résistances développées par les cellules tumorales et d'envisager de nouvelles thérapies pour améliorer le traitement des LF.

Etant donné le rôle majeur que joue le BCR dans le développement du lymphocyte B et les évidences qui s'accumulent concernant son implication dans les lymphopathies B (129, 130, 132, 135, 138, 139), nous nous sommes intéressés dans la première partie de ce travail au ciblage pharmacologique du BCR. Plusieurs travaux montrent que le rituximab met en jeu des événements moléculaires semblables à ceux engagés par la stimulation du BCR (219) et suggèrent un lien potentiel entre le CD20 et le BCR (223, 224). De ce fait, nous avons exploré l'effet potentiel du rituximab sur le signal du BCR et proposé de nouveaux mécanismes moléculaires par lesquels le rituximab pourrait agir. Ce travail a constitué mon principal projet de thèse et a été accepté pour publication dans le journal *Blood* en novembre 2009.

Dans un deuxième temps, nous avons examiné le potentiel anti-tumoral du ciblage des composantes de la signalisation du BCR que sont les voies PKC et AKT dans le LF. En effet, ces deux voies sont considérées comme médiatrices du signal BCR et pourraient constituer un mécanisme de résistance aux traitements actuels. Ainsi, nous avons étudié l'effet de l'enzastaurine (inhibiteur des PKC et de la voie PI3K/Akt) sur les cellules de LF *in vitro* et *in vivo* et nous avons tenté de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels agit ce médicamenteusement antitumoral. Ce travail est soumis à *Blood*.

RESULTATS-partie I

Rituximab inhibits B-cell receptor signalling

Introduction de la partie I des résultats

Le rituximab est un anticorps monoclonal utilisé dans le traitement des lymphomes B et de certaines maladies auto-immunes. La cible du rituximab est la protéine transmembranaire CD20 qui est exprimée du stade pré-B au stade B mature. Les trois modes d'action mis en jeu par le rituximab pour induire la déplétion des lymphocytes B sont : l'ADCC, la CDC et l'effet direct d'inhibition de la prolifération et/ou d'induction de l'apoptose. Bien que l'ADCC semble jouer un rôle majeur, la contribution respective de ces mécanismes chez le patient reste inconnue. Le caractère incurable des LNHs ainsi que l'apparition quasi-systématique de résistance au traitement rend la compréhension des mécanismes d'action du rituximab primordiale pour l'amélioration des traitements et son application à d'autres pathologies.

Plusieurs équipes, dont la notre, ont montré que le rituximab exerce un effet direct sur les cellules et induit ainsi l'inhibition de la prolifération ou l'induction de l'apoptose. Ces effets sont médiés par plusieurs événements allant de la membrane plasmique jusqu'à la transcription des gènes. En effet, le rituximab induit une translocation du CD20 dans les radeaux lipidiques accompagnée de changement de la distribution membranaire des sphingolipides et de formation de médiateurs lipidiques comme le céramide. Ces changements membranaires ne sont pas sans conséquences sur les effecteurs protéiques ancrés dans la membrane plasmique. Le rôle de ces effecteurs est d'activer les cascades de signalisation intracellulaire afin de réguler la survie ou la mort cellulaire.

Etant donné les études qui montrent que le CD20 et le BCR peuvent être associés dans les radeaux lipidiques et que l'engagement de l'un met en jeu la signalisation de l'autre, il est possible que le CD20 exerce un rôle lié à la fonction du BCR. Le BCR est le chef d'orchestre de la régulation de la survie, la prolifération et l'apoptose mais aussi de la sécrétion d'anticorps et de la présentation de l'antigène. La publication de données décrivant une altération de la signalisation du BCR dans les lymphopathies B nous a amené à postuler que le BCR pourrait être une cible du rituximab et ainsi participer à l'effet thérapeutique de cet anticorps.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons traité les lignées de lymphome folliculaire et les lymphocytes B normaux avec le rituximab. Puis, la stimulation du BCR a été évaluée à

l'aide d'un anticorps anti-IgM ou IgG. Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes moléculaires qui pourraient rendre compte de l'effet du rituximab sur la signalisation du BCR.

La majorité des expériences présentées dans l'article a été effectuée sur deux lignées de LF, les cellules RL et DOHH2. Ces deux lignées présentent la translocation t(14 ;18). Les cellules RL possèdent des immunoglobines de surface de type IgM et IgD et les cellules DOHH2 possèdent une immunoglobine de surface de type IgG. Les expériences menées sur les cellules DOHH2 ont été présentées dans l'article dans un souci d'allègement des figures. Bien que la stimulation du BCR soit plus intense dans les cellules DOHH2, les mêmes résultats ont été obtenus dans la lignée RL. Cependant, le taux de mortalité élevé lors du traitement des cellules DOHH2 avec la M β CD, le MG132 et la transfection cellulaire nous a amené à présenter dans les figures 1D, 5D et 6D les résultats obtenus avec les cellules RL, qui présentaient des taux de mortalité très faible, voir inexistant suite aux traitements.

L'analyse de la stimulation du BCR s'est basée sur la mesure du taux de phosphorylation des protéines connues pour être activées suite à l'engagement du BCR. La protéine kinase qui a servi de marqueur pour l'activation du signal BCR est Syk. Deux types de phosphorylation ont été évalué dans cet article : Les phosphorylations sur Y 348 et 352 probablement phosphorylés par la kinase Lyn et l'autophosphorylation en Y525/526 qui signe une activité optimale de Syk (Figure 36).

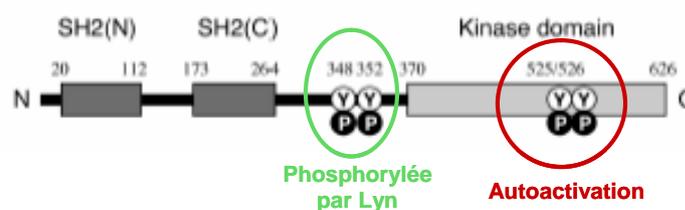


Figure 36 : Les phosphorylations de Syk évaluées dans la partie I des résultats : Les sites Y 348 et 352 sont situés dans l'interdomaine B de la protéine et sont phosphorylés par la Src kinases Lyn. L'auto-phosphorylation des Y 525/526 s'effectue après la liaison de Syk aux ITAMS et signe donc l'auto-activation de Syk.

Rituximab inhibits B-cell receptor signaling

Samar Kheirallah,^{1,2} Pierre Caron,^{1,2} Emilie Gross,^{1,2} Anne Quillet-Mary,^{1,2} Justine Bertrand-Michel,³ Jean-Jacques Fournié,^{1,2} Guy Laurent,^{1,2,4} and Christine Bezombes²

¹Inserm, U563, Toulouse; ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse; ³Plateau de lipidomique, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 150, Inserm, Toulouse; and ⁴Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Toulouse, Hôpital Purpan, Service Hématologie, Toulouse, France

Rituximab (RTX), a monoclonal antibody directed against the CD20 protein, is a drug commonly used in the treatment of B-cell–derived lymphoid neoplasias and of antibody-mediated autoimmune diseases. In addition to cell- and complement-mediated B-cell depletion, RTX is thought to inhibit B-cell survival and proliferation through negative regulation of canonical signaling pathways involving Akt, ERK, and mammalian target of rapamycin. However, surpris-

ingly, although B-cell receptor (BCR) signaling has been considered critical for normal and more recently, for neoplastic B cells, the hypothesis that RTX could target BCR has never been investigated. Using follicular lymphoma cell lines as models, as well as normal B cells, we show here, for the first time, that pretreatment with RTX results in a time-dependent inhibition of the BCR-signaling cascade involving Lyn, Syk, PLC γ 2, Akt, and ERK, and calcium mobiliza-

tion. The inhibitory effect of RTX correlates with decrease of raft-associated cholesterol, complete inhibition of BCR relocalization into lipid raft microdomains, and downregulation of BCR immunoglobulin expression. Thus, RTX-mediated alteration of BCR expression, dynamics, and signaling might contribute to the immunosuppressive activity of the drug. (*Blood*. 2010;115:985-994)

Introduction

Rituximab (RTX) is a monoclonal antibody directed against the CD20 membrane-associated glycoprotein expressed on normal human B cells and most malignant B cell–derived neoplasias. RTX has been largely used, alone or in combination with chemotherapy, in the treatment of chronic lymphoid neoplasias in large cohorts of patients with significant clinical benefit, especially in follicular lymphoma (FL) and diffuse large B cell lymphoma (DLBCL).¹ RTX has also proven efficacy in autoimmune diseases, including autoimmune cytopenia and rheumatoid arthritis.² It is currently admitted that RTX acts through normal or malignant B-cell depletion, which operates through antibody-dependent cellular cytotoxicity, complement-mediated cell lysis, and direct inhibitory effect (cell growth inhibition or apoptosis). At the present time, the respective contribution of each of these mechanisms has not been yet fully characterized in clinical settings.³⁻⁵ Although RTX has been used for more than a decade in more than a million patient encounters, elucidating its mechanism of action still remains an important issue.

Although compelling evidence suggests a major role for antibody-dependent cellular cytotoxicity, we and others have largely documented that RTX also triggers a complex network of direct inhibitory signals that can be divided in 3 categories. The first group consists in membrane-associated proximal events, including sphingolipid distribution alterations, modifications of lipid raft microdomains, and calcium fluxes, as well as release of potent lipidic second messengers, such as ceramide.⁶⁻⁸ The second group consists of the inhibition of canonical signaling pathways involving MAPK, phosphoinositide 3-kinase/Akt, some specific protein kinase C isoforms, nuclear factor- κ B, and mammalian target of rapamycin.^{5,9} The last group is composed of regulation of proteins controlled by these signaling modules, Bcl-2 proteins family being the most representative.^{10,11} Although all these events

might interfere with B-cell proliferation and survival, RTX-mediated CD20 activation probably results in the inhibition of additional B cell–specific survival pathways. In this context, based on the role of ligand-induced B-cell receptor (BCR) activation in normal B-cell proliferation and survival, we hypothesized that RTX could interfere with BCR signaling.

BCR is a protein complex constituted by immunoglobulins (Ig), Ig α (CD79a), Ig β (CD79b), the 2 latter containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs).¹² Ligand-induced BCR activation results in its oligomerization and translocation to cholesterol-enriched raft microdomains, in which Ig α and Ig β are phosphorylated by Src family kinases Lyn, Fyn, and Blk.¹³⁻¹⁵ Among these phosphorylation events, Lyn activation plays a central role because it results in the recruitment on ITAM of the nonreceptor tyrosine kinase Syk, this step being critical for the propagation of BCR signaling.¹⁶ Syk displays an autophosphorylation site (Y525) and 2 Lyn-targeted tyrosine motifs (Y348 and Y352).¹⁷ On Syk phosphorylation, BCR signaling propagates through downstream canonical pathways, including phospholipase C and subsequent Ca²⁺ release as well as stimulation of ERK/MAPK and Akt.¹⁸ In addition, BCR is finely tuned through different regulators among which the tyrosine phosphatase SHP-1 plays a critical function.¹⁹ Recent studies have identified BCR regulation disturbances in some neoplastic B cells. Indeed, Chen et al have described a constitutive high level of Syk phosphorylation at Y348/Y352 in DLBCL, supporting the concept of “tonic BCR” in this disease.²⁰ Irish et al have described that stimulated FL cells display greater levels of BCR-induced phosphorylation of Syk (Y352), Btk, and MAPK.²¹ Thus, FL cells represent models suitable for evaluating pharmacologic targeting of BCR signaling.

Submitted August 8, 2009; accepted October 11, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, November 17, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-08-237537.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge

payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

In this study, we hypothesized that RTX could interfere with BCR signaling, from 3 lines of evidence. First, RTX induces sharp changes in the organization of raft microdomains.^{7,8} Second, treatment with RTX inhibits Lyn activity at least in B-cell lymphoma.²² Finally, RTX is potentially active against distal signaling events, such as ERK and Akt activity.⁹ This study was aimed at studying the influence of RTX on BCR signaling in FL cell lines and in normal B cells.

Methods

Cell lines and reagents

RL and DOHH2 are transformed FL cell lines carrying the t(14;18). They were obtained from ATCC and Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, respectively. RL subclones (1G11 and 2B11) were obtained using limiting dilution assay. CD20 quantification was performed with Quantibrite kit (BD Biosciences). Cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), glutamine (2mM), streptomycin (10 µg/mL), and penicillin (200 U/mL; Invitrogen).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from healthy donors (Etablissement Français du Sang, CHU Purpan) and separated by Ficoll-Hypaque density gradient (GE Healthcare). Cytometry analyses were performed by gating on CD19⁺ populations.

RTX and alemtuzumab (Campath-H1) were kindly provided by Roche Pharma. Nonimmune human IgG, MG132, methyl-β-cyclodextrin (MβCD), ionomycin, filipin, and sodium orthovanadate were purchased from Sigma-Aldrich.

F(ab')₂ RTX preparation

F(ab')₂ RTX was produced according to Pierce F(ab')₂ preparation kit instructions (Perbio Sciences). Briefly, 2 mg of RTX was digested by immobilized pepsin, and F(ab')₂ was purified using immobilized protein A column and separated from Fc fragment by centrifugation on Amicon Ultra-4 filter tube (Millipore). F(ab')₂ purity was verified by migration on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Ponceau coloration. F(ab')₂ was ultimately prepared at 10 mg/mL in phosphate-buffered saline (PBS).

BCR stimulation

Cells were seeded at 0.3 million cells/mL 24 hours before treatment. Entire RTX (for RL cells) or F(ab')₂ RTX (for normal B cells or DOHH2) was added at 10 µg/mL for 16 hours, and then cells were stimulated with F(ab')₂ goat anti-human (Fc fragment specific) IgM (RL), IgG (DOHH2), or IgM/IgG (normal B cells; Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 10 µg/mL for the indicated times. Because DOHH2 cells trigger IgG isotype BCRs, these cells were treated with F(ab')₂ RTX to avoid human RTX Fc fragment cross-reaction with F(ab')₂ goat anti-human IgG used for BCR stimulation.

For cholesterol depletion, cells were incubated in complete medium containing 5mM MβCD during 30 minutes at 37°C before filipin staining or BCR stimulation. For proteasome inhibition, 10µM of MG132 was coincubated with 10 µg/mL of RTX during 16 hours. For tyrosine phosphatase inhibition, sodium orthovanadate was used at 0.1mM for 1 hour before RTX treatment.

Flow cytometric analysis

For intracellular protein staining, cells were washed with cold PBS, fixed for 10 minutes at room temperature with 4% paraformaldehyde (pH 7.4), and permeabilized 10 minutes at room temperature with 0.1% saponin.

BCR activation was analyzed on BDLSRII cytometer (BD Biosciences) using an anti-phospho-Syk (Y525/S26) primary antibody (Cell Signaling Technology) at 0.4 µg/mL and a secondary goat anti-rabbit fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 5 µg/mL or a phycoerythrin-conjugated anti-phospho-Syk (Y348 or Y352; BD Biosciences).

Cy5-conjugated anti-IgM or IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories) were used for BCR expression analyses. Cholesterol staining was performed on fixed cells using filipin at 50 µg/mL. Flow cytometric data were analyzed using FlowJo software Version 7.2.5 (TreeStar) for overlay representations and DIVA 6.1.2 (BD Biosciences) software for other interpretations.

Western blot

Analyses were performed as we previously described.⁹ The different antibodies used for Western blot were as follows: anti-Akt, anti-phospho-Akt (Thr 308), anti-ERK, anti-PLCγ2, anti-phospho-PLCγ2 (Y1217), anti-phospho-tyrosine (P-Tyr-100), anti-phospho-Src (Y416; all from Cell Signaling Technology), anti-Igα, anti-Lyn (from Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-ERK (T183, Y185; Sigma-Aldrich), anti-β-actin (Lab Vision), goat anti-human IgG, or IgM Fc fragment-specific (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies against rabbit, mouse, or goat immunoglobulins were from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Immunoprecipitation

After F(ab')₂ RTX treatment, 5 × 10⁶ cells were washed with PBS and lysed with RadioImmuno Precipitation Assay (RIPA) buffer (20mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 4mM ethylenediaminetetraacetic acid, and 0.5% Triton X-100) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Cell lysates were sonicated and centrifuged 10 minutes at 13 000g at 4°C. The supernatant was precleared during 1 hour with 25 µL of protein A-Sepharose beads (GE Healthcare). After preclearing, 500 µg of supernatant proteins was incubated with 5 µg of anti-Syk antibody (Cell Signaling Technology) overnight at 4°C. Immune complexes were collected by incubation with 25 µL protein A-Sepharose beads for 1 hour 30 minutes at 4°C. Immunoprecipitated complexes were washed 3 times with RIPA buffer, resuspended into Laemmli buffer, and analyzed by Western blot.

siRNA transfection assay

RL cells were transfected using Amaxa nucleofector kit V (Lonza). A total of 5 million cells were transfected with 200nM of SHP-1 siRNA duplex (5'GCAGGAGGUGAAGAACUUG3') or siRNA control duplex (Eurogentec). Four hours after transfection, cells were seeded at 0.5 × 10⁶ cells/mL in RPMI 10% FCS, and protein depletion was assessed 24 hours after transfection by Western blot analysis.

Calcium mobilization

A total of 3 × 10⁶ cells were treated or not with RTX at 10 µg/mL for 16 hours. Cells were centrifuged and resuspended with RPMI 1% FCS at 1 million cells/mL. Staining with Indo-1 probe (Invitrogen) at 5 µg/mL was performed during 45 minutes at 37°C in the dark. Cells were then centrifuged 5 minutes at 1200g, washed with PBS, and resuspended in 500 µL PBS. Calcium flux was induced by BCR stimulation with anti-IgM antibody (10 µg/mL) or ionomycin (2µM) and analyzed on BD LSRII flow cytometer with BD FACSDiva 6.1.2 software.

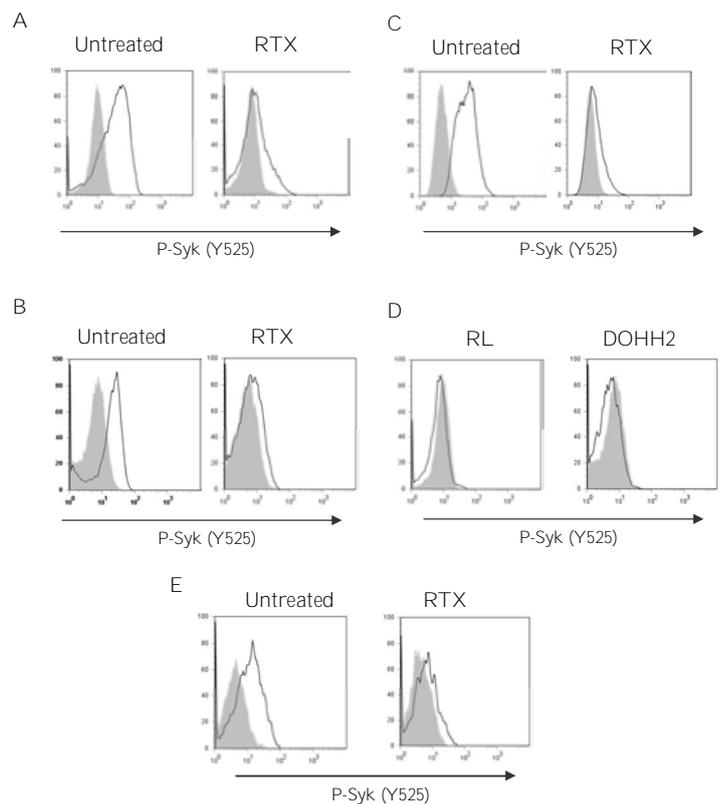
Isolation of detergent-resistant membranes

DOHH2 cells (20 × 10⁶) were washed with cold PBS and resuspended with 200 µL of D solution (150mM NaCl, 5mM dithiothreitol, 5mM ethylenediaminetetraacetic acid, 25mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100; pH was adjusted to 7.4 and solution was supplemented with a cocktail of protease inhibitors) and left on ice for 30 minutes. A total of 400 µL of iodixanol (60%; Optiprep, Sigma-Aldrich) was added to the cell homogenate and overlaid on a step gradient consisting of 40%, 35%, 25%, 20%, and 0% iodixanol in the same buffer. Gradient was centrifuged during 4 hours at 33 400g using TST41.14 rotor. Five fractions were collected and analyzed by Western blot. Flotillin-1 (BD Biosciences) and Lyn (Santa Cruz Biotechnology) antibodies were used to assess raft fraction purity (fractions 1 and 2).

Isolation of detergent-free raft membranes

For cholesterol quantification, detergent-free raft membranes were isolated as described.²³ In brief, 10⁸ cells were suspended in ice-cold 250mM

Figure 1. Effect of RTX on BCR activation in FL cell lines and normal B cells. RL (A,C) or DOHH2 (B) cells were incubated for 16 hours with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of RTX or F(ab')₂ RTX, respectively, and then treated with anti-IgM or anti-IgG antibodies (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) during 5 minutes (A-B) or 2 hours (C). Nonstimulated and stimulated cells are represented by gray and black histograms, respectively. (D) RL or DOHH2 cells were treated with RTX or F(ab')₂ RTX, respectively (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16 hours). Untreated and treated cells with RTX are represented by gray and black histograms, respectively. (E) PBMCs isolated from healthy donors were incubated with F(ab')₂ RTX (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16 hours) and then treated with a mixture of anti-IgM/IgG antibody (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 minutes). Nonstimulated and stimulated cells are represented by gray and black histograms, respectively. Syk phosphorylation on Y525 was measured by flow cytometry. Results are representative of at least 3 independent experiments.



sucrose, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, and 20mM Tris-HCl (pH 7.8) supplemented with protease inhibitor cocktail. Cell homogenate was sheared by repeated passage through needle and Dounce. Samples were centrifuged at 1000g for 10 minutes at 4°C, and the shearing/centrifugation steps were repeated on the cell pellets. Supernatants from each round were combined, mixed with an equal volume of 50% iodixanol, and overlaid with a step gradient consisting of 20% and 10% iodixanol. Samples were centrifuged for 90 minutes at 33 400g with TST41.14 rotor at 4°C. Twelve fractions were collected. Fractions from 2 to 5 were pooled, as well as fractions from 9 to 12 corresponding to the raft and nonraft fractions, respectively. Lipid content was analyzed as described in "Cholesterol quantification."

Cholesterol quantification

Lipids from raft and nonraft fractions (4 mL) were extracted according to Bligh and Dyer²⁴ in chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2.1, v/v/v) in the presence of internal standards stigmaterol (2 μg). The dried lipid extract was silylated in bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (1% TMSCl)-acetonitrile (1:1, v/v) overnight at room temperature.

Lipid extract (5 μL) was directly analyzed by gas-liquid chromatography on a 4890 Hewlett Packard system using a RESTEK RTX-50 fused silica capillary columns (30 m \times 0.32 μm inner diameter, 0.1 μm film thickness). Oven temperature increased from 195°C to 310°C (12 minutes) 3.5°C per minute using hydrogen (0.5 bar) as carrier gas. Injector and detector were at 310°C and 340°C, respectively. Cholesterol was normalized in nanomoles per nanomole of total lipid phosphorus of the cell homogenate as described.²⁵

Statistics

Data shown represent mean plus or minus SD. Significant differences were assessed by Student *t* test. *P* values less than .05 were considered statistically significant.

Results

Effect of RTX on BCR activation

In this study, we first evaluated the profile of BCR activation in both FL cell lines (RL and DOHH2) and gated CD19⁺ normal B cells by measuring Syk phosphorylation level at site Y525. Several independent analyses of BCR activation kinetics have been performed (*n* = 15 for FL cell lines and *n* = 5 for normal B cells). As shown in Figure 1A-B,E, BCR stimulation resulted in increased Syk phosphorylation in both FL and normal B cells. However, FL cells displayed more rapid (1-5 minutes) and more sustained Syk phosphorylation (up to 3 hours), compared with stimulated normal B cells (data not shown).

In further experiments, RL or DOHH2 was pretreated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of RTX or F(ab')₂ RTX, respectively, and BCR stimulation was evaluated by Syk phosphorylation level (Y525) at 5 minutes (peak of BCR stimulation, data not shown). These experiments showed that, in BCR-stimulated cells, pretreatment with RTX seriously interfered with Syk phosphorylation in both RL and DOHH2 cells (Figure 1A,B, respectively). The time of preincubation with RTX appeared to be critical because we did not detect the inhibitory effect of RTX for DOHH2 and RL cell pretreatments shorter than 3 and 6 hours, respectively. Moreover, for both cell lines, prolonged time of RTX preincubation improved Syk inhibition level (data not shown). Thus, 16-hour incubation was used for further experiments. It is important to note that, in RTX-pretreated cells, BCR was unable to be activated even after prolonged stimulation (up to 2 hours), as shown in Figure 1C. Furthermore, we showed that RTX had no measurable effect on

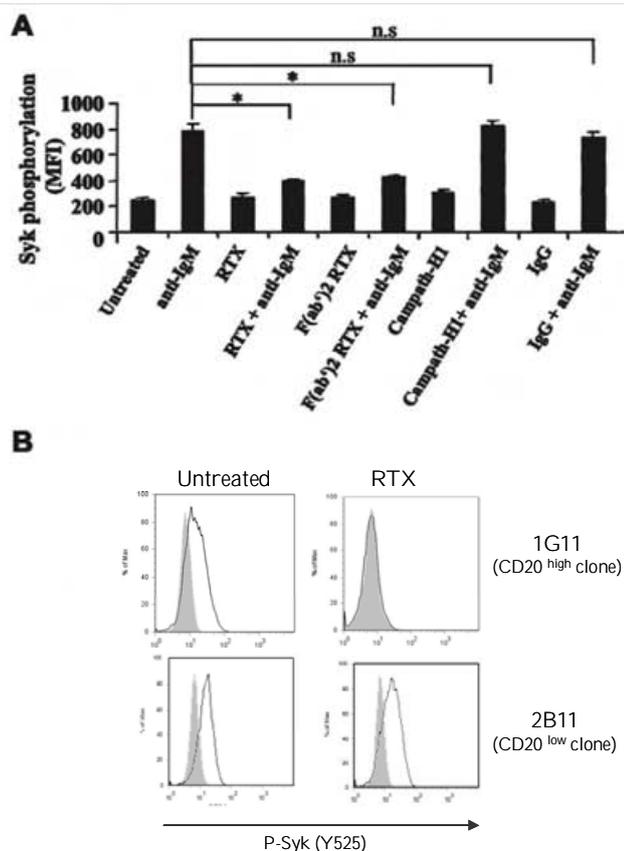


Figure 2. Influence of CD20 on RTX inhibitory effect. (A) BCR was stimulated in FL cells pretreated during 16 hours with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of entire RTX, F(ab')₂ RTX, Campath-H1, or nonrelevant human IgG. Results represent Syk activation (Y525) expressed in MFI and are the mean of 3 independent experiments \pm SD. * $P < .05$; n.s indicates not significant. (B) Syk activation (Y525) was evaluated on CD20 high (clone 1G11) and CD20 low (clone 2B11) expressing cells preincubated with RTX (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16 hours) and stimulated with anti-IgM (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 minutes). Nonstimulated and stimulated cells are represented by gray and black histograms, respectively. Histograms are representative of 3 independent experiments.

constitutive Syk phosphorylation in nonstimulated RL and DOHH2 cells (Figure 1D) as we previously described.⁹

Based on these findings, we have asked whether RTX interfered with BCR signaling in non-neoplastic B cells. F(ab')₂ RTX did inhibit Y525 Syk phosphorylation in normal B cells activated by a mixture of anti-IgM and anti-IgG, as measured by cytometry analysis on CD19⁺ gated cells issued from healthy donor PBMCs (Figure 1E).

Non-FL malignant cells, including mantle cell lymphoma (Granta) or large cell lymphoma (Daudi, DEAU, LIB), were also investigated. In these cells, BCR stimulation had low effect on Syk phosphorylation and RTX had no significant impact (data not shown), suggesting that the inhibitory effect of RTX correlated with the magnitude of BCR stimulation. These experiments suggested that RTX is a potent inhibitor of BCR signaling in normal and FL cells.

Role of CD20 in RTX-mediated BCR-signaling inhibition

We next investigated whether the effect of the antibody was mediated through CD20 engagement or related to Fc γ receptor (Fc γ R) through the binding of the RTX Fc moiety. As illustrated in Figure 2A, RTX F(ab')₂ was as efficient as unmodified RTX for inhibiting Syk phosphorylation at the Y525 site. Moreover, pretreatment of RL cells with either chimeric anti-CD52 (Mab-

Campath-H1) or nonimmune IgG fraction was unable to interfere with Syk phosphorylation induced by BCR stimulation (Figure 2A). We further evaluated the influence of CD20 density on RTX inhibitory effect using 2 RL subclones expressing different CD20 level. The mean number of CD20 molecules per cell was 407 625 and 16 773 for 1G11 and 2B11 clone, respectively (data not shown). As shown in Figure 2B, RTX inhibited Syk phosphorylation in 1G11 but not in 2B11 clone. These results suggested that RTX acts through its F(ab')₂ moiety and that the level of CD20 expression is a limiting factor for inhibiting BCR activation.

Effect of RTX on Lyn activation in BCR-stimulated FL cell lines

The fact that RTX has no effect on Syk in nonstimulated FL cell lines (Figure 1D)⁹ suggested that RTX acts upstream Syk. Lyn being the main regulator of Syk, we investigated whether RTX inhibited BCR-induced Lyn activation. We found that pretreatment with F(ab')₂ RTX reduced BCR-dependent Lyn phosphorylation in DOHH2 cells, as revealed by an immunoblot using anti-phospho-Src Y416. As visualized in Figure 3A, p56 Lyn isoform appeared more affected than its p53 isoform, whereas Lyn expression level remained unchanged.

The role of Lyn was substantiated by the inhibitory effect of RTX on Syk phosphorylation at both Y348 and Y352, 2 residues targeted by Lyn (Figure 3B). Based on these latter results, we hypothesized that RTX might prevent BCR/Syk association because Lyn facilitates the recruitment of Syk on ITAM-containing Ig α . Using immunoprecipitation experiments, we confirmed that pretreatment with F(ab')₂ RTX abolished the Syk/Ig α interaction (Figure 3C).

The mechanism by which RTX influences Lyn status in the context of BCR activation was then investigated. Based on the major Lyn-regulating role of SHP-1, we hypothesized that RTX acts through this tyrosine phosphatase. We thus evaluated the effect of SHP-1 inhibition by orthovanadate or SHP-1 depletion by siRNA on RTX inhibitory effect on Syk phosphorylation (Y525) in BCR-stimulated cells. As shown in Figure 3D, BCR signaling was unaffected in either SHP-1-inhibited or SHP-1-depleted FL cell lines, suggesting that SHP-1 played no role in RTX effect. These results suggested that Lyn is a target for RTX and contributes to its inhibition of BCR signaling.

Effect of RTX on other BCR-signaling components

In further experiments, we evaluated to which extent RTX interfered with downstream BCR-signaling components. It is well established that, on BCR stimulation, Syk activation induces stimulation of PLC γ 2, Akt, and MAPK.¹⁸ These phosphorylation events are key to propagate the BCR signaling and induce biologic functions of B lymphocytes (antigen presentation, survival, and proliferation). We found that, in FL cell lines, pretreatment with RTX for 16 hours strongly changed the global profile of tyrosine phosphorylation and dramatically reduced the PLC γ 2 activation (Figure 4A). Akt and ERK phosphorylation was also affected, although to a lesser extent. Furthermore, we observed that RTX also impacted on BCR-induced calcium fluxes, a well-described marker for BCR activation (Figure 4B). These results showed that, in accordance with its impact on Lyn and Syk activation, RTX does profoundly alter distal BCR-related signaling events.

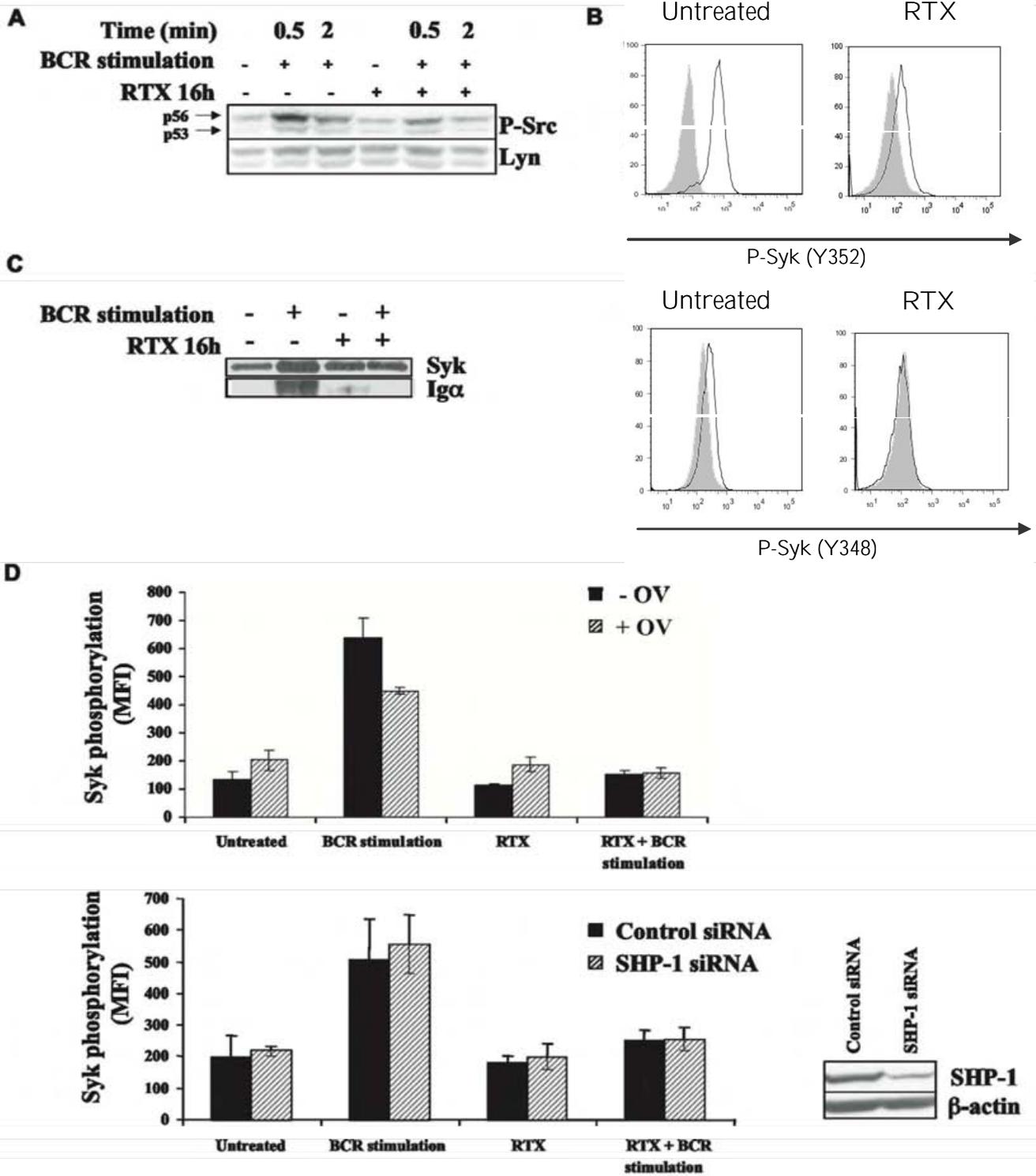


Figure 3. Effect of RTX on BCR-induced Lyn activation. (A) DOHH2 were preincubated with F(ab')₂ RTX (10 μg/mL, 16 hours) and then BCR was stimulated for the indicated times. Lyn activation was evaluated by an anti-phospho-Src antibody (Y416) revealing p53 and p56 Lyn isoforms. This result is representative of 3 independent experiments. (B) DOHH2 were preincubated with F(ab')₂ RTX (10 μg/mL, 16 hours) and stimulated with anti-IgG antibody (10 μg/mL, 5 minutes). Then, Lyn-dependent Syk phosphorylation was evaluated by flow cytometry using phycoerythrin-conjugated phospho-Syk (Y348 or Y352) antibodies. Nonstimulated and stimulated cells are represented by gray and black histograms, respectively, and are representative of 3 independent experiments. (C) Syk/BCR interaction was evaluated using DOHH2 preincubated with F(ab')₂ RTX (10 μg/mL, 16 hours) and stimulated or not with 10 μg/mL of anti-IgG antibody during 1 minute. BCR Igα associated with Syk was revealed by Western blot analysis. (D) SHP-1 was inhibited by 0.1mM sodium orthovanadate (OV) during 1 hour or depleted with SHP-1 siRNA. Then, FL cells were preincubated with RTX (16 hours, 10 μg/mL) and treated with anti-IgG (10 μg/mL, 5 minutes). Results represent Syk phosphorylation (Y525) expressed in MFI and are the mean of 3 independent experiments ± SD. (Inset) SHP-1 expression analyzed by Western blot in FL cell lines transfected by control or SHP-1 siRNA.

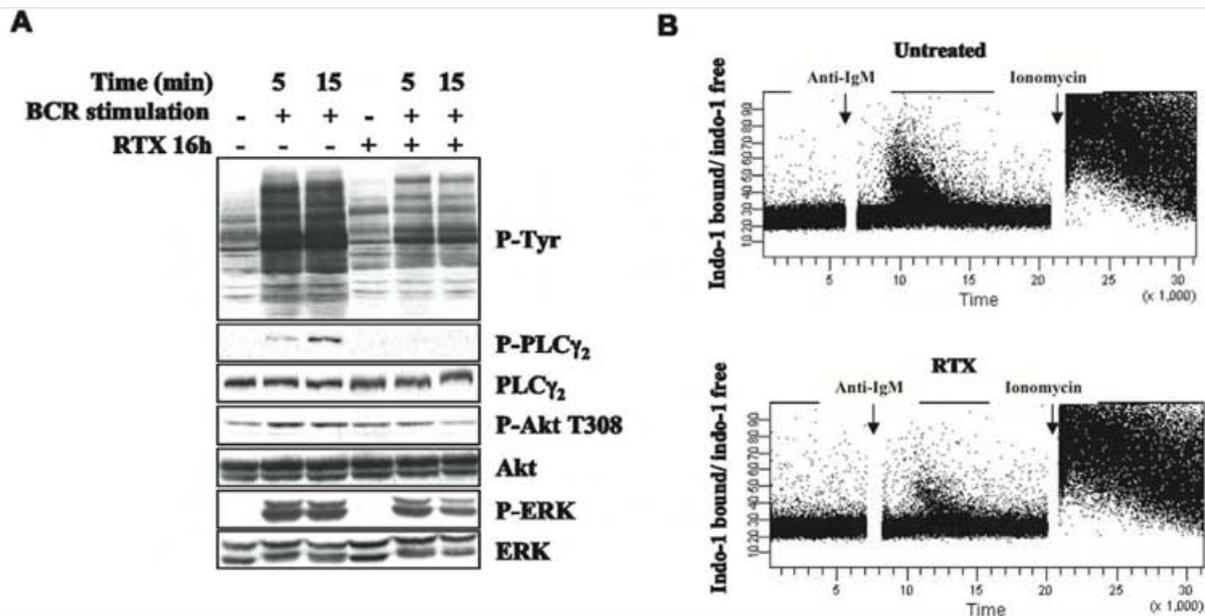


Figure 4. Effect of RTX on BCR-signaling components. (A) DOHH2 cells were preincubated with F(ab')₂ RTX (10 μ g/mL, 16 hours) and stimulated with anti-IgG antibody (10 μ g/mL, 5 or 15 minutes). Results are representative of 3 independent experiments. (B) Calcium mobilization was analyzed by flow cytometry. RL cells were preincubated with RTX (10 μ g/mL, 16 hours), and calcium flux was stimulated by the addition of anti-IgM antibody (10 μ g/mL). Ionomycin (2 μ M) was used as a positive control. Results are represented as ratio of indo-1 bound/indo-1 free and are representative of 3 independent experiments.

Effect of RTX on BCR translocation into raft and on membrane-associated cholesterol content

Previous studies have largely demonstrated that, on antigen stimulation, BCR translocates in part to membrane raft microdomains.^{26,27} This event is now considered as one of the most proximal steps of BCR stimulation and critical for Lyn and Syk activation.^{14,15} Based on the results obtained, we therefore speculated that RTX interfered with this important component of BCR activation. Thus, we evaluated BCR expression (Ig α) in detergent-insoluble fractions after IgG cross-linking in F(ab')₂ RTX pretreated DOHH2 cells. As described in other B-cell models, Figure 5A shows that BCR activation resulted in the rapid (5 minutes) relocalization of a minor fraction of BCR into detergent-insoluble fractions (1 and 2), which contained Flotillin-1 and Lyn, 2 raft markers. However, RTX pretreatment totally inhibited the translocation of BCR into raft (Figure 5A).

This result suggested that pretreatment with RTX changed the composition of raft-contained lipids, cholesterol being the most representative. Moreover, cholesterol is essential for propagation of BCR signaling.^{28,29} Thus, treatment with RTX could decrease the membrane-associated cholesterol. Paraformaldehyde-fixed cells stained with filipin, a naturally fluorescent tracker of cholesterol, revealed that RTX reduces the membrane cholesterol content (Figure 5B). To explore precisely whether RTX specifically affects the raft fraction, we performed chromatographic analysis of raft and non-raft-isolated fractions from RTX-treated cells. As shown in Figure 5C, RTX significantly decreased raft-associated cholesterol content in DOHH2 cells, compared with untreated cells. Non-raft-cholesterol content remained unchanged. Interestingly, treatment of FL cell lines with the cholesterol-depleting M β CD resulted in reduction of both cholesterol amount and BCR-activated Syk phosphorylation, compared with RTX-treated cells (Figure 5B,D). Altogether, these results showed that RTX alters BCR translocation into lipid raft microdomains, perhaps by decreasing raft-associated cholesterol.

Effect of RTX on BCR expression

As RTX seemed to affect BCR signaling by targeting proximal components of BCR activation, we hypothesized that RTX might directly target the BCR itself. Although speculative, this hypothesis was supported by a previous study showing that treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody specific for another CD20 epitope than RTX significantly decreased the surface-associated IgM from both normal and malignant B cells.³⁰ Here, we show, for the first time, that prolonged exposure to RTX (16 hours) significantly reduced (at least 50%) the surface IgM and IgG from nonpermeabilized RL and DOHH2 cells, respectively (Figure 6A). IgM expression remained virtually unchanged in RTX-treated 2B11 low expressing CD20 RL subclone, whereas RTX exerts a potent effect on 1G11 (Figure 6B). This suggested that, as depicted for Syk inhibition, CD20 is a limiting parameter for the inhibitory effect of RTX on BCR expression. Reduction of BCR expression level was also found in experiments using cytometry with fixed and permeabilized cells (Figure 6Ci) or Western blot with whole cell extracts (Figure 6Cii), suggesting that RTX influenced the total amount of BCR and not only its surface expression.

This finding conflicted with Bourget's hypothetical model wherein anti-CD20 antibody reduced BCR expression by internalization, but rather argued for reduced BCR synthesis or its accelerated degradation. Proteasome-mediated BCR degradation has been demonstrated previously.^{31,32} For this reason, we asked whether MG132-induced proteasome inhibition could prevent this RTX-reduced IgM expression and BCR signaling. Indeed, cotreatment with RTX and MG132 prevented RTX-induced IgM reduction in both total and surface-associated fractions (Figure 6D). Moreover, MG132 pretreatment restored BCR signaling as attested by normal Syk Y525 phosphorylation (Figure 6E). Similar results were observed with lactacystin, another proteasome inhibitor (data not shown). These results showed that CD20 binding by RTX reduced the expression of BCR by facilitating its degradation by proteasome.

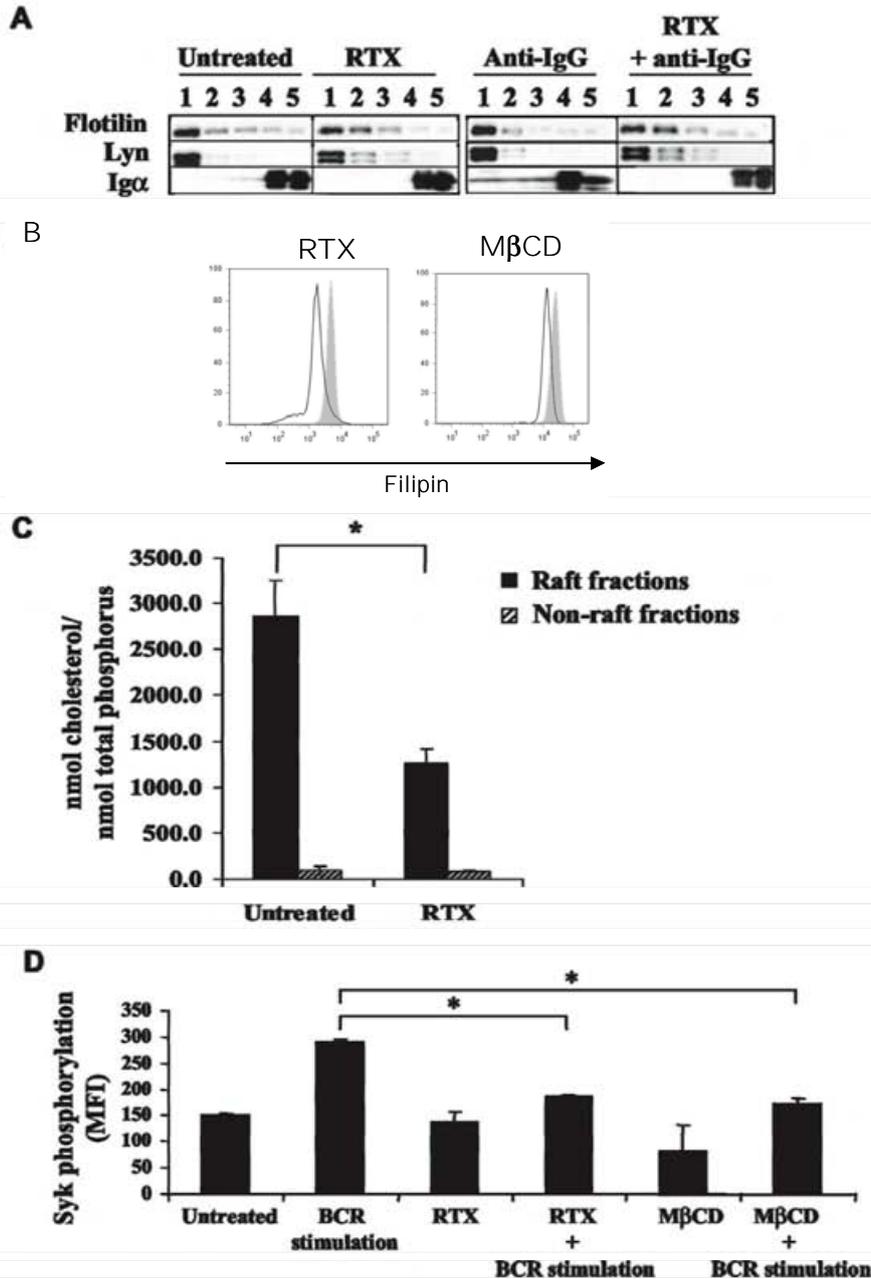


Figure 5. Effect of RTX on BCR translocation and on raft-associated cholesterol content. (A) DOHH2 cells were preincubated with F(ab')₂ RTX (10 μg/mL, 16 hours) and then stimulated with anti-IgG antibody (10 μg/mL, 5 minutes). Results are representative of 3 independent experiments. Vertical lines have been inserted to indicate a repositioned gel lane. (B) Cholesterol staining by filipin in RTX- or MβCD-treated and fixed RL cells (black histograms) compared with untreated and fixed cells (gray histograms). Results are representative of 3 independent experiments. (C) DOHH2 cells were treated with RTX (10 μg/mL, 16 hours), and cholesterol from raft and nonraft fractions was measured as described in "Methods." Histograms are the mean of 3 independent experiments ± SD. **P* < .005 compared with untreated cells. (D) RL cells were preincubated with MβCD (5mM, 30 minutes), and then BCR was stimulated with anti-IgM antibody (10 μg/mL, 5 minutes). Histograms represent Syk phosphorylation (Y525) expressed in MFI and are the mean of 3 independent experiments ± SD. **P* < .005 compared with BCR-stimulated cells.

Discussion

In this study, we demonstrate, for the first time, that RTX antagonizes the BCR-signaling cascade, from very proximal events such as BCR translocation to raft, to kinases activation and calcium flux. Most of these findings were obtained with transformed FL cell lines, which appear in our experience excellent models for investigating BCR signaling. Indeed, these cells displayed overreactive BCR activation, as previously described by Irish et al using fresh FL cells isolated from patients, compared with normal infiltrating

tumor B cells.²¹ The reason why FL cells displayed high magnitude BCR signaling, compared with other lymphomas as reported here, remains unknown but could be related to defective negative regulators, such as tyrosine phosphatase, or intrinsic abnormalities of BCR structure.^{33,34} Moreover, FL cell lines, such as other immortalized cells, enabled us to carry out cell-consuming biochemistry and raft biology techniques, all hardly applicable to normal B cells. However, the physiologic relevance of our study is supported by the fact that RTX was also found to affect BCR signaling in normal B cells, as attested by Syk (Y525) phosphorylation, a hallmark of BCR activation.

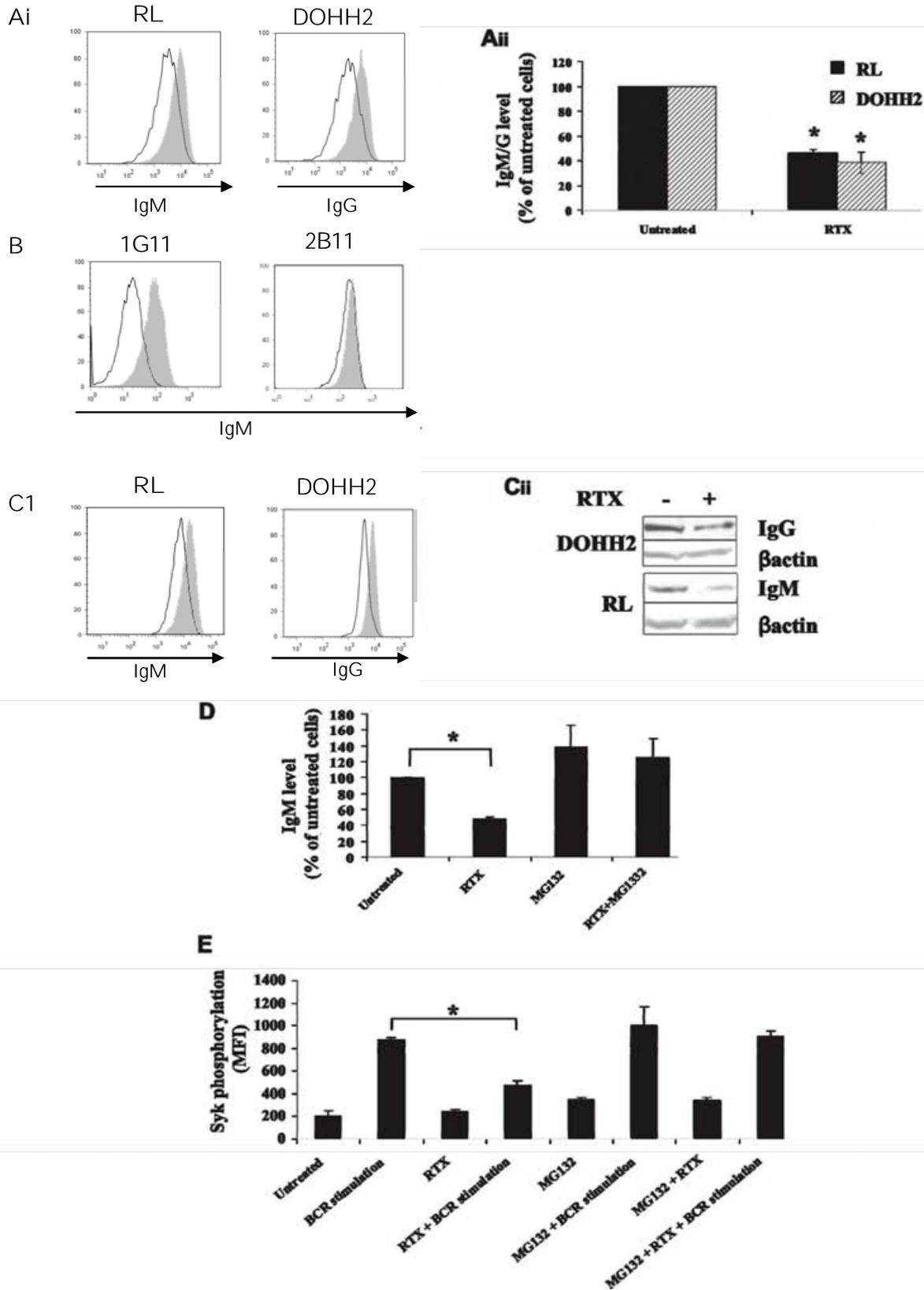


Figure 6. Effect of RTX on BCR expression and proteasome-mediated degradation. (A-B) BCR expression at the cell surface was evaluated by flow cytometry on fixed cells pretreated with RTX (10 μ g/mL, 16 hours) and then stained with Cy5-conjugated anti-IgM antibody (RL, 1G11, 2B11) or Cy5-conjugated anti-IgG antibody (DOHH2). (Aii) Results are expressed as percentage of untreated cells and are the mean of 3 independent experiments \pm SD. $P < .005$ compared with untreated cells. (C) Total BCR expression level was analyzed by flow cytometry with fixed and permeabilized FL cells (Ci) or by Western blot (Cii). (Ai,B,C1) Untreated and treated cells are represented by gray and black histograms, respectively. Histograms are representative of at least 3 independent experiments. (D) RL cells were cotreated with MG132 (10 μ M) and RTX (10 μ g/mL) for 16 hours. BCR expression was analyzed as described in panel A. Results are expressed in percentage of untreated cells and are the mean of 3 independent experiments \pm SD. $*P < .002$ compared with untreated cells. (E) RL cells were cotreated with MG132 (10 μ M) and RTX (10 μ g/mL) for 16 hours. BCR was then stimulated with anti-IgM antibody (10 μ g/mL, 5 minutes) and Syk phosphorylation (Y525) was evaluated by flow cytometry. Results are expressed in MFI and are the mean of 3 independent experiments \pm SD. $*P < .002$ compared with BCR-stimulated cells.

The fact that RTX inhibits BCR in normal B cells might have functional consequences in terms of antibody production and, therefore, in risks of infection. However, it should be pointed out that patients routinely treated with RTX do not display reduced level of Ig and increased rate of infection.³⁵ However, it has been reported that prolonged RTX treatment could result in decreased serum IgM and reduced vaccinal response as well as a risk for infection in some vulnerable patients cotreated with other immunosuppressive drugs.³⁶ This effect so far was explained by the profound and sustained B-cell depletion. Our study offers another explanation through BCR inhibition.

RTX is now widely used for autoimmune disease, including arthritis and lupus erythematosus (LE).² The mechanisms by which RTX acts in the latter setting are not totally understood. However, B-cell depletion is generally thought to represent the main mechanism. However, BCR signaling is abnormal in patients with some autoimmune diseases, such as LE. In this disease, BCR-constitutive activation was proven and potentially related to defective FcγRIIB signaling or/and circulating B-cell stimulator.³⁷ Our study raises the possibility that, in LE, RTX also acts through BCR inhibition.

The fact that RTX inhibits BCR in malignant B cells may have some concerns in the context of hemato-oncology. Indeed, BCR plays a role in survival of malignant B cells, notably in some non-Hodgkin malignant lymphomas. Recently, Chen et al have described that a fraction of DLBCL patients displays a constitutive activation of Syk that was associated with high BCR density at the cell surface of these malignant cells.²⁰ The concept of so-called "tonic BCR" had a significant impact on the hematologist community thanks to the promise that new classes of Syk inhibitors become disposable for clinical use and would thus display unequivocally antilymphoma activity, both in vitro and in vivo.^{20,38-40} The fact that RTX has no effect on Syk phosphorylation at Y525 in basal conditions invalidates the possibility that, in vivo, RTX acts directly as a simple "Syk inhibitor." However, if RTX treatment results in decreased BCR expression in clinical settings, as suggested by our in vitro experiments, it is conceivable that such modifications could prime malignant cells to apoptosis in "tonic BCR" DLBCL patients. This hypothesis may have significant implications with regards to the synergy between RTX and chemotherapy in DLBCL.

The mechanism by which RTX influences BCR signaling was examined. The fact that RTX had no effect on Syk status in basal conditions raised the possibility that RTX affects more proximal events; for example, it is conceivable that RTX influences BCR itself or its translocation into raft. Our study indicates that the 2 mechanisms are plausible and might coexist. Obviously, RTX treatment reduced expression of not only surface but also total Ig. This observation was not unprecedented as more than 10 years ago Bourget et al already reported reduction of surface Ig under treatment with another anti-CD20 monoclonal antibody.³⁰ This intriguing phenomenon has been neglected, and neither the mechanism nor the functional consequences have been examined for years. One of the most appealing implications of this observation is to establish a new link between CD20 and BCR. Indeed, previous studies have already documented that CD20 is physically and functionally linked to BCR. For example, CD20 and BCR colocalize and then rapidly dissociate at the cell surface before endocytosis of BCR,^{41,42} whereas CD20 and BCR cooperate for activating calcium flux.⁴³ The mechanism by which RTX affects Ig expression has not been thoroughly investigated in our study. However, our results suggest a mechanism involving proteasome. Based on the literature, it is possible that RTX affects BCR degradation through distinct but coordinated mechanisms. First, RTX could regulate posttrans-

lational events, such as glycosylation or ubiquitinylation, necessary for Ig folding and stability.³¹ Second, RTX could interfere with the expression of chaperones, such as Bip and Calnexin, which are known to associate with Ig and target it to degradation.^{44,45} Third, RTX may affect Ig-αβ subunit regulation, responsible for BCR assembly defect, and subsequent enhanced BCR IgM/G degradation.⁴⁶

Our study also shows, for the first time, that treatment with RTX prevents BCR relocalization into raft. Depletion of raft-associated cholesterol and subsequent raft disorganization induced by RTX could be considered as sufficient to explain BCR-signaling cascade inhibition, as suggested by the previously documented potent inhibitory effect of MβCD on BCR signal propagation.²⁶ The mechanism by which RTX acts on cholesterol distribution or metabolism was beyond the scope of our paper. However, cholesterol depletion could be the result of RTX-induced membrane sphingolipid changes, including ceramide accumulation, as we previously described.⁷ Indeed, this lipid messenger was shown to be able to interfere with both distribution and metabolism of cholesterol.^{47,48}

In conclusion, our study provides several lines of evidence showing that RTX significantly interferes with BCR signaling by targeting proximal components of the BCR cascade, including decreased BCR expression and disturbances of BCR membrane dynamics, although the respective contribution of these 2 events, perhaps coordinated, should be determined. BCR inhibition might contribute to RTX immunosuppressive property.

Acknowledgments

The authors thank Catherine Trichard for technical assistance; Amandine Blanc for quantibrite analysis; Fatima-Ezzahra L'Faqih-Olive for flow cytometry expertise (plateau de cytométrie en flux et tri cellulaire, IFR150, Toulouse, France); Véronique Roques and Séverine Viala (plateau de lipidomique, IFR150, Toulouse, France) for technical assistance; Emilie Laprévotte and Emilie-Fleur Gauthier for reading the manuscript; and Loïc Dupré, Séverine Fruchon, Thierry Levade, Jany Ragab, Ashraf Ragab, and François Tercé for helpful discussions and invaluable advice.

This work was supported by Inserm and INCA (Pair Lymphome-Rituxop) and by l'Association pour la Recherche sur le Cancer (C.B.). S.K. is supported by le Ministère délégué à l'Enseignement Supérieur et à la Recherche.

Authorship

Contribution: S.K. conceived and designed the research plan, performed experiments, analyzed data, and drafted the manuscript; P.C., E.G., and A.Q.-M. performed experiments; J.B.-M. designed and performed lipid experiments; J.-J.F. contributed to the research plan and wrote the manuscript; and G.L. and C.B. designed the research plan, contributed to the interpretation, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Christine Bezombes, Inserm U563-CPTP, Bâtiment B, pavillon Lefebvre, Département d'Oncogénèse, Signalisation et Innovation Thérapeutique, CHU Purpan-BP3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France; e-mail: christine.bezombes-cagnac@inserm.fr.

References

- Molina A. A decade of rituximab: improving survival outcomes in non-Hodgkin's lymphoma. *Annu Rev Med.* 2008;59:237-250.
- Gürçan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(1):10-25.
- Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7359-7368.
- Taylor RP, Lindorfer MA. Immunotherapeutic mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(4):444-449.
- Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of anti-apoptotic cell survival pathways: implications in chemo-immunoresistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene.* 2007;26(25):3629-3636.
- Janas E, Priest R, Wilde JI, White JH, Malhotra R. Rituxan (anti-CD20 antibody)-induced translocation of CD20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis. *Clin Exp Immunol.* 2005;139(3):439-446.
- Bezombes C, Grazide S, Garret C, et al. Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood.* 2004;104(4):1166-1173.
- Semac I, Palomba C, Kulangara K, et al. Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells. *Cancer Res.* 2003;63(2):534-540.
- Leseux L, Laurent G, Laurent C, et al. PKC zeta mTOR pathway: a new target for rituximab therapy in follicular lymphoma. *Blood.* 2008;111(1):285-291.
- Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2001;7(3):709-723.
- Jazirehi AR, Gan XH, De Vos S, Emmanouilides C, Bonavida B. 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.* 2003;2(11):1183-1193.
- Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature.* 1989;338(6214):383-384.
- Tolar P, Sohn HW, Pierce SK. Viewing the antigen-induced initiation of B cell activation in living cells. *Immunol Rev.* 2008;221:64-76.
- Pierce SK. Lipid rafts and B cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(2):96-105.
- Gupta N, DeFranco AL. Lipid rafts and B cell signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18(5):616-626.
- Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol.* 2004;41(6):599-613.
- Keshvara LM, Isaacson CC, Yankee TM, Sarac R, Harrison ML, Geahlen RL. Syk- and Lyn-dependent phosphorylation of Syk on multiple tyrosines following B cell activation includes a site that negatively regulates signaling. *J Immunol.* 1998;161(10):5276-5283.
- Campbell KS. Signal transduction from the B cell antigen-receptor. *Curr Opin Immunol.* 1999;11(3):256-264.
- Reth M, Brummer T. Feedback regulation of lymphocyte signaling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(4):269-277.
- Chen L, Monti S, Juszczynski P, et al. SYK-dependent tonic B cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B cell lymphoma. *Blood.* 2008;111(4):2230-2237.
- Irish JM, Czerwinski DK, Nolan GP, Levy R. Altered B cell receptor signaling kinetics distinguish human follicular lymphoma B cells from tumor-infiltrating nonmalignant B cells. *Blood.* 2006;108(9):3135-3142.
- Vega MI, Huerta-Yepaz S, Garban H, Jazirehi A, Emmanouilides C, Bonavida B. Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of p38 MAPK in drug resistance. *Oncogene.* 2004;23(20):3530-3540.
- Macdonald JL, Pike LJ. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res.* 2005;46(5):1061-1067.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37:911-917.
- Siakotos AN, Rouser G, Fleischer S. Phospholipid composition of human, bovine and frog myelin isolated on a large scale from brain and spinal cord. *Lipids.* 1969;4(3):239-242.
- Cheng PC, Dykstra ML, Mitchell RN, Pierce SK. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Med.* 1999;190(11):1549-1560.
- Cheng PC, Brown BK, Song W, Pierce SK. Translocation of the B cell antigen receptor into lipid rafts reveals a novel step in signaling. *J Immunol.* 2001;166(6):3693-3701.
- Blery M, Tze L, Miosge LA, Jun JE, Goodnow CC. Essential role of membrane cholesterol in accelerated BCR internalization and uncoupling from NF-kappa B in B cell clonal anergy. *J Exp Med.* 2006;203(7):1773-1783.
- Karnell FG, Brezski RJ, King LB, Silverman MA, Monroe JG. Membrane cholesterol content accounts for developmental differences in surface B cell receptor compartmentalization and signaling. *J Biol Chem.* 2005;280(27):25621-25628.
- Bourget I, Breittmayer JP, Grenier-Brossette N, Cousin JL. CD20 monoclonal antibodies down-regulate IgM at the surface of B cells. *Eur J Immunol.* 1993;23(3):768-771.
- Ho SC, Chaudhuri S, Bachawat A, McDonald K, Pillai S. Accelerated proteasomal degradation of membrane Ig heavy chains. *J Immunol.* 2000;164(9):4713-4719.
- Elkabetz Y, Kerem A, Tencer L, Winitz D, Kopito RR, Bar-Nun S. Immunoglobulin light chains dictate vesicular transport-dependent and -independent routes for IgM degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 2003;278(21):18922-18929.
- Hayslip J, Montero A. Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review. *Mol Cancer.* 2006;5:44.
- Radcliffe CM, Arnold JN, Suter DM, et al. Human follicular lymphoma cells contain oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B cell receptor. *J Biol Chem.* 2007;282(10):7405-7415.
- Walewski J, Kraszewska E, Mioduszezowska O, et al. Rituximab (Mabthera, Rituxan) in patients with recurrent indolent lymphoma: evaluation of safety and efficacy in a multicenter study. *Med Oncol.* 2001;18(2):141-148.
- van der Kolk LE, Baars JW, Prins MH, van Oers MH. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. *Blood.* 2002;100(6):2257-2259.
- Jenks SA, Sanz I. Altered B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2009;8(3):209-213.
- Leseux L, Hamdi SM, Al Saati T, et al. Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. *Blood.* 2006;108(13):4156-4162.
- Young RM, Hardy IR, Clarke RL, et al. Mouse models of non-Hodgkin lymphoma reveal Syk as an important therapeutic target. *Blood.* 2009;113(11):2508-2516.
- Friedberg JW, Sharman J, Schaefer-Cutliffe J, et al. Fostamatinib disodium (FosD), an oral inhibitor of Syk, is well-tolerated and has significant clinical activity in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and chronic lymphocytic leukemia (SLL/CLL). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).* 2008;112:3.
- Petrie RJ, Deans JP. Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J Immunol.* 2002;169(6):2886-2891.
- Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor: dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J Biol Chem.* 2008;283(27):18545-18552.
- Walsh CA, Beers SA, French RR, et al. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2008;283(25):16971-16984.
- Hochstenbach F, David V, Watkins S, Brenner MB. Endoplasmic reticulum resident protein of 90 kilodaltons associates with the T- and B cell antigen receptors and major histocompatibility complex antigens during their assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(10):4734-4738.
- Foy SP, Matsuuchi L. Association of B lymphocyte antigen receptor polypeptides with multiple chaperone proteins. *Immunol Lett.* 2001;78(3):149-160.
- Dylke J, Lopes J, Dang-Lawson M, Machtaler S, Matsuuchi L. Role of the extracellular and transmembrane domain of Ig-alpha/beta in assembly of the B cell antigen receptor (BCR). *Immunol Lett.* 2007;112(1):47-57.
- London M, London E. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem.* 2004;279(11):9997-10004.
- Subbalah PV, Sowa JM, Singh DK. Sphingolipids and cellular cholesterol homeostasis: effect of ceramide on cholesterol trafficking and HMG CoA reductase activity. *Arch Biochem Biophys.* 2008;474(1):32-38.

Conclusion de la partie I des résultats

Au cours de ce travail nous avons démontré que le pré-traitement des lignées de LF et des LB issus de donneurs sains avec le rituximab inhibe la signalisation du BCR induite par un anti-IgM/G. L'activation du BCR a été mesurée par cytométrie en flux en analysant le niveau de phosphorylation de Syk sur son résidu d'autophosphorylation, la tyrosine 525. Le traitement des cellules avec 10µg/ml de rituximab empêche significativement l'augmentation du taux de phosphorylation de Syk dans les lignées RL et DOHH2 ainsi que dans les lymphocytes B normaux et ceci, même après 2h de stimulation du BCR. (Figure 1A, B, C et E). Cependant, le rituximab n'exerce pas un effet significatif sur la phosphorylation basale de Syk, indépendamment de la stimulation du BCR (Figure 1D). Ce résultat suggère que le rituximab inhibe la signalisation du BCR en ciblant un événement moléculaire situé en amont de Syk.

L'effet inhibiteur du signal BCR est spécifique au rituximab puisque d'autre anticorps tel que le campath-1H ou les IgG non immunes n'exercent pas d'effet sur la phosphorylation de Syk. De plus, l'utilisation du F(ab')₂ du rituximab induit les mêmes effets que le rituximab entier, ce qui suggère que le ciblage de la signalisation du BCR est dépendant du CD20 (Figure 2A). Ces résultats sont confirmés par l'utilisation de deux clones cellulaires exprimant des taux différents de CD20. L'inhibition de P-Syk est corrélée à une expression élevée du CD20 et inversement (Figure 2B).

Nous avons ensuite déterminé les conséquences de l'inhibition de Syk. Ainsi, nous avons mis en évidence que le rituximab est capable d'inhiber l'activation de PLC γ 2, Akt et Erk ainsi que le profil général de phosphorylation en tyrosine. De plus, nous avons observé que le traitement des cellules de LF par le rituximab affecte de façon importante le flux calcique, considéré comme signature de l'activation de ce signal (Figure 4A, B).

Pour comprendre par quel mécanisme le rituximab exerce cette inhibition, nous avons analysé son effet sur les événements initiateurs du signal. Ainsi, nous avons démontré que le prétraitement au rituximab empêche l'activation très rapide de Lyn (Figure 3A, B). L'importance de la localisation de Lyn dans les radeaux lipidiques et de la translocation du BCR dans ces microdomaines pour l'initiation du signal, nous a amené à nous intéresser aux

radeaux lipidiques et à analyser la localisation du BCR suite à un traitement au rituximab. L'isolement et l'analyse des radeaux lipidiques ont montré que le rituximab empêche la translocation du BCR dans les radeaux lipidiques induite par sa stimulation (Figure 5A). De plus, l'étude de la composition lipidique des radeaux lipidiques a révélé que le taux de cholestérol est fortement diminué dans les fractions radeaux lipidiques des cellules traitées avec le rituximab par rapport aux fractions contenant les radeaux lipidiques des cellules non traitées (Figure 5C). Plusieurs études montrent l'importance du cholestérol dans le maintien de l'intégrité des radeaux lipidiques et le rôle que joue le cholestérol dans la régulation de la localisation du BCR. Ainsi, nous pouvons postuler que la diminution du cholestérol dans les radeaux lipidiques des cellules traitées pourrait être à l'origine du défaut de translocation du BCR dans les radeaux lipidiques.

Parallèlement, nous avons constaté que le niveau d'expression du BCR est sérieusement affecté après le traitement au rituximab. En effet, le rituximab induit une diminution du marquage de l'IgM. Cette diminution affecte le niveau global (membranaire et intracytoplasmique) du BCR. Bien que le mécanisme par lequel le rituximab diminue l'expression du BCR n'ait pas été déterminé dans notre étude, nos résultats montrent qu'un co-traitement des cellules avec le rituximab et le MG132 (inhibiteur du protéasome) empêche l'effet du rituximab sur le niveau d'expression du BCR. Ces résultats indiquent que la diminution de l'expression du BCR induite par le rituximab provient directement ou indirectement d'un mécanisme dépendant de la dégradation protéique.

Ainsi, nos résultats montrent un nouveau mode d'action du Rituximab, jusqu'à lors inconnu, qui met en jeu un mécanisme d'immunomodulation du BCR. Ces résultats s'intègrent parmi les connaissances existantes sur les effets membranaires et intracellulaires qu'induit le rituximab. En effet, l'inhibition de certaines voies de signalisation et de facteurs de transcription par le rituximab déjà décrite par d'autres équipes sur des types cellulaires différents proviendrait de l'effet qu'exerce le rituximab sur la dynamique membranaire ainsi que sur la signalisation du BCR (figure 37).

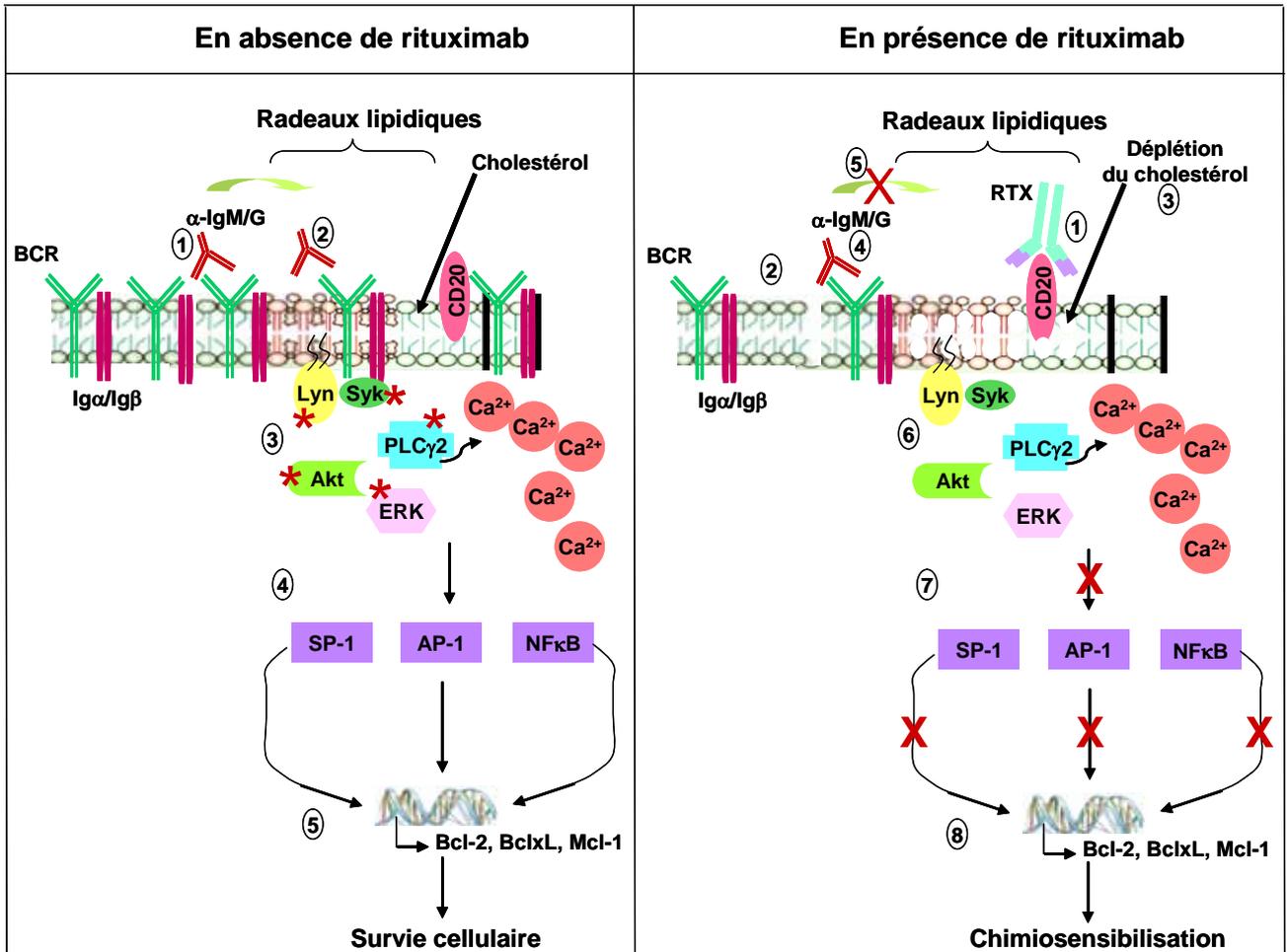


Figure 37 : Schéma général des mécanismes d'action du rituximab dépendants de l'engagement du CD20. **En absence de rituximab :** (1) la stimulation du BCR avec un anti-IgM ou un anti IgG induit sa translocation dans les radeaux lipidiques (2) et l'activation des voies de signalisation (3) qui activent certains facteurs de transcription (4) qui contrôlent l'expression des protéines anti-apoptotiques (5) assurant ainsi la survie cellulaire. **En présence de rituximab :** l'expression du BCR est diminuée (1) et le cholestérol des radeaux lipidiques est déplié. Ces deux phénomènes empêchent la translocation du BCR dans les radeaux lipidiques suite à son engagement (4) (5) et inhibent alors l'activation des voies de signalisation en aval du BCR (6). Les facteurs de transcription n'étant pas activés (7), le taux d'expression des protéines anti-apoptotiques reste bas, ce qui favorise l'action des agents cytotoxiques (8) utilisés en combinaison avec le rituximab tel que la chimiothérapie.

La compréhension des mécanismes moléculaires mis en place par le rituximab pour diminuer le taux de cholestérol dans les radeaux lipidiques d'une part et le niveau d'expression du BCR d'autre part ainsi que l'éventuelle relation entre ces deux événements restent à déterminer.

La discussion de ce travail ainsi que les perspectives et les retombées qui en découlent seront présentées dans la partie discussion.

RESULTATS- partie II

Enzastaurin displays in vitro and in vivo antitumoral activity in follicular lymphoma cells

Introduction de la partie II des résultats

Le LF est le deuxième type de LNH le plus fréquent. Son incidence ne cesse d'augmenter et les patients subissent des phases de rémission suivies de phases de rechute. Ce caractère incurable du LF nécessite l'investigation de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à cibler les voies de survie dérégulées dans le LF. La translocation t(14 ;18) participe au dérèglement de la balance survie/apoptose en raison de la surexpression de la protéine antiapoptotique Bcl-2. Le ciblage direct de la protéine Bcl2 ou de son ARNm n'a toujours pas encore démontré une efficacité significative et a souvent été confronté aux effets secondaires dus à l'absence de spécificité des antagonistes de Bcl-2 qui sont aussi capables de se lier aux autres protéines de la famille Bcl-2 dont des protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bak ou Bad (322).

Outre la t(14 ;18), plusieurs études ont révélé des défauts d'expression ou d'activation de certaines protéines appartenant à des voies de signalisation telles que PI3K/Akt (323) (324), les MAPK (325) et les PKCs. De plus, notre équipe a démontré que la voie Syk/mTOR est suractivée dans les LF (162). mTOR est une protéine qui joue un rôle majeur dans la survie, la traduction et la prolifération cellulaire. Elle peut être régulée par différentes kinases telles que Akt et les PKC. Ainsi, la suractivation de la PKC ζ constitue un obstacle pour l'inhibition de mTOR par les agents anti-tumoraux tel que le Rituximab (254). En accord avec ces données, différentes études montrent l'altération de la signalisation du BCR dans le LF et suspectent l'implication de cette signalisation dans la formation et/ou le maintien du caractère tumoral des cellules de LF (135).

En considérant ces données bibliographiques, nous avons postulé que tout composé capable d'interférer avec une ou plusieurs composantes de la signalisation du BCR pourrait présenter une activité anti-tumorale dans les LF et ainsi fournir une nouvelle possibilité de traitement. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'enzastaurine, inhibiteur des voies PI3K/Akt et PKC, qui a démontré une activité anti-proliférative et anti-angiogénique dans différents types de tumeurs (296).

Dans cette étude, nous avons exploré le potentiel anti-tumoral de l'enzastaurine dans le LF ainsi que les mécanismes moléculaires mis en jeu pour induire cet effet.

Enzastaurin displays in vitro and in vivo antitumoral activity in follicular lymphoma cells

Kheirallah Samar,^{1,2} Fruchon Séverine,^{1,2} Talal AlSaati,³ Ysebaert Loïc,^{1,2,4} Benhadji Karim,⁵ Fournié Jean-Jacques,^{1,2} Laurent Guy,^{1,2,4} and Bezombes Christine^{1,2,*}

¹ INSERM, U563, Toulouse, F-31300 France

² Université Toulouse III Paul-Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, F-31300 France

³ Plateau technique d'histopathologie expérimentale, IFR 30, CHU Purpan, Toulouse F-31024, France

⁴ CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service Hématologie, Toulouse, F-31300 France

⁵ Eli Lilly and Compagny. Lilly Corporate Center, Suresnes, F-92158 France

* Correspondence should be addressed to Dr Christine Bezombes, INSERM U563 - CPTP, Bâtiment B, pavillon Lefebvre, Département d'Oncogénèse, Signalisation et Innovation thérapeutique, CHU Purpan – BP3028, 31024 Toulouse cedex 3, France. Phone: 33-5-62-74-45-62; Fax: 33-5-62-74-45-58; E-mail: christine.bezombes-cagnac@inserm.fr

INTRODUCTION

Follicular lymphoma (FL) is the second most common type of B-non Hodgkin's lymphoma (NHL) including 35% to 40% of all adult lymphomas. FL is derived from germinal center follicles lymphoid cells, and is characterized by indolent initial course, favorable response to first line therapy, but also recurrences followed by refractory phase eventually complicated by histological transformation. Although the prognosis of FL is variable, most patients with aggressive forms of FL (high FLIPI score) ultimately die from their disease with median survival of 8 to 10 years.(142) Its incidence is rapidly increasing in Western countries and has nearly doubled within the last three decades.(141) The reasons for this development are not completely clear but increasing evidence suggests that environmental factors most probably contribute.(140)

Despite the introduction of rituximab in FL treatment, this disease is still incurable and most patients tend to relapse after treatment with shorter intervals of remission in between. Incurability of FL leaves a wide-scope for development of future strategies to provide durable complete remissions. Thus, the identification of new targets and development of novel targeted therapies are imperative to improve patient response and to prevent relapse.

FL exhibits a follicular or nodular pattern of growth reminiscent of germinal centers. Approximately 85% of FL cases are associated with a specific translocation $t(14;18)(q32;q21)$ that leads to overexpression of the anti-apoptotic Bcl-2. Thus, Bcl-2 constitutes a major obstacle for cell death induction. However, this genetic abnormality alone is unlikely to be sufficient to produce a clinical FL. Indeed, Bcl-2 overexpressing transgenic mice do not develop FL and $t(14;18)$ -bearing lymphocytes have been reported in healthy individuals.(326) Moreover, other genetic alterations involving Bcl-6 or c-Myc for example have been described in this pathology.(150)

Beside the hypothesis postulating that FL could result from sequential accumulation of genetic alterations, recent studies demonstrated the potential role of several signaling pathways alterations in FL cell growth. Indeed, Levy's group supplied evidence about an altered B-Cell Receptor (BCR) signaling in tumor cells from FL patients as compared to their normal B cell counterparts.(135) Moreover, it has been described that FL exhibits an overexpression of a phosphorylated form of the pro-survival protein Akt.(323, 324) For our

part, we identified mTOR as a serine threonine kinase overactivated in FL patients which plays a critical role in the survival and clonogenic potential of FL cells.(162)

mTOR is regulated by many kinases including PKC.(327, 328) The role of PKC beta in B cell signaling and survival has been demonstrated in PKC beta deficient mice which display a strong impairment of humoral and B cell proliferative responses.(297) Moreover, PKC beta is overexpressed in B cell malignancies such as DLBCL (329, 330) and also in FL.(305) Altogether, these studies underline the role of PKC in lymphomagenesis and support the use of PKC inhibitor in NHL treatment.

The acyclic bisindolylmaleimide, enzastaurin, is a PKC beta inhibitor that demonstrates a strong anti-tumoral activity in various pathologies such as colon cancer, glioblastoma, cutaneous T-cell lymphoma, gastric cancer, and interestingly, in B cell malignancies such as multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia.(308, 311-314, 331)enzastaurin effect in FL has never been investigated.

Our results show that enzastaurin displays a cytotoxic effect in the FL cell line, through the inhibition of the pro-survival pathway mediated by mTOR, and through the activation of the pro-apoptotic pathway mediated by Bad. These two pathways seem to be under the control of the p90 ribosomal S6 serine/threonine kinase: P90RSK.

We also demonstrated for the first time that enzastaurin exerts an anti-tumoral activity against FL cells *in vivo*.

Thus, our study provides evidences for anti-tumoral activity of enzastaurin in FL models and demonstrates the potential role of P90RSK as a mediator of enzastaurin-induced molecular effect.

METHODS

Cell lines and reagents

RL are transformed FL cell line carrying the t(14;18) translocation. There were obtained from the ATCC (American Type Cell Collection) (Rockville, MD, USA). Cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), glutamine (2 mM), streptomycin (10 µg/mL) and penicillin (200 U/mL) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Cell viability

RL cells were seeded at 3x10⁵ cells/ml and were treated or not with various concentrations of enzastaurin. Cell viability was evaluated after 24 and 48 hours treatment by counting cells using Trypan blue exclusion.

Cell cycle analysis

After washing in PBS, RL cells were permeabilized in a PBS solution containing 0,01% Triton x-100 and 1µg/ml of RNase A for 1 minute. After 2 min of centrifugation, pellets were resuspended in PBS containing DAPI at 10 µg/ml for 15 min and cell cycle was analyzed using a BDLSRII cytometer (Becton Dickinson) and DIVA 6.1.2 software. For DNA staining visualization, a Nikon Eclipse TE2000-U fluorescent microscope was used.

Western-blot

Analyses were performed as we previously described (162). The different antibodies used for Western-blot were: anti-GSK3β, anti-phospho GSK3α/β ser21/ser9, anti-p90RSK, anti-phospho p90RSK (T359/S363), anti-Bad, anti-phospho Bad (S112, S136), anti-S6Ribosomal protein, anti-phospho S6Ribosomal protein, anti-p70S6K, anti-phospho p70S6K (T389), anti-caspase 3, anti-PARP, anti-Akt, anti-phospho-Akt (T308, S473). Horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies against rabbit, mouse or goat immunoglobulins were from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

siRNA transfection

RL cells were transfected using Amaxa nucleofector kit V (Lonza, Levallois-Perret, France). Five million cells were transfected twice with 950 nM p90RSK siRNA or scramble (Dharmacon, Brebières, France). Four hours after transfection, cells were seeded at $0.3 \cdot 10^6$ cells /mL in RPMI 10% FCS and protein depletion was assessed 48 h after the second transfection by Western-blot analysis.

FL xenograft murine model

10×10^6 RL cells (resuspended in 300 μ l of PBS) were subcutaneously injected in the right flank of SCID-Beige mice, according to the INSERM Animal Care and Use Committee-approved protocol. When tumor volumes reached 100 mm³, mice were divided into two groups of 8 to 10 animals. One group was treated by oral gavage once daily with 150 mg/kg of enzastaurin dissolved in a 10% acacia solution (Fisher Scientific) containing 1/6 intralipid (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and 0.5% of Tween 80 (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The control group was treated with the vehicle at the same schedule and route of administration. Tumor burden was measured 3 times per week with a caliper, and tumor volume (TV) was calculating using the formula ($TV = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$). Animals were killed when the TV reached 1600/1800 mm³.

Secreted VEGF quantification

VEGF secreted by RL cells, treated or not with enzastaurin, was detected in cell supernatant by ELISA assay according to the manufacturer's recommendations (VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

Statistics

Data shown represent means \pm SD. Significant differences were assessed by Student's t-test. P values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Enzastaurin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in RL cells

In order to evaluate the biological effect of enzastaurin in FL cell line, we first examined its impact on cell proliferation. As showed in Figure 1A, enzastaurin inhibits in a dose-dependent manner the number of viable FL cells evaluated at 24 and 48 hours post-treatment. This effect was accompanied by the induction of apoptosis as attested the sub-G1 phase proportion increase (Fig. 1B). The DNA fragmentation was also illustrated by DAPI staining as shown in Figure 1C. Enzastaurin-induced apoptosis involved caspase-3 and PARP cleavage as attested by Western-blot analysis (Fig. 1D). The role of caspases in enzastaurin-induced apoptosis was suggested by preincubating RL cells with *ZVAD-fmk*, a pan-caspase inhibitor. As observed in Figures 1B, *ZVAD* partially prevents subG1 proportion increase, suggesting that enzastaurin-induced apoptosis is, at least in part, caspase-dependent.

These results demonstrate the ability of enzastaurin to exert a cytotoxic effect by inhibiting cell proliferation and activating apoptosis in FL cell lines.

Enzastaurin inhibits classical targets in FL cells

In order to understand the molecular mechanisms involved in enzastaurin-induced effect on proliferation and apoptosis, we analyzed classical described targets of enzastaurin as GSK3 β , the PI3K/Akt module, and p70S6kinase. Indeed, enzastaurin is known to induce anti-proliferative effect by targeting PI3K/Akt pathway in many tumor cells. In these studies, Akt inhibition seems to be responsible for the dephosphorylation of GSK3 β and p70S6kinase, two known targets of Akt. In B-lymphoma cell lines, it was very recently described that enzastaurin inhibits Akt and their classical targets after a long period of treatment (48, 72hrs) (332). In our study, we showed that enzastaurin induces a huge decrease of GSK3 β phosphorylation on its inhibitory site Ser9, after only 3 hours of treatment (Fig. 2A). However, we were unable to detect at this time any inhibition of Akt phosphorylation on its two sites T308 and S473 (Fig. 2A) nor PI3K activity (data not shown), this phenomenon occurring later (at 24, 48 hrs). Interestingly, enzastaurin induced a decrease in mTOR activity,

attested by the inhibition of the phosphorylated form of its two targets, p70S6K and S6 ribosomal protein very rapidly (3h) (Fig. 2B).

These results demonstrated that, in FL cells, enzastaurin display a biological activity, illustrated by GSK3 β Ser9 dephosphorylation, and inhibit mTOR by an unknown mode of action independent of the classically described Akt pathway.

P90RSK: the mediator of enzastaurin molecular effect in RL cells

In order to investigate how enzastaurin exert its rapid action on GSK3 β and mTOR, in an Akt-independent manner, we speculated that enzastaurin could inhibit the p90 ribosomal S6kinase (p90RSK or RSK1). Indeed, p90RSK is known to phosphorylate GSK3 β on Ser9 and to activate mTOR by inhibiting its main inhibitor, TSC2.(333) As shown in Figure 3A, enzastaurin inhibits p90RSK phosphorylation (T³⁵⁹/S³⁶³) very rapidly (3h). This result shows that p90RSK is targeted by enzastaurin in a time and dose manner that correlates with the dephosphorylation of its two targets GSK3 β and mTOR.

To confirm that p90RSK is able to regulate GSK3 β and mTOR in FL cells, we investigated the effect of p90RSK siRNA. As shown in Figure 3B, p90RSK depletion in RL cells strongly decreased GSK3 β and mTOR phosphorylation.

mTOR targeting in FL is important to consider as this kinase is overactivated in this pathology and its inhibition could induce significant consequences in terms of survival and tumor promotion. In this context, we explored the potential effect of enzastaurin-induced p90RSK/mTOR inhibition on VEGF level. Indeed, VEGF expression is known to be under the control of mTOR (334, 335) and this growth factor plays an important role in lymphoma cell survival (336-338) . In this study, we demonstrated that enzastaurin was able to inhibit VEGF secretion by FL cell lines (Figure 3C).

Altogether, these results pointed out the implication of p90RSK in mediating enzastaurin effect on the survival pathway mTOR and lead us to investigate if this kinase could also have a role in enzastaurin-mediated apoptosis.

Thus, we explored the effect of enzastaurin on the pro-apototic protein Bad. Bad is known to be phosphorylated by different kinases including, p90RSK on Ser¹¹² and Akt on Ser¹³⁶. Under its unphosphorylated form, Bad is associated with Bcl-2 or Bcl-x_L and inhibits

their anti-apoptotic functions. After phosphorylation, Bad is sequestered by 14-3-3 protein allowing Bcl-2 and Bcl_{xL} to inhibit apoptosis by preventing cytochrome C release and caspases activation. We observed that after 3 hours of treatment, enzastaurin strongly decrease Bad phosphorylation level on the p90RSK-dependant S¹¹² site. Then, Bad becomes dephosphorylated on the Akt-dependant S¹³⁶ site after 48h of treatment, as a consequence of Akt inhibition (Fig. 3D). This result indicates that enzastaurin-induced cell death could be due to Bad activation, probably through p90RSK inhibition.

Altogether, these results showed that enzastaurin modulate both survival and apoptotic pathways through a rapid inhibition of p90RSK.

Enzastaurin is a potent antitumoral agent in FL xenograft model

Numerous studies revealed that enzastaurin exerts *in vivo* antitumoral activity against various types of cancers(308, 311, 312, 314). In order to explore this phenomenon in FL, we injected subcutaneously RL cells in SCIB-Beige mice and evaluated the tumor volume after enzastaurin administration by daily oral gavage at 150 mg/kg. As shown in Figure 4, enzastaurin inhibits the tumor volume, supporting the idea that enzastaurin presents an anti-tumoral activity *in vivo*.

This result demonstrated for the first time that enzastaurin displays an anti-tumoral effect in a FL xenograft model.

Figure 1

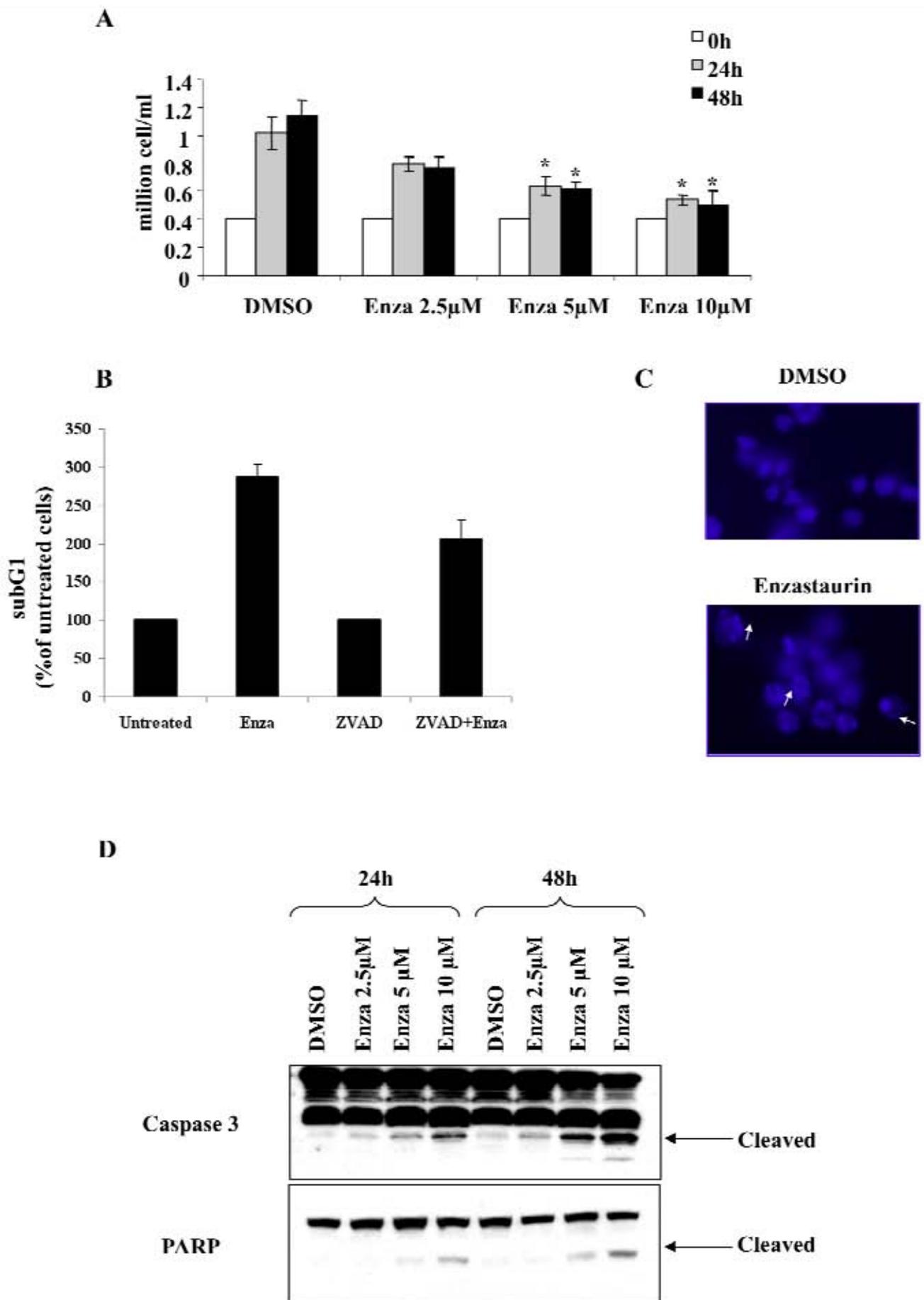


Figure 2

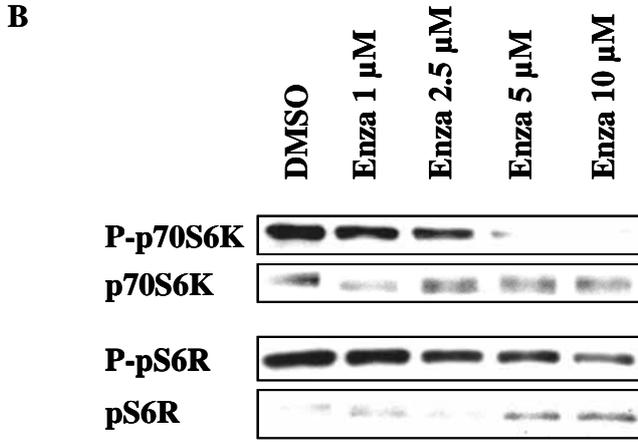
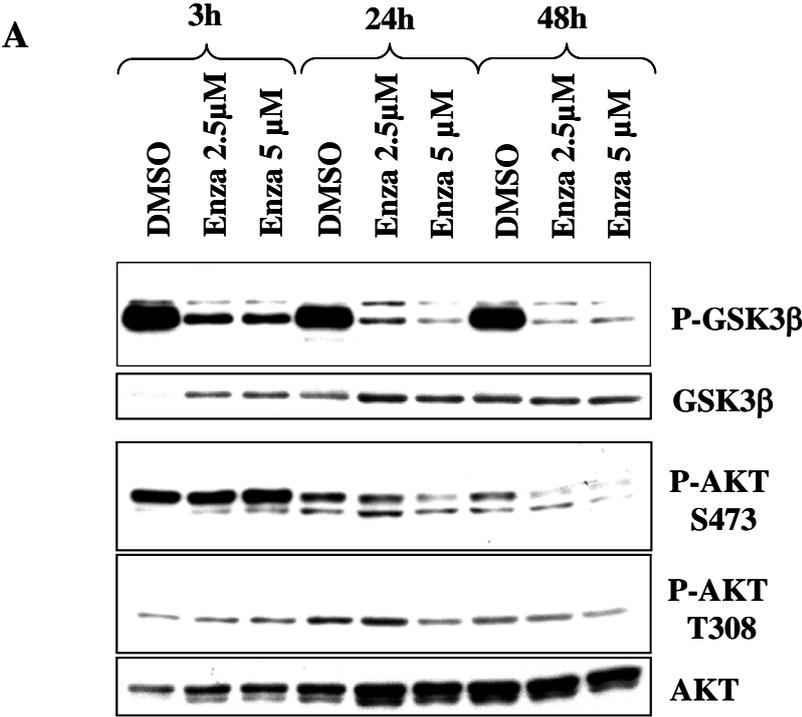


Figure 3

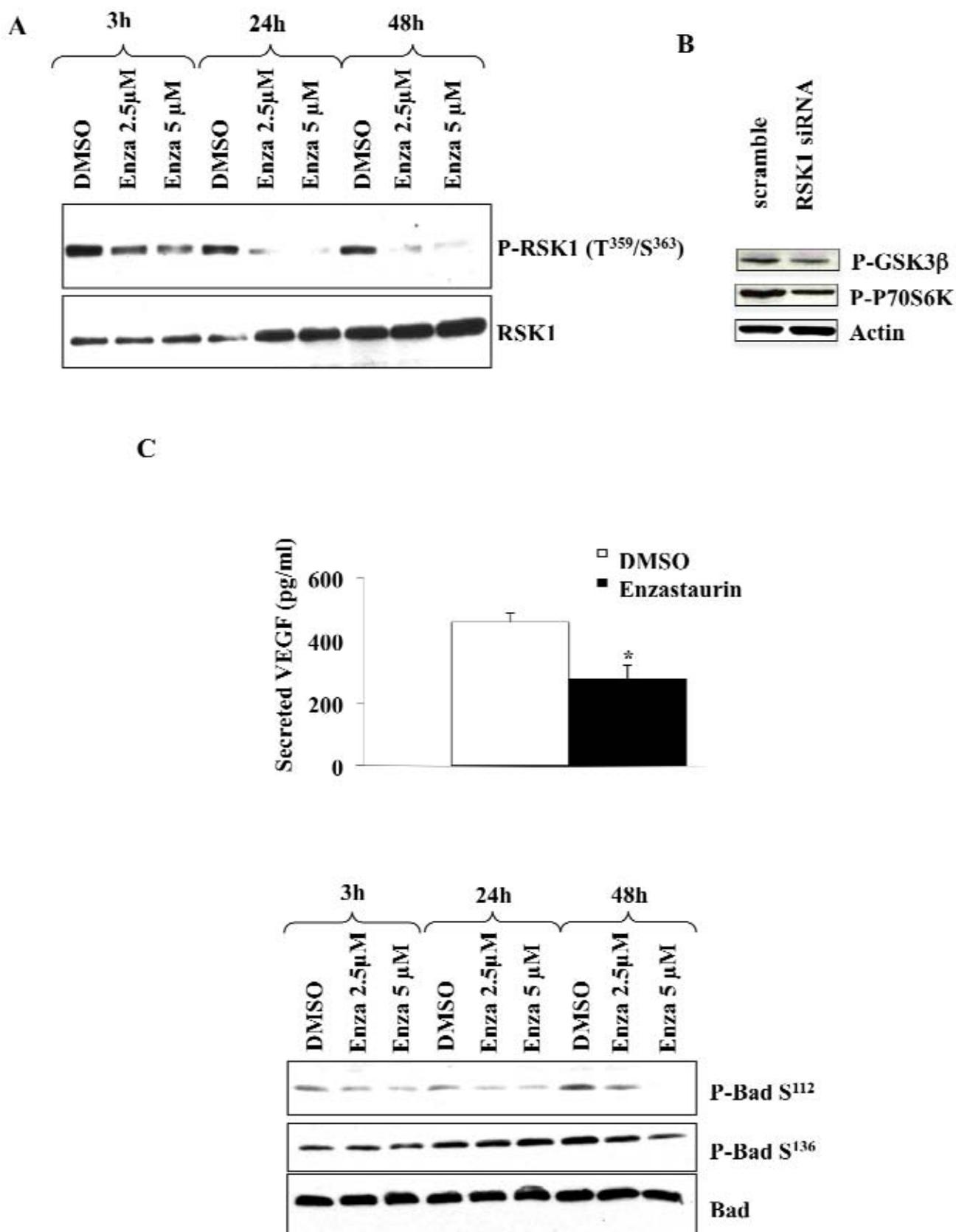


Figure 4

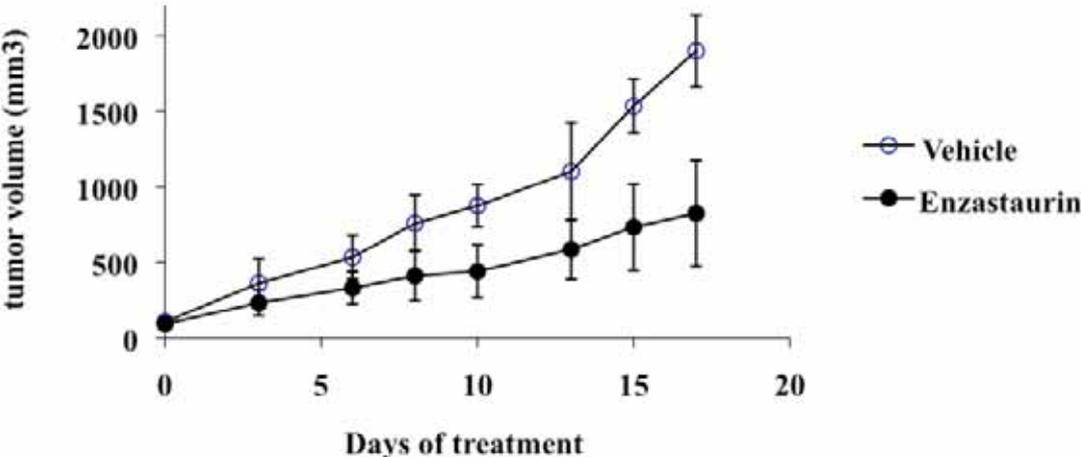
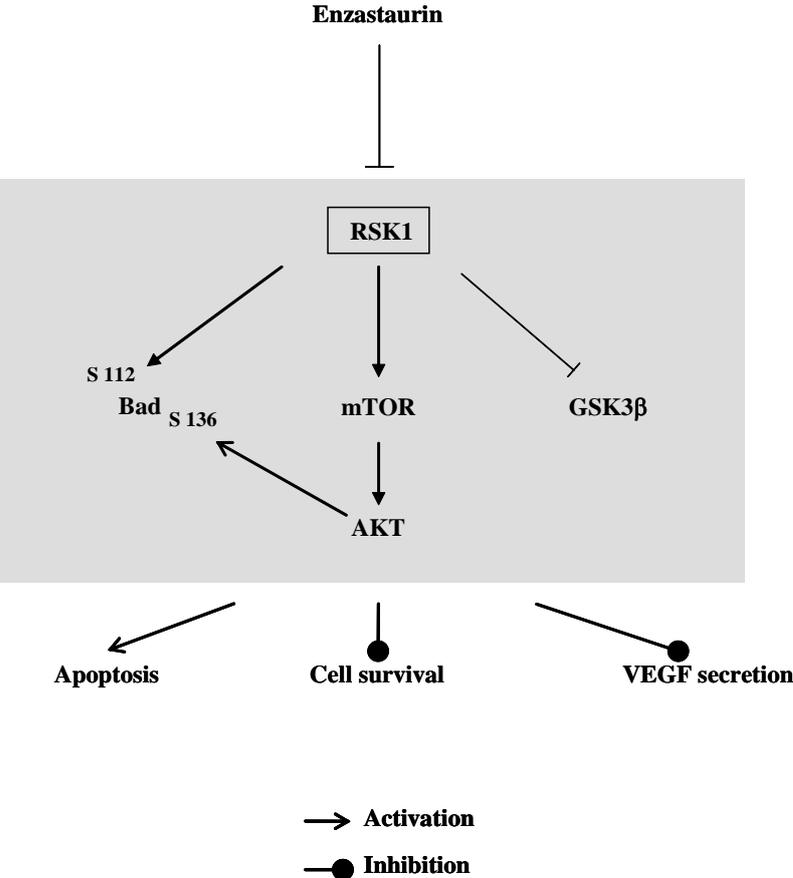


Figure 5



FIGURES LEGENDS

Figure 1: Cellular effect of enzastaurin on RL cells

A/ RL cells were treated or not (DMSO) with 2.5 to 10 μ M enzastaurin, and viable cells were determined by cell counting after 24 and 48 hours of treatment. Results are expressed in million of cell/ml and are the mean of three independent experiments \pm SD. * $<p$ 0.05. **B/** RL cells were preincubated or not with ZVAD-Fmk at 30 μ M during 1h30 and then treated or not (DMSO) with enzastaurin at 5 μ M. The percent of cells in the subG1 phase was determined by analyzing the cell cycle as described in methods. Histograms are expressed % of untreated cells and are the mean of three independent experiments \pm SD. * $<p$ 0.01. **C/** RL cells were treated with 10 μ M of enzastaurin during 48 hours and nuclear fragmentation was visualized under a fluorescent microscope after DAPI staining. **D/** RL cells were treated or not (DMSO) at various doses of enzastaurin and capsase 3 and PARP cleavage were determined after 24 and 48 hours of treatment by Western-blot analysis. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure 2: Inhibition of classical targets of enzastaurin in RL cells

A/ RL cells were treated or not (DMSO) with various doses of enzastaurin, and phosphorylation status of GSK3 β and Akt were determined at different times by Western-blot analysis using specific anti-phospho-protein antibodies. GSK3 β and Akt expression were used as a control of protein expression. Results are representative of at least 3 independent experiments. **B/** RL cells were treated or not (DMSO) with various doses of enzastaurin during 3 hours. mTOR activity was determined by Western-blot analysis using anti-phospho-P70S6K and anti-phospho-PS6R antibodies. P70S6K and S6R expression were used as a control of protein expression. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure 3: Inhibition of RSK and subsequent targets by enzastaurin in RL cells

RL cells were treated or not (DMSO) with enzastaurin with indicated doses for 3, 24 or 48h. p90RSK (**A**) and Bad (**D**) phosphorylation levels were determined by Western-blot analysis using specific anti-phospho-protein antibodies. p90RSK and Bad expression were used as a control of protein expression. Results are representative of 3 independent experiments. **B/** RL cells were transfected by p90RSK siRNA and phosphorylation of p70S6K and GSK3 β was evaluated by Western-blot analysis. Results are representative of 3 independent experiments.

C/ RL cells were treated or not (DMSO) with 5 μ M of enzastaurin and secreted VEGF was measured in the cell supernatant as described in methods. Histograms are expressed in pg/ml and are the mean of 3 independent experiments \pm SD. * $<$ p 0.01.

Figure 4: *In vivo* anti-tumoral effect of enzastaurin

SCID-Beige mice engrafted with RL cells were treated or not (vehicle) with 150 mg/kg of enzastaurin daily during 17 days. Results represent tumor volume calculated as described in methods \pm SD.

Figure 5: Hypothetical model for signaling pathways targeted by enzastaurin in RL cells.

REFERENCES

1. Bastion Y, Sebban C, Berger F, et al. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol.* 1997;15:1587-1594.
2. Michallet AS, Coiffier B. Recent developments in the treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood Rev.* 2009;23:11-23.
3. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, et al. The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer.* 2007;120 Suppl 12:1-39.
4. Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;36:211-223.
5. Viardot A, Barth TF, Moller P, Dohner H, Bentz M. Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. *Semin Cancer Biol.* 2003;13:183-190.
6. Irish JM, Czerwinski DK, Nolan GP, Levy R. Altered B-cell receptor signaling kinetics distinguish human follicular lymphoma B cells from tumor-infiltrating nonmalignant B cells. *Blood.* 2006;108:3135-3142.
7. Zha H, Raffeld M, Charboneau L, et al. Similarities of prosurvival signals in Bcl-2-positive and Bcl-2-negative follicular lymphomas identified by reverse phase protein microarray. *Lab Invest.* 2004;84:235-244.
8. Gulmann C, Espina V, Petricoin E, 3rd, et al. Proteomic analysis of apoptotic pathways reveals prognostic factors in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11:5847-5855.
9. Leseux L, Hamdi SM, Al Saati T, et al. Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. *Blood.* 2006;108:4156-4162.
10. Foster KG, Fingar DC. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem.* 2005;280:14071-14077.
11. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 2007;12:9-22.
12. Leitges M, Schmedt C, Guinamard R, et al. Immunodeficiency in protein kinase cbeta-deficient mice. *Science.* 1996;273:788-791.
13. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2005;18:1377-1384.
14. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2002;8:68-74.
15. Decouvelaere AV, Morschhauser F, Buob D, Copin MC, Dumontet C. Heterogeneity of protein kinase C beta(2) expression in lymphoid malignancies. *Histopathology.* 2007;50:561-566.
16. Lee KW, Kim SG, Kim HP, et al. Enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, suppresses signaling through the ribosomal S6 kinase and bad pathways and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68:1916-1926.
17. Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, et al. The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res.* 2005;65:7462-7469.
18. Rieger J, Lemke D, Maurer G, et al. Enzastaurin-induced apoptosis in glioma cells is caspase-dependent and inhibited by BCL-XL. *J Neurochem.* 2008;106:2436-2448.

19. Querfeld C, Rizvi MA, Kuzel TM, et al. The selective protein kinase C beta inhibitor enzastaurin induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines through the AKT pathway. *J Invest Dermatol.* 2006;126:1641-1647.
20. Podar K, Raab MS, Zhang J, et al. Targeting PKC in multiple myeloma: in vitro and in vivo effects of the novel, orally available small-molecule inhibitor enzastaurin (LY317615.HCl). *Blood.* 2007;109:1669-1677.
21. Moreau AS, Jia X, Ngo HT, et al. Protein kinase C inhibitor enzastaurin induces in vitro and in vivo antitumor activity in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 2007;109:4964-4972.
22. Civallero M, Cosenza M, Grisendi G, Marcheselli L, Todoerti K, Sacchi S. Effects of enzastaurin, alone or in combination, on signaling pathway controlling growth and survival of B-cell lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma;*51:671-679.
23. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:747-758.
24. Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A, Sellers WR, Kaelin WG, Jr. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer Cell.* 2003;4:147-158.
25. Del Bufalo D, Ciuffreda L, Trisciuoglio D, et al. Antiangiogenic potential of the Mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer Res.* 2006;66:5549-5554.
26. Wang ES, Teruya-Feldstein J, Wu Y, Zhu Z, Hicklin DJ, Moore MA. Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood.* 2004;104:2893-2902.
27. Jorgensen JM, Sorensen FB, Bendix K, et al. Expression level, tissue distribution pattern, and prognostic impact of vascular endothelial growth factors VEGF and VEGF-C and their receptors Flt-1, KDR, and Flt-4 in different subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2009;50:1647-1660.
28. Jorgensen JM, Sorensen FB, Bendix K, et al. Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: clinico-pathological correlations and prognostic significance in specific subtypes. *Leuk Lymphoma.* 2007;48:584-595.

Conclusion de la partie II des résultats

Cette étude a montré que l'enzastaurine exerce un effet anti-tumoral sur les cellules de LF à travers une inhibition de la prolifération et une augmentation de l'apoptose. Cette mort cellulaire induite par l'enzastaurine est en partie dépendante de l'activation des caspases. L'exploration des mécanismes moléculaires induits par l'enzastaurine nous a révélé que ce médicament antitumoral induit une déphosphorylation de la kinase GSK3 β . Ce résultat est concordant avec ceux des études menées sur d'autres modèles cellulaires où la déphosphorylation de la ser9 de GSK3 β constitue un biomarqueur de l'activité de l'enzastaurine (293, 296, 308).

De plus, l'enzastaurine induit l'inhibition de la voie mTOR, illustrée par la déphosphorylation de ces cibles p70S6 kinase et la protéine ribosomale S6. Cette inhibition est importante à considérer dans une pathologie où mTOR est suractivée et constitue un avantage de survie aux cellules de LF.

Contrairement à ce qu'il a été décrit dans d'autres études, nos résultats montrent que l'inhibition de mTOR par l'enzastaurine n'est pas le reflet de l'inhibition d'Akt puisque cette dernière survient après la déphosphorylation des cibles de mTOR. Ce résultat intrigant nous a amené à rechercher la cause de la déphosphorylation de GSK3 β et de l'inhibition de mTOR qui survient à un temps précoce après le traitement (3h). Ainsi, nous nous sommes intéressés à la protéine p90RSK.

p90RSK est une sérine/thréonine kinase régulée essentiellement par la voie Ras/Erk (339) mais qui peut être sous l'influence des PKC, indépendamment de la voie Erk (340) (341) (342). De plus, p90RSK est capable de phosphoryler GSK3 β mais aussi d'activer mTOR à travers l'inhibition de TSC2 (343), le principal inhibiteur de mTOR. Nos résultats ont montré que l'enzastaurine inhibe p90RSK à des temps précoces, corrélant ainsi avec l'inhibition de mTOR. La déplétion de p90RSK à l'aide de siRNA, nous a permis de confirmer que p90RSK est capable de réguler mTOR dans les cellules de LF. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'inhibition de mTOR par l'enzastaurine provient, au moins en partie, de l'inhibition de p90RSK.

Le ciblage de mTOR à travers l'inhibition de p90RSK pourrait se répercuter sur l'expression de certaines protéines impliquées dans la promotion de la survie et du développement tumorale comme le VEGF. En effet il est connu que mTOR régule l'expression du VEGF (334, 335) dans certains modèles cellulaires. Nous avons donc montré que l'enzastaurine diminue aussi la quantité de VEGF sécrétée par les cellules de LF.

La découverte de p90RSK en tant que médiateur moléculaire de l'effet anti-tumoral de l'enzastaurine nous a amené à explorer l'implication de p90RSK dans la promotion de l'apoptose induite par l'enzastaurine. p90RSK est connue pour phosphoryler la protéine Bad et ainsi empêcher sa liaison avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl_{xL}. En effet, Bad phosphorylé, essentiellement par Akt et p90RSK sur 2 sites différents, se lie à la protéine 14-3-3. Cette liaison le séquestre loin de Bcl-2 et Bcl_{xL} et l'empêche ainsi d'exercer sa fonction pro-apoptotique. Nous avons alors exploré l'effet de l'enzastaurine sur les phosphorylations inhibitrices de Bad. Le traitement à l'enzastaurine diminue dès 3h la phosphorylation de Bad dépendante de p90RSK (Ser 112). Ce résultat suggère l'implication de p90RSK dans l'action pro-apoptotique de l'enzastaurine dans les LF.

La pertinence de l'effet anti-tumoral de l'enzastaurine obtenu dans des lignées de LF a ensuite été vérifiée dans un système de xénogreffe. Ainsi, nous avons démontré pour la première fois que l'enzastaurine inhibe la croissance tumorale des cellules de LF *in vivo*.

En conclusion, cette étude démontre le potentiel anti-tumoral de l'enzastaurine dans le LF *in vitro* et *in vivo*. Cet effet semble se produire à travers l'inhibition de la voie de survie mTOR et l'activation de la protéine pro-apoptotique Bad. Ces événements sont indépendants d'Akt mais seraient sous la dépendance de la protéine p90RSK, kinase probablement située au centre de l'effet anti-tumoral de l'enzastaurine.

Discussion

Mon **principal travail** de thèse a porté sur les mécanismes d'action du rituximab. Nous avons montré que le rituximab inhibe la signalisation du BCR à partir des événements les plus proximaux tels que l'inhibition des tyrosines kinases Lyn et Syk ou le flux calcique. Ces effets se répercutent sur les effecteurs distaux qui assurent la propagation du signal et ainsi les fonctions biologiques du lymphocyte B. Le ciblage de la signalisation du BCR dans le lymphocyte B normal pourrait avoir des conséquences sur ses fonctions biologiques telles que la présentation de l'antigène ou la sécrétion d'anticorps. En effet, comme je l'ai déjà évoqué dans l'introduction, le risque d'infection ainsi que la diminution du taux d'IgM sécrétée a été décrit chez certains patients traités par le rituximab. Ces effets, qui sont considérés comme le résultat de la déplétion massive des LB, peuvent être également dûs à l'inhibition du signal BCR par le rituximab.

L'inhibition du signal BCR pourrait s'avérer important dans le contexte des maladies auto-immunes. En effet, le rituximab est utilisé dans le traitement de ces pathologies et les raisons de son succès sont très mal connues. De plus en plus d'études montrent l'implication des lymphocytes B dans les maladies auto-immunes, en particulier le dérèglement de la signalisation du BCR. L'inhibition de la signalisation du BCR pourrait participer à l'effet thérapeutique du rituximab dans ces pathologies et constituerait un mécanisme d'anergisation des LB auto-réactifs. A ce propos, nous avons pu confirmer l'inhibition du signal BCR par le rituximab dans des cellules issues de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (données non publiées).

Ainsi, l'exploration des conséquences biologiques (prolifération, apoptose, sécrétion d'anticorps ou présentation de l'antigène) de cette inhibition dans les lymphocytes B normaux ou issus de patients atteints de maladies auto-immunes constitue des perspectives intéressantes à ce travail. De plus, il est primordial de vérifier l'effet du rituximab sur la signalisation du BCR induite par un Ag présenté par une CPA ou par une bicouche lipidique.

Le ciblage du BCR par le rituximab dépend du CD20 et est affecté par son niveau d'expression. En effet, l'utilisation du F(ab')₂ du rituximab reproduit parfaitement l'inhibition de Syk. En accord avec ce résultat, l'équipe de B. Bonavida a récemment publié une étude qui

montre que les signaux intracellulaires, connus pour être induits par le rituximab, sont dépendants de sa partie F(ab')₂ (258). Bien que la contribution de ces effets *in vivo* reste à prouver, nos résultats confirment le fait que le rituximab puisse aussi agir directement à travers la signalisation du CD20. De plus, ce résultat suggère que le CD20 exerce une fonction liée à celle du BCR et pourrait faire partie de ses co-récepteurs, comme l'ont déjà suggéré les équipes de Cragg et Deans. Bien que les événements moléculaires exacts induits par l'engagement du CD20 sont encore à éclaircir, ces données nous amènent à reconsidérer le rôle du CD20 dans le ciblage thérapeutique en tant qu'entité de signalisation et non seulement en tant qu'une molécule qui permet la liaison de l'anticorps sur le lymphocyte B.

Le ciblage par le rituximab des protéines les plus proximales dans la signalisation du BCR, nous a amené à explorer l'effet du rituximab sur les événements initiateurs du signal BCR. L'engagement du BCR induit sa translocation dans les domaines membranaires radeaux lipidiques où des protéines kinases telles que Lyn et Syk sont présentes et participent à l'activation du signal. Comme il a été déjà décrit par d'autres études, nous avons observé la translocation d'une fraction mineure de BCR dans les radeaux lipidiques suite à son engagement (82). Compte tenu des changements spectaculaires qu'induit le rituximab au niveau des radeaux lipidiques, en particulier la coalescence de ces microdomaines et la génération de céramide, nous avons postulé que le rituximab pourrait interférer avec la translocation du BCR dans les radeaux lipidiques. En effet, le traitement des cellules de LF avec le rituximab empêche la translocation de l'Ig α dans les radeaux lipidiques. Le céramide, connu pour être généré par le rituximab, pourrait être à l'origine de l'effet inhibiteur du rituximab, mais, le traitement des cellules avec du céramide ne reproduit pas l'inhibition du signal BCR observée avec le rituximab (données supplémentaires non publiées). Ceci nous a amené à explorer le mécanisme par lequel le rituximab pourrait provoquer la perte de la translocation du BCR dans les radeaux lipidiques. L'équipe de SK. Pierce a montré que la translocation du BCR dans les radeaux lipidiques n'est pas sous la dépendance de la phosphorylation des Ig α /Ig β , ni du cytosquelette d'actine (80) même si ce dernier est impliqué dans la coalescence des radeaux lipidiques et affecte la force du signal BCR (344) (345). Ainsi, nous pouvons postuler que l'inhibition de la translocation du BCR dans les radeaux lipidiques, due au rituximab, pourrait provenir d'une modification de la structure des radeaux lipidiques. Ainsi, nous avons exploré l'effet du rituximab sur la composition des radeaux lipidiques et en particulier sur leur contenu en cholestérol. Les données de la littérature montrent que le cholestérol est impliqué dans la régulation de la localisation et du

trafic du BCR et affecte donc des fonctions essentielles du BCR comme le signal et la présentation de l'antigène (346, 347). Ainsi, nous avons montré que les fractions radeaux lipidiques des cellules traitées par le rituximab sont appauvries en cholestérol. La diminution drastique du cholestérol dans les radeaux lipidiques pourrait avoir des conséquences majeures sur le BCR et sur d'autres molécules membranaires dont l'activité dépend de ces domaines membranaires comme certains récepteurs à tyrosine kinase. La participation de ce phénomène à l'inhibition du signal BCR est étayée par le fait que la déplétion du cholestérol par la M β CD mime parfaitement l'effet du rituximab sur la signalisation du BCR. Néanmoins, le mécanisme par lequel le rituximab induit la diminution du cholestérol dans les radeaux lipidiques n'a pas été exploré dans notre étude. Ce phénomène peut être dû à une inhibition de la synthèse globale du cholestérol ou à un défaut de sa distribution cellulaire et membranaire. L'analyse présentée dans notre étude ne nous permet pas de conclure sur ce point puisque la quantification n'a pas été réalisée sur l'extrait cellulaire total mais sur des fractions définies comme étant radeaux lipidiques ou non radeaux lipidiques. Les fractions non radeaux lipidiques étant les fractions lourdes et non pas la totalité de l'extrait cellulaire séparée des fractions radeaux lipidiques. Ainsi, une étude plus approfondie est indispensable pour comprendre à quel niveau agit le rituximab pour affecter le taux de cholestérol dans les radeaux lipidiques et quelles sont les conséquences sur la plasticité membranaire et la fonction des radeaux lipidiques.

Outre la composition lipidique de la membrane, la translocation du BCR dans les radeaux lipidiques et la propagation du signal dépendent aussi du niveau d'expression du BCR à la surface. Le ciblage des événements proximaux par le rituximab, nous a amené à penser que le rituximab pourrait directement affecter la molécule du BCR. Nous avons donc évalué l'effet du rituximab sur le niveau d'expression du BCR. Une diminution de l'expression globale (membranaire et totale) du BCR est observée après traitement au rituximab. Cet effet semble être spécifique du BCR puisque le traitement n'affecte pas le niveau d'expression d'autres protéines telles que le CD19 ou le CD22 (données non publiées). Cette diminution de l'expression du BCR est visible dès 1h de traitement (données non publiées) et augmente avec le temps. L'effet rapide du rituximab sur le BCR plaide en défaveur d'une régulation transcriptionnelle du BCR par le rituximab. Néanmoins, cette hypothèse reste à exclure en effectuant des expériences de PCR quantitatives pour évaluer le niveau d'expression des ARNm de l'Ig mais aussi de l'Ig α et l'Ig β après traitement au rituximab.

Une autre explication possible de la diminution de l'expression est l'internalisation du BCR. Cependant, la diminution du taux global du BCR exclue la possibilité d'internalisation et de stockage du BCR dans le milieu intracytoplasmique. Néanmoins, il est possible que le rituximab induise l'internalisation du BCR suivie de sa dégradation rapide. Afin de répondre à cette question, il serait envisageable d'évaluer par microscopie la localisation des molécules de BCR rapidement après le traitement au rituximab.

Afin d'explorer les mécanismes de cette diminution d'expression, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le rituximab agirait sur le niveau du BCR en affectant sa dégradation. Nous avons alors montré que le traitement des cellules avec l'inhibiteur du protéasome, le MG132 empêche la diminution de l'expression du BCR, membranaire et global, induite par le rituximab. Ce résultat suggère que le rituximab favorise la dégradation du BCR d'une façon directe ou indirecte. L'évaluation de la dégradation du BCR après traitement au rituximab nous permettrait de confirmer cet effet. Pour cela, il faudrait inhiber la transcription et la traduction cellulaire et observer la vitesse de dégradation du BCR suite au traitement par le rituximab.

L'utilisation du MG132 permet non seulement une réexpression normale du BCR mais restaure également sa capacité à induire une signalisation normale illustrée par l'activation de P-Syk. Ce résultat montre que la diminution de l'expression du BCR est responsable de la diminution du signal induit par le rituximab. Il est important de noter que la diminution de l'expression du BCR est visible dès 1h de traitement alors que l'effet sur la signalisation est observé à partir de 3h. Ce décalage suggère que l'atteinte d'un seuil d'expression critique du BCR est nécessaire pour provoquer une inhibition de la signalisation.

Différentes étapes de contrôle qualité régissent le transport du BCR à travers l'appareil de golgi, le réticulum endoplasmique et les vésicules d'adressage avant son expression à la membrane. De ce fait, plusieurs hypothèses pourraient expliquer la diminution de l'expression du BCR par le rituximab. Ainsi, on peut imaginer que le rituximab puisse interférer avec l'activité des protéines qui contrôlent la qualité du BCR comme Bip ou la calnexine ou avec les $Ig\alpha/Ig\beta$ qui sont indispensables pour le bon assemblage et l'adressage du BCR. Le rituximab pourrait aussi affecter la régulation posttranscriptionnelle du BCR telle que la glycosylation ou l'ubiquitination qui conditionnent sa dégradation.

La réversion complète de l'effet du rituximab sur la signalisation du BCR à l'aide du MG132 pose la question de l'implication de la diminution du cholestérol dans l'inhibition du signal. En effet, l'exploration du lien possible entre ces deux phénomènes est essentielle afin de comprendre la chronologie des événements qui conduisent à cette inhibition du signal.

En résumé, nous avons montré pour la première fois un nouveau mécanisme d'action du rituximab qui consiste à inhiber le signal BCR à travers la perturbation de l'expression et de la dynamique membranaire du BCR. Les retombées de ce phénomène pourraient s'appliquer tant sur le plan des lymphopathies malignes que sur le plan des maladies auto-immunes. Concernant les lymphomes, le ciblage du BCR sensibiliserait les cellules tumorales à l'effet de la chimiothérapie. En effet, dans un contexte où le signal BCR confère un avantage de survie aux cellules lymphomateuses, son inhibition pourrait participer à la synergie entre le rituximab et la chimiothérapie. L'hyper-réactivité des LB caractérise les maladies auto-immunes, il est alors plausible de postuler que l'immunomodulation du BCR participe à l'effet thérapeutique du rituximab dans ces pathologies.

Dans la **deuxième partie** de ce travail, nous nous sommes intéressés au potentiel anti-tumoral de l'enzastaurine dans les LF. Le LF reste une maladie incurable dans la mesure où des résistances aux traitements apparaissent et les patients finissent inexorablement par rechuter. En effet, les cellules de LF sont caractérisées par une résistance accrue aux agents cytotoxiques, probablement due à la translocation t(14 ;18) induisant la surexpression de Bcl-2. Cependant, d'autres défauts moléculaires ont été rapportés, tous ayant comme point commun l'appartenance à la signalisation du BCR. Ainsi, l'équipe de R. Levy a démontré l'existence d'un signal plus activable et plus durable dans les cellules de LF comparativement aux lymphocytes B normaux. A ce sujet, notre équipe a démontré une surexpression de la tyrosine kinase Syk, une suractivation de la PKC ζ et de la voie mTOR dans les lignées de LF ainsi que dans les cellules issues de patients atteints de LF (162, 254). D'autres études ont démontré la suractivation d'Akt ainsi que la surexpression de la PKC β dans les LF (323) (305, 324). L'ensemble de ces altérations pourrait être responsable de la difficulté à induire une cytotoxicité cellulaire et pourrait rendre compte des phénomènes de résistance observés chez ces patients. Ainsi, le ciblage de ces voies de survie paraît donc une piste non négligeable pour améliorer le traitement de cette maladie. Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet de l'enzastaurine, inhibiteur des PKC et de la voie Akt, sur les cellules de LF.

Nous avons pu démontrer une cytotoxicité significative de cet agent envers les lignées de LF. Les doses utilisées dans notre étude sont similaires à celle utilisées dans d'autres études et présentent une pertinence clinique puisqu'elles sont incluses dans la fourchette de concentrations retrouvées dans le sérum de patients traités par enzastaurine dans le cadre d'essais cliniques (1,4 – 8 μ M, données de phase I fournies par le laboratoire Eli-Lilly).

Dans les cellules de LF, nous avons pu mettre en évidence que l'enzastaurine induit l'inhibition de la voie Pi3K/Akt de façon tardive (24-48h). Ces résultats étaient inattendus dans la mesure où la plupart des études publiées montrent une inhibition très rapide de cette voie. Ces études ont également montré ou suggéré que l'inhibition d'Akt était à l'origine de la déphosphorylation de GSK3 β et de l'inhibition de p70S6kinase suggérant que, Akt est à l'origine des événements moléculaires et cytotoxiques induits par l'enzastaurine. Dans notre étude, nous observons une diminution très rapide de la phosphorylation de GSK3 β en sérine 9 (3h) ce qui suggère que Akt n'est probablement pas le seul responsable de l'effet moléculaire et cytotoxique de l'enzastaurine.

Ainsi, afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'enzastaurine dans les LF, nous avons recherché des protéines connues pour jouer un rôle important dans la survie et la prolifération des LF. Nous avons montré que l'enzastaurine cible de façon très rapide (3h de traitement) la voie de la sérine/thréonine kinase mTOR, protéine suractivée dans les LF (254).

L'inhibition de la voie mTOR, induite par l'enzastaurine, indépendamment de la voie PI3K/Akt, nous a amené à rechercher un acteur intermédiaire qui pourrait expliquer cette inhibition. p90RSK est une sérine/thréonine kinase qui contient deux domaines kinases activables par ERK sous l'effet de divers facteurs de croissance. Etant donné que p90RSK régule à la fois la phosphorylation de GSK3 β et l'activité de mTOR, nous avons postulé que cette kinase pourrait être à l'origine de leur modulation sous l'effet de l'enzastaurine. Notre hypothèse a été confirmée par l'observation de l'inhibition de p90RSK après 3h de traitement à l'enzastaurine.

Concernant le mécanisme d'inhibition de p90RSK par l'enzastaurine, plusieurs hypothèses sont envisageables :

* L'inhibition de p90RSK pourrait tout simplement provenir de l'inhibition des PKC. En effet, différentes études montrent que les PKC régulent directement la phosphorylation de p90RSK (340) (341) (342).

* L'enzastaurine pourrait inhiber ERK, à travers l'inhibition des PKC, ce qui résulte en une inhibition de p90RSK. En effet, cette hypothèse est attractive étant donné que les cellules de LF représentent une suractivation de la voie ERK/PKC ζ /mTOR (165, 254).

* La PDK1 (3-Phosphoinositide-dependent kinase 1) est aussi connue pour participer à l'activation de p90RSK (339). Cependant, l'activité de cette kinase est sous la dépendance de la PI3K et se reflète par l'inhibition de la phosphorylation T308 d'Akt. Or, ces deux événements sont observés de façon tardive suite au traitement par l'enzastaurine et de fait l'inhibition de p90RSK ne pourrait pas provenir d'un ciblage de la PDK1 par l'enzastaurine.

* Bien que jamais rapportée auparavant, nous ne pouvons pas exclure une inhibition directe de p90RSK par l'enzastaurine. En effet, Roberts NA et al. ont décrit une inhibition directe de p90RSK par deux autres inhibiteurs de PKC (348).

* Enfin, la diminution de la phosphorylation de p90RSK pourrait provenir de l'activation de sérine/thréonine phosphatase comme PP2C γ , connue pour réguler p90RSK (349). L'activation de la phosphatase PP2A pourrait aussi être à l'origine de l'inhibition de p90RSK à travers l'inactivation par déphosphorylation de Raf-1 (350).

Nos données préliminaires indiquent que l'enzastaurine inhibe ERK après 3h de traitement. Ainsi, si ces résultats sont confirmés, il semblerait que l'enzastaurine inhibe le module ERK-p90RSK. Afin de valider cette hypothèse il serait intéressant d'évaluer l'effet de la surexpression d'une forme constitutivement active de ERK sur l'inhibition de p90RSK induite par l'enzastaurine.

En aval de p90RSK, nous avons pu observer de façon préliminaire que l'enzastaurine était capable d'inhiber la phosphorylation inhibitrice S1798 de TSC2 dépendante de p90RSK. TSC2 ainsi activée par l'enzastaurine pourrait inhiber mTOR.

Nous avons confirmé que p90RSK est capable de réguler GSK3 β et mTOR dans les cellules de LF grâce à l'utilisation de siRNA dirigés contre p90RSK. Néanmoins, pour connaître la part de responsabilité de p90RSK dans l'induction de l'effet de l'enzastaurine, il

serait nécessaire de surexprimer p90RSK dans les cellules de LF et d'évaluer la résistance éventuelle des cellules aux effets moléculaires et biologiques de l'enzastaurine.

L'implication de p90RSK a également atteint les mécanismes d'activation de l'apoptose puisque le traitement à l'enzastaurine induit une diminution de la phosphorylation inhibitrice de Bad dépendante de p90RSK. La phosphorylation sur Ser112 pourrait être suffisante pour activer l'apoptose puisque l'expression dans des cellules FDCP1 d'un mutant non phosphorylable de Bad (Ser112A) provoque rapidement l'apoptose des cellules déprivées en sérum (351). L'activation de Bad prend toute son importance dans notre modèle cellulaire où la surexpression de Bcl-2 confère une résistance à l'induction de l'apoptose. En effet, l'enzastaurine n'affecte pas le niveau d'expression de Bcl-2, ni son niveau de phosphorylation sur le site ser70 (données supplémentaires), mais l'activation de Bad est connue pour induire sa liaison avec Bcl_{-XL} ou Bcl-2 qui se retrouvent séparés et donc incapables d'inhiber l'apoptose au niveau de la membrane mitochondriale. Bad permettrait ainsi la régulation indirecte de Bcl-2 dans les cellules de LF. Il serait donc primordial de vérifier la présence de ces événements en évaluant la liaison de Bad avec les protéines anti-apoptotiques ainsi que la localisation cellulaire de ces complexes après traitement à l'enzastaurine. Bien que la phosphorylation du site Ser112 de Bad soit essentiellement dûe à p90RSK, d'autres protéines semblent intervenir sur ce site comme les Pim kinases, p70S6kinase ou encore les phosphatases comme la calcineurine (339, 351). L'implication de ces effecteurs dans la régulation de la phosphorylation de Bad n'a pas été explorée dans notre travail.

Enfin, nos résultats convergent vers l'attribution d'un rôle important de p90RSK dans l'effet moléculaire médié par l'enzastaurine, d'une part, à travers l'inhibition de la voie de prolifération et de survie mTOR et d'autre part, à travers l'activation de la voie pro-apoptotique Bad. Cependant, les effets biologiques de ce médicament semblent provenir d'une coopération de plusieurs signaux, puisque la diminution de l'expression de p90RSK à l'aide de siRNA n'induit qu'une inhibition de la prolifération et une induction d'apoptose partielles comparativement à l'effet de l'enzastaurine.

Bien que la diminution de la phosphorylation inhibitrice de GSK3 β soit considérée comme marqueur de l'activité biologique de l'enzastaurine, aucune étude n'a exploré les conséquences biologiques d'une telle activation. Ce manque de données est probablement dû à la complexité de la régulation de GSK3 β qui peut être impliquée dans la survie comme dans

la mort cellulaire. En effet, l'état de phosphorylation de GSK3 β ne suffit pas à déterminer son activité. La localisation sub-cellulaire ainsi que les interactions avec d'autres facteurs influencent fortement sa fonction. L'utilisation de mutant non déphosphorylable sur la Ser9 permettrait d'évaluer la part de responsabilité de cette phosphorylation dans l'effet anti-tumoral de l'enzastaurine. Ainsi, une étude détaillée sur la localisation de GSK3 β et ses partenaires protéiques est nécessaire pour comprendre le rôle exact que joue GSK3 β dans les cellules traitées à l'enzastaurine.

Cependant, beaucoup de zones d'ombres restent à éclaircir concernant la contribution respective de chaque cible (p90RSK, mTOR, GSK3 β , Bad, Akt...) à l'effet biologique de l'enzastaurine. L'approfondissement de cette étude nous permettra de mieux comprendre l'action anti-tumorale de l'enzastaurine et ainsi d'envisager son utilisation dans le traitement des LF. Cette application est d'autant plus plausible qu'une étude clinique de phase II en cours, montre des résultats très encourageants quant au traitement du LF par l'enzastaurine (321)

Cette étude fournit ainsi des preuves d'une activité antitumorale de l'enzastaurine dans les LF et nous amène à postuler que l'enzastaurine pourrait agir comme agent cytotoxique tout seul mais aussi en combinaison avec d'autres traitements. En effet, on peut imaginer que l'affaiblissement du signal pro-prolifératif ne peut qu'optimiser la cytotoxicité induite par la chimiothérapie ou par le rituximab. En accord avec cette étude, d'autres travaux de notre équipe, auxquels j'ai participé pendant ma thèse, montrent un effet cytotoxique de l'enzastaurine dans les cellules issues de patients atteints de LLC. Cette cytotoxicité semble être médiée par l'activation de la phosphatase PP2A. De façon intéressante, le traitement à l'enzastaurine sensibilise les cellules de LLC à l'effet du rituximab mais aussi à celui de la fludarabine (annexe article 1). Ces résultats montrent bien que l'enzastaurine est un agent pharmacologique capable d'optimiser l'effet anti-tumoral des agents pharmacologiques classiquement utilisés dans le traitement des lymphopathies B.

Au total, le ciblage de la signalisation du BCR pourrait représenter une part non négligeable de la réponse anti-tumorale étant donné l'importance que constitue ce signal dans la survie des cellules tumorales. Ceci est étayé par une étude très récente de l'équipe de R. Levy qui démontre l'existence, au sein des cellules de lymphome folliculaire, d'une population tumorale non répondeuse à la stimulation du BCR. La proportion de cette population corrèle avec une mauvaise réponse aux traitements (352). Ceci suggère que la

possibilité d'inhibition de la signalisation du BCR dans les cellules de LF constitue un avantage pronostic considérable. De plus, ce nouveau mécanisme d'action du rituximab apporte non seulement une nouvelle vision quand au ciblage pharmacologique des voies proto-oncogéniques dans les lymphomes mais participe aussi à une meilleure compréhension des mécanismes de résistance. En effet, toute activation constitutive de l'une des composantes de la signalisation du BCR est susceptible de conférer une résistance au traitement par le rituximab.

Les mécanismes de résistance constituent aussi un obstacle aux traitements à base d'inhibiteurs de protéines kinases comme l'enzastaurine. La connaissance des modes d'action de ce médicament nous fournit une possibilité d'appréhender les mécanismes de résistance susceptibles de compromettre les bénéfices thérapeutiques de cette molécule.

Outre les retombés dans le domaine des hémopathies malignes, ces travaux offrent des perspectives d'applications thérapeutiques dans le domaine des maladies auto-immunes. La diminution de l'expression du BCR suite au traitement par le rituximab constitue une nouvelle possibilité d'immunomodulation des lymphocytes B auto-réactifs. De plus, l'inhibition du signal BCR observée même en utilisant la fraction Fab'2 du rituximab constituerait une nouvelle méthode immunosuppressive sans pour autant induire la déplétion des lymphocytes B médiée par la fraction Fc de l'anticorps.

En conclusion, ce travail de thèse fournit des données expérimentales qui contribuent à la compréhension des mécanismes d'action du rituximab et de l'enzastaurine, à l'appréhension des phénomènes de résistance et met en avant l'importance de la signalisation du BCR dans la thérapie des pathologies du lymphocyte B.

Références bibliographiques

1. Revillard JP. immunologie. 4e édition ed: DeBoeck.
2. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in immunology* 2003;24(6):343-9.
3. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, *et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005;121(2):295-306.
4. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91(5):661-72.
5. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302(5909):575-81.
6. Schlissel MS. Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nature reviews* 2003;3(11):890-9.
7. Diaz M, Daly J. Immunology: B cells break the rules. *Nature* 2009;460(7252):184-6.
8. Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nature reviews* 2009;9(3):195-205.
9. Vettermann C, Jack HM. The pre-B cell receptor: turning autoreactivity into self-defense. *Trends in immunology* 2010;31(5):176-83.
10. Parker MJ, Licence S, Erlandsson L, *et al.* The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription. *The EMBO journal* 2005;24(22):3895-905.
11. Rolink A, Karasuyama H, Grawunder U, Haasner D, Kudo A, Melchers F. B cell development in mice with a defective lambda 5 gene. *European journal of immunology* 1993;23(6):1284-8.
12. Geier JK, Schlissel MS. Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements. *Seminars in immunology* 2006;18(1):31-9.
13. Cedar H, Bergman Y. Choreography of Ig allelic exclusion. *Current opinion in immunology* 2008;20(3):308-17.
14. Coleclough C, Perry RP, Karjalainen K, Weigert M. Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. *Nature* 1981;290(5805):372-8.
15. Liang HE, Hsu LY, Cado D, Cowell LG, Kelsoe G, Schlissel MS. The "dispensable" portion of RAG2 is necessary for efficient V-to-DJ rearrangement during B and T cell development. *Immunity* 2002;17(5):639-51.
16. Mostoslavsky R, Singh N, Tenzen T, *et al.* Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature* 2001;414(6860):221-5.
17. Wen R, Chen Y, Schuman J, *et al.* An important role of phospholipase Cgamma1 in pre-B-cell development and allelic exclusion. *The EMBO journal* 2004;23(20):4007-17.
18. Schweighoffer E, Vanes L, Mathiot A, Nakamura T, Tybulewicz VL. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity* 2003;18(4):523-33.
19. Rolink AG, Winkler T, Melchers F, Andersson J. Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *The Journal of experimental medicine* 2000;191(1):23-32.
20. Ohnishi K, Melchers F. The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nature immunology* 2003;4(9):849-56.

21. Gauthier L, Rossi B, Roux F, Termine E, Schiff C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(20):13014-9.
22. Bradl H, Wittmann J, Milius D, Vettermann C, Jack HM. Interaction of murine precursor B cell receptor with stroma cells is controlled by the unique tail of lambda 5 and stroma cell-associated heparan sulfate. *J Immunol* 2003;171(5):2338-48.
23. Guo B, Kato RM, Garcia-Lloret M, Wahl MI, Rawlings DJ. Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity* 2000;13(2):243-53.
24. Rolli V, Gallwitz M, Wossning T, *et al.* Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Molecular cell* 2002;10(5):1057-69.
25. Nagaoka H, Takahashi Y, Hayashi R, *et al.* Ras mediates effector pathways responsible for pre-B cell survival, which is essential for the developmental progression to the late pre-B cell stage. *The Journal of experimental medicine* 2000;192(2):171-82.
26. Kurosaki T. Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nature reviews* 2002;2(5):354-63.
27. Jumaa H, Bossaller L, Portugal K, *et al.* Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2003;423(6938):452-6.
28. Kersseboom R, Middendorp S, Dingjan GM, *et al.* Bruton's tyrosine kinase cooperates with the B cell linker protein SLP-65 as a tumor suppressor in Pre-B cells. *The Journal of experimental medicine* 2003;198(1):91-8.
29. Hendriks RW, Middendorp S. The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *Trends in immunology* 2004;25(5):249-56.
30. Thompson EC, Cobb BS, Sabbattini P, *et al.* Ikaros DNA-binding proteins as integral components of B cell developmental-stage-specific regulatory circuits. *Immunity* 2007;26(3):335-44.
31. Schlissel MS. Regulation of activation and recombination of the murine Igkappa locus. *Immunological reviews* 2004;200:215-23.
32. Johnson K, Hashimshony T, Sawai CM, *et al.* Regulation of immunoglobulin light-chain recombination by the transcription factor IRF-4 and the attenuation of interleukin-7 signaling. *Immunity* 2008;28(3):335-45.
33. Meffre E, Davis E, Schiff C, *et al.* Circulating human B cells that express surrogate light chains and edited receptors. *Nature immunology* 2000;1(3):207-13.
34. Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B cell signaling and fate decision. *Annual review of immunology* 2010;28:21-55.
35. Nemazee D. Does immunological tolerance explain the waste in the B-lymphocyte immune system? Experiment and theory. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995;764:397-401.
36. Niuro H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature reviews* 2002;2(12):945-56.
37. Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, *et al.* CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 1995;376(6536):181-4.
38. von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nature immunology* 2010;11(1):14-20.
39. Carsetti R, Kohler G, Lamers MC. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *The Journal of experimental medicine* 1995;181(6):2129-40.

40. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, *et al.* B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *The Journal of experimental medicine* 1999;190(1):75-89.
41. Chung JB, Sater RA, Fields ML, Erikson J, Monroe JG. CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. *International immunology* 2002;14(2):157-66.
42. Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, Rudd K, Shinton SA, Hardy RR. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* 2001;167(12):6834-40.
43. Merrell KT, Benschop RJ, Gauld SB, *et al.* Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* 2006;25(6):953-62.
44. Su TT, Rawlings DJ. Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J Immunol* 2002;168(5):2101-10.
45. Cariappa A, Pillai S. Antigen-dependent B-cell development. *Current opinion in immunology* 2002;14(2):241-9.
46. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, *et al.* An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science (New York, NY)* 2001;293(5537):2111-4.
47. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nature immunology* 2002;3(10):958-65.
48. Chan VW, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* 1997;7(1):69-81.
49. Turner M, Gulbranson-Judge A, Quinn ME, Walters AE, MacLennan IC, Tybulewicz VL. Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *The Journal of experimental medicine* 1997;186(12):2013-21.
50. Grossmann M, O'Reilly LA, Gugasyan R, Strasser A, Adams JM, Gerondakis S. The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *The EMBO journal* 2000;19(23):6351-60.
51. Pani G, Siminovitch KA, Paige CJ. The motheaten mutation rescues B cell signaling and development in CD45-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 1997;186(4):581-8.
52. Pappu R, Cheng AM, Li B, *et al.* Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. *Science (New York, NY)* 1999;286(5446):1949-54.
53. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature reviews* 2009;9(11):767-77.
54. Samardzic T, Marinkovic D, Danzer CP, Gerlach J, Nitschke L, Wirth T. Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice. *European journal of immunology* 2002;32(2):561-7.
55. Cariappa A, Tang M, Parg C, *et al.* The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 2001;14(5):603-15.
56. Hardy RR, Hayakawa K, Parks DR, Herzenberg LA. Demonstration of B-cell maturation in X-linked immunodeficient mice by simultaneous three-colour immunofluorescence. *Nature* 1983;306(5940):270-2.
57. Hikida M, Johmura S, Hashimoto A, Takezaki M, Kurosaki T. Coupling between B cell receptor and phospholipase C-gamma2 is essential for mature B cell development. *The Journal of experimental medicine* 2003;198(4):581-9.

58. Klaus GG, Humphrey JH, Kunkl A, Dongworth DW. The follicular dendritic cell: its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunological reviews* 1980;53:3-28.
59. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature reviews* 2009;9(1):15-27.
60. MacLennan IC. Germinal centers. *Annual review of immunology* 1994;12:117-39.
61. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature reviews* 2008;8(1):22-33.
62. Bross L, Fukita Y, McBlane F, Demolliere C, Rajewsky K, Jacobs H. DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity* 2000;13(5):589-97.
63. Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science (New York, NY)* 1998;280(5370):1750-2.
64. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000;102(5):553-63.
65. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature immunology* 2007;8(5):463-70.
66. Angelin-Duclos C, Cattoretti G, Lin KI, Calame K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol* 2000;165(10):5462-71.
67. Scheeren FA, Naspetti M, Diehl S, *et al.* STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nature immunology* 2005;6(3):303-13.
68. Arpin C, Dechanet J, Van Kooten C, *et al.* Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science (New York, NY)* 1995;268(5211):720-2.
69. Foy SP, Matsuuchi L. Association of B lymphocyte antigen receptor polypeptides with multiple chaperone proteins. *Immunol Lett* 2001;78(3):149-60.
70. Ho SC, Chaudhuri S, Bachhawat A, McDonald K, Pillai S. Accelerated proteasomal degradation of membrane Ig heavy chains. *J Immunol* 2000;164(9):4713-9.
71. Condon C, Hourihane SL, Dang-Lawson M, Escribano J, Matsuuchi L. Aberrant trafficking of the B cell receptor Ig-alpha beta subunit in a B lymphoma cell line. *J Immunol* 2000;165(3):1427-37.
72. Batista FD, Iber D, Neuberger MS. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 2001;411(6836):489-94.
73. Depoil D, Fleire S, Treanor BL, *et al.* CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nature immunology* 2008;9(1):63-72.
74. Fleire SJ, Goldman JP, Carrasco YR, Weber M, Bray D, Batista FD. B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science (New York, NY)* 2006;312(5774):738-41.
75. Harwood NE, Batista FD. New insights into the early molecular events underlying B cell activation. *Immunity* 2008;28(5):609-19.
76. Carrasco YR, Fleire SJ, Cameron T, Dustin ML, Batista FD. LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity* 2004;20(5):589-99.
77. Weber M, Treanor B, Depoil D, *et al.* Phospholipase C-gamma2 and Vav cooperate within signaling microclusters to propagate B cell spreading in response to membrane-bound antigen. *The Journal of experimental medicine* 2008;205(4):853-68.

78. Tolar P, Hanna J, Krueger PD, Pierce SK. The constant region of the membrane immunoglobulin mediates B cell-receptor clustering and signaling in response to membrane antigens. *Immunity* 2009;30(1):44-55.
79. Treanor B, Depoil D, Gonzalez-Granja A, *et al.* The membrane skeleton controls diffusion dynamics and signaling through the B cell receptor. *Immunity* 2010;32(2):187-99.
80. Cheng PC, Brown BK, Song W, Pierce SK. Translocation of the B cell antigen receptor into lipid rafts reveals a novel step in signaling. *J Immunol* 2001;166(6):3693-701.
81. Sohn HW, Tolar P, Pierce SK. Membrane heterogeneities in the formation of B cell receptor-Lyn kinase microclusters and the immune synapse. *J Cell Biol* 2008;182(2):367-79.
82. Cheng PC, Dykstra ML, Mitchell RN, Pierce SK. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *The Journal of experimental medicine* 1999;190(11):1549-60.
83. Sohn HW, Pierce SK, Tzeng SJ. Live cell imaging reveals that the inhibitory FcγRIIB destabilizes B cell receptor membrane-lipid interactions and blocks immune synapse formation. *J Immunol* 2008;180(2):793-9.
84. Pierce SK. Lipid rafts and B-cell activation. *Nature reviews* 2002;2(2):96-105.
85. Tolar P, Sohn HW, Liu W, Pierce SK. The molecular assembly and organization of signaling active B-cell receptor oligomers. *Immunol Rev* 2009;232(1):34-41.
86. Kurosaki T, Hikida M. Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol Rev* 2009;228(1):132-48.
87. Tamir I, Cambier JC. Antigen receptor signaling: integration of protein tyrosine kinase functions. *Oncogene* 1998;17(11 Reviews):1353-64.
88. Takata M, Sabe H, Hata A, *et al.* Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *Embo J* 1994;13(6):1341-9.
89. Mocsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nature reviews* 2010;10(6):387-402.
90. Kurosaki T, Takata M, Yamanashi Y, *et al.* Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *The Journal of experimental medicine* 1994;179(5):1725-9.
91. Hutchcroft JE, Harrison ML, Geahlen RL. Association of the 72-kDa protein-tyrosine kinase PTK72 with the B cell antigen receptor. *The Journal of biological chemistry* 1992;267(12):8613-9.
92. <http://web.rcai.riken.jp/en/labo/lympho/research.html>.
93. Kurosaki T, Maeda A, Ishiai M, Hashimoto A, Inabe K, Takata M. Regulation of the phospholipase C-γ2 pathway in B cells. *Immunol Rev* 2000;176:19-29.
94. Yasuda T, Maeda A, Kurosaki M, *et al.* Cbl suppresses B cell receptor-mediated phospholipase C (PLC)-γ2 activation by regulating B cell linker protein-PLC-γ2 binding. *The Journal of experimental medicine* 2000;191(4):641-50.
95. <http://www.cellsignal.com/pathways/lymphocyte.jsp>.
96. Fearon DT, Carroll MC. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol* 2000;18:393-422.
97. Cherukuri A, Shoham T, Sohn HW, *et al.* The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol* 2004;172(1):370-80.
98. Huntington ND, Xu Y, Puthalakath H, *et al.* CD45 links the B cell receptor with cell survival and is required for the persistence of germinal centers. *Nature immunology* 2006;7(2):190-8.
99. Katagiri T, Ogimoto M, Hasegawa K, *et al.* CD45 negatively regulates lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells. *J Immunol* 1999;163(3):1321-6.

100. Cornall RJ, Cyster JG, Hibbs ML, *et al.* Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection. *Immunity* 1998;8(4):497-508.
101. Xu Y, Harder KW, Huntington ND, Hibbs ML, Tarlinton DM. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 2005;22(1):9-18.
102. Reth M, Brummer T. Feedback regulation of lymphocyte signalling. *Nature reviews* 2004;4(4):269-77.
103. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nature immunology* 2002;3(12):1129-34.
104. Maeda A, Scharenberg AM, Tsukada S, Bolen JB, Kinet JP, Kurosaki T. Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1. *Oncogene* 1999;18(14):2291-7.
105. Niu H, Ye BH, Dalla-Favera R. Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes Dev* 1998;12(13):1953-61.
106. Wakabayashi C, Adachi T, Wienands J, Tsubata T. A distinct signaling pathway used by the IgG-containing B cell antigen receptor. *Science (New York, NY)* 2002;298(5602):2392-5.
107. Engels N, König LM, Heemann C, *et al.* Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nature immunology* 2009;10(9):1018-25.
108. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993;11:331-60.
109. Clark MR, Massenbarg D, Zhang M, Siemasko K. Molecular mechanisms of B cell antigen receptor trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 2003;987:26-37.
110. Gazumyan A, Reichlin A, Nussenzweig MC. Ig beta tyrosine residues contribute to the control of B cell receptor signaling by regulating receptor internalization. *The Journal of experimental medicine* 2006;203(7):1785-94.
111. Cherukuri A, Dykstra M, Pierce SK. Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity* 2001;14(6):657-60.
112. Brown BK, Song W. The actin cytoskeleton is required for the trafficking of the B cell antigen receptor to the late endosomes. *Traffic* 2001;2(6):414-27.
113. Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol*;28:21-55.
114. Monroe JG. Ligand-independent tonic signaling in B-cell receptor function. *Curr Opin Immunol* 2004;16(3):288-95.
115. Wienands J, Larbolette O, Reth M. Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(15):7865-70.
116. Sayegh CE, Demaries SL, Iacampo S, Ratcliffe MJ. Development of B cells expressing surface immunoglobulin molecules that lack V(D)J-encoded determinants in the avian embryo bursa of fabricius. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(19):10806-11.
117. Muljo SA, Schlissel MS. The variable, C(H)1, C(H)2 and C(H)3 domains of Ig heavy chain are dispensable for pre-BCR function in transgenic mice. *Int Immunol* 2002;14(6):577-84.
118. Bannish G, Fuentes-Panana EM, Cambier JC, Pear WS, Monroe JG. Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 2001;194(11):1583-96.

119. Mielenz D, Ruschel A, Vettermann C, Jack HM. Immunoglobulin mu heavy chains do not mediate tyrosine phosphorylation of Ig alpha from the ER-cis-Golgi. *J Immunol* 2003;171(6):3091-101.
120. Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 2004;117(6):787-800.
121. Meffre E, Nussenzweig MC. Deletion of immunoglobulin beta in developing B cells leads to cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(17):11334-9.
122. Meixlsperger S, Kohler F, Wossning T, Reppel M, Muschen M, Jumaa H. Conventional light chains inhibit the autonomous signaling capacity of the B cell receptor. *Immunity* 2007;26(3):323-33.
123. Stadanlick JE, Kaileh M, Karnell FG, *et al.* Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BLyS signaling. *Nature immunology* 2008;9(12):1379-87.
124. Monroe JG. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nature reviews* 2006;6(4):283-94.
125. Tolar P, Sohn HW, Pierce SK. The initiation of antigen-induced B cell antigen receptor signaling viewed in living cells by fluorescence resonance energy transfer. *Nature immunology* 2005;6(11):1168-76.
126. Schamel WW, Reth M. Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* 2000;13(1):5-14.
127. Sasaki Y, Kurosaki T. Immobile BCRs: the safety on the signal trigger. *Immunity* 2010;32(2):143-4.
128. Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B. B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol* 2005;174(4):1775-81.
129. Pugh-Bernard AE, Cambier JC. B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18(5):451-5.
130. Jenks SA, Sanz I. Altered B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2009;8(3):209-13.
131. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R, *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2008;58(11):3309-18.
132. Zheng B, Zhang X, Guo L, Han S. IgM plays an important role in induction of collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol* 2007;149(3):579-85.
133. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005;5(4):251-62.
134. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, *et al.* Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005;105(12):4820-7.
135. Irish JM, Czerwinski DK, Nolan GP, Levy R. Altered B-cell receptor signaling kinetics distinguish human follicular lymphoma B cells from tumor-infiltrating nonmalignant B cells. *Blood* 2006;108(9):3135-42.
136. Radcliffe CM, Arnold JN, Suter DM, *et al.* Human follicular lymphoma cells contain oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B-cell receptor. *The Journal of biological chemistry* 2007;282(10):7405-15.
137. Cozma D, Yu D, Hodawadekar S, *et al.* B cell activator PAX5 promotes lymphomagenesis through stimulation of B cell receptor signaling. *J Clin Invest* 2007;117(9):2602-10.

138. Chen L, Monti S, Juszczynski P, *et al.* SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2008;111(4):2230-7.
139. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, *et al.* Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010;463(7277):88-92.
140. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, *et al.* The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *International journal of cancer* 2007;120 Suppl 12:1-39.
141. Michallet AS, Coiffier B. Recent developments in the treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood Rev* 2009;23(1):11-23.
142. Bastion Y, Sebban C, Berger F, *et al.* Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997;15(4):1587-94.
143. Solal-Celigny P. Prognosis of follicular lymphomas. *Clin Lymphoma* 2005;6(1):21-5.
144. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, *et al.* Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104(5):1258-65.
145. Bernstein SH, Burack WR. The incidence, natural history, biology, and treatment of transformed lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:532-41.
146. Stevenson F, Sahota S, Zhu D, *et al.* Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev* 1998;162:247-59.
147. Kupperts R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999;341(20):1520-9.
148. Aarts WM, Bende RJ, Steenbergen EJ, *et al.* Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. *Blood* 2000;95(9):2922-9.
149. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science (New York, NY)* 1985;228(4706):1440-3.
150. Viardot A, Barth TF, Moller P, Dohner H, Bentz M. Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. *Seminars in cancer biology* 2003;13(3):183-90.
151. Bakhshi A, Wright JJ, Graninger W, *et al.* Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84(8):2396-400.
152. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, *et al.* Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood* 1999;93(9):3081-7.
153. Raghavan SC, Swanson PC, Wu X, Hsieh CL, Lieber MR. A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature* 2004;428(6978):88-93.
154. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991;349(6306):254-6.
155. Jardin F, Gaulard P, Buchonnet G, *et al.* Follicular lymphoma without t(14;18) and with BCL-6 rearrangement: a lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics. *Leukemia* 2002;16(11):2309-17.
156. Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, *et al.* Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 1991;6(12):2271-6.
157. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Heutte N, Nadel B, Gauduchon P. Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia* 2006;20(1):158-62.
158. Roulland S, Navarro JM, Grenot P, *et al.* Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *The Journal of experimental medicine* 2006;203(11):2425-31.
159. Staudt LM. A closer look at follicular lymphoma. *N Engl J Med* 2007;356(7):741-2.

160. Giannelli F, Moscarella S, Giannini C, *et al.* Effect of antiviral treatment in patients with chronic HCV infection and t(14;18) translocation. *Blood* 2003;102(4):1196-201.
161. Zhu D, McCarthy H, Ottensmeier CH, Johnson P, Hamblin TJ, Stevenson FK. Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood* 2002;99(7):2562-8.
162. Leseux L, Hamdi SM, Al Saati T, *et al.* Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. *Blood* 2006;108(13):4156-62.
163. Chim CS, Wong KY, Loong F, Srivastava G. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Leukemia* 2004;18(2):356-8.
164. Kupperts R. Prognosis in follicular lymphoma--it's in the microenvironment. *N Engl J Med* 2004;351(21):2152-3.
165. Calvo KR, Dabir B, Kovach A, *et al.* IL-4 protein expression and basal activation of Erk in vivo in follicular lymphoma. *Blood* 2008;112(9):3818-26.
166. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 2007;21(1):18-29.
167. Ame-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, *et al.* Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* 2007;109(2):693-702.
168. Reiser M, Diehl V. Current treatment of follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer* 2002;38(9):1167-72.
169. Advani R, Rosenberg SA, Horning SJ. Stage I and II follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of no initial therapy. *J Clin Oncol* 2004;22(8):1454-9.
170. Hauke RJ, Armitage JO. A new approach to non-Hodgkin's lymphoma. *Intern Med* 2000;39(3):197-208.
171. Coiffier B, Neidhardt-Berard EM, Tilly H, *et al.* Fludarabine alone compared to CHVP plus interferon in elderly patients with follicular lymphoma and adverse prognostic parameters: a GELA study. Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Ann Oncol* 1999;10(10):1191-7.
172. Hauke RJ, Armitage JO. Treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2000;12(5):412-8.
173. Czuczman MS. CHOP plus rituximab chemoimmunotherapy of indolent B-cell lymphoma. *Semin Oncol* 1999;26(5 Suppl 14):88-96.
174. Hiddemann W, Buske C, Dreyling M, *et al.* Treatment strategies in follicular lymphomas: current status and future perspectives. *J Clin Oncol* 2005;23(26):6394-9.
175. Bendandi M. Idiotype vaccines for lymphoma: proof-of-principles and clinical trial failures. *Nat Rev Cancer* 2009;9(9):675-81.
176. Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, *et al.* Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2003;21(16):3051-9.
177. Morschhauser F, Kraeber-Bodere F, Wegener WA, *et al.* High rates of durable responses with anti-CD22 fractionated radioimmunotherapy: results of a multicenter, phase I/II study in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2010;28(23):3709-16.
178. Barski G, Sorieul S, Cornefert F. [Production of cells of a "hybrid" nature in cultures in vitro of 2 cellular strains in combination.]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* 1960;251:1825-7.
179. Littlefield JW. Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in Vitro and Their Presumed Recombinants. *Science (New York, NY)* 1964;145:709-10.
180. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(5517):495-7.

181. de StGroth SF, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *Journal of immunological methods* 1980;35(1-2):1-21.
182. Siberil S, Dutertre CA, Boix C, Teillaud JL. [Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes]. *Transfus Clin Biol* 2005;12(2):114-22.
183. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984;81(21):6851-5.
184. Co MS, Queen C. Humanized antibodies for therapy. *Nature* 1991;351(6326):501-2.
185. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature reviews* 2001;1(2):118-29.
186. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, *et al.* Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998;16(8):2825-33.
187. Coiffier B. Monoclonal antibody as therapy for malignant lymphomas. *Comptes rendus biologies* 2006;329(4):241-54.
188. Cheung MC, Haynes AE, Meyer RM, Stevens A, Imrie KR. Rituximab in lymphoma: a systematic review and consensus practice guideline from Cancer Care Ontario. *Cancer treatment reviews* 2007;33(2):161-76.
189. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, *et al.* 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* 2005;23(18):4117-26.
190. Newman R, Alberts J, Anderson D, *et al.* "Primatization" of recombinant antibodies for immunotherapy of human diseases: a macaque/human chimeric antibody against human CD4. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 1992;10(11):1455-60.
191. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7359-68.
192. Tedder TF, Schlossman SF. Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 1988;263(20):10009-15.
193. Valentine MA, Meier KE, Rossie S, Clark EA. Phosphorylation of the CD20 phosphoprotein in resting B lymphocytes. Regulation by protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 1989;264(19):11282-7.
194. Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *The EMBO journal* 1988;7(3):711-7.
195. Manshouri T, Do KA, Wang X, *et al.* Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood* 2003;101(7):2507-13.
196. www.cd20loops.com.
197. Polyak MJ, Deans JP. Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood* 2002;99(9):3256-62.
198. Press OW, Appelbaum F, Ledbetter JA, *et al.* Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas. *Blood* 1987;69(2):584-91.
199. Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *The Journal of cell biology* 1993;121(5):1121-32.

200. Deans JP, Kalt L, Ledbetter JA, Schieven GL, Bolen JB, Johnson P. Association of 75/80-kDa phosphoproteins and the tyrosine kinases Lyn, Fyn, and Lck with the B cell molecule CD20. Evidence against involvement of the cytoplasmic regions of CD20. *The Journal of biological chemistry* 1995;270(38):22632-8.
201. Leveille C, R AL-D, Mourad W. CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *European journal of immunology* 1999;29(1):65-74.
202. Tomita A, Hiraga J, Kiyoi H, *et al.* Epigenetic regulation of CD20 protein expression in a novel B-cell lymphoma cell line, RRBL1, established from a patient treated repeatedly with rituximab-containing chemotherapy. *International journal of hematology* 2007;86(1):49-57.
203. Valentine MA, Cotner T, Gaur L, Torres R, Clark EA. Expression of the human B-cell surface protein CD20: alteration by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84(22):8085-9.
204. Bil J, Winiarska M, Nowis D, *et al.* Bortezomib modulates surface CD20 in B-cell malignancies and affects rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity. *Blood* 2010;115(18):3745-55.
205. Venugopal P, Sivaraman S, Huang XK, Nayini J, Gregory SA, Preisler HD. Effects of cytokines on CD20 antigen expression on tumor cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia research* 2000;24(5):411-5.
206. Ziller F, Macor P, Bulla R, Sblattero D, Marzari R, Tedesco F. Controlling complement resistance in cancer by using human monoclonal antibodies that neutralize complement-regulatory proteins CD55 and CD59. *European journal of immunology* 2005;35(7):2175-83.
207. Wojciechowski W, Li H, Marshall S, Dell'Agnola C, Espinoza-Delgado I. Enhanced expression of CD20 in human tumor B cells is controlled through ERK-dependent mechanisms. *J Immunol* 2005;174(12):7859-68.
208. Kunala S, Macklis RM. Ionizing radiation induces CD20 surface expression on human B cells. *International journal of cancer* 2001;96(3):178-81.
209. Gupta D, Crosby ME, Almasan A, Macklis RM. Regulation of CD20 expression by radiation-induced changes in intracellular redox status. *Free radical biology & medicine* 2008;44(4):614-23.
210. Lapalombella R, Yu B, Triantafillou G, *et al.* Lenalidomide down-regulates the CD20 antigen and antagonizes direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab on primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2008;112(13):5180-9.
211. Anolik J, Looney RJ, Bottaro A, Sanz I, Young F. Down-regulation of CD20 on B cells upon CD40 activation. *European journal of immunology* 2003;33(9):2398-409.
212. O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. Mice carrying a CD20 gene disruption. *Immunogenetics* 1998;48(2):125-32.
213. Li H, Ayer LM, Lytton J, Deans JP. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(43):42427-34.
214. Polyak MJ, Tailor SH, Deans JP. Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment. *J Immunol* 1998;161(7):3242-8.
215. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, *et al.* Mouse CD20 expression and function. *International immunology* 2004;16(1):119-29.
216. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunology today* 1994;15(9):450-4.
217. Golay JT, Clark EA, Beverley PC. The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G0 to the G1 phase of the cell cycle. *J Immunol* 1985;135(6):3795-801.

218. Bourget I, Breitmayer JP, Grenier-Brossette N, Cousin JL. CD20 monoclonal antibodies down-regulate IgM at the surface of B cells. *European journal of immunology* 1993;23(3):768-71.
219. Mathas S, Rickers A, Bommert K, Dorken B, Mapara MY. Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer research* 2000;60(24):7170-6.
220. Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, *et al.* Costimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. *Leukemia* 2003;17(6):1164-74.
221. Petrie RJ, Deans JP. Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J Immunol* 2002;169(6):2886-91.
222. Holder MJ, Chamba A, Hardie DL, Deans JP, Gordon J. Improved access to CD20 following B cell receptor cross-linking at Burkitt's lymphoma cell surfaces. *Leukemia research* 2004;28(11):1197-202.
223. Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(27):18545-52.
224. Walshe CA, Beers SA, French RR, *et al.* Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(25):16971-84.
225. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine* 2008;359(6):613-26.
226. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 2004;104(9):2635-42.
227. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 2006;24(1):19-28.
228. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science (New York, NY)* 2005;310(5753):1510-2.
229. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine* 2000;6(4):443-6.
230. Fossati-Jimack L, Ioan-Facsinay A, Reininger L, *et al.* Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fcγ receptor III. *The Journal of experimental medicine* 2000;191(8):1293-302.
231. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fcγ receptor IIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fcγ receptor IIIa, independently of the Fcγ receptor IIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 1997;90(3):1109-14.
232. Cartron G, Dacheux L, Salles G, *et al.* Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fcγ receptor IIIa gene. *Blood* 2002;99(3):754-8.
233. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003;21(21):3940-7.
234. de Haij S, Jansen JH, Boross P, *et al.* In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer research*;70(8):3209-17.
235. Cragg MS, Glennie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 2004;103(7):2738-43.

236. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, *et al.* Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol* 2003;171(3):1581-7.
237. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, *et al.* CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 2001;98(12):3383-9.
238. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, *et al.* Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 2001;98(9):2771-7.
239. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT, *et al.* Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 2003;101(3):1045-52.
240. van der Kolk LE, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, Hack CE, van Oers MH. Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *British journal of haematology* 2001;115(4):807-11.
241. Schmidt RE, Gessner JE. Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. *Immunology letters* 2005;100(1):56-67.
242. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology* 2002;107(2):176-82.
243. Deans JP, Robbins SM, Polyak MJ, Savage JA. Rapid redistribution of CD20 to a low density detergent-insoluble membrane compartment. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(1):344-8.
244. Flieger D, Renoth S, Beier I, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf I. Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cellular immunology* 2000;204(1):55-63.
245. Hofmeister JK, Cooney D, Coggeshall KM. Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood cells, molecules & diseases* 2000;26(2):133-43.
246. Cardarelli PM, Quinn M, Buckman D, *et al.* Binding to CD20 by anti-B1 antibody or F(ab')(2) is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51(1):15-24.
247. Li H, Ayer LM, Polyak MJ, *et al.* The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts: antibody binding increases the affinity of the association through an epitope-dependent cross-linking-independent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(19):19893-901.
248. Unruh TL, Li H, Mutch CM, *et al.* Cholesterol depletion inhibits src family kinase-dependent calcium mobilization and apoptosis induced by rituximab crosslinking. *Immunology* 2005;116(2):223-32.
249. Winiarska M, Bil J, Wilczek E, *et al.* Statins impair antitumor effects of rituximab by inducing conformational changes of CD20. *PLoS medicine* 2008;5(3):e64.
250. Meyer zum Buschenfelde C, Feuerstacke Y, Gotze KS, Scholze K, Peschel C. GM1 expression of non-Hodgkin's lymphoma determines susceptibility to rituximab treatment. *Cancer research* 2008;68(13):5414-22.
251. Nowakowski GS, Maurer MJ, Habermann TM, *et al.* Statin use and prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 2010;28(3):412-7.
252. Semac I, Palomba C, Kulangara K, *et al.* Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells. *Cancer research* 2003;63(2):534-40.

253. Bezombes C, Grazide S, Garret C, *et al.* Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood* 2004;104(4):1166-73.
254. Leseux L, Laurent G, Laurent C, *et al.* PKC zeta mTOR pathway: a new target for rituximab therapy in follicular lymphoma. *Blood* 2008;111(1):285-91.
255. Daniels I, Abulayha AM, Thomson BJ, Haynes AP. Caspase-independent killing of Burkitt lymphoma cell lines by rituximab. *Apoptosis* 2006;11(6):1013-23.
256. van der Kolk LE, Evers LM, Omene C, *et al.* CD20-induced B cell death can bypass mitochondria and caspase activation. *Leukemia* 2002;16(9):1735-44.
257. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene* 2007;26(25):3629-36.
258. Vega MI, Huerta-Yepez S, Martinez-Paniagua M, *et al.* Rituximab-mediated cell signaling and chemo/immuno-sensitization of drug-resistant B-NHL is independent of its Fc functions. *Clin Cancer Res* 2009;15(21):6582-94.
259. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 1998;91(5):1644-52.
260. Selenko N, Majdic O, Jager U, Sillaber C, Stockl J, Knapp W. Cross-priming of cytotoxic T cells promoted by apoptosis-inducing tumor cell reactive antibodies? *Journal of clinical immunology* 2002;22(3):124-30.
261. Kalergis AM, Ravetch JV. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2002;195(12):1653-9.
262. Rafiq K, Bergtold A, Clynes R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *The Journal of clinical investigation* 2002;110(1):71-9.
263. Cartron G, Zhao-Yang L, Baudard M, *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2008;26(16):2725-31.
264. Davis TA, Grillo-Lopez AJ, White CA, *et al.* Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol* 2000;18(17):3135-43.
265. Hainsworth JD, Litchy S, Burris HA, 3rd, *et al.* Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2002;20(20):4261-7.
266. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 1985;314(6011):537-9.
267. Perosa F, Prete M, Racanelli V, Dammacco F. CD20-depleting therapy in autoimmune diseases: from basic research to the clinic. *Journal of internal medicine* 2010;267(3):260-77.
268. Protheroe A, Edwards JC, Simmons A, MacLennan K, Selby P. Remission of inflammatory arthropathy in association with anti-CD20 therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Rheumatology (Oxford, England)* 1999;38(11):1150-2.
269. Dalakas MC. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nature clinical practice* 2008;4(10):557-67.
270. Perosa F, Favoino E, Caragnano MA, Prete M, Dammacco F. CD20: a target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews* 2005;4(8):526-31.
271. Kimby E. Tolerability and safety of rituximab (MabThera). *Cancer treatment reviews* 2005;31(6):456-73.
272. Grillo-Lopez AJ, Hedrick E, Rashford M, Benyunes M. Rituximab: ongoing and future clinical development. *Seminars in oncology* 2002;29(1 Suppl 2):105-12.

273. Lemieux B, Tartas S, Traulle C, *et al.* Rituximab-related late-onset neutropenia after autologous stem cell transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Bone marrow transplantation* 2004;33(9):921-3.
274. Dayde D, Ternant D, Ohresser M, *et al.* Tumor burden influences exposure and response to rituximab: pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling using a syngeneic bioluminescent murine model expressing human CD20. *Blood* 2009;113(16):3765-72.
275. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of clinical pathology* 1998;51(5):364-9.
276. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, *et al.* Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res* 2008;14(5):1561-70.
277. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer research* 2007;67(3):1270-81.
278. Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, *et al.* Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2009;15(7):2523-30.
279. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, *et al.* Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* 2009;113(20):4885-93.
280. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, *et al.* Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood* 2009;113(16):3773-80.
281. Henry C, Deschamps M, Rohrlich PS, *et al.* Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. *Blood* 2010;115(12):2420-9.
282. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol* 2006;176(4):2600-9.
283. Williams ME, Densmore JJ, Pawluczkwycz AW, *et al.* Thrice-weekly low-dose rituximab decreases CD20 loss via shaving and promotes enhanced targeting in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 2006;177(10):7435-43.
284. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(2):133-46.
285. Wing EJ, Magee DM, Whiteside TL, Kaplan SS, Shaddock RK. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor alpha and interferon in cancer patients. *Blood* 1989;73(3):643-6.
286. Gluck WL, Hurst D, Yuen A, *et al.* Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-hodgkin's lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical response. *Clin Cancer Res* 2004;10(7):2253-64.
287. Takei K, Yamazaki T, Sawada U, Ishizuka H, Aizawa S. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leukemia research* 2006;30(5):625-31.
288. Treon SP, Mitsiades C, Mitsiades N, *et al.* Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies. *J Immunother* 2001;24(3):263-71.

289. Racila E, Link BK, Weng WK, *et al.* A polymorphism in the complement component C1qA correlates with prolonged response following rituximab therapy of follicular lymphoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(20):6697-703.
290. Dalle S, Dupire S, Brunet-Manquat S, Reslan L, Plesa A, Dumontet C. In vivo model of follicular lymphoma resistant to rituximab. *Clin Cancer Res* 2009;15(3):851-7.
291. Bannerji R, Kitada S, Flinn IW, *et al.* Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *J Clin Oncol* 2003;21(8):1466-71.
292. Mossner E, Brunker P, Moser S, *et al.* Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 2010;115(22):4393-402.
293. Pearce HL, Alice Miller M. The evolution of cancer research and drug discovery at Lilly Research Laboratories. *Advances in enzyme regulation* 2005;45:229-55.
294. Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature reviews* 2007;7(4):281-94.
295. Mackay HJ, Twelves CJ. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nature reviews* 2007;7(7):554-62.
296. Ma S, Rosen ST. Enzastaurin. *Current opinion in oncology* 2007;19(6):590-5.
297. Leitges M, Schmedt C, Guinamard R, *et al.* Immunodeficiency in protein kinase cbeta-deficient mice. *Science (New York, NY)* 1996;273(5276):788-91.
298. Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular immunology* 2004;41(6-7):599-613.
299. Su TT, Guo B, Kawakami Y, *et al.* PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nature immunology* 2002;3(8):780-6.
300. Pracht C, Minguet S, Leitges M, Reth M, Huber M. Association of protein kinase C-delta with the B cell antigen receptor complex. *Cellular signalling* 2007;19(4):715-22.
301. Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, *et al.* The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene* 2009;28(37):3261-73.
302. Martin P, Duran A, Minguet S, *et al.* Role of zeta PKC in B-cell signaling and function. *The EMBO journal* 2002;21(15):4049-57.
303. Li S, Phong M, Lahn M, *et al.* Retrospective analysis of protein kinase C-beta (PKC-beta) expression in lymphoid malignancies and its association with survival in diffuse large B-cell lymphomas. *Biology direct* 2007;2:8.
304. Riihijarvi S, Koivula S, Nyman H, Rydstrom K, Jerkeman M, Leppa S. Prognostic impact of protein kinase C beta II expression in R-CHOP-treated diffuse large B-cell lymphoma patients. *Mod Pathol* 2010;23(5):686-93.
305. Decouvelaere AV, Morschhauser F, Buob D, Copin MC, Dumontet C. Heterogeneity of protein kinase C beta(2) expression in lymphoid malignancies. *Histopathology* 2007;50(5):561-6.
306. Holler C, Pinon JD, Denk U, *et al.* PKCbeta is essential for the development of chronic lymphocytic leukemia in the TCL1 transgenic mouse model: validation of PKCbeta as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113(12):2791-4.
307. zum Buschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, *et al.* Recruitment of PKC-betaII to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70. *Leukemia*;24(1):141-52.
308. Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, *et al.* The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces

- apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer research* 2005;65(16):7462-9.
309. Vignot S, Soria JC, Spano JP, Mounier N. [Protein kinases C: a new cytoplasmic target]. *Bulletin du cancer* 2008;95(7):683-9.
310. Rizvi MA, Ghias K, Davies KM, *et al.* Enzastaurin (LY317615), a protein kinase Cbeta inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Molecular cancer therapeutics* 2006;5(7):1783-9.
311. Podar K, Raab MS, Zhang J, *et al.* Targeting PKC in multiple myeloma: in vitro and in vivo effects of the novel, orally available small-molecule inhibitor enzastaurin (LY317615.HCl). *Blood* 2007;109(4):1669-77.
312. Moreau AS, Jia X, Ngo HT, *et al.* Protein kinase C inhibitor enzastaurin induces in vitro and in vivo antitumor activity in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2007;109(11):4964-72.
313. Querfeld C, Rizvi MA, Kuzel TM, *et al.* The selective protein kinase C beta inhibitor enzastaurin induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines through the AKT pathway. *The Journal of investigative dermatology* 2006;126(7):1641-7.
314. Lee KW, Kim SG, Kim HP, *et al.* Enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, suppresses signaling through the ribosomal S6 kinase and bad pathways and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *Cancer research* 2008;68(6):1916-26.
315. Hanauske AR, Oberschmidt O, Hanauske-Abel H, Lahn MM, Eismann U. Antitumor activity of enzastaurin (LY317615.HCl) against human cancer cell lines and freshly explanted tumors investigated in in-vitro [corrected] soft-agar cloning experiments. *Investigational new drugs* 2007;25(3):205-10.
316. Civallero M, Cosenza M, Grisendi G, Marcheselli L, Todoerti K, Sacchi S. Effects of enzastaurin, alone or in combination, on signaling pathway controlling growth and survival of B-cell lymphoma cell lines. *Leukemia & lymphoma* 2010;51(4):671-9.
317. Herbst RS, Oh Y, Wagle A, Lahn M. Enzastaurin, a protein kinase Cbeta- selective inhibitor, and its potential application as an anticancer agent in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(15 Pt 2):s4641-6.
318. www.clinicaltrials.gov.
319. Robertson MJ, Kahl BS, Vose JM, *et al.* Phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25(13):1741-6.
320. Morschhauser F, Seymour JF, Kluin-Nelemans HC, *et al.* A phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 2008;19(2):247-53.
321. Schwartzberg s. ENZASTAURIN IN PATIENTS WITH FOLLICULAR LYMPHOMA: PRELIMINARY RESULTS OF A PHASE II STUDY. Abstract, EHA, Barcelona, 2010.
322. Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *The Journal of clinical investigation* 2005;115(10):2648-55.
323. Zha H, Raffeld M, Charboneau L, *et al.* Similarities of prosurvival signals in Bcl-2-positive and Bcl-2-negative follicular lymphomas identified by reverse phase protein microarray. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2004;84(2):235-44.
324. Gulmann C, Espina V, Petricoin E, 3rd, *et al.* Proteomic analysis of apoptotic pathways reveals prognostic factors in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):5847-55.
325. Elenitoba-Johnson KS, Jenson SD, Abbott RT, *et al.* Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein

- kinase as a target for therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(12):7259-64.
326. Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes, chromosomes & cancer* 2003;36(3):211-23.
327. Foster KG, Fingar DC. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *The Journal of biological chemistry*;285(19):14071-7.
328. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* 2007;12(1):9-22.
329. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, *et al.* Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2005;18(10):1377-84.
330. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, *et al.* Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nature medicine* 2002;8(1):68-74.
331. Rieger J, Lemke D, Maurer G, *et al.* Enzastaurin-induced apoptosis in glioma cells is caspase-dependent and inhibited by BCL-XL. *Journal of neurochemistry* 2008;106(6):2436-48.
332. Civallero M, Cosenza M, Grisendi G, Marcheselli L, Todoerti K, Sacchi S. Effects of enzastaurin, alone or in combination, on signaling pathway controlling growth and survival of B-cell lymphoma cell lines. *Leukemia & lymphoma*;51(4):671-9.
333. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature reviews* 2008;9(10):747-58.
334. Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A, Sellers WR, Kaelin WG, Jr. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer cell* 2003;4(2):147-58.
335. Del Bufalo D, Ciuffreda L, Triscioglio D, *et al.* Antiangiogenic potential of the Mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer research* 2006;66(11):5549-54.
336. Wang ES, Teruya-Feldstein J, Wu Y, Zhu Z, Hicklin DJ, Moore MA. Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood* 2004;104(9):2893-902.
337. Jorgensen JM, Sorensen FB, Bendix K, *et al.* Expression level, tissue distribution pattern, and prognostic impact of vascular endothelial growth factors VEGF and VEGF-C and their receptors Flt-1, KDR, and Flt-4 in different subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Leukemia & lymphoma* 2009;50(10):1647-60.
338. Jorgensen JM, Sorensen FB, Bendix K, *et al.* Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: clinico-pathological correlations and prognostic significance in specific subtypes. *Leukemia & lymphoma* 2007;48(3):584-95.
339. Frodin M, Gammeltoft S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Molecular and cellular endocrinology* 1999;151(1-2):65-77.
340. Tan Y, Ruan H, Demeter MR, Comb MJ. p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 1999;274(49):34859-67.
341. Bertolotto C, Maulon L, Filippa N, Baier G, Auberger P. Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(47):37246-50.
342. Hurbin A, Coll JL, Dubrez-Daloz L, *et al.* Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(20):19757-67.

343. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101(37):13489-94.
344. Chichili GR, Rodgers W. Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 2007;282(50):36682-91.
345. Hao S, August A. Actin depolymerization transduces the strength of B-cell receptor stimulation. *Molecular biology of the cell* 2005;16(5):2275-84.
346. Blery M, Tze L, Miosge LA, Jun JE, Goodnow CC. Essential role of membrane cholesterol in accelerated BCR internalization and uncoupling from NF-kappa B in B cell clonal anergy. *The Journal of experimental medicine* 2006;203(7):1773-83.
347. Karnell FG, Brezski RJ, King LB, Silverman MA, Monroe JG. Membrane cholesterol content accounts for developmental differences in surface B cell receptor compartmentalization and signaling. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(27):25621-8.
348. Roberts NA, Haworth RS, Avkiran M. Effects of bisindolylmaleimide PKC inhibitors on p90RSK activity in vitro and in adult ventricular myocytes. *British journal of pharmacology* 2005;145(4):477-89.
349. Doehn U, Gammeltoft S, Shen SH, Jensen CJ. p90 ribosomal S6 kinase 2 is associated with and dephosphorylated by protein phosphatase 2Cdelta. *The Biochemical journal* 2004;382(Pt 2):425-31.
350. Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *The EMBO journal* 2002;21(1-2):64-71.
351. Aho TL, Sandholm J, Peltola KJ, Mankonen HP, Lilly M, Koskinen PJ. Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS letters* 2004;571(1-3):43-9.
352. Jonathan M, Irisha b, June H, Myklebusta, Ash A, Alizadeha et al. B-cell signaling networks reveal a negative prognostic human lymphoma cell subset that emerges during tumor progression. *Blood* 2010;107(29):12747-54.

Annexes

Article 1 :

**Targeting of Protein Phosphatase-2A gives rationale for drug combinations with
Enzastaurin in Chronic Lymphoid Leukemia**

Liffraud C, **Kheirallah S**, Fournié JJ, Quillet-Mary A, Guy Laurent G, and Ysebaert L

Soumis à Oncogene

**Targeting of Protein Phosphatase-2A gives rationale for drug combinations with
Enzastaurin in Chronic Lymphoid Leukemia**

Running title: Enzastaurin activates PP2A to kill CLL cells

Cecile Liffraud (1), Samar Kheirallah (1), Jean-Jacques Fournié (1), Anne Quillet-Mary (1), Guy Laurent (1,2), and Loic Ysebaert (1,2).

Affiliations : (1) InsermU563, Toulouse, F-31300 France and Université Toulouse III Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, F-31300 France (2) CHU Toulouse, Hopital Purpan, Service d'Hematologie, Toulouse, F-31300 France.

Corresponding author : Dr L.Ysebaert, CHU Toulouse, Hopital Purpan, Service d'Hematologie, Toulouse, F-31300 France. Phone number (+33)561772094 and Fax number (+33)561772177. E-mail to: ysebaert.l@chu-toulouse.fr

Abstract: 175 words
Text: 3315 words
References: 45
Table: 1, and Figures: 7

Abstract

Targeting both B cell Receptor (BCR) downstream pathways (Protein Kinase C, Src family, SYK/ZAP70) and Bcl-2 family proteins is of therapeutic importance to eradicate Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) cells. We show here that a PKC inhibitor (Enzastaurin, orally available, actually tested in phase III trials) activates Protein Phosphatase 2A (PP2A) to mediate critical pro-apoptotic events (cleavage of Mcl-1, dephosphorylation of Bcl-2 and GSK3beta), these two latter being good biomarkers for drug activity against CLL cells. PP2A activation is at least partly mediated by its dephosphorylation, and pharmacological agents or siRNA directed against the catalytic subunit of PP2A significantly hampers cell death induced by Enzastaurin. IgVH mutational status, CD38, del17p, Binet stage do not correlate with drug sensitivity, suggesting a broad range of potential synergy with other agents used in CLL patients. Indeed, Enzastaurin sensitizes CLL cells to fludarabine and Rituximab, disturbs CLL/Nurse-Like Cells dialogue, but seems to be subverted to NLC-mediated drug resistance. These results argue for the screening of PP2A activators as potential anti-CLL drugs, and the use of Enzastaurin in combination therapy.

Introduction

Despite substantial improvements have been made with immunochemotherapy in the management of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), we still have to face relapses, primary or secondary refractoriness to alkylating agents and/or purine analogs. Further insights into key cellular events leading to clonal advantage and drug resistance will help to identify novel therapeutic avenues to improve patient outcome (1). In this regard, signals downstream B-cell receptor (BCR) engagement are now increasingly considered as crucial (1,2). Antigen selection is involved in the initial expansion of malignant clones, and the subsequent disease evolution, based on the strong association between structural (Immunoglobulin Variable Heavy chain gene segment (IgVH) mutational status (3)) and functional (ZAP70, gene expression/surface expression phenotypes (4-6)) properties of CLL BCRs and the prognosis of patients.

BCR signals are transmitted through and modulated by complex orchestrated events involving kinases, phosphatases, and adaptor proteins (7), which may represent interesting druggable targets. Indeed, SYK, LYN, PKC β II and δ are constitutively activated and/or overexpressed in CLL cells (8-12), and are implicated in the transmission of abnormal BCR signals. Small molecule inhibitors of tyrosine kinases SYK(8) and LYN(13), and of serine/threonine kinases of the PKC family (11,12) were already shown to induce apoptosis in CLL cells both *in vitro* and *in vivo*. BCR is also important in the orchestration of a supportive micro-environment through CLL/Nurse-Like Cells (NLC) interactions, recruitment of T cells, thought to provide a proliferative advantage and presumably an Environment Mediated-Drug Resistance (13). The E μ -myc Tcl-1 (T cell leukemia-1) mouse model recapitulates some aspects of unmutated, aggressive CLL, and provides a good model to study disease pathogenesis and drug effects (14-17). Tcl-1 is a transcriptional activator (14) and a co-activator of Akt (18). The data in mouse model was later corroborated in CLL patients, since a role for Tcl1 and Akt/Mcl-1 in both disease progression and immunochemotherapy resistance has been reported (19-21). Recently, PKC β was validated as a crucial mediator of Tcl-1-induced leukemogenesis in transgenic animals, phosphorylating Akt being antagonized by Enzastaurin (22). This orally available inhibitor of classic (PKC $\alpha,\beta,\gamma,\delta$) and novel (δ) PKC isoforms (23) is also considered as an inhibitor of Akt pathway, cascades that mediate tumor

survival, migration, differentiation, angiogenesis. Its activity in haematologic malignancies is very broad (indolent and aggressive lymphomas), and only few haematologic toxicity is reported in phase I trials (24). Still, its precise modes of action on CLL or NLC cells, as well as potential antagonism of its activity through CLL-NLC interactions, remain largely unexplored.

In this study, we show that Enzastaurin is active in CLL cells, without inactivation of Akt or ERK pathways, but through an original activation of Protein Phosphatase 2A (PP2A) to dephosphorylate downstream targets, a process that does not appear to be relevant in NLC. In view of recent publications of PP2A activation-triggered apoptosis in CLL cells (25, 26), our data support the use of Enzastaurin in combination with other agents, especially those able to revert NLC-mediated drug resistance mechanisms.

Material and Methods

CLL primary samples

Blood from CLL patients were collected upon signed informed consent, in accordance with the declaration of Helsinki. All patients in our series had confirmed CLL with Matutes score 4 to 5. Isolation of fresh Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMCs) was made using ficoll density gradient centrifugation. For NLC studies, freshly isolated CLL cells were plated in 6-well plates at a concentration of 1.10^7 /ml in RPMI+10% FCS, 2mM L-Glutamine (Invitrogen, France) and penicillin/streptomycin at 37°C, and were left for 15 days in culture to allow outgrowth of adherent Nurse-Like Cells (NLC), with or without 5µM DMSO or Enzastaurin from day 1. NLC spreading was evaluated at day 3, 7, 10 and 15, by counting the large, adherent cells in 3 different visual fields at x20 magnification, using a phase-contrast microscope.

Chemicals and assessment of cell viability

Enzastaurin was obtained from Eli-Lilly Company (Indianapolis, IN), dissolved in DMSO at a stock concentration of 10mM and stored at -20°C. Z-VAD-fmk and Fludarabine were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO), FTY720 and Okadaic Acid from Calbiochem (La Jolla, CA). Assessment of cell viability was made by counting CLL cells using the trypan blue exclusion technique, under an inverted microscope. In other instances, the Annexin V/Propidium Iodide binding test was used. For combination assays, Fludarabine 1µg/ml and Enzastaurin or DMSO 5µM were added at the same time (total incubation: 96h), for Rituximab assays CLL cells were incubated with Enzastaurin or DMSO 24h before adding either 10µg/ml Rituximab or human IgG1, and cell viability was assessed 48h after.

Nurse-Like Cells and CLL co-cultures

After 15 days of co-culture to obtain NLC, CLL cells were removed from adherent NLC with vigorous pipetting. Three sets of experiments were then started: (i) NLC without CLL cells were treated with DMSO, Enza or FTY720 for 24h (then lysed and submitted to Western blotting to detect PARP cleavage and GSK3β dephosphorylation), (ii) NLC counting was performed at day 5 post-treatment with DMSO, Enza or FTY720 5µM under an inverted microscope, and (iii) CLL cells removed from NLC were kept in co-culture medium (no washing), added back to their NLC or, as a control, in fresh 6-well plates without NLC, and

treated with DMSO, Enza or FTY720 for 5 days. CLL survival was checked with Annexin V/PI test (as the % of double-negative cells).

Transfection assays

Specific siRNA raised against catalytic subunit of PP2A was obtained from Dharmacon (Lafayette, CO). Amaxa nucleofector apparatus was used to transfect CLL cells, using solution V and program U-013 (Lonza, Cologne, Germany), according to manufacturer's instructions. Briefly, $15 \cdot 10^6$ cells were resuspended in 800-1200nM siRNA or scramble control, nucleofected, placed in fresh RPMI+10% FCS medium (final concentration : $5 \cdot 10^6$ CLL cells/ml), and incubated at 37°C for 24h. Then, DMSO or Enzastaurin was added at a 5 μ M concentration, and cell viability was assessed after 24h treatment (48h after nucleofection).

PP2A immunoprecipitation assay

PP2A activity was measured using the non radioactive kit from Millipore (Upstate, Temecula, CA). Briefly, after 4h of DMSO, Enzastaurin or FTY720 treatment (5 μ M, +/-OA at 5nM when indicated), cells were lysed and 200 μ g of proteins were incubated with anti-PP2Ac mouse monoclonal antibody and protein A beads, at 4°C with constant rocking. Immunoprecipitated PP2A was then used for the phosphatase assay, by adding 750 μ M specific phosphopeptide substrate. Free released phosphate concentration was measured by the malachite green technique, at a 650nM density using a DLReady spectrophotometer (Berthold). The amount of precipitated PP2Ac was checked by western blotting, to avoid variability among samples.

Western blotting

Cell lysates were prepared after protein dosage using the BCA method (Pierce, Rockford, IL), and 50-100 μ g of protein were separated in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nitrocellulose membrane, blocked in 5% fat milk, washed three times in 0,1% Tween PBS, before primary antibodies were incubated overnight. Secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit or -mouse antibodies were added for 1h, and after 3 washes detection was made using chemiluminescent substrate (SuperSignal, Pierce). Antibodies used were : anti-PP2Ac (Millipore, Upstate), anti-Actin, Mcl-1, SET, LYN and Bcl-2 (Santa Cruz biotechnology), anti-Ser21/9 phospho-GSK3 α/β , GSK3 α/β , Ser473 phospho-Akt, Tyr416-phospho Src, PARP, Ser70 phospho-Bcl-2, Ser660-pan phospho-PKC and phospho-PKC α

(Cell Signaling), anti-Tyr307 phospho-PP2Ac (Epitomics), and anti- β -catenin (BD Transduction Laboratories).

Statistical analyses

Results are expressed as mean \pm standard deviation (s.d.) of at least 3 or more experiments.

Levels of significance were evaluated by two-sided Student's t-test

Results

Enzastaurin activity in primary CLL samples

Incubation of CLL cells with increasing doses of Enzastaurin (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 μ M) for 7 days resulted in a dose-dependent decrease in viable cells (as determined by vital trypan blue exclusion test). Mean IC50 at day 5 for our 30 patients (characteristics resumed in Table 1) was 6.9 μ M (95% CI 3.6-10.4 μ M, doses achievable *in vivo* with 525mg Enzastaurin daily (28), and comparable to previous studies in Waldenström macroglobulinemia (29)). Median IC50 at day 5 was 5 μ M. We used this 5 μ M threshold to classify patients into two cohorts: 11 resistant patients displayed >50% cell viability and 19 responding patients <50% cell viability at day 5 (with respective median cell survival of 74% vs 25%, $p < 0.05$) (Figure 1A). No baseline characteristic (IgVH, del17p, CD38, Binet stage) was associated with Enzastaurin response. Caspase activation is involved in the observed cell death, as exemplified by western blot analyses showed PARP cleavage after 24h (Figure 1B). Furthermore, Mcl-1 and serine 70 p-Bcl-2 were down-modulated (but not total Bcl-2 protein) upon exposure with 5 μ M Enzastaurin. Furthermore, pre-treatment with a broad caspase inhibitor (Z-VAD-fmk, 5 μ M), induced almost complete resistance to Enzastaurin (live cells with Enzastaurin 63.3 \pm 1% vs enzastaurin+Z-VAD-fmk 93 \pm 7%, $p < 0.05$, $n=3$) (Figure 1C). These data indicate that Enzastaurin triggers CLL apoptosis in responding patients.

Dephosphorylation of GSK3 β and Ser70 p-Bcl-2 as pharmacodynamic markers of enzastaurin activity in CLL cells

Dephosphorylation of GSK3 β on Serine 9 is the classical pharmacodynamic marker of Enzastaurin activity, and mirrors either PKC or Akt inhibition (24, 29). Enzastaurin induces a dose-dependent inhibition of Serine 9 p-GSK3 β as early as 30mn, without detectable dephosphorylation of either Serine 660 p-panPKC or Serine 473 p-Akt (Figure 2A). On the other hand, a strong accumulation of beta-catenin (another downstream event of PKC inhibition with Enzastaurin reported in multiple myeloma cells recently (30)) could be readily observed. Interestingly, dephosphorylation of GSK3 β and Ser70-pBcl-2 were incomplete or absent in resistant patients, as compared to responding cases (Figure 2B). Both markers could thus be considered reliable biomarkers of activity, as opposed to beta-catenin accumulation which was observed in all cases. The mechanism by which dephosphorylation events occur

did not involve Enzastaurin-induced kinase inhibition (Akt, p70S6K, SYK, ERK, or PKC δ , data not shown), suggesting that an alternative pathway is involved in CLL cells.

Enzastaurin induces PP2A activation in CLL cells

To determine if Enzastaurin could dephosphorylate GSK3 β and Ser70-pBcl-2 through the activation of a phosphatase, CLL B cells were treated with 5 μ M Enzastaurin or 5 μ M FTY720 (a drug that activates PP2A to kill CLL cells (25)), for 4h. As shown in Figure 3A, Enzastaurin induced a mean 1.4 increase in PP2A activity, significantly higher than basal level. In our hands, FTY720 5 μ M also activated PP2A, as published (25). Incubation of 5nM Okadaic Acid (OA, highly selective to PP2A at this low nanomolar range) completely abrogated protein phosphatase activity, suggesting Enzastaurin activates PP2A or a PP2A-like phosphatase. Consistent with this activation, both GSK3 β and Ser70-pBcl-2 were found to be highly phosphorylated upon OA treatment alone, which further blocks Enzastaurin-induced dephosphorylation of these two biomarkers of activity (Figure 3B). OA also markedly reduced caspase activation, as measured by PARP cleavage, and partially restored Mcl-1 levels. On the other hand, OA had no impact on Enzastaurin-mediated β -catenin accumulation that seemed PP2A-independent). FTY720 did not induce dephosphorylation of neither GSK3 β nor Ser70 p-Bcl-2, but down-regulated Mcl-1 expression (Figure 3C and data not shown). Altogether, these results suggest that FTY720 and Enzastaurin activate different PP2A phosphatase complexes, leading to regulation of different downstream targets.

PP2A activation is important for cell death with Enzastaurin

PP2A activation is crucial for cell death triggered by FTY720 (25). To determine whether PP2A also is one key player for Enzastaurin-induced apoptosis, we pre-treated CLL cells with 5nM OA before adding Enzastaurin. Pre-incubation resulted in a significant reduction of Enzastaurin-induced cytotoxicity (% surviving cells with Enzastaurin 57.6 \pm 15.6% vs Enzastaurin+OA 87 \pm 17.7%: p=0.02, n=6) (Figure 4A). Specific targeting of the catalytic subunit of PP2A (PP2Ac) using specific siRNA showed a significant survival increase after Enzastaurin treatment, as compared to scramble siRNA (mean survival 97.5 \pm 2.5% vs 63 \pm 13%, respectively, n=4, p<0.05), further demonstrating that PP2A activation is critical to Enzastaurin-mediated CLL cells lysis (Figure 4B). Altogether, these data confirmed that PP2A activation is cytotoxic to CLL cells, and is an important mechanism leading to death induced by both FTY720 (25) and Enzastaurin.

Mechanism of activation of PP2A with Enzastaurin

Diversified specificity of PP2A is related to the heterotrimeric complex that constitutes PP2A. It contains a structural A subunit, a catalytic C subunit, and a regulatory B subunit (that governs substrate specificity) (31). Inhibition of PP2A may be achieved through many mechanisms in cancer (32). Transcriptional repression by SET (33), post-translational modifications (especially tyrosine phosphorylation on residue Tyr307 by Src kinases pp60 and p56Lck, or serine phosphorylation by PKC or AMPc-dependent Protein Kinase (PKA)), or holoenzyme composition have all been involved in PP2A activity modulation. Using western blotting, we could not detect any modulation of p-PKA, PP2A A/C or pan-B subunits (data not shown), neither a down-modulation of SET or inhibition of p-PKC α (a classical regulator of PP2A-B56 α sub-unit in the Bcl-2 phosphatase complex (34)) (Figure 5A). On the other hand, high basal level of Tyr307 p-PP2Ac sub-unit was reduced upon exposure to Enzastaurin (Figure 5B). It is possible that Tyr307 dephosphorylation only reflects PP2A activation (acting as a phosphotyrosine phosphatase to re-activate itself (31)), but also may be regulated by upstream src kinases. In this regard, we used a broad src inhibitor (Dasatinib 300nM, active against Tyr416 p-pan-Src), but it seems inactive against Tyr307 p-PP2A (Figure 5C). Altogether, these results suggest PP2A is activated through dephosphorylation after Enzastaurin treatment, either by itself (or by a PP2A-related phosphatase) or by the inhibition of an unknown PP2Ac kinase.

Enzastaurin sensitizes CLL cells to Fludarabine and Rituximab

Because Rituximab direct apoptotic effects and Fludarabine activity depends on Mcl-1 levels and possibly Bcl-2 phosphorylation status (35,36), we sought to determine any chemosensitization effect with Enzastaurin. In five patients resistant to Enzastaurin, cell viability was assessed after 96h incubation with Fludarabine 1 μ g/ml+/- Enzastaurin 5 μ M. An additive effect was shown (% cell survival with Enzastaurin 87+/-11%, Fludarabine 74.4+/-21% vs Fludarabine+Enzastaurin 49+/-13%, p=0.046, n=5) (Figure 6A). Interestingly one patient with del17p and Fludarabine refractoriness also responded to the combination therapy, suggesting synergy in some cases. Accordingly, caspase activity (based on PARP cleavage), dephosphorylation of p-Bcl-2 and down-modulation of Mcl-1 were higher with Fludarabine+Enzastaurin than with either drug alone (Figure 6B). In three out of twelve tested patients (but all three with high risk CLL with del17p by FISH analysis), a synergistic effect

of the combination of Rituximab 10 μ g/ml and Enzastaurin 5 μ M was also evidenced (Figure 6C), suggesting Enzastaurin can sensitize CLL cells to death induced by various agents.

Enzastaurin inhibits dialogue between CLL cells and Nurse-Like Cells (NLC)

NLC differentiate from blood monocytes co-cultured with CLL cells, and protect them from spontaneous or drug-induced death. Considering monocytes as the major cell subset target of Enzastaurin in cancer patients receiving the drug (37), we checked the impact of Enzastaurin on NLC outgrowth in long-term CLL cultures. In all 30 patients from our cohort, Enzastaurin induced a dose-dependent inhibition of NLC outgrowth (complete inhibition at 5 μ M, Figure 7A). On the other hand, neither Enzastaurin nor FTY720 induced significant NLC death, when used at 5 μ M on established 15 days NLC+CLL co-cultures (Figure 7B). This lack of activity was exemplified by the absence of both GSK3 β dephosphorylation and PARP cleavage (see insert in Figure 7B). We next sought to determine whether CLL survival upon treatment, as measured by Annexin V/PI double-negative cells, was increased upon co-culture with NLC for 15 days. In 9/15 patients, CLL removed from NLC and cultured alone (in the same co-culture medium, not washed) with 5 μ M Enzastaurin for 5 extra days (as in Figure 1A) had <50% cell survival. In these patients, mean CLL survival increased from 14.7 \pm 11% without NLC to 39.6 \pm 18.5% with NLC, indicating NLC protected significantly from Enzastaurin-induced apoptosis ($p=0.005$, Figure 7C). Altogether, these data indicate that Enzastaurin could prevent NLC outgrowth but not viability, suggesting a disruption in CLL/NLC dialogue rather than a direct anti-NLC effect.

Discussion

The studies described herein demonstrate that Enzastaurin is a promising toxic agent in CLL. It is important to consider that we used primary leukemic samples instead of cell lines, and pharmacologically relevant doses of Enzastaurin in our experiments. Within this range, this drug demonstrated significant caspase-dependent apoptosis, PP2A activation, and inhibition of NLC-CLL dialogue *in vitro*. Combination with Rituximab and Fludarabine further indicate the potential relevance of this compound in the clinical setting.

Despite high levels of SET (the most potent PP2A transcriptional inhibitor) and inhibitory tyrosine phosphorylation of the catalytic sub-unit that are hallmarks of baseline inhibition of the phosphatase, activation of PP2A is feasible and cytotoxic in CLL cells. Enzastaurin represents the third compound published to date able to enhance PP2A-mediated cell death in CLL (25, 26), but the first to involve a Bcl-2 phosphatase activity (unlike FTY720). Inhibition of Bcl-2 phosphatase may occur by up-regulating PKC α in acute leukemia cell lines (34), but Enzastaurin does not seem to involve such mechanism. PP2A is the major phosphatase expressed in CLL cells (38), and regulates Serine 70 p-Bcl-2 levels. The finding of such an effect of classical PKC inhibition with Enzastaurin on Bcl-2 and Mcl-1 is not surprising, considering the fact that bryostatin (a PKC modulator) enhances both Mcl-1 expression and Serine 70 Bcl-2 phosphorylation in CLL cells (39). Accordingly, Enzastaurin was shown to chemosensitize many kinds of cancer cells to the effects of various classes of cytotoxic agents (40), including Fludarabine and Rituximab (in Antibody-dependent Cell Cytotoxicity assays (29)). Moreover, strategies aiming to increase PP2A activity may induce higher genotoxic insult in combination to chemotherapy, since PP2A modulate both Bcl-2 phosphorylation levels and p53 pro-apoptotic functions at the mitochondria. Enzastaurin probably triggers p53-dependent and -independent cytotoxicity, as it was found active in 4/7 del17p patients.

Not all patients responded equally to Enzastaurin. In this regard, patients with del 11q23 (the locus harboring ATM gene, but also the beta isoform of PP2A-A sub-unit gene, PPP2R1B) exhibited incomplete GSK3 β and Bcl-2 dephosphorylation, higher resistance levels to drug, but not complete refractoriness. Indeed, such patients have variable residual PP2A activity that may allow Enzastaurin to be active (41). Other pathways activated by Enzastaurin to promote cytotoxicity include beta-catenin induced-endoplasmic reticulum (ER) stress response (30). Enzastaurin treatment dramatically increased β -catenin levels, in all

samples tested (resistant or not to the drug), thus suggesting β -catenin did not play a substantial role in cell death in CLL cells, in contrast to myeloma cells. The precise role of the three key players downstream PP2A activation (GSK3 β , p-Bcl-2, Mcl-1) is an important issue that is currently addressed in our lab. GSK3 β destabilizes Mcl-1 expression through phosphorylation and further proteasomal degradation. We could not detect GSK3 β in Mcl-1 immunoprecipitates, and pharmacological inhibition of GSK3 β is toxic by itself to CLL cells (41). GSK3 β can act as a pro-apoptotic (through mitochondrial outer membrane polarization) or an anti-apoptotic factor (inhibiting death initiating signaling complex downstream death receptors, but also by promoting NF- κ B activation) (42). Recently, a novel SYK/PKC δ /Akt/GSK3 β module whose pharmacological inhibition kills CLL cells through GSK3 β -mediated phosphorylation of Mcl-1 has been unravelled (43). In our hands, Enzastaurin could not induce either SYK or PKC δ dephosphorylation, but used a PP2A-dependent pathway to activate GSK3 β . This may offer synergistic opportunities between SYK and PKC β inhibitors. Very recently, a direct PKC β -Bcl-2 pro-survival pathway has been demonstrated in CLL cells, inhibited by Enzastaurin (40). The precise role of PP2A has not been addressed in this publication, but these data and ours converge to a critical role of Bcl-2 phosphorylation on Serine 70 in the chemoresistant phenotype of CLL cells.

Owing to its antagonistic effects on NLC-CLL dialogue, Enzastaurin should also be considered as a promising agent as a maintenance treatment after high burden disease eradication (currently assessed in a phase III international trial in Diffuse Large B Cell Lymphoma after frontline R-CHOP, PRELUDE trial). Indeed, Lymphoma-Associated Macrophages, or NLC in CLL, provide a supportive micro-environment that is now widely emerging as a rational therapeutic target (45). They also play important roles in homing, trafficking, tumor immune evasion and neo-angiogenesis by secreting many chemokines and growth factors. Enzastaurin was first developed for its anti-angiogenic properties, and could also act as an antagonist of tumor-milieu interactions. This, and interesting results in combinations with classic chemotherapy or novel smart molecules (BH3 mimetics, SYK inhibitors), emphasizes the multi-faceted clinical potential of Enzastaurin in CLL.

Acknowledgements

We would like to thank patients for giving consent to participate in these studies. We also acknowledge Dr K.Benhadji (Eli-Lilly and Company) for his continuous support, and providing an institutional research grant (L.Y.).

Authorship contributions

CL performed research and analyzed data, SK performed research, JJF and AQM analyzed data, GL designed research and analyzed data, LY performed and analyzed research, analyzed data and wrote the paper.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare not to have conflict of interest.

References

- 1 : Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL : novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:405-418.
- 2 : Chiorazzi N, Ferrarini M. Bcell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Ann Rev Immunol*. 2003;21:841-894.
- 3 : Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, *et al*. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.
- 4 : Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, *et al*. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:893-901.
- 5 : Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, *et al*. Relation of gene expression expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-1647.
- 6 : Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, *et al*. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002;99:4087-4093.
- 7 : Monroe JG. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:283-294.
- 8 : Contri A, Brunati AM, Trentin L, *et al*. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*. 2005 ;115:369-78.
- 9 : Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, *et al*. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2009;23:686-693.
- 10 : Abrams ST, Lakum T, Lin K, *et al*. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase CbetaII. *Blood* 2007;109:1193-201.
- 11 : Ringshausen I, Oelsner M, Weick K, *et al*. Mechanisms of apoptosis-induction by rottlerin: therapeutic implications for B-CLL. *Leukemia* 2006;20:514-20.
- 12 : Ganeshaguru K, Wickremasinghe RG, Jones DT, *et al*. Actions of the selective protein kinase C inhibitor PKC412 on B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Haematologica* 2002;87:167-76.

- 13 : Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009;114:3367-75.
- 14 : Pekarsky Y, Palamarchuk A, Maximov V, et al. Tcl1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:19643-8.
- 15 : Yan XJ, Albesiano E, Zanesi N, et al. B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:11713-8.
- 16 : Zanesi N, Aqeilan R, Drusco A, et al. Effect of rapamycin on mouse chronic lymphocytic leukemia and the development of nonhematopoietic malignancies in Emu-TCL1 transgenic mice. *Cancer Res* 2006;66:915-20.
- 17 : Gorgun G, Ramsay AG, Holderried TA, *et al.* JG. E(mu)-TCL1 mice represent a model for immunotherapeutic reversal of chronic lymphocytic leukemia-induced T-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:6250-5.
- 18 : Laine J, Kunstle G, Obata T, et al. The protooncogene Tcl-1 is an akt kinase coactivator. *Mol Cell.* 2000;6:395-407.
- 19 : Herling M, Patel KA, Khalili J, et al. TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* 2006;20:280-5.
- 20 : Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, *et al.* The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 2007;21:110-20.
- 21 : Awan FT, Kay NE, Davis ME, *et al.* Mcl-1 expression predicts progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients treated with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab. *Blood* 2009;113:535-7.
- 22 : Holler C, Piñón JD, Denk U, *et al.* PKCbeta is essential for the development of chronic lymphocytic leukemia in the TCL1 transgenic mouse model: validation of PKCbeta as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:2791-4.
- 23 : Ma S, Rosen ST. Enzastaurin. *Curr Opin Oncol.* 2007;19:590-595.
- 24 : Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, et al. The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res.* 2005;65 :7462-9.

- 25 : Liu Q, Zhao X, Frizzera F, *et al.* FTY720 demonstrates promising preclinical activity for chronic lymphocytic leukemia and lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood* 2008;111:275-84.
- 26 : Moon EY, Lerner A. PDE4 inhibitors activate a mitochondrial apoptotic pathway in chronic lymphocytic leukemia cells that is regulated by protein phosphatase 2A. *Blood* 2003;101:4122-30.
- 27 : Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99:1030-7.
- 28 : Herbst R, Thornton DE, Kies MS, *et al.* Phase I study of LY317615, a protein kinase C β inhibitor. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;20:82a.
- 29 : Moreau AS, Jia X, Ngo H, *et al.* Protein kinase C inhibitor enzastaurin induces in vitro and in vivo antitumor activity in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2007;109:4964-4972.
- 30 : Raab M, Breitkreutz I, Tonon G, *et al.* Targeting PKC : a novel role for beta-catenin in ER stress and apoptotic signaling. *Blood*. 2009;113:1513-1521.
- 31 : Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*. 2001;353:417-439.
- 32 : Eichhorn P, Creighton M, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1795:1-15.
- 33 : Neviani P, Santhanam R, Trotta R, *et al.* The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell*. 2005;8:355-68.
- 34 : Jiffar T, Kurinna S, Suck G, *et al.* PKC alpha mediates chemoresistance in acute lymphoblastic leukemia through effects on Bcl2 phosphorylation. *Leukemia*. 2004;18:505-12.
- 35 : Hussain SR, Cheney CM, Johnson AJ, *et al.* Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2144-50.
- 36 : Pepper C, Lin TT, Pratt G, *et al.* Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood*. 2008;112:3807-17.
- 37 : Green LJ, Marder P, Ray C, *et al.* Development and validation of a drug activity biomarker that shows target inhibition in cancer patients receiving enzastaurin, a novel protein kinase C-beta inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3408-15.

- 38 : Yamamoto M, Suzuki Y, Kihira H, et al. Expressions of four major protein Ser/Thr phosphatases in human primary leukemic cells. *Leukemia*. 1999;13:595-600.
- 39 : Thomas A, Pepper C, Hoy T, Bentley P. Bryostatins induces protein kinase C modulation, Mcl-1 up-regulation and phosphorylation of Bcl-2 resulting in cellular differentiation and resistance to drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2004;45:997-1008.
- 40 : zum Büschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, et al. Recruitment of PKC-betaII to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70. *Leukemia*. 2010;24:141-152.
- 41 : Kalla C, Scheuermann MO, Kube I, et al. Analysis of 11q22-q23 deletion target genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence for a pathogenic role of NPAT, CUL5, and PPP2R1B. *Eur J Cancer*. 2007;43:1328-35.
- 42 : Ougolkov AV, Bone ND, Fernandez-Zapico ME, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2007;110:735-42.
- 43 : Maurer U, Charvet C, Wagman AS, et al. Glycogen Synthase Kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell*. 2006;21:749-760.
- 44 : Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, et al. The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene* 2009;28:3261-3273.
- 45 : Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* 2009;114:1029-1037.

Table 1 :Characteristics of CLL patients.

Pt #	Gender	Age	Binet stage	WBC 10 ⁹ /L	Rx line	CD38 %	β2m mg/l	IgVH M/UM	FISH	Karyotype
1	M	58	B	42	1	17	2.86	M	del 11q	del 11q
2	M	73	C	62	1	54	9.16	UM	del 17p	del 17p
3	M	42	B	85	1	67	4.27	UM	del 13q	del 11 q
4	M	77	A	26	0	2	nd	M	normal	normal
5	M	59	C	53	1	16	3.91	UM	nd	nd
6	F	57	C	135	4	10	12.5	nd	del 17p	del 13q, t(1;17), t(4;6)
7	M	77	B	127	1	nd	nd	nd	normal	normal
8	M	73	C	111	1	41	8.5	nd	del 13q	del 6q, 6p,10q, and 13q
9	M	70	C	50	2	nd	nd	UM	del 17p	del17p
10	F	78	A	96	3	35	nd	nd	del 17p	del 17p, 13q and 18q
11	F	70	A	83	1	nd	3.9	UM	del 13q	del 13q
12	M	51	A	21	1	2	1.7	M	normal	normal
13	M	73	A	58	1	3	nd	nd	del 13q	del 13q, t(8 ;12)
14	M	53	B	34	0	57	3.6	UM	del 11q	del 11q, t(1 ;2), t(10 ;15)
15	F	56	C	250	2	nd	nd	UM	del 17p	del 13q, t(8 :9), t(15 ;17)
16	F	53	A	102	0	1	5.37	UM	normal	normal
17	M	63	B	187	1	27	nd	UM	del 17p	del 17p, del 8q
18	M	77	A	56	0	1	4.53	M	normal	normal
19	M	77	C	61	1	2	nd	nd	nd	nd
20	F	75	A	30	3	nd	nd	nd	normal	normal
21	M	70	A	71	0	nd	2.7	M	normal	normal
22	M	77	C	82	1	46	5.42	UM	normal	del 6q, 6p, and tri12
23	M	67	A	69	0	1	2.76	M	normal	normal
24	F	68	B	103	1	15	3.66	UM	normal	normal
25	M	72	A	80	1	43	nd	nd	del 11q	del 11q
26	M	64	A	95	1	nd	nd	nd	nd	nd
27	M	57	C	98	1	1	2	M	normal	normal
28	M	69	A	42	2	7	nd	nd	normal	normal
29	F	65	C	337	2	47	nd	UM	normal	tri12, t(14 ;19), del9p/7q
30	M	75	C	34	4	75	5.57	UM	del 11q/17p	del11q, del17p 7%

nd : not done, UM/M : unmutated/mutated IgVH, WBC : white blood cells. Resistant patients are indicated in bold numbers.

Legends to Figures

Figure 1: Enzastaurin induces down-modulation of key pro-survival Mcl-1 and serine 70 phospho-Bcl-2, and caspase-dependent death in responding CLL samples. (A) In 30 patients, cell survival curves with Enzastaurin 5 μ M at day 0-5 were plotted, and responding/resistant patients defined as having less or more than 50% survival at day 5, respectively. (B) After 48h incubation, Enzastaurin induced PARP cleavage, down-modulation of Mcl-1 and dephosphorylation of residue Serine 70 of Bcl-2. Result shown is representative of ten responding patients (C) Broad caspase inhibition with 5 μ M Z-VAD-fmk (1h before adding drug) abrogates Enzastaurin-induced cell killing measured after 48h of treatment in 3 patients. * means student $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Figure 2: Biomarkers of Enzastaurin activity include dephosphorylation of GSK3 β and Bcl-2. (A) Enzastaurin does not induce either dephosphorylation of Serine 660 pan-PKC residue, nor Serine 473 Akt residue, despite previous reported studies (n=30). (B) Dephosphorylation of GSK3 β is a reliable biomarker, complete in responding patients (n=19), incomplete or absent in refractory patients (n=11), as soon as 30mn of Enzastaurin 5 μ M exposure. Dephosphorylation of Bcl-2 (in patients with baseline detectable levels) is also a biomarker for Enzastaurin activity, since it is only noticed in responding patients.

Figure 3: Enzastaurin activates PP2A activity to mediate its downstream cellular effects. (A) PP2A catalytic subunit was immunoprecipitated after 4h after drug treatment, and its activity against a specific phospho-substrate measured using a non-radioactive malachite green assay. Pre-incubation for 2h with 5nM Okadaic Acid blocked phosphatase activity, further suggesting PP2A activity was specifically measured (n=5). (B) OA augments Mcl-1 levels and phosphorylation levels of GSK3 β and Bcl-2 (but not β -catenin), and leads to decreased PARP cleavage (a surrogate for caspase activation), in cells treated or not by Enzastaurin 5 μ M for 24h (n=15). (C) FTY720 and Enzastaurin both activate PP2A, but downstream signaling targets diverge, as shown for GSK3 β dephosphorylation, suggesting different PP2A complexes to be regulated (n=4). OA: okadaic acid, * means $p < 0.05$.

Figure 4: PP2A activation is required for Enzastaurin-induced cell death. (A) Pre-incubation for 2h with 5nM Okadaic Acid leads to significant reduction of cell killing with Enzastaurin 5 μ M for 48h (n=6, $p = 0.02$). (B) Preliminary siRNA down-modulation of the catalytic subunit of PP2A leads to increased CLL resistance towards Enzastaurin treatment, 5 μ M for 24h (Enza was 24h after nucleofection of CLL cells, n=4).

Figure 5: PP2A catalytic subunit dephosphorylation of Tyrosine 307 inhibitory residue is observed upon Enzastaurin treatment. (A) Classic inhibitors of PP2A (PKC α , SET transcriptional repressor) are not regulated by Enzastaurin treatment (results shown: 5 μ M for 4h, n=8). (B) Inhibitory site Tyr307-PP2A is dephosphorylated upon exposure to enzastaurin (results shown: 5 μ M for 4h, n=8), suggesting either autodephosphorylation of PP2A by itself, or regulation of a tyrosine kinase aiming PP2A catalytic subunit. (C) SRC kinases are not involved in Tyr307 PP2A phosphorylation, despite complete abrogation of Tyr416 pan-SRC kinases residues upon treatment with a broad SRC family kinases inhibitor, Dasatinib (results shown: 300nM for 20mn, n=3).

Figure 6: Enzastaurin sensitizes CLL cells towards various agents. (A) In five patients resistant to Enzastaurin (as emphasized by high cell survival after 96h treatment and absent dephosphorylation of GSK3 β), and with moderate response to Fludarabine alone, combination of both drugs leads to significant increase of cell death, as compared to that observed with Fludarabine 1 μ g/ml alone (p<0.05). (B) Combination therapy Fludarabine+Enzastaurin yields higher caspase activation (as measured by PARP cleavage), decreased total Mcl-1 levels, and reduced phosphorylation status of Serine 70 Bcl-2 (but not GSK3 β), emphasizing the potential benefit of such an association (n=5). (C) In 3/12 patients, 24h Enzastaurin pre-incubation, followed by an extra 2 days treatment with 10 μ g/ml IgG1 or Rituximab, leads to a synergistic potentialization of direct apoptotic effects of Rituximab.

Figure 7: Enzastaurin inhibits CLL/NLC dialogue. (A) In all 30 patients, 5 μ M Enzastaurin inhibited NCL outgrowth after 15 days of culture (result shown is a representative case with rapid outgrowth). (B) and (C) Established NLC can partially rescue CLL cells from apoptosis triggered by Enzastaurin. After 15 days, CLL cells were removed from adherent NLC, kept in the same conditioned medium, and replaced onto either NLC or a 6-well plate, for 5 days of culture with 5 μ M of either DMSO or Enzastaurin. CLL cells were again removed from NLC (which were counted under an inverted microscope), stained with Annexin V/PI apoptosis detection kit, and % of surviving cells was calculated as % of Annexin V/PI double-negative cells (n=9/15 patients). In three cases, we checked GSK3 β dephosphorylation and PARP cleavage in NLC without CLL (drug treatment for 24h), to show that a direct anti-NLC effect was unlikely to occur upon Enzastaurin treatment.

Figure 1

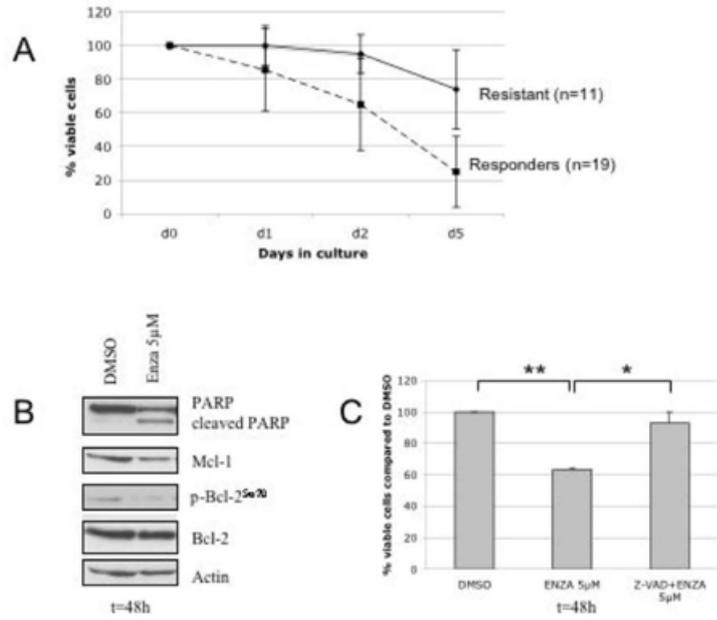


Figure 2

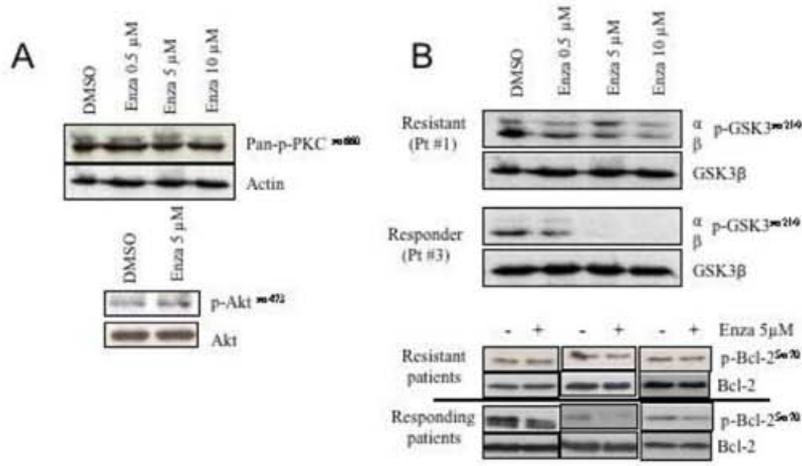


Figure 3

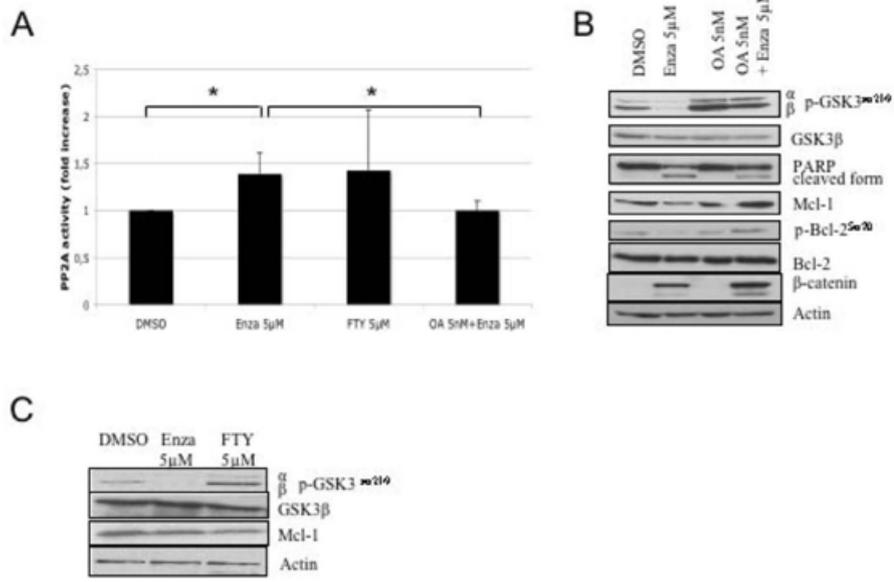


Figure 4

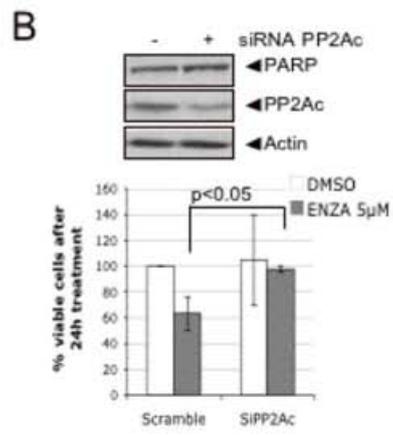
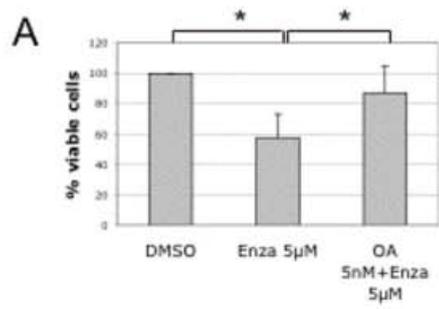


Figure 5

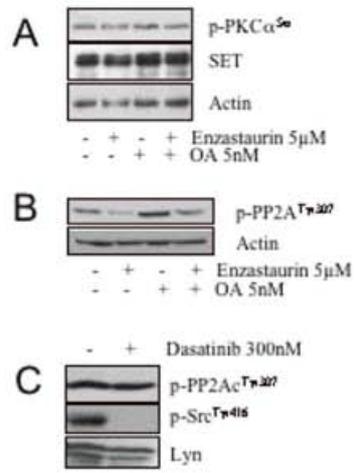


Figure 6

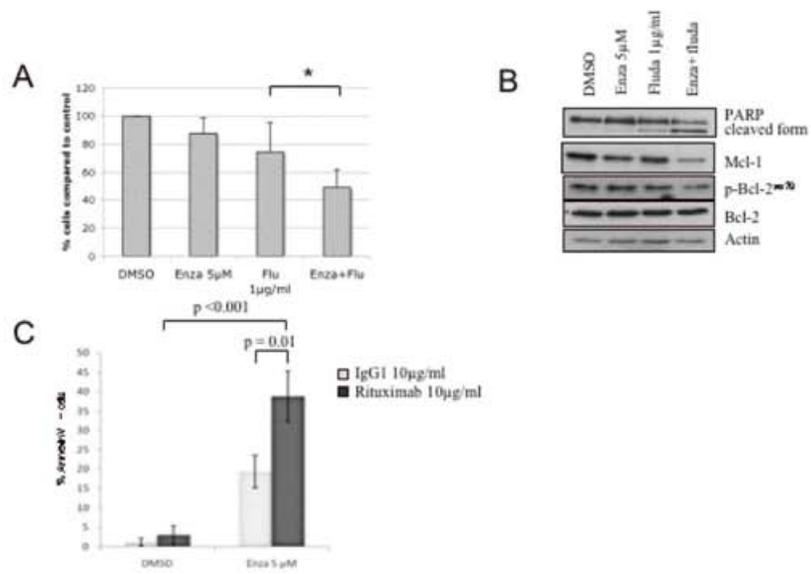
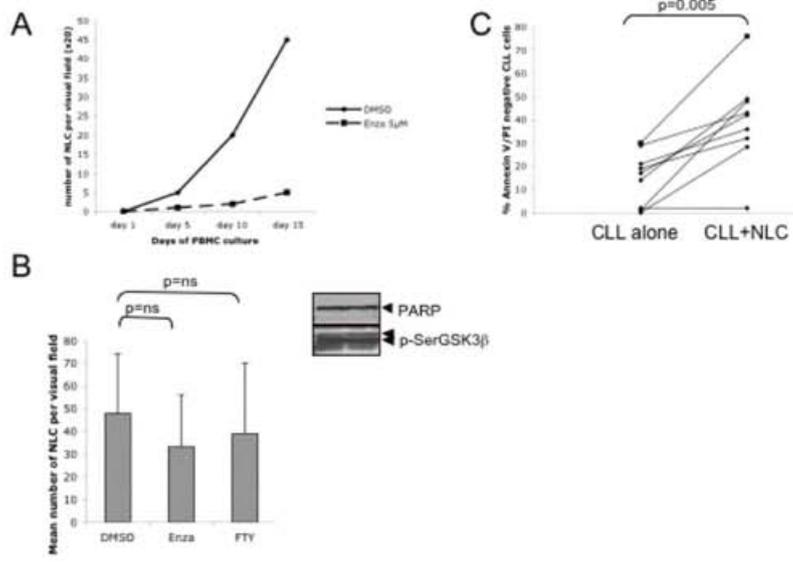


Figure 7



Article 2 :

Emerging Concepts for the Treatment of Hematological Malignancies with Therapeutic Monoclonal Antibodies

Capietto AH, **Keirallah S**, Gross E, Dauguet N, Laprévotte E , Jean C, Gertner-Dardenne J, Bezombes C, Quillet-Mary A Guy Laurent G and Fournié JJ

Curr Drug Targets. 2010 Jul;11(7):790-800

Emerging Concepts for the Treatment of Hematological Malignancies with Therapeutic Monoclonal Antibodies

Aude-Hélène Capietto^{1,2,5}, Samarh Keirallah^{1,2,5}, Emilie Gross^{1,2,5}, Nicolas Dauguet^{1,2,5}, Emilie Laprévotte^{1,2,5}, Christine Jean^{1,2,5}, Julie Gertner-Dardenne³, Christine Bezombes^{1,2}, Anne Quillet-Mary^{1,2}, Guy Laurent^{1,2} and Jean-Jacques Fournié^{1,2,4}

¹INSERM, U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, 31300 Toulouse, France;

²Université Toulouse III Paul-Sabatier, 31300 Toulouse, France;

³INSERM UMR 891, Institut Paoli Calmettes, 13009 Marseille, France

⁴Corresponding author: jean-jacques.fournie@inserm.fr

⁵ these authors contributed equally to this review

Summary

The development of therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) has revolutionized the treatment of cancer along the last ten years. The best examples of their therapeutic efficacies have been obtained with rituximab for the treatment of CD20⁺ B-cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL), and several others antibodies with optimized bioactivities are now being developed for the treatment of various malignant hemopathies. We review here the main drugs developed in this field, and present some emerging concepts able to improve the bioactivities of the next generation of therapeutic mAbs.

Introduction

Along the last ten years, monoclonal antibodies (mAbs) have revolutionized the treatment of cancer. This peculiar class of anticancer drugs has successfully demonstrated the efficacy of targeted therapies, most notably in the treatment of haematological malignancies. Clearcut therapeutic success were obtained with the anti-CD20 rituximab for CD20⁺ NHL and since then allowed more than 500,000 patients worldwide to benefit this drug [1-3]. The anti-CD52 alemtuzumab (Campath-1H) has proven efficacy in B-Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)[4], the anti-CD33 gemtuzumab-ozogamicin is useful for treating acute promyelocytic leukemia, and other new mAbs are now emerging for these diseases. In addition, radio-immuno-conjugates such as ibritumomab tiuxetan (Zevalin) and ¹³¹I-tositumomab(Bexxar, which comprises both radiolabeled and unconjugated tositumomab). Several hundreds of new mAbs are now in clinical development. As a therapeutic class, these new drugs will represent by 2010 about 40% of the global biodrug market (42 billion US\$), and will show the greatest growth rate in the pharmaceutical industry for the next decade. Of the rapidly expanding list of mAbs currently in clinical trials, one might have predicted that this therapeutic class would completely dominate the list of approved anticancer drugs. But on the 2009 market however, there are only 29 of these reagents, they comprise 5 murine, 5 chimeric, 12 humanized and 4 fully human mAbs

(see: <http://www.imgt.org/textes/IMGTrepertoire/GenesClinical/monoclonalantibodies>).

Furthermore, they only target a handful of specificities addressing malignant hemopathies (Table 1).

Table 1: Representative monoclonal antibodies for treatment of haematological malignancies

Monoclonal antibody	Isotype	Antigen	Trade name	Target disease
Rituximab	IgG1	CD20	Rituxan	NHL
Apolizumab	IgG1	HLA-DR	Remitogen	NHL, CLL
Epratuzumab	IgG1	CD22	LymphoCide	NHL, B-ALL
Gemtuzumab ozogamicin	IgG4	CD33	Mylotarg	AML
Alemtuzumab	IgG1	CD52	Campath	CLL
Ibritumomab tiuxetan	IgG1	CD20	Zevalin	NHL
Tositumomab	IgG2a	CD20	Bexxar	NHL
Lumiliximab	IgG1	CD23		CLL

Ofatumumab	IgG1	CD20	Arzerra	Refractory CLL
Lintuzumab	IgG1	CD33	HuM195	AML
1-7F9	IgG4	NKIR	Kiromab	AML, MM, Sézary
Inotuzumab ozogamicin	IgG4	CD22	CMC-544	NHL, CLL
Iratumumab	IgG1	CD30	MDX060	Hodgkin's L, ALCL
Veltuzumab	IgG2a	CD20	IMMUNO106	NHL, CLL
Ocrelizumab	IgG1	CD20	rhumAb	Refractory NHL, CLL
Siplizumab	IgG1	CD2	MEDI-507	T-cell leukemia
Zanolimumab	IgG1	CD4	HuMax-CD4	Sezary, CTCL, T-lymphoma
Daclizumab	IgG1	CD25	Zenapax	HLTV-I ⁺ ATL

Regardless of the survival advantage conferred by therapeutic mAbs however, most of the patients with hematological malignancies ultimately relapse with tumors developing therapeutic resistance and die of their disease. There are many reasons, essentially related to the natural defences of malignant cells, accounting for why such antibodies progressively become inefficient. The emergence of immune-escape tumor cell variants is a frequent outcome of the Darwinian selection driven by these cytolytic drugs. Altogether, antigen-loss, antibody pharmacokinetics, pharmacodynamics, on-target and off-target side-effects as well as post-opsonization cytolysis might also contribute to cancer immunoevasion and the yet insufficient patient benefit. Since considerable research efforts have provided us with better knowledge on the molecular basis by which these pejorative processes operate however, new options are now envisaged to improve the therapeutic efficacy of mAbs in onco-hematology.

Progressive optimization of therapeutic monoclonal antibodies

The concept of magic bullet is not a new one indeed, the “magic bullet that selectively targets disease” was envisioned in 1908 by Paul Ehrlich[5], but remained almost devoid of application for almost a century. The advent of therapeutic mAbs resulted from a suite of technological developments based on the fundamental invention of the mAb-producing hybridoma technology by Kohler and Milstein in 1975[6]. This provided researchers with immunoglobulins capable of highly specific associations with their targeted antigens, but effective mAb-based therapeutics for the treatment of cancer have proven more difficult to produce than originally envisioned. Owing to their murine origins, the first generation of mAbs evaluated in the clinic was limited by their poor ability to recruit immune effectors in humans and their intrinsic immunogenicity (induction of human anti-mouse antibodies, HAMA)[7]. These pitfalls were progressively overcome by the generation of chimeric and humanized mAbs that contain human Fc domains and keep the genuine targeting specificity by incorporating parts of the murine variable regions. This was accomplished by engrafting either the entire murine V segments (chimeric antibodies) or their complementarity-determining regions in the human IgG framework (humanized antibodies). Finally, the transition to fully human IgG was obtained by immunizing mice transgenic for whole human Ig locus (Fig. 1) (see [8] for review).

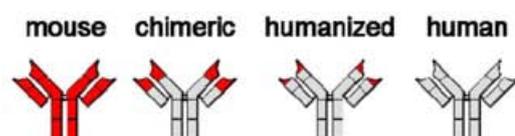


Figure 1: successive generations of therapeutic monoclonal antibodies. The murine sequences (red) from the mAb structure have been progressively replaced by human sequences (grey). The generic names indicate the type of structure as follows: “omab”: fully murine IgG, “ximab”: chimeric IgG, “zumab”: humanized IgG, “mumab” fully human IgG.

Among the various Ig isotypes, most of therapeutic mAbs with human backbones are now of the IgG1 isotype which optimally mediates Fc domain-based functions, such as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement fixation. Other isotypes, such as human IgG2 or IgG4, have been used when the mAb was designed to act only by antigen-binding properties, as exemplified by the anti-VLA4 natalizumab[9] and anti-C5 eculizumab[10]. Further modifications to create mAbs with more human characteristics have attenuated the foreign nature of these proteins and allowed them to efficiently interact with the Fc receptors expressed on immune effector cells. More recently, the IgG1 Fc-Asn297 N-glycoconjugate was delineated as the specific Fc R3A-interacting ligand which induces ADCC (Fig. 2). This

oligosaccharide was therefore modified, mostly by defucosylation, such as to increase ADCC efficacy [11, 12]. This approach was developed by Glycomab (Roche-Glycart, see: <http://www.glycart.com>), EMABling (LFB, see: <http://www.lfb.fr>), Potelligent (Kyowa/Biowa, see: <http://www.potelligent.com>) to produce the currently emerging generation of therapeutic mAbs with optimized ADCC [13]. Since the glycosylated mAb-secreting cells are currently based on either of CHO, NSO, SP2/0 or hybridoma cell cultures yielding about tens of mAb picogram per cell per day, the industrial bioproduction of mAbs requires large bioreactors of up to 15,000 liters to fulfil the average of yearly worldwide needs, estimated to around a ton for most mAbs [14].

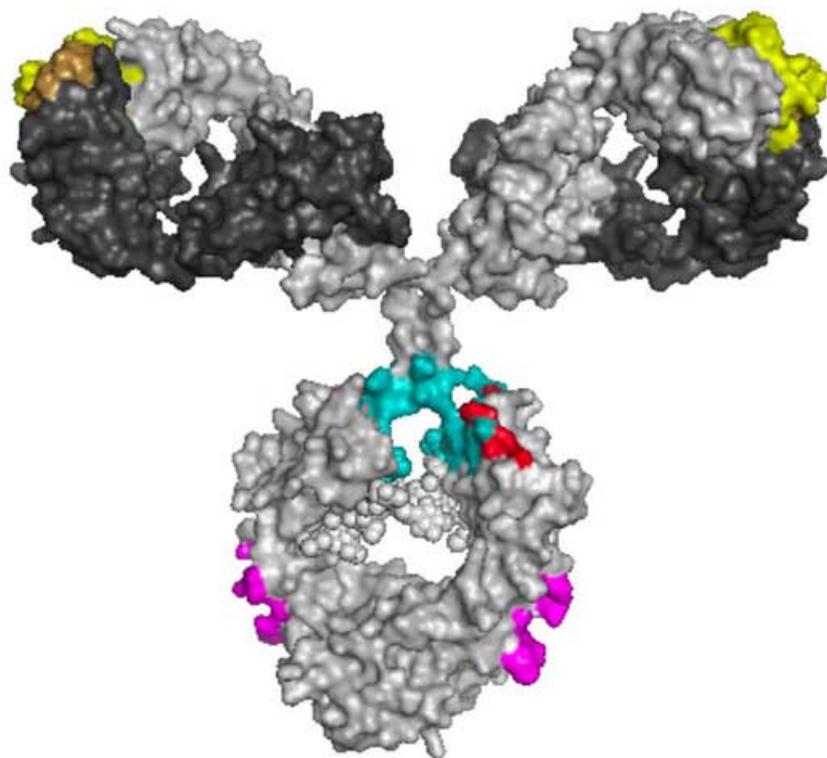


Figure 2 : The anti-CD20 chimeric IgG1 rituximab. Coloured regions indicate the light chains (dark grey) and heavy chains (light grey). The CD20-complementarity-determining regions from both chains are shown in the corresponding yellow colours. The Asn297 N-glycoconjugate is shown as white balls, while heavy chain aminoacid residues possibly involved in interactions with Fc R are featured in light blue, those interacting with C1q are shown in red and the FcRn-binding residues are shown in pink. The IgG isotype determines the efficacy of therapeutic mAbs for two main reasons. First, the IgG half-lives in the blood are significantly different according to the isotype, with approximately 21 days for IgG1, IgG2 and IgG4, versus approximately 7 days for IgG3. Second, their bioactivity may comprise and cumulate any of the four distinct mechanisms according to the isotype, since human IgG subclasses have distinct capabilities to activate the classical complement pathway and to bind Fc γ -receptors (see text).

Molecular bioactivity of therapeutic monoclonal antibodies

The bioactivity of therapeutic mAbs encompasses four distinct and complementary mechanisms of bioactivity (reviewed in [15, 16]). These comprise: i) direct binding to the targeted antigen, which induces various intracellular signalling and responses of the target cell, ii), complement-dependent cytotoxicity (CDC), iii) phagocytosis and iv) antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) by cells releasing cytolytic molecules (Fig. 3).

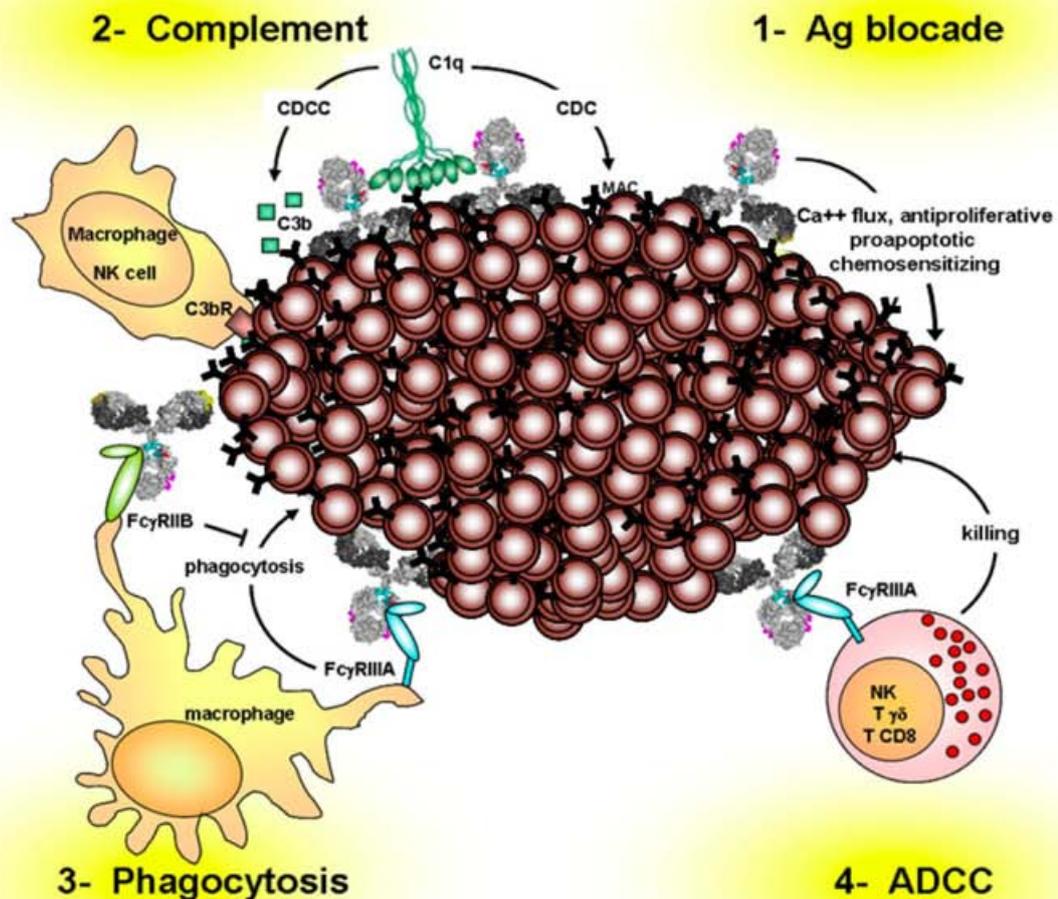


Figure 3: Mechanisms of therapeutic antibody bioactivity. The binding of a mAb to a tumor cell mass may induce one or several of the following bioactivities according to the IgG isotype. Antigen blockade is a primary mode of action, to which other bioactivities may superimpose according to the IgG isotype. IgG1 and IgG3 can activate the classical complement pathway and interact with Fcγ receptors more potently than IgG2 or IgG4. In addition, this latter cannot activate the classical complement pathway. The other mechanisms involve complement-mediated cytotoxicity (CDC), phagocytosis and ADCC (see below).

1-Direct consequences of antigen blockade. MAb-induced blockade of the targeted antigen is able to trigger/interfere/antagonize several distinct intracellular signalling according to the antigen and the tumor cell type. Typically, this may comprise antagonism on a targeted receptor (e.g. ERB2 blockade by trastuzumab), induction of anti-proliferative responses, delivery of pro-apoptotic signalling, induction of cytostatic signals, perturbation of intracellular homeostatic signalling. Selective induction of tumor target cell death may conveniently be achieved by targeting the extrinsic apoptotic pathway death receptors by agonistic monoclonal antibodies to TRAIL-R1 (mapatumumab) and TRAIL-R2 (lexatumumab) in solid tumors as well as in haematological malignancies [17-20]. The direct effect of MAb/antigen binding was firstly characterized with the anti-CD20 rituximab, which induces *inter alia* the direct apoptosis of some –but not all– CD20⁺ B-cell lymphomas, and/or sensitizes these latter to chemotherapeutic regimens. The function(s) of the CD20 molecule comprise at least Ca⁺⁺ channel activity. Accordingly, CD20 binding by rituximab alters intracellular Ca⁺⁺ fluxes and triggers a cytostatic or pro-apoptotic cascade in different lymphoma cell lines. This binding also recruits in the targeted cell membrane an acidic sphingomyelinase which enzymatic activity releases ceramide. This lipid mediator triggers a pro-apoptotic cascade and inhibits the constitutive signalling of

Syk/PKC /mTOR/P70S6K in targeted NHL cells [21, 22]. In diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), the binding of rituximab inhibits the MAK/NF B module and anti-apoptotic Bcl-2 [23]. We recently demonstrated that rituximab binding to CD20 redistributes this marker in membrane rafts, but also blocks the recruitment of the B-cell receptor (BCR) in the rafts, thereby inhibiting its signalling from the NHL cell surface [24]. Another example of tumor cell pathways down-modulated by a therapeutic mAb is provided by epratuzumab, which is used for treating B-NHL. This antibody targets cell surface CD22, a negative regulator of mitogenic signaling in B-cells, which internalization is able to recruit the SHP-1 phosphatase [25]. By this activity, epratuzumab dampens the chronic hyperactivation of the targeted NHL cells [26, 27].

2-Complement-dependent cytotoxicity (CDC): by interacting with the constant region of the mAb (Fig.2), the complement factor C1q activates a proteolytic cascade of the classical complement pathway which forms a membrane-attack complex (MAC) lysing the target cells. Of note, the C3b generated during this reaction also facilitates complement-dependent cell-mediated cytotoxicity (CDCC), a reaction of phagocytosis and cytolysis triggered by the C3b binding to the C3bR expressed by macrophages and NK cells. IgG1 and IgG3 are both very effective and more potent than IgG2 at activating CDC, whereas IgG4 cannot activate it, making CDC a major mechanism of bioactivity by most therapeutic mAbs. In the CDC cascade, the formation of antigen-antibody complexes on a tumor cell clusters multiple binding sites for C1q in close proximity on the CH2 domains of participating IgG molecules. These C1q-binding sites convert the previously low-affinity C1q-IgG interaction to a high avidity binding site which triggers with a series of other complement proteins a proteolytic cascade releasing the effector-cell chemotactic/activating agents C3a and C5a. The complement cascade finally assembles membrane attack complexes which create cell membrane pores that facilitate diffusion of water and metabolites [28]. Normal cells need to express the complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 to avoid their own attack by complement. Unfortunately, expression of these complement-regulatory proteins is often deregulated in tumors, and these are frequently showing at the same time loss of one or more inhibitors and overexpression of the others [29, 30]. The contribution of CDC to immune mechanisms underlying therapeutic mAb bioactivity and the role of complement factors as an effector mechanism are still debated[31, 32]. On the one hand, the mAb surface density on target cells might suffice to induce CDC. On the other hand however, rituximab aggregates with CD20 in membrane rafts bind efficiently to C1q and C3b which activates CDC [33]. Along this line, both complement depletion and C1q-deficient mice showed reduced or abolished efficacy of rituximab in murine lymphoma models [34]. In addition, during the complement activation cascade, C3b generation triggers phagocytosis and cellular lysis through the engagement with C3b-receptor macrophages, NK cells and polymorphonuclear leukocytes. Other activated complement factors such as CD3a and C5a might also facilitate inflammatory responses to efficiently eliminate tumour cells. The second generation of anti-CD20 ofatumumab is potentiated in both CDC, as well as for ADCC[35].

3-Phagocytosis. Tumor cell antigens coated by any molecular aggregate (opsonins) stimulate their engulfment upon phagocytosis by macrophages or neutrophils. Opsonins may comprise IgG but also components of the complement factors (C1q, C3b, iC3b, C4b) coated on target cell membranes. By interacting with receptors for Ig or complement on the immune cells, the coated tumor cells trigger distinct phagocytic activities. MAb/Fc R-induced phagocytosis initiates a Cdc42/Rac-mediated pro-inflammatory cascade, whereas phagocytosis of complement-opsonized targets, induced by the CR3/ C3bi interaction, has a different process and outcome. Upon binding of mAb-coated tumor cells through their Fc receptors the phagocytes are immediately activated, ingest the targeted cancer cell and drive it to lysosomes where the cell is eliminated [36-40]. In DC, but not in other cell types however, Fc R-mediated transport leads internalized antigens to the cytosol, where moderate degradation by the proteasome produces peptides that are further translocated into the lumen of the ER, loaded on MHC class I molecules and recycled by cross-priming as cell surface antigens presented to CD8 T lymphocytes. Thus mAbs targeting tumoral antigens to Fc γ R thus increase considerably the antigen cross-presentation, an essential starter to adaptive immunity [41-43]. So, mAb-induced phagocytosis is essential, not only for tumoral clearance, but also to establish long-lasting (adaptive) anti-cancer immunity. Fc Rs can be functionally considered as antigen receptors since most Fc γ Rs do not bind IgG,

unless these latter are aggregated by multivalent antigens trapped as immune complexes. Thus, activatory receptors Fc γ R2 (CD32) and Fc γ R3 (CD16) bind monomeric IgG quite inefficiently, but bind immune complexes with very high affinity. Fc γ RI (CD64), in contrast, binds monomeric IgG with high affinity, but, like high affinity receptors for IgE, it does not signal unless IgGs are cross-linked by their specific polymeric ligands. Furthermore, these phagocytic cells may also express the Fc R2B which, upon binding to the same aggregates, may deliver inhibitory intracellular signalling able to block the phagocytosis. Human tumor therapy with trastuzumab or rituximab in xenogeneic mouse models requires activatory Fc γ Rs and was regulated by inhibitory Fc γ R2B [44]. Rituximab treatment of B-CLL and mantle cell lymphoma also triggers removal of a minor proportion of the CD20 antigen from the targeted cancer cell surface, through a trogocytic process referred to as “shaving” by mAb-activated macrophages. This reaction was also detected in other tumor models treated with various mAbs, and could possibly contribute to accelerate emergence of tumor escape cell variants [45-48].

4-Antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC). ADCC is the attack of an antibody-coated target cell by an Fc R+ cytolytic lymphocyte releasing lytic granules to the targeted cell. The human genome encodes several families of Fc receptors, and specific lymphoid cell populations characteristically express only some of them. For example, neutrophils commonly express human Fc RI (CD64), Fc RII (CD32) and the B (lipid-anchored) isoform of Fc RIII (CD16). By contrast, some cytotoxic lymphoid cell types expressing perforin granules (NK, T and CD8 T) and only the A isoform of CD16 (Fc RIIIA) are potent mediators of ADCC and able to kill mAb-targeted tumor cells. The transmembrane Fc RIIIA structure facilitates recruitment of adaptor proteins and activation of natural killer cells by antibody engagement of CD16. Within seconds upon IgG1 binding to CD16 dimers, the lytic synapses of killer lymphocytes focalise massive releases of cytolytic perforin granules to tumor cell targets which die ~5 minutes later (Fig. 3). In addition, most cells mediating ADCC not only need IgG-coated target cells to activate ADCC, but they also involve killer inhibitory receptors (KIR) for self HLA class I molecules. KIR/self HLA class I interactions at the surface of the lymphoid cells enables them to avoid ADCC of autologous cells, in a deleterious fratricide lysis. Since tumors frequently show partial loss or total deletion of HLA-I molecules, presumably to escape cytolytic CD8 T lymphocytes, they are thus preferentially targeted by KIR+ killer cells such as NK or T cells. Although many anti-tumor mAbs have been shown to mediate ADCC in vitro, the contribution of this mechanism to clinical efficacy was a matter of debate. The importance of Fc-receptor interactions was investigated in mice by examining the anti-tumor activities of therapeutic mAbs against human tumor xenografts growing either in wild-type or Fc RII/III^{ko} mice. Anti-tumor activity was diminished in the Fc R^{ko} mice and was either preserved or enhanced when only the inhibitory Fc -receptor isoform was deleted [44]. Hence, Fc-receptor interactions underlie anti-tumor efficacy in mice and may be important as well for the activity of selected mAbs in the clinic.

The importance of ADCC in the clinical bioactivity of mAbs developed for oncology has been initially underestimated. Actually, there was little published evidence that ADCC contributed significantly to clinical responses, before the finding that human Fc γ RIIIA is dimorphic, with either phenylalanine (F) or valine (V) at position 158. This residue directly interacts with IgG1, making this allotype a critical determinant of the rituximab efficacy. In lymphoma patients with Fc gamma-receptor III 158V, the response to rituximab was found superior than in patients with Fc γ RIIIA-158F [49]. In addition, both better IgG1 binding to Fc RIIIA, functional and clinical responses did not result from an increased expression of this allotype on the effector NK cells [50]. This formally demonstrated that ADCC is a major mechanism of action underlying the clinical efficacy of rituximab in B-cell lymphoma [51]. This conclusion also applies to other thereapeutic IgG1, since Fc γ RIIIA polymorphism turned out to impact on therapeutic activity of the other IgG1 trastuzumab or alemtuzumab [52].

An important aspect supporting the development of novel ADCC-based therapeutic antibodies is that ADCC not only induces immediate tumor destruction, but might also contribute to antigen cross-presentation with further induces antigen-specific T-cell and antibody response [41, 53, 54]. The induction of such antitumor adaptive immunity might actually underlie some long-lasting responses to therapeutic mAbs, and certainly justifies the development of new strategies potentiating ADCC by therapeutic mAbs.

Monoclonal antibodies in B-Cell Non Hodgkin Lymphoma

Malignant lymphomas are subdivided between Hodgkin's lymphomas (HL) and non Hodgkin's lymphomas (NHL) which comprise a large variety of diseases. HLs are commonly associated with Epstein Barr virus (EBV) and affect both children and adults, while NHL are associated with several etiologic factors such as immunodeficiency and exposure to pesticides or chemicals among others. NHL are the third most common haematological malignancies in children but they also affect adults. The most common and aggressive NHL subtype are diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL; about 40% of NHL) and follicular lymphoma (FL; about 20% of NHL); other NHL comprising mantle cell lymphoma (MCL), marginal zone lymphoma (MZL, MALT etc.) are less frequent.

NHL and more precisely FL represent the haematological malignant disease for which therapeutic mAbs have demonstrated efficacy. Classical treatment of FL at stage I and II (15-20% of patients) is radiotherapy, resulting in long-term disease-free survival and probable cure in approximately 45-80% of patients. In the majority of patients however, FL is diagnosed at a more advanced stages. In these cases, different therapeutic options are available ranging from single agent to combination chemotherapy, unfortunately with no major impact on survival of FL patients. Thus, new treatment modalities have been developed, including myeloablative therapy followed by autologous stem cell transplantation (ASCT) and monoclonal antibodies, either with an intrinsic anti-lymphoma activity or as carriers for radioisotopes or immunotoxins. As a single drug-based treatment, rituximab demonstrated a first efficacy in relapsed FL patients, which, upon four weekly injections (375 mg/m²), showed 60% of global response (GR) with up to 15% of complete responses (CR)[1-3]. Furthermore, as a first line treatment for patients with low tumor mass, the same regimen gave up to 80% of GR and up to 35% of CR [55-58]. Further pilot studies established the reference FL treatment as association of rituximab with chemotherapy (either of R-CHOP, R-FCM or R-CVP)[21, 59-62]. Following such immuno-chemotherapies, current maintenance regimens with rituximab confer a better control of the disease on the long term [63]. The anti-CD80 galiximab showed bioactivity in patients with relapsed or refractory follicular lymphoma [64, 65]. Because of the inherent radiosensitivity of FL and the expression of CD20 on the B cell surface, new protocols based on radio-immunotherapy were also developed to associate monoclonal antibodies and radioelements. Such radio-immunotherapy represents a highly attractive and promising approach for the treatment of FL. As an example, clinical studies with ⁹⁰Y-labeled murine antibody ibritumomab (Zevalin) [66, 67] or the ¹³¹I-labeled antibody tositumomab (Bexxar) [68-70] showed response rates of 60-80% and complete response/complete remission rates between 15-44% in non-myeloablative approaches.

The R-CHOP regimen has become the standard of care for patients with DLBCL, for which the antibody has brought a significant increase in terms of both GR and CR. In this disease, introducing rituximab to the CHOP regimen convincingly improved the overall patient's survival, whatever the patient's IPI (international prognostic index) score [71-73]. Myeloablative radiochemotherapy followed by ASCT is an effective treatment for young patients (<65 years) which improves both duration of response and overall survival. Even for the most aggressive DLBCL or MCL, the patients receiving ASCT show better survivals when treated early with a CHOP regimen combined to Rituximab [74]. Rituximab has also demonstrated activity against B-CLL (see below) and for some hairy cell leukaemia, for which several other mAbs have therapeutic potential [75]. In patients with more indolent MALT or other extranodal lymphomas, rituximab alone or with new associations are encouraging, whereas in advanced disseminated diseases, the reference therapeutic choice remains R-CHOP [76, 77].

Monoclonal antibodies in B-Cell Leukemia

Leukemia are usually sub-divided in four different clinical entities: acute lymphocytic leukaemia (ALL), chronic lymphocytic leukaemia (CLL), acute myelogenous leukaemia (AML) and chronic myelogenous leukaemia (CML). Among them CLL and specially B-lineage CLL (B-CLL) is the most common leukemia in adults in the western countries, representing about 30% of all leukemias. B-CLL is a disease of the elderly, with 90% of cases occurring after 50 and a median age of presentation of 65. The standard first line treatment for many patients with B-CLL is based on chemotherapy by FC protocol. Nevertheless, long-term remissions are

not frequently observed with it, leading to the association of FC with mAbs in first-line therapy. Despite profound lymphoid cell depletion from circulating blood compartment, this treatment does not affect the NK cell's ability to reconstitute and mediate ADCC several weeks after chemotherapy. Two major therapeutic mAbs are currently used for this disease: rituximab [78] and the anti-CD52 alemtuzumab [79]. A recent clinical study showed a high efficiency for FC in association with rituximab (FCR): 66% CR and 14% of partial response [80]. Among patients with CR, 59% had no residual disease after one year. Nowadays, the FCR regimen is the standard of care for B-CLL [81]. Alemtuzumab (Campath) is a mAb directed against the CD52 antigen expressed on normal and leukemic B cells but also on T lymphocytes, macrophages, monocytes and NK cells (reviewed in [82]). The bioactivity of alemtuzumab involves direct induction of apoptosis, CDC and ADCC [83-85]. Regardless of the large expression pattern of the recognized epitope, this antibody is currently used in treatment of advanced or relapsed B-CLL with good response rates [86]. Despite major side effects due to immunosuppression and infections however, alemtuzumab is essential in second-line therapy in fludarabine-refractory patients. The protocols used were based on chemotherapy in combination or not with mAbs. Alemtuzumab is also effective against cutaneous T cell lymphoma and Sézary syndrome, T-cell prolymphocytic leukaemia, adult T cell leukaemia and lymphoma, but it is not yet approved for such treatments [87, 88]. In relapsed CLL, activities were encouraging for the new anti-CD20 ofatumumab [89, 90] and HuMax-CD20 [75], for the anti-CD22 epratuzumab [91, 92], the anti-CD23 lumiliximab [93-96] and the anti-MHCII apolizumab [97-99]. Of note, HuMax-CD20 might also benefit to patients with hairy cell leukemia (HCL) [75].

Monoclonal antibodies in T-Cell NHL and Leukemia

Only 15% of the lymphoid cell malignancies involve cells of the T-lymphocyte lineage, and these have generally a worse prognosis than B-cell lymphomas (BCL). Peripheral T-cell lymphomas (PTCL) comprise distinct histological subtypes: the angioimmunoblastic T lymphomas which commonly express CXCL13 and CD10 (AITL; 23%), the pleomorphic medium and large T-cell lymphomas (PML; 49%) and the anaplastic large cell lymphomas (ALCL; 20%). These diseases are usually treated with chemotherapeutic combinations related to the cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) regimen, but generally have a poor prognosis with 30% of patients alive at 7 years (for AITL). No currently available mAb has been approved for T cell NHL, but several new ones are currently in development for such indications. Siplizumab is a new mAb in development, directed against human CD2, a TCR-associated cell surface receptor for LFA3 responsible for T cell activation in immunological synapses. This antibody was found active in patients with T cell leukemia although some of the treated individuals further developed EBV infections [92, 100, 101]. Daclizumab, an anti-IL2R IgG1 is currently used for preventing renal allograft rejection. This mAb is currently investigated in CD25^{high} T cell leukemias such as HLTV1-associated acute T-cell leukemia and anaplastic lymphoma which cells express a high level of this cytokine receptor [102-105]. Zanolimumab is an anti-CD4 IgG1 which inhibits T cell signalling and activates CDC and ADCC functions leading to CD4 T cell depletions [106, 107]. In phase II trials for cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides and Sezary syndrome, zanolimumab 34% responses in the former, 22% in the latter, and some infectious side-effects [108, 109].

Monoclonal antibodies in Myeloid Leukemia

Current treatment of acute myeloid leukemia (AML) involves induction with the cytotoxic antimetabolite cytarabine combined to anthracyclin, followed by repeated cytarabine regimens and eventually by allogeneic hematopoietic transplantation. These combination chemotherapy produce remissions in AML patients, but the majority of patients ultimately relapse and die with growth of drug-resistant blasts. Most differentiating myeloid cells do express CD33, a marker, which functions remain unclear, but whose expression is significantly upregulated at the surface of more than 90% AML cells. Furthermore, the structure of CD33 comprises cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) which regulate CD33 internalization once bound. Since the anti-CD33 gemtuzumab internalizes once bound to AML cells, its coupling to the highly cytotoxic N-acetyl-calicheamicin (gemtuzumab ozogamicin, Mylotarg) allows the intranuclear release of calicheamicin, a drug which binds to DNA and induces potent cell death (reviewed in

[110-112]. Therapy with gemtuzumab ozogamicin (2 doses of 9 mg/m²) in 3 non-comparative studies produced complete remission in 16% of adult patients with AML in first relapse, and complete remission with incomplete platelet recovery in an additional 13% of patients. Rates of remission did not differ between those aged less than 60 years and older than 60 years. Thus, several studies have well established the benefit of gemtuzumab ozogamicin in combination with chemotherapy for AML and APML patients [113, 114]. Overall, gemtuzumab ozogamicin administered as a single agent has resulted in overall response rates of about 30% in previously relapsed adults AML patients (including also with incomplete platelet recovery). The main mechanism of resistance to gemtuzumab ozogamicin is Pgp-mediated drug efflux [115, 116]. Other antibodies with reported activity in AML include alemtuzumab, new ¹³¹I-CD45 [117, 118] and ¹⁸⁸Re-CD66 immunoconjugates [119, 120]. Finally, gemtuzumab ozogamicin has also showed some efficacy in the treatment of CD33-positive refractory acute lymphoblastic leukemia harbouring the Philadelphia chromosome [113].

Boosting ADCC cell effectors to optimize bioactivities of therapeutic mAbs.

As mentioned above, the major role of ADCC in therapeutic activity of rituximab was made by identifying a major difference of ADCC efficacy and response to this mAb treatment in NHL patients with Fc R3A 158 V/V as opposed to V/F or F/F [49]. Indeed, the optimisation of ADCC-mediating oligosaccharide part of the mAbs will still play a great part in future generations of therapeutic mAbs [121]. Strategies to improve rituximab performance have been discussed previously [122]. Since the cell subsets mediating ADCC are important in this regard, means to enhance their frequency in the circulating blood of patients are of interest. Neither macrophages nor NK cells are specifically expanded during physiological immunostimulations or therapeutic induction by immunomodulatory drugs during cancer immunotherapies, raising the question of how one could possibly boost this ADCC effector cell population.

An hitherto largely unexplored option is to target antigen-specific T cells able to proliferate and to up-regulate cell surface expression of Fc R3A. Cytotoxic CD8 T lymphocytes are induced to express this receptor under stimulating circumstances, but other T cell subsets are also able to do so. A recent study has documented induction of Fc R3A expression by human $\gamma\delta$ T cells, a quantitatively minor subset of circulating T lymphocytes [123]. These T cells are HLA-unrestricted lymphocytes with anti-lymphoma cytotoxic activity, and which specifically respond to stimulation by non-peptide phosphoantigens from malignant cells or infectious microbial pathogens (see for review [124, 125]). Natural and synthetic phosphoantigens stimulating blood cells from human and primates have been characterized and produced under GMP conditions (reviewed in [126]), allowing us to selectively induce a massive expansion (up to 100-fold) of these cells in blood of individuals which received phosphoantigen and IL2 [127]. A few weeks after such injections, the rates of blood cells in recipients have increased on average from 1% to 15% of whole PBMC. In addition, around 10% of these cells expressed only low levels of the Fc R3A marker prior to injection, but those with very level of cell surface Fc R3A consistently comprised about 50% of them at later time points. Thus, the ADCC function of individuals treated with phosphoantigens are greatly increased through the highly selective activation by phosphoantigens of $\gamma\delta$ T lymphocytes in blood. Therefore phosphoantigen association with therapeutic IgG1mAbs does provide better therapeutic efficacies of mAbs directed against tumoral cells. Accordingly, an increased number and activity of blood cell effectors of ADCC was observed one to three weeks after phosphoantigen injection in non-human primates and in human cancer patients [128]. Current phase II clinical trials in relapsed follicular NHL are assessing this concept by measuring the efficacy of phosphoantigen + rituximab association. In addition, ongoing studies indicate that this concept is transposable to other cancers like HER2/Neu⁺ mammary carcinoma targeted by other therapeutic IgG1 mAbs such as trastuzumab (A.H.C. *ms in prep.*)

Along the same line, the concept of inducing a large panel of cytolytic CD8⁺ T cell effectors directed against CD19⁺ B-cell NHL has been also addressed by bispecific mAbs. Such reagents, exemplified by the CD19/CD3-bispecific mAb blinatumomab, were designed to activate and bind every circulating T cell in addition to crosslinking to the tumor cell target. This reagent, which efficiently depletes target CD19⁺ B cells in blood of NHL patients, even at doses as low as 0.005 milligrams per m² per day, seems quite promising for relapsed NHL [129-131]. In this case however, the anti-CD3 specificity drives all T cells to bind the target B-

cells, and thereby possibly delivers a more heterogeneous response than when involving more defined T cell subsets.

Another emerging concept able to boost the cytolytic activity of ADCC NK cell effectors is based on the regulation of cytolytic activity in this peculiar cell subset. NK cells cytotoxicity is induced by activating NK cell cytotoxicity receptors and co-receptors, which comprise *inter alia*, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, Fc R3A, NKG2D, 2-B4 and other cell surface proteins. The lysis-activating function of these cells is counteracted by a broad set of inhibitory NK cell receptors for HLA class I molecules (collectively referred to as KIRs). When these NK cell's inhibitory receptors (KIR2DL-1,-2,-3) do not bind their self-HLA ligands, the intracellular signalling for missing self induces NK cell lytic activity. Such self-reactivity, which is inhibited in normal physiological situations where healthy cells are not attacked by NK cells, is thought to underlie the reduced NK cells activity against tumor cells expressing high levels of protective self-HLA molecules. Therefore, inhibiting the inhibitors would presumably provide NK cells with a higher cytolytic activity directed towards self HLA⁺ unwanted cancer cells that otherwise remain unattacked[132]. This concept was addressed by developing a fully human anti-KIR IgG4 mAb (Kiromab 1-7F9), which restores NK cell-mediated lysis of autologous tumor cells [133]. This new reagent, currently in phase II for AML and myeloma, might prove interesting to boost NK cell functions in AML and multiple myeloma. Whether Kiromab potentiates the ADCC bioactivity of therapeutic IgG1 mAbs yet remains to be seen however, although this possibility appears likely.

Acknowledgments :

Work in JJF lab is funded by institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by contracts from the Association pour la Recherche sur le Cancer (# 3757), Institut National du Cancer (Projects V9V2TER and RITUXOP). E.L., E.G and S.K. are funded by PhD fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References cited:

- [1] Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ, White CA, Liles TM, Royston I, et al. IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 1997 Oct;15(10):3266-74.
- [2] Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1997 Sep 15;90(6):2188-95.
- [3] McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* 1998 Aug;16(8):2825-33.
- [4] Ravandi F, O'Brien S. Alemtuzumab in CLL and other lymphoid neoplasms. *Cancer Invest.* 2006 Nov;24(7):718-25.
- [5] Ehrlich P. On immunity with special reference to cell life. *Proceedings of the Royal Society of London* 1899-1900;66:424-48.
- [6] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975 Aug 7;256(5517):495-7.
- [7] Schulz G, Buchler M, Muhrer KH, Klapdor R, Kubel R, Harthus HP, et al. Immunotherapy of pancreatic cancer with monoclonal antibody BW 494. *International journal of cancer Supplement = Journal international du cancer.* 1988;2:89-94.
- [8] Ruuls SR, Lammerts van Bueren JJ, van de Winkel JG, Parren PW. Novel human antibody therapeutics: the age of the Umabs. *Biotechnology journal.* 2008 Oct;3(9-10):1157-71.
- [9] Neumann F, Zohren F, Haas R. The role of natalizumab in hematopoietic stem cell mobilization. *Expert opinion on biological therapy.* 2009 Aug;9(8):1099-106.
- [10] Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socie G, Muus P, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England journal of medicine.* 2006 Sep 21;355(12):1233-43.
- [11] Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry.* 2003 Jan 31;278(5):3466-73.

- [12] Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Jul 26;277(30):26733-40.
- [13] Paintaud G, Lejarre F, Ternant D, Goupille P, Watier H. [Monoclonals antibodies: a recent and major therapeutic advance]. *Therapie*. 2009 Jan-Feb;64(1):1-7.
- [14] Rossignol A, Watier H. Les anticorps monoclonaux: une ingénierie technologique au service de l'efficacité thérapeutique. *Hematologie*. 2009;15 (special 3):5-13.
- [15] Cartron G. [Immunologic effects of anti-B-lymphocyte antibodies]. *La Revue de medecine interne / fondee 2005 Oct;26 Spec No 1*:42-6.
- [16] Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature biotechnology*. 2005 Sep;23(9):1147-57.
- [17] Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, Jong S, Samali A. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer treatment reviews*. 2009 May;35(3):280-8.
- [18] Henson ES, Johnston JB, Gibson SB. The role of TRAIL death receptors in the treatment of hematological malignancies. *Leukemia & lymphoma*. 2008 Jan;49(1):27-35.
- [19] Nawrocki ST, Carew JS, Douglas L, Cleveland JL, Humphreys R, Houghton JA. Histone deacetylase inhibitors enhance lexatumumab-induced apoptosis via a p21Cip1-dependent decrease in survivin levels. *Cancer research*. 2007 Jul 15;67(14):6987-94.
- [20] Huang Y, Sheikh MS. TRAIL death receptors and cancer therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Nov 1;224(3):284-9.
- [21] Leseux L, Hamdi SM, Al Saati T, Capilla F, Recher C, Laurent G, et al. Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. *Blood*. 2006 Dec 15;108(13):4156-62.
- [22] Leseux L, Laurent G, Laurent C, Rigo M, Blanc A, Olive D, et al. PKC zeta mTOR pathway: a new target for rituximab therapy in follicular lymphoma. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):285-91.
- [23] Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene*. 2007 May 28;26(25):3629-36.
- [24] Kheirallah S, Caron P, E. G, Quillet-Mary A, Bertrand-Michel J, J.J. F, et al. Rituximab inhibits B cell Receptor signaling. *Blood*. 2010;in press.
- [25] Carnahan J, Stein R, Qu Z, Hess K, Cesano A, Hansen HJ, et al. Epratuzumab, a CD22-targeting recombinant humanized antibody with a different mode of action from rituximab. *Molecular immunology*. 2007 Feb;44(6):1331-41.
- [26] Leonard JP, Coleman M, Ketas J, Ashe M, Fiore JM, Furman RR, et al. Combination antibody therapy with epratuzumab and rituximab in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5044-51.
- [27] Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, Chadburn A, Ely S, Furman RR, et al. Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003 Aug 15;21(16):3051-9.
- [28] Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD, Gorter A. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends in immunology*. 2004 Mar;25(3):158-64.
- [29] Dalle S, Dumontet C. [Rituximab: mechanism of action and resistance]. *Bulletin du cancer*. 2007 Feb 1;94(2):198-202.
- [30] Stolz C, Schuler M. Molecular mechanisms of resistance to Rituximab and pharmacologic strategies for its circumvention. *Leukemia & lymphoma*. 2009 Jun;50(6):873-85.
- [31] Harjunpaa A, Wiklund T, Collan J, Janes R, Rosenberg J, Lee D, et al. Complement activation in circulation and central nervous system after rituximab (anti-CD20) treatment of B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2001 Aug;42(4):731-8.
- [32] Wang SY, Weiner G. Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert opinion on biological therapy*. 2008 Jun;8(6):759-68.
- [33] Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3383-9.
- [34] Zhou X, Hu W, Qin X. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *Oncologist*. 2008 Sep;13(9):954-66.
- [35] Natsume A, Niwa R, Satoh M. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug design, development and therapy*. 2009;3:7-16.
- [36] Ito M, Omoto S, Kato Y, Hayashi T, Mori N, Fujii YR. In vivo tumouricidal effects of LAD-1 monoclonal antibody on murine RL-male-1 lymphoma mediated by enhanced phagocytosis. *Clinical and experimental immunology*. 2005 Jul;141(1):54-61.

- [37] Akewanlop C, Watanabe M, Singh B, Walker M, Kufe DW, Hayes DF. Phagocytosis of breast cancer cells mediated by anti-MUC-1 monoclonal antibody, DF3, and its bispecific antibody. *Cancer research*. 2001 May 15;61(10):4061-5.
- [38] Wallace PK, Kaufman PA, Lewis LD, Keler T, Givan AL, Fisher JL, et al. Bispecific antibody-targeted phagocytosis of HER-2/neu expressing tumor cells by myeloid cells activated in vivo. *Journal of immunological methods*. 2001 Feb 1;248(1-2):167-82.
- [39] Ely P, Wallace PK, Givan AL, Graziano RF, Guyre PM, Fanger MW. Bispecific-armed, interferon gamma-primed macrophage-mediated phagocytosis of malignant non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1996 May 1;87(9):3813-21.
- [40] Shibata-Koyama M, Iida S, Misaka H, Mori K, Yano K, Shitara K, et al. Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for Fc gamma RIIIb and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils. *Experimental hematology*. 2009 Mar;37(3):309-21.
- [41] Harbers SO, Crocker A, Catalano G, D'Agati V, Jung S, Desai DD, et al. Antibody-enhanced cross-presentation of self antigen breaks T cell tolerance. *The Journal of clinical investigation*. 2007 May;117(5):1361-9.
- [42] Rafiq K, Bergtold A, Clynes R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Jul;110(1):71-9.
- [43] Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet*. 2009 Mar 21;373(9668):1033-40.
- [44] Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine*. 2000 Apr;6(4):443-6.
- [45] Williams ME, Densmore JJ, Pawluczkoawicz AW, Beum PV, Kennedy AD, Lindorfer MA, et al. Thrice-weekly low-dose rituximab decreases CD20 loss via shaving and promotes enhanced targeting in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol*. 2006 Nov 15;177(10):7435-43.
- [46] Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol*. 2006 Feb 15;176(4):2600-9.
- [47] Beum PV, Mack DA, Pawluczkoawicz AW, Lindorfer MA, Taylor RP. Binding of rituximab, trastuzumab, cetuximab, or mAb T101 to cancer cells promotes trogocytosis mediated by THP-1 cells and monocytes. *J Immunol*. 2008 Dec 1;181(11):8120-32.
- [48] Li Y, Williams ME, Cousar JB, Pawluczkoawicz AW, Lindorfer MA, Taylor RP. Rituximab-CD20 complexes are shaved from Z138 mantle cell lymphoma cells in intravenous and subcutaneous SCID mouse models. *J Immunol*. 2007 Sep 15;179(6):4263-71.
- [49] Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIIa gene. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):754-8.
- [50] Congy-Jolivet N, Bolzec A, Ternant D, Ohresser M, Watier H, Thibault G. Fc gamma RIIIa expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma RIIIa-158V allotype. *Cancer research*. 2008 Feb 15;68(4):976-80.
- [51] Cartron G. FCGR3A polymorphism story: a new piece of the puzzle. *Leukemia & lymphoma*. 2009 Sep;50(9):1401-2.
- [52] Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 10;26(11):1789-96.
- [53] Groh V, Li YQ, Cioca D, Hunder NN, Wang W, Riddell SR, et al. Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 May 3;102(18):6461-6.
- [54] Selenko N, Majdic O, Jager U, Sillaber C, Stockl J, Knapp W. Cross-priming of cytotoxic T cells promoted by apoptosis-inducing tumor cell reactive antibodies? *Journal of clinical immunology*. 2002 May;22(3):124-30.
- [55] Colombat P, Salles G, Brousse N, Eftekhari P, Soubeyran P, Delwail V, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):101-6.
- [56] Hainsworth JD, Burris HA, 3rd, Morrissey LH, Litchy S, Scullin DC, Jr., Bearden JD, 3rd, et al. Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2000 May 15;95(10):3052-6.
- [57] Witzig TE, Vukov AM, Habermann TM, Geyer S, Kurtin PJ, Friedenbergr WR, et al. Rituximab therapy for patients with newly diagnosed, advanced-stage, follicular grade I non-Hodgkin's lymphoma: a phase II trial in the North Central Cancer Treatment Group. *J Clin Oncol*. 2005 Feb 20;23(6):1103-8.

- [58] Ghilmini M, Schmitz SF, Cogliatti S, Bertoni F, Waltzer U, Fey MF, et al. Effect of single-agent rituximab given at the standard schedule or as prolonged treatment in patients with mantle cell lymphoma: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *J Clin Oncol*. 2005 Feb 1;23(4):705-11.
- [59] Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999 Jan;17(1):268-76.
- [60] Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3725-32.
- [61] Salles G, Mounier N, de Guibert S, Morschhauser F, Doyen C, Rossi JF, et al. Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):4824-31.
- [62] Marcus R, Imrie K, Solal-Celigny P, Catalano JV, Dmoszynska A, Raposo JC, et al. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008 Oct 1;26(28):4579-86.
- [63] Hochster H, Weller E, Gascoyne RD, Habermann TM, Gordon LI, Ryan T, et al. Maintenance rituximab after cyclophosphamide, vincristine, and prednisone prolongs progression-free survival in advanced indolent lymphoma: results of the randomized phase III ECOG1496 Study. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 1;27(10):1607-14.
- [64] Czuczman MS, Thall A, Witzig TE, Vose JM, Younes A, Emmanouilides C, et al. Phase I/II study of galiximab, an anti-CD80 antibody, for relapsed or refractory follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005 Jul 1;23(19):4390-8.
- [65] Leonard JP, Friedberg JW, Younes A, Fisher D, Gordon LI, Moore J, et al. A phase I/II study of galiximab (an anti-CD80 monoclonal antibody) in combination with rituximab for relapsed or refractory, follicular lymphoma. *Ann Oncol*. 2007 Jul;18(7):1216-23.
- [66] Witzig TE. Radioimmunotherapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Best practice & research*. 2006;19(4):655-68.
- [67] Morschhauser F, Illidge T, Huglo D, Martinelli G, Paganelli G, Zinzani PL, et al. Efficacy and safety of yttrium-90 ibritumomab tiuxetan in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma not appropriate for autologous stem-cell transplantation. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):54-8.
- [68] Kaminski MS, Tuck M, Estes J, Kolstad A, Ross CW, Zasadny K, et al. 131I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2005 Feb 3;352(5):441-9.
- [69] Cheson B. Bexxar (Corixa/GlaxoSmithKline). *Curr Opin Investig Drugs*. 2002 Jan;3(1):165-70.
- [70] Kaminski M. Bexxar, iodine I 131 tositumomab, effective in long-term follow-up of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer biology & therapy*. 2007 Jul;6(7):996-7.
- [71] Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, et al. 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. *The lancet oncology*. 2006 May;7(5):379-91.
- [72] Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, et al. 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 (MInT) study. *The lancet oncology*. 2008 May;9(5):435-44.
- [73] Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *The lancet oncology*. 2008 Feb;9(2):105-16.
- [74] Forstpointner R, Unterhalt M, Dreyling M, Bock HP, Repp R, Wandt H, et al. Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood*. 2006 Dec 15;108(13):4003-8.
- [75] Thomas DA, Ravandi F, Kantarjian H. Monoclonal antibody therapy for hairy cell leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2006 Oct;20(5):1125-36.
- [76] Conconi A, Martinelli G, Thieblemont C, Ferreri AJ, Devizzi L, Peccatori F, et al. Clinical activity of rituximab in extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood*. 2003 Oct 15;102(8):2741-5.

- [77] Martinelli G, Laszlo D, Ferreri AJ, Pruneri G, Ponzoni M, Conconi A, et al. Clinical activity of rituximab in gastric marginal zone non-Hodgkin's lymphoma resistant to or not eligible for anti-Helicobacter pylori therapy. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):1979-83.
- [78] O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, Giles FJ, Freireich EJ, Cortes J, et al. Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2001 Apr 15;19(8):2165-70.
- [79] Moreton P, Kennedy B, Lucas G, Leach M, Rassam SM, Haynes A, et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol*. 2005 May 1;23(13):2971-9.
- [80] Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005 Jun 20;23(18):4079-88.
- [81] Foon KA, Boyiadzis M, Land SR, Marks S, Raptis A, Pietragallo L, et al. Chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine and cyclophosphamide and high dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 1;27(4):498-503.
- [82] Ravandi F, O'Brien S. Alemtuzumab. Expert review of anticancer therapy. 2005 Feb;5(1):39-51.
- [83] Keating M, Hallek M. Alemtuzumab, the first monoclonal antibody (MAB) directed against CD52. *Medical oncology* (Northwood, London, England). 2002;19 Suppl:S1-2.
- [84] Ferrajoli A, O'Brien S, Keating MJ. Alemtuzumab: a novel monoclonal antibody. Expert opinion on biological therapy. 2001 Nov;1(6):1059-65.
- [85] Fietz T, Thiel E. Antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: the role of rituximab, 90Y-ibritumomab tiuxetan, and alemtuzumab. Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung. 2007;176:153-63.
- [86] Alinari L, Lapalombella R, Andritsos L, Baiocchi RA, Lin TS, Byrd JC. Alemtuzumab (Campath-1H) in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2007 May 28;26(25):3644-53.
- [87] Ure UB, Ar MC, Salihoglu A, Guner SI, Baran A, Oguz O, et al. Alemtuzumab in Sezary syndrome: efficient but not innocent. *Eur J Dermatol*. 2007 Nov-Dec;17(6):525-9.
- [88] Morris JC, Waldmann TA. Antibody-based therapy of leukaemia. Expert reviews in molecular medicine. 2009;11:e29.
- [89] Coiffier B, Lefebvre S, Pedersen LM, Gadeberg O, Fredriksen H, van Oers MH, et al. Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1094-100.
- [90] Hagenbeek A, Gadeberg O, Johnson P, Pedersen LM, Walewski J, Hellmann A, et al. 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*. 2008 Jun 15;111(12):5486-95.
- [91] Leonard JP, Goldenberg DM. Preclinical and clinical evaluation of epratuzumab (anti-CD22 IgG) in B-cell malignancies. *Oncogene*. 2007 May 28;26(25):3704-13.
- [92] Fanale MA, Younes A. Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Drugs*. 2007;67(3):333-50.
- [93] Reichert JM. Technology evaluation: lumiliximab, Biogen Idec. *Current opinion in molecular therapeutics*. 2004 Dec;6(6):675-83.
- [94] Byrd JC, Kipps TJ, Flinn IW, Castro J, Lin TS, Wierda W, et al. Phase 1/2 study of lumiliximab combined with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009 Oct 20.
- [95] Pathan NI, Chu P, Hariharan K, Cheney C, Molina A, Byrd J. Mediation of apoptosis by and antitumor activity of lumiliximab in chronic lymphocytic leukemia cells and CD23+ lymphoma cell lines. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1594-602.
- [96] Byrd JC, O'Brien S, Flinn IW, Kipps TJ, Weiss M, Rai K, et al. Phase 1 study of lumiliximab with detailed pharmacokinetic and pharmacodynamic measurements in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4448-55.
- [97] Rech J, Repp R, Rech D, Stockmeyer B, Dechant M, Niedobitek G, et al. A humanized HLA-DR antibody (hu1D10, apolizumab) in combination with granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: a pilot study. *Leukemia & lymphoma*. 2006 Oct;47(10):2147-54.
- [98] Bowles JA, Weiner GJ. CD16 polymorphisms and NK activation induced by monoclonal antibody-coated target cells. *Journal of immunological methods*. 2005 Sep;304(1-2):88-99.
- [99] Mavromatis BH, Cheson BD. Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia. *Blood reviews*. 2004 Jun;18(2):137-48.
- [100] Adkins D, Ratanatharathorn V, Yang H, White B. Safety profile and clinical outcomes in a phase I, placebo-controlled study of sipilizumab in acute graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2009 Jul 27;88(2):198-202.

- [101] O'Mahony D, Morris JC, Stetler-Stevenson M, Matthews H, Brown MR, Fleisher T, et al. EBV-related lymphoproliferative disease complicating therapy with the anti-CD2 monoclonal antibody, sipilizumab, in patients with T-cell malignancies. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 1;15(7):2514-22.
- [102] Waldmann TA. Daclizumab (anti-Tac, Zenapax) in the treatment of leukemia/lymphoma. *Oncogene*. 2007 May 28;26(25):3699-703.
- [103] Koon HB, Severy P, Hagg DS, Butler K, Hill T, Jones AG, et al. Antileukemic effect of daclizumab in CD25 high-expressing leukemias and impact of tumor burden on antibody dosing. *Leukemia research*. 2006 Feb;30(2):190-203.
- [104] Grigg A. Daclizumab in anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2006 Jan;47(1):175.
- [105] Linden O. Remission of a refractory, anaplastic large-cell lymphoma after treatment with daclizumab. *The New England journal of medicine*. 2004 Sep 30;351(14):1466-7.
- [106] Rider DA, Havenith CE, de Ridder R, Schuurman J, Favre C, Cooper JC, et al. A human CD4 monoclonal antibody for the treatment of T-cell lymphoma combines inhibition of T-cell signaling by a dual mechanism with potent Fc-dependent effector activity. *Cancer research*. 2007 Oct 15;67(20):9945-53.
- [107] Villadsen LS, Skov L, Dam TN, Dagnaes-Hansen F, Rygaard J, Schuurman J, et al. In situ depletion of CD4+ T cells in human skin by Zanolimumab. *Archives of dermatological research*. 2007 Feb;298(9):449-55.
- [108] Kim YH, Duvic M, Obitz E, Gniadecki R, Iversen L, Osterborg A, et al. Clinical efficacy of zanolimumab (HuMax-CD4): two phase 2 studies in refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):4655-62.
- [109] Mestel DS, Beyer M, Mobs M, Steinhoff M, Sterry W, Assaf C. Zanolimumab, a human monoclonal antibody targeting CD4 in the treatment of mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Expert opinion on biological therapy*. 2008 Dec;8(12):1929-39.
- [110] McGavin JK, Spencer CM. Gemtuzumab ozogamicin. *Drugs*. 2001;61(9):1317-22; discussion 23-4.
- [111] Stasi R, Evangelista ML, Buccisano F, Venditti A, Amadori S. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer treatment reviews*. 2008 Feb;34(1):49-60.
- [112] Linenberger ML. CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia*. 2005 Feb;19(2):176-82.
- [113] Golay J, Di Gaetano N, Amico D, Cittera E, Barbui AM, Giavazzi R, et al. Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) has therapeutic activity against CD33 acute lymphoblastic leukaemias in vitro and in vivo. *British journal of haematology*. 2005 Feb;128(3):310-7.
- [114] Ravandi F, Estey E, Jones D, Faderl S, O'Brien S, Fiorentino J, et al. Effective treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 1;27(4):504-10.
- [115] Linenberger ML, Hong T, Flowers D, Sievers EL, Gooley TA, Bennett JM, et al. Multidrug-resistance phenotype and clinical responses to gemtuzumab ozogamicin. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):988-94.
- [116] Walter RB, Gooley TA, van der Velden VH, Loken MR, van Dongen JJ, Flowers DA, et al. CD33 expression and P-glycoprotein-mediated drug efflux inversely correlate and predict clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia treated with gemtuzumab ozogamicin monotherapy. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4168-70.
- [117] Glatting G, Muller M, Koop B, Hohl K, Friesen C, Neumaier B, et al. Anti-CD45 monoclonal antibody YAML568: A promising radioimmunoconjugate for targeted therapy of acute leukemia. *J Nucl Med*. 2006 Aug;47(8):1335-41.
- [118] Pagel JM, Appelbaum FR, Eary JF, Rajendran J, Fisher DR, Gooley T, et al. 131I-anti-CD45 antibody plus busulfan and cyclophosphamide before allogeneic hematopoietic cell transplantation for treatment of acute myeloid leukemia in first remission. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):2184-91.
- [119] Ringhoffer M, Blumstein N, Neumaier B, Glatting G, von Harsdorf S, Buchmann I, et al. 188Re or 90Y-labelled anti-CD66 antibody as part of a dose-reduced conditioning regimen for patients with acute leukaemia or myelodysplastic syndrome over the age of 55: results of a phase I-II study. *British journal of haematology*. 2005 Aug;130(4):604-13.
- [120] Bunjes D. 188Re-labeled anti-CD66 monoclonal antibody in stem cell transplantation for patients with high-risk acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2002 Nov;43(11):2125-31.
- [121] Satoh M, Iida S, Shitara K. Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert opinion on biological therapy*. 2006 Nov;6(11):1161-73.
- [122] Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2635-42.
- [123] Sicard H, Al Saati T, Delsol G, Fournie JJ. Synthetic phosphoantigens enhance human Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes killing of non-Hodgkin's B lymphoma. *Mol Med*. 2001 Oct;7(10):711-22.
- [124] Poupot M, Fournie JJ. Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunol Lett*. 2004 Sep 15;95(2):129-38.
- [125] Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol*. 2006 Oct;18(5):539-46.

- [126] Belmont C, Decise D, Fournie JJ. Phosphoantigens and aminobisphosphonates: New leads targeting gamma delta T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. 2006;3(1):17-23.
- [127] Sicard H, Ingoure S, Luciani B, Serraz C, Fournie JJ, Bonneville M, et al. In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J Immunol*. 2005 Oct 15;175(8):5471-80.
- [128] Gertner-Dardenne J, Bonnafous C, Bezombes C, Capietto AH, Scaglione V, Ingoure S, et al. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood*. 2009 May 14;113(20):4875-84.
- [129] Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science (New York, NY)*. 2008 Aug 15;321(5891):974-7.
- [130] Nagorsen D, Bargou R, Ruttinger D, Kufer P, Baeuerle PA, Zugmaier G. Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab. *Leukemia & lymphoma*. 2009 Jun;50(6):886-91.
- [131] d'Argouges S, Wissing S, Brandl C, Prang N, Lutterbuese R, Kozhich A, et al. Combination of rituximab with blinatumomab (MT103/MEDI-538), a T cell-engaging CD19-/CD3-bispecific antibody, for highly efficient lysis of human B lymphoma cells. *Leukemia research*. 2009 Mar;33(3):465-73.
- [132] Sola C, Andre P, Lemmers C, Fuseri N, Bonnafous C, Blery M, et al. Genetic and antibody-mediated reprogramming of natural killer cell missing-self recognition in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Aug 4;106(31):12879-84.
- [133] Romagne F, Andre P, Spee P, Zahn S, Anfossi N, Gauthier L, et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood*. 2009 Sep 24;114(13):2667-77.

TITLE: IMPLICATION OF BCR SIGNALING IN FOLLICULAR LYMPHOMA
THERAPEUTIC TARGETING.

ABSTRACT

Beside its central role in the recognition of antigen, the BCR (B Cell Receptor) controls a multitude of intracellular mechanisms that regulate B lymphocyte biology. Altered BCR signaling has been demonstrated in various types of B-cell lymphoma and some autoimmune diseases. Thus, therapeutic targeting of BCR signaling has been the focus of my PhD studies. We demonstrate that the monoclonal anti-CD20 antibody, Rituximab, inhibits BCR signaling at least by down-regulating BCR expression. Furthermore, enzastaurin (kinases inhibitor) exerts an anti-tumoral effect on follicular lymphoma cells by inhibiting downstream BCR signaling. Then, we characterized new mechanisms of action of Rituximab and enzastaurin and we focused on the importance of BCR signaling in lymphoma's therapy.

AUTEUR : SAMAR KHEIRALLAH

**TITRE : IMPLICATION DE LA SIGNALISATION DU BCR DANS LE CIBLAGE
THERAPEUTIQUE DES LYMPHOMES FOLLICULAIRES**

DIRECTEUR DE THESE : Dr. CHRISTINE BEZOMBES

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : TOULOUSE, LE 27 SEPTEMBRE 2010

RESUME

Une des molécules clés des fonctions biologiques du lymphocyte B est le BCR (B Cell Receptor). Les connaissances concernant l'altération du signal BCR et son implication dans l'apparition des lymphopathies B ne cessent de s'élargir. De ce fait, le ciblage pharmacologique de cette molécule et de sa signalisation a constitué le centre d'intérêt de mes travaux de thèse. Ainsi nous avons montré que le Rituximab (anticorps thérapeutique anti-CD20) est capable d'inhiber le signal BCR à travers la diminution de son expression et que l'enzastaurine qui est un inhibiteur de protéines kinases situées en aval du BCR représente un potentiel anti-tumoral pour le lymphome folliculaire. Ainsi, ces travaux participent à la compréhension des mécanismes d'action de ces molécules thérapeutiques et démontrent l'importance du signal BCR dans la thérapie des lymphomes.

MOTS-CLES : BCR, lymphome folliculaire, Rituximab, enzastaurine.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Cancérologie

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE : INSERM U563,
CPTP, équipe immunité innée et hémopathies malignes.
CHU Purpan, BP 3028, 31024 TOULOUSE CEDEX 3.**