

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

CANCEROLOGIE

Présentée et soutenue par :

PAULINE GRAVELLE

le : vendredi 31 mai 2013

Titre :

Influence de l'organisation tridimensionnelle des cellules de lymphome
folliculaire sur l'expression génique:
Contribution à la caractérisation des mécanismes d'échappement immunitaire
et de chimiorésistance.

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM UMR1037

Directeur(s) de Thèse :

Professeur Guy LAURENT

Rapporteurs :

Professeur Hervé WATIER

Professeur Jean FEUILLARD

Membre(s) du jury :

Professeur Eric DELABESSE, Hôpital Purpan - Toulouse (Président)

Professeur Hervé WATIER, Université de Tours (Rapporteur)

Professeur Jean FEUILLARD, Université de Limoges (Rapporteur)

Docteur Salem CHOUAIB, Institut Gustave Roussy - Paris (Examineur)

Professeur Guy LAURENT, Hôpital Purpan - Toulouse (Directeur de thèse)

Je dédie cette thèse à ma Famille

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté et pris le temps de juger mon travail de thèse.

***Professeur Delabesse**, je vous remercie d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Surtout, je vous remercie pour votre ponctualité, qui s'est avérée être unique, le jour de la soutenance (!). Merci enfin pour vos commentaires et suggestions pour améliorer mon manuscrit.*

***Professeur Watier**, je vous remercie énormément pour vos corrections précises et éclairées, ainsi que vos commentaires pointilleux quant à ma présentation le jour de la thèse. J'espère avoir amélioré le manuscrit à votre convenance, en particulier pour les détails au sujet des analyses bioinformatiques et les données expérimentales concernant la matrice extracellulaire, que j'ai intégrées au manuscrit final.*

***Professeur Feuillard**, merci pour vos conseils et vos remarques très constructives relatives à mon manuscrit. Vous trouverez dans cette version finale de ma thèse la partie tant attendue consacrée à la physiologie lymphocytaire B, ainsi que des améliorations sur la forme générale du manuscrit, comme vous l'aviez suggéré.*

***Docteur Chouaib**, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse, et d'avoir consacré un temps précieux pour la lire en détail, afin d'y apporter vos corrections.*

*Je remercie le **Professeur Guy Laurent**, pour son encadrement, et le temps précieux qu'il m'a consacré tout au long de la thèse. Merci de votre enthousiasme constant concernant l'évolution du projet, merci aussi pour vos idées et les discussions "philosophico-scientifiques" que nous avons pu avoir ensemble, qui m'ont permis d'avancer pendant ces trois ans et demi. Enfin, je vous remercie pour la perspective que vous m'offrez à court terme après la thèse.*

*J'adresse un merci tout particulier au Docteur **Jean-Jacques Fournié**, pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche. Je vous remercie énormément pour le temps précieux de directeur d'équipe que vous m'avez accordé, et pour l'orientation qu'a pris mon article grâce à vous. Aujourd'hui, il est en révision et j'espère que l'issue de tout ce travail sera favorable, car il a été profondément enrichi par vos idées. Sans vous, l'aventure aurait*

été nettement différente, en moins "bien" je pense, et pour cela je ne vous remercierai jamais assez.

*Je remercie le **Docteur Christine Bezombes** pour ses conseils avisés, sa disponibilité, et son aide apportée au quotidien pendant ces 3 années de doctorat. Je te remercie pour toutes les discussions scientifiques, culinaires et diverses que l'on a pu avoir ensemble, au labo comme pendant les pauses déjeuner. Merci pour ton enthousiasme à toute épreuve, et ton aide majeure, que ce soit pour les choses importantes dans le travail ou pour les conseils de la vie courante. Je te souhaite de continuer à t'épanouir de la sorte dans ton travail et en famille. En un mot, merci Chris!*

*J'adresse un grand merci au **Docteur Anne Quillet-Mary**. Vous avez été à l'écoute pendant ces 3 ans, et avez toujours su me prodiguer des conseils précieux tant sur les démarches expérimentales à suivre que sur les bonnes attitudes à adopter. J'admire votre rigueur scientifique et vos compétences, et vous souhaite le meilleur pour la suite de votre carrière, car je pense sincèrement que vous le méritez. Merci pour tout.*

*Merci au **Docteur Mary Poupot**, pour ton aide scientifique et les discussions professionnelles et parfois plus personnelles que l'on a pu avoir ensemble. Je te remercie aussi pour les moments gourmandises, car pendant ces trois ans il n'a pas été rare que tu fasses profiter à toute l'équipe de tes talents de pâtissière ! Je te remercie Mary.*

*Merci à **Amandine Blanc**, technicienne de l'équipe, pour son aide et son soutien pendant ma thèse.*

Outre ces membres statutaires qui font partie de l'équipe qui m'a accueillie pendant ma thèse, je remercie aussi tous les non statutaires, présents et passés, que j'ai côtoyé pendant ces trois ans et demi.

***Emilie Laprevotte**, LE soutien indéfectible de ma thèse. Je te remercie énormément pour l'écoute que tu m'as apporté, et le soutien sans faille dont tu as fait preuve avec moi en ces temps difficiles de fin de thèse. Un peu moins sérieusement, merci beaucoup pour les papotages que l'on a eus ensemble, les potins que nous avons partagés (en toute gentillesse bien sûr), et les discussions animées concernant certains programmes phares que tu*

reconnâtras... On m'a assez vite rapproché de toi, en tant que "clone", en raison des nombreux points communs qui nous caractérisent (enfant unique, fille de mécano,...), ce qui est un sacré compliment selon moi! Tu as toujours été l'oreille attentive des aventures de Sacha, et Dieu sait que je suis intarissable sur le sujet, alors merci de ne pas m'avoir renvoyé bouler avec mes histoires! Tu n'as jamais oublié un seul des anniversaires de Sacha, et pour ça aussi je te remercie beaucoup... De toute façon, on reste en contact, le petit texto quotidien est de rigueur maintenant, même si quelques centaines de kilomètres nous séparent à présent! Et puis on reviendra te voir, il faut que j'apprenne à dompter les poneys... Merci pour tout et bonne chance pour ta vie professionnelle, tu mérites de réussir!!!

***Caroline Duault**, alias Caro, je suis très heureuse de t'avoir côtoyé d'un peu plus près pendant cette dernière année de thèse. J'ai apprécié ton franc parler, tes remarques judicieuses, et tes idées brillantes. Bien évidemment, j'ai aussi aimé les discussions animées et peu sérieuses qui avaient lieu dans le bureau, et dont - je l'avoue - j'ai été souvent l'instigatrice...on ne referra pas Madame Bavarde!!! Aussi bien dans le pro que dans le perso, nous avons beaucoup échangé sur la fin, et sache que j'en garderai un très bon souvenir. Je te souhaite plein de belles choses pour la suite et courage jusqu'à la fin de la thèse. Merci!*

*Je remercie **Marie Tosolini**, qui, pour moi, représente l'incarnation de la "force tranquille". Avisée, calme, de bon conseil, acharnée dans le travail, je pense que tu es une personne très sage et que tu réussiras professionnellement si tu continues ainsi. Tes conseils ont toujours été pour moi d'une valeur inestimable! Au final, je suis heureuse d'avoir moi aussi pu t'aider un petit peu, en tant que Miss Western Blot, et mentor du Mithras, sur la fin... Merci aussi pour tout ce à quoi tu as participé le jour J... Je te souhaite une belle carrière, tu le mérites. Merci pour tout...*

***Frédéric Boissard**, alias Fred, merci pour ta bonne humeur et ton aide, notamment pour les analyses de transcriptomes. Tu es d'une gentillesse à toute épreuve, et j'ai beaucoup aimé travailler à tes côtés, tant pour les moments "pros" que pour les pauses, pendant lesquelles tu m'as appris beaucoup de choses saugrenues (notamment, ça fait quoi quand on essore un gant de toilette dans l'espace ?, et j'en passe...). Bon courage pour la suite de la thèse.*

***Emilie Decaup**, aussi connue sous le surnom de Mily, je te remercie pour ta présence pendant toute la thèse, ton aide dans les manips et les discussions qu'on a pu avoir ensemble, dans les moments hauts et bas de la thèse. J'ai apprécié travailler à tes côtés. C'est bientôt ton tour, alors je te souhaite bon courage, et te remercie pour tout.*

***François Artis**, mon voisin de bureau! Merci à toi d'avoir apporté des notions de physique dans ce monde "fermé" qu'est celui de la biologie. Je te remercie aussi pour ton aide pour les macros sur Excel, grâce à toi je suis presque une experte... Mais aussi, je te remercie énormément pour les moments de bavardage et d'humour que nous avons partagés! Je te souhaite plein de courage et de réussite pour la suite de ton voyage à l'interface entre la physique et la biologie. Merci!*

*Je remercie particulièrement **Séverine Fruchon** pour sa présence et son aide pendant ma thèse. Je me souviens des discussions scientifiques et moins scientifiques que l'on a pu avoir ensembles quand tu faisais partie de l'équipe. Pour moi tu représentes une force de travail énorme, ta rigueur et ton sérieux ne peuvent être qu'admirés. Même si nos routes ont quelque peu dévié par la suite, je tenais vraiment à te remercier.*

***Emilie Fleur**, merci à toi pour ton accompagnement tout au long de ces 3 années. Tes conseils avisés, ta bienveillance, ton oreille attentive (...), que de qualités qui te permettront, je l'espère, d'avoir une belle carrière professionnelle! Je garderai un excellent souvenir de toi, merci pour tout.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Delphine Betous**. Bien que nous ne nous soyons côtoyées que peu de temps, tu as fait preuve d'une grande gentillesse vis-à-vis de moi, et je t'en remercie. Merci aussi pour ton aide et tes conseils avant la soutenance. Je te souhaite le meilleur avec ta petite famille, et sur le plan professionnel bien sûr.*

***Srdjana**, merci pour ton soutien à l'approche de la thèse. Merci aussi pour ta bonne humeur constante. Tu fais partie des personnes que j'ai peu côtoyées car tu es arrivée quand je partais m'isoler pour la rédaction, mais j'ai aimé discuter avec toi. Essaye de ne pas stresser, tu es une bosseuse, et tout se passera bien pour toi, j'en suis sûre! A bientôt pour visionner "l'exploit" de ma prestation doctorale, puisque tu m'as dit que tu l'avais filmée!!!!*

***Samar Kheirallah**, merci à toi pour ta grande sagesse et tes enseignements de diplomatie... Je suis arrivée dans l'équipe alors que tu t'apprêtais à partir rédiger ta thèse, mais je garde un excellent souvenir de toi et de tes conseils, dont j'ai quand même pu profiter pendant ce court laps de temps de cohabitation. Merci pour ça, et bon courage pour tes études de médecine.*

*Je remercie **Emilie Gross** pour ses conseils et son aide pendant le démarrage de ma thèse. J'espère avoir rempli le contrat que tu évoquais dans tes remerciements de thèse, en parlant de mon caractère prometteur. Je te souhaite bon courage pour le post doc et le retour.*

***Christine Jean**, merci de m'avoir accueillie dans l'équipe, et de m'avoir chapeauté pour le passage de relai et la prise en main du projet. Je te souhaite une belle carrière à ton retour. Merci de ton aide.*

*Je remercie **Camille Daugrois** pour son aide pendant la fin de la thèse. Je te souhaite plein de courage pour ta thèse maintenant, mais je ne me fais pas de souci, tu travailles dur, et forcément, ça paiera!*

*Je remercie **Frédéric Pont**, alias "Fred", pour son aide scientifique, sans laquelle mon projet n'aurait pas évolué de la sorte. Merci aussi pour les discussions moins sérieuses que nous avons pu avoir ensembles. Ca y est, le petit surnom d'impétrante que tu m'as donné pendant les trois derniers mois n'est plus de rigueur! Merci à toi pour tout.*

*Je tiens à remercier aussi les étudiantes qui ont fait des stages avec moi, pour leur sérieux tout d'abord, mais aussi pour leur gentillesse. Merci aussi de m'avoir permis de développer mes capacités d'enseignement. **Candice** et **Elizabeth**, je vous souhaite le meilleur pour la suite de votre cursus.*

Je tiens à remercier également les étudiants des autres équipes de "l'étage jaune", avec lesquels j'ai partagé le fameux bureau étudiant, qui n'est plus aujourd'hui, mais dont on se souviendra j'en suis sûre...

***Cathy Quelen**, merci pour ton aide scientifique et technique, apportée notamment pour les design d'amorces de qPCR et l'entretien de la développeuse, qui tombait toujours sur moi, comme de par hasard... Merci surtout pour les qualités humaines dont tu fais preuve, ta gentillesse notamment. Merci aussi pour avoir occupé mon petit bout le jour de la thèse pendant les questions. Je te souhaite le meilleur tant au niveau professionnel que personnel.*

***Etienne Coyaud**, merci pour ton soutien et ton aide pendant ces trois ans, et ce jusqu'au bout, via des messages de bon courage sur le net. Je retiens de toi la devise "Force et Honneur", et*

te remercie pour tous les encouragements que tu as pu me prodiguer pour me redonner confiance en moi quand j'en manquais. Merci pour ça, et travailles bien en post-doc, comme tu sais le faire!

***Charlotte Cresson**, je te remercie pour ta bonne humeur et ton accompagnement pendant la thèse. Je te souhaite bon courage pour tes études de médecine, et un gros m.... puisque, mine de rien, ta soutenance approche elle aussi à grands pas!*

***Wilfried Valleron**, ou encore Will, merci pour ton aide à toute épreuve. Brillant, toujours prêt à aider tout le monde, et de bonne compagnie. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites avec tes études de médecine, et te remercie pour l'aide que tu m'as apporté à moi aussi, notamment avec les analyses de transcriptomes.*

***Julien Familiades**, je te remercie pour ton aide bioinformatique sur le papier, et aussi pour les moments moins sérieux que nous avons partagés. Et je ne te dirai qu'une chose: Non, je ne suis pas "blonde"!!*

***Laure Berquet**, merci pour ton sourire constant, et ta bonne humeur. Je te souhaite bon courage pour la suite (et fin) de la thèse, ainsi qu'une belle réussite professionnelle.*

*Je tiens à remercier aussi **Lingli Yuan**, pour sa gentillesse, et son aide précieuse, notamment à Paris, pour se repérer dans les 4 Temps (!). Je suis heureuse d'avoir pu te connaître un peu mieux, et partager les moments du congrès de la SFH avec toi. Je ne dirai qu'une chose: où sont les consommables ???? Plus sérieusement, merci aussi pour les discussions scientifiques et relatives aux articles que nous avons échangées. Bonne chance pour la fin de la thèse !*

*Je remercie également les personnes qui ont collaboré à mon projet, et en particulier le **Docteur Camille Laurent**, pour son aide dans les mises au point de marquages immunohistochimiques. J'espère sincèrement que notre collaboration à venir se passera pour le mieux.*

*Merci aux organismes de financement, plateaux techniques (**Vectorologie, Cytométrie, Immunohistochimie, et Microscopie**).*

*Merci aussi aux personnels logistiques pour leur travail "dans l'ombre", mais d'une valeur inestimable, car nécessaire pour le bon déroulement des projets du Centre. Parmi ces personnes, je tiens à remercier particulièrement **Anne-Marie Benot** pour son aide, mais aussi pour sa grande patience et son efficacité à toute épreuve. Merci d'être venue partager le moment du pot de thèse avec ma famille. Je vous souhaite bon courage et plein de bonnes choses pour la suite de votre carrière.*

*Merci à la **Société Française d'Hématologie**, de m'avoir financée pendant mes 6 derniers mois de thèse, mais aussi de m'avoir permis de participer à l'organisation de leur congrès annuel. Je me souviendrai toujours de cette expérience professionnelle et humaine unique. Merci beaucoup!*

Je remercie également les personnes du labo que j'ai (peut-être) malencontreusement oubliées...

Enfin, je remercie mes proches, amis et famille, pour leur présence et le soutien dont ils ont fait preuve avec moi.

***Tatie Domie et Tonton Jacky**, merci à vous d'être venus me soutenir le jour de la thèse. Je garde de très bons souvenirs de mon enfance à vos côtés, et ça m'a beaucoup touchée que vous fassiez la démarche, spontanément, de venir assister à la soutenance. A très vite, et merci!*

***Brigitte et Bernard**, mes beaux parents, je vous remercie d'avoir été présents pour moi pour la clôture de cette aventure. C'était important pour moi que vous soyez là, alors merci!*

*Mes amis **Fouzia, Virginie, Karim, Noham**, merci d'avoir été présents pour moi, de m'avoir aidé et supporté dans les temps difficiles, et de m'avoir aidé parfois avec le petit Sacha, lors de retards intempestifs (...). Merci surtout d'avoir égayé mes moments hors du labo! Je suis sûre qu'on se trouvera l'occasion de boire l'apéro tous ensemble pour fêter ça! Merci à vous*

d'être venus assister à la thèse bien que vous ne soyez pas spécialistes, ça compte beaucoup pour moi.

*Mon amie **Lucie**, avec sa petite famille **Jérôme, Elisa, Margaux**, même si on dit loin des yeux loin du cœur, il n'en est rien avec vous... Merci à vous d'avoir fait de longs déplacements pour venir nous voir à Toulouse, et nous faire tout oublier et décompresser le temps de quelques week-ends!*

*Je remercie ma **grand-mère, Pierrette**, d'être là pour moi , et ce depuis toujours. La soutenance aurait eu un goût amer si tu n'avais pas été présente. Je suis heureuse de pouvoir te rendre fière de par mon cursus professionnel. Je ne pourrai jamais te remercier assez pour tout ce que tu fais pour moi.*

*Je remercie en particulier **mes parents, Christophe et Martine**. Merci à vous d'avoir cru en moi jusqu'à la fin, et de m'avoir permis d'aller au bout de cette aventure. Sans vous c'est sûr, je n'en serais pas là aujourd'hui! Merci pour les remontages de moral, pour les conseils avisés, et surtout pour l'éducation que vous m'avez prodiguée. Si je suis ce que je suis aujourd'hui, (et je pense ne pas m'en être trop mal sortie) c'est grâce à vous! J'espère pouvoir continuer à faire votre fierté, en tout cas je ferai tout pour. Merci, merci, merci....*

*Enfin, bien que l'ordre n'ait pas vraiment d'importance dans ces remerciements, je garderai les meilleurs pour la fin: mes deux amours, **Jérôme et Sacha**, ma famille à moi.*

*Toi **Jérôme**, qui m'accompagnes au quotidien et me soutiens dans les moments plus difficiles, comme notamment pendant la rédaction du manuscrit. Merci pour tes conseils, qui, même si tu es d'un autre monde que le monde scientifique, sont riches d'enseignement, et d'une valeur sûre. Merci de m'avoir aidé à relativiser dans les moments difficiles, et surtout merci pour la vie personnelle que tu me permets d'avoir.*

*Et toi, mon petit bébé d'amour, mon **Sacha**, que j'aime plus que tout au monde. Merci pour ta contribution notable dans mes capacités à faire mes nuits complètes...car oui c'est important de dormir pendant la thèse! Merci d'être présent dans ma vie, et de l'égayer chaque jour un peu plus. Je suis fière de tes prouesses scolaires (oui oui c'est important la maternelle, surtout la petite section!), et surtout, encore une fois, merci de m'avoir aidé à dédramatiser et à relativiser, et ce par ta simple présence.*

SOMMAIRE

SOMMAIRE	12
TABLE DES FIGURES	16
LISTE DES ABREVIATIONS	19
INTRODUCTION	21
I. DEVELOPPEMENT ET PHYSIOLOGIE DES LYMPHOCYTES B	22
A. Généralités : Système Immunitaire, Lignée lymphocytaire B et Immunoglobulines 22	
1. Système immunitaire	22
2. Lignée lymphocytaire B	22
2. Les Immunoglobulines: caractéristiques et fonctionnalité	23
B. La différenciation lymphocytaire B: Phase indépendante de l'antigène.....	25
1. Naissance des cellules B dans la moelle.....	25
2. Les cellules pré-pro B.....	25
3. Les cellules pro-B.....	25
4. Les cellules pré-B	26
5. Les cellules B immatures.....	27
C. La différenciation lymphocytaire B: Phase dépendante de l'antigène.....	28
1. Les cellules B transitionnelles	28
2. Les cellules B matures	28
3. Cellules B matures: rencontre avec l'antigène et interactions microenvironnementales.....	29
4. Le centre germinatif	31
8. La différenciation post - centre germinatif.....	34
II. LE LYMPHOME FOLLICULAIRE	36
A. Les lymphomes malins non hodgkiniens	36
B. Le lymphome folliculaire: Epidémiologie et incidence	36
C. Le lymphome folliculaire : Classifications & Pronostic	37
1. Généralités	37
2. Classification de Ann-Arbor.....	37
3. Index pronostiques.....	38
4. Classification histologique	39
D. Le lymphome folliculaire: origine & phénotype.....	40

1. Généralités : Morphologie et origine.....	40
2. Phénotype	41
3. Translocation t(14;18)	41
E. Lymphome Folliculaire: Succession d'anomalies moléculaires et altérations de la signalisation	44
1. Cumul d'anomalies génétiques	44
2. La signalisation du BCR.....	46
F. Microenvironnement cellulaire dans le Lymphome Folliculaire.....	47
1. Généralités	47
2. Cellules endothéliales et hypoxie	48
3. Lymphocytes T, Cellules Natural killer et immuno-intervention.....	49
4. Cellules folliculaires dendritiques, macrophages et progression tumorale	55
G. Lymphome folliculaire et échappement immunitaire	57
1. Concept d'immunité anti-tumorale et mécanismes d'immuno-évasion	57
2. Application aux lymphoproliférations malignes de type B	59
H. Thérapie du lymphome folliculaire.....	61
1. Standard thérapeutique	61
2. Mécanismes de résistance.....	65
3. Alternatives et nouvelles approches	66
III. L'ANALYSE DES TRANSCRIPTOMES DANS LE LYMPHOME FOLLICULAIRE ..	68
A. Généralités	68
B. Principe.....	68
C. Profil moléculaire du LF: un centre germinatif malin, qui peut évoluer en forme agressive.....	70
1. Signature génique proche du CG normal	70
2. Transformation agressive	72
D. Valeurs diagnostique et pronostique de l'analyse des profils d'expression génique dans le Lymphome Folliculaire.....	73
1. Diagnostic et classifications	73
2. Pronostic et réponse aux traitements	74
IV. LES CULTURES EN TROIS DIMENSIONS EN CANCEROLOGIE EXPERIMENTALE.....	78
A. Généralités	78

B. Les différents types de modèles en trois dimensions	78
1. Nomenclature	79
2. Eventail de cultures en trois dimensions	79
3. Méthodologies pour l'obtention des sphéroïdes.....	83
C. Le sphéroïde, une tumeur miniature.....	86
1. Paramètres physiques mesurables	86
2. Sphéroïdes et dérégulation des profils d'expression génique	88
D. Le sphéroïde, modèle valide en recherche préclinique: chimiorésistance et progression tumorale associées à la structure tridimensionnelle	90
1. 3D et chimiorésistance multicellulaire	90
2. Modèles de co-cultures en 3D: progression tumorale et échappement immunitaire.....	94
BILAN BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL:.....	97
RESULTATS	98
I. ORGANISATION TRI-DIMENSIONNELLE DES CELLULES DE LYMPHOME FOLLICULAIRE, EXPRESSION GENIQUE, HYPOXIE ET CHIMIORESISTANCE	99
A. Méthodologie	99
B. L'analyse de gènes : Autocompare & Genesis	101
1. Autocompare: principe	101
2. Application à notre étude.....	105
3. Principe de l'étude parallèle avec les échantillons de tissus sains / malins : Genesis	106
C. Article 1: <i>Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival and chemoresistance of Follicular Lymphoma.</i>	107
1. Introduction	107
2. Article	110
3. Conclusion, résultats complémentaires et perspectives de l'étude	111
4. Etude complémentaire : Accumulation & Régulation de la matrice extracellulaire cellulaire dans les lymphomes folliculaires, <i>application au modèle MALC</i>	115
II. ORGANISATION TRI-DIMENSIONNELLE DES CELLULES DE LYMPHOME FOLLICULAIRE ET IMMUNO-EVASION.....	123
A. Préambule.....	123
B. Article 2: <i>Innate predisposition to immune escape in follicular lymphoma cells.</i> ...	123

1. Introduction	123
2. Article	124
3. Perspectives et résultats complémentaires de l'étude	125
DISCUSSION GENERALE - PERSPECTIVES	133
I. PERTINENCE DU MODELE MALC EN RECHERCHE PRECLINIQUE.	134
II. ROLE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS LA BIOLOGIE 3D DES CELLULES DE LYMPHOME FOLLICULAIRE	136
A. M atrice extracellulaire et Lymphome Folliculaire :.....	136
B. Dépôt de matrice extracellulaire et résistance aux médicaments anti-cancéreux.....	137
C. Accumulation de matrice extracellulaire et limite de diffusion des drogues.	138
D. Accumulation de matrice extracellulaire et immuno-infiltration.....	138
E. L'accumulation de matrice extracellulaire dans les MALC obéit à des mécanismes encore incertains.	139
III. ROLE DE L'HYPOXIE DANS LA BIOLOGIE 3D DES CELLULES DE LYMPHOME FOLLICULAIRE	140
A. Hypoxie et Lymphome Folliculaire	140
B. Hypoxie et résistance aux médicaments anti-cancéreux	141
C. Hypoxie et immuno-évasion	142
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	144
ANNEXES	165
ANNEXE 1:	166
ANNEXE 2:	167
ABSTRACT	169
RESUME:.....	171

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Structure d'une immunoglobuline.....	23
Figure 2: La recombinaison V(D)J, source de diversité des gènes codant pour les immunoglobulines dans les précurseurs B.	24
Figure 3: La différenciation des lymphocytes B.	31
Figure 4: Organisation d'un centre germinatif.....	34
Figure 5: Coupe histologique d'un lymphome folliculaire de haut grade (3A).....	40
Figure 6: Mécanismes de la translocation chromosomique t(14;18) dans le LF.....	43
Figure 7: Accumulation d'altérations génétiques responsables de l'évolution en LF, et mécanismes de transformation proposés.	46
Figure 8: Courbe de survie en fonction de la quantité de macrophages dans la biopsie, chez les patients atteints de LF.	57
Figure 9: Modèle des interactions micro-environnementales dans le LF et contribution à la progression tumorale.	60
Figure 10: Mode d'action des anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	64
Figure 11: Principe des puces à ADN.	69
Figure 12: Regroupement hiérarchique des gènes qui sont dérégulés dans les différents échantillons, selon la fonction biologique ou le type cellulaire auquel ils sont associés.	71
Figure 13: Prédiction de la survie en fonction des signatures géniques identifiées dans le LF.	75
Figure 14: Liste des gènes sur-exprimés chez les patients non répondeurs au rituximab, classés par fonction biologique.	76

Figure 15: Tableau recensant les lignées épithéliales cancéreuses formant des cultures 3D. .80	
Figure 16: Principe des MCL. 81	
Figure 17: Techniques pour l'obtention de sphéroïdes. 85	
Figure 18: Homologies entre sphéroïdes et microrégions tumorales. 86	
Figure 19: Répartitions concentriques de la prolifération, de la viabilité et des métabolites/nutriments dans les MCTS. 87	
Figure 20: Modèle proposé de diffusion altérée des drogues in vivo. 91	
Figure 21: Marquages immunohistochimiques montrant la diffusion des fragments d'anticorps dans les cultures 3D. 92	
Figure 22: Modulation des voies de signalisation quand les cellules sont cultivées en 3D. ... 93	
Figure 23: Méthodologie pour la culture en 3D de cellules lymphomateuses. 101	
Figure 24: Résultats obtenus avec le logiciel Autocompare.. 104	
Figure 25: Régulation négative de cdc25a dans les MALC. 113	
Figure 26: La culture en 3 dimensions des cellules de LF est propice à la synthèse de fibres de collagène. 116	
Figure 27: La culture en 3 dimensions des cellules de LF favorise la production de protéines matricielles d'adhérence. 117	
Figure 28: Accumulation de protéines matricielles dans le modèle MALC. 118	
Figure 29: Régulation transcriptionnelle de gènes codant pour des protéines de la MEC dans les MALC, comparativement aux cellules en suspension. 119	
Figure 30: Accumulation de métalloprotéases induite par l'organisation tridimensionnelle des cellules de LF. 120	
Figure 31: Régulation transcriptionnelle de gènes codant pour des métalloprotéases. 121	

Figure 32: Tableaux récapitulant les transcrits éteints dans les MALC comparativement aux cellules en suspension, dans les voies "cytokine - cytokine receptor interaction" et "chemokine signaling" 125

Figure 33: Les cellules cultivées sous la forme de MALC sont plus résistantes que les cellules en suspension à la lyse induite par les effecteurs NK. 126

Figure 34: Analyse comparative du phénotype des cellules RL cultivées en suspension ou sous la forme de MALC. 128

Figure 35: Expression de marqueurs d'activation sur les cellules NK en fonction des différentes cibles..... 130

Figure 36: Activité de dégranulation des lymphocytes $T\gamma\delta$ et mort induite par ces effecteurs en fonction de la nature 2D ou 3D des cibles, et du traitement par le rituximab.. 136

Figure 37: Conséquences fonctionnelles de l'accumulation de la MEC dans les MALC, modèle hypothétique.. 140

Figure 38: Modèle hypothétique des adaptations ayant lieu dans les MALC..... 143

LISTE DES ABREVIATIONS

2D: deux-dimensions
3D: trois-dimensions, tridimensionnel
ADCC: Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity
ADN: Acide Désoxyribonucléique
Ag: Antigène
ARN: Acide Ribonucléique
BCR: B-Cell Receptor
CA IX: carbonic anhydrase 9
CAF: Cancer Associated Fibroblasts
CAM-DR: Cell adhesion Mediated Drug Resistance
CD: Cluster of Differentiation
CDC: Complement Dependent Cytotoxicity
CEA: Carcinombryonic Antigen
CFD: Cellules Folliculaires Dendritiques
CG: Centre Germinatif
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSH: Cellule Souche Hématopoïétique
CTL: Cytotoxic T Lymphocytes
FDA: fluorescein diacetate
FLIPI: Follicular Lymphoma International Prognostic Index
FMCA: fluorometric microculture cytotoxicity assay
GLUT-1: glucose transporter 1
HIF: Hypoxia Inducible Factor
HLA: Human Leucocyte Antigen
ICAM: Inter-Cellular Adhesion Molecule
IFN: Interféron
Ig: Immunoglobuline
IL-: Interleukine
IR: Immune Response
KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin
LAM: Lymphoma Associated Macrophages
LBDGC: Lymphome B Diffus a Grandes Cellules
LF: Lymphome Folliculaire
LLC: Leucémie Lymphoïde Chronique
LNH: Lymphome Non Hodgkinien
MALC: Multicellular Aggregate of Lymphoma Cells
MCL: Multicell layer
MCR: Multicellular Resistance
MC(T)S: Multicellular (tumor) spheroid
MDR: Multidrug Resistance
MH: Maladie de Hodgkin
MM: Myélome Multiple
NFkB: Nuclear Factor Kappa, B
NK: lymphocytes Natural Killer
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
PAg: Phospho-Antigen
PEG: Profil(s) d'expression génique(s)

Pgp: P- *glycoprotein*
PKC: Protéine Kinase C
TAM: Tumor Associated Macrophages
TCR: T Cell Receptor
TFH: lymphocytes T Follicular helper
T $\gamma\delta$: Lymphocytes T gamma delta
Treg: lymphocytes T Régulateurs
TTF: Time to Treatment Failure
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

I. DEVELOPPEMENT ET PHYSIOLOGIE DES LYMPHOCYTES B

A. Généralités : Système Immunitaire, Lignée lymphocytaire B et Immunoglobulines

1. Système immunitaire

Le système immunitaire se compose de différents types cellulaires, qui participent à l'immunité adaptative, spécifique ou non spécifique. Notamment, de nombreuses cellules hématopoïétiques jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire spécifique, en même temps qu'elles assurent l'immunité non spécifique. Parmi elles, on retrouve les cellules polynucléaires, les mastocytes, les plaquettes et des cellules de la lignée myéloïde.

Toutefois, dans la cohorte de cellules assurant l'immunité spécifique ou adaptative, seuls les lymphocytes de type T et B expriment des récepteurs aux antigènes (Ag), qui leur permettent d'exercer leurs fonctions immunes. Cette réponse immunitaire spécifique est mise en œuvre *via* la prolifération et la différenciation des seules cellules lymphocytaires de type B ou T qui présentent un récepteur d'antigène fonctionnel, capable de lier l'antigène natif ou dégradé, afin d'en assurer la neutralisation. Pour les lymphocytes de type T, le récepteur à l'antigène est le TCR (*T cell receptor*), alors que les lymphocytes B, eux, expriment le BCR (*B cell receptor*), qui est une immunoglobuline (Ig) membranaire.

Par la suite, nous parlerons exclusivement des lymphocytes de type B, car ce sont les cellules d'intérêt dans la pathologie lymphomateuse, à laquelle mes travaux ont été consacrés.

2. Lignée lymphocytaire B

Les lymphocytes sont de petites cellules rondes (7-9 μm de diamètre), présentant un gros noyau à chromatine dense, et un petit cytoplasme pauvre en mitochondries et lysosomes, alors qu'il comporte des ribosomes. Le point de départ de la différenciation B est la cellule souche hématopoïétique (CSH). Ensuite, la différenciation des lymphocytes B passe par deux étapes clés. La première est centrale, elle a lieu dans la moelle osseuse, et est indépendante des stimulations environnementales et antigéniques. La seconde est périphérique, se produit dans les organes lymphoïdes secondaires, et est marquée par l'activation des lymphocytes matures par des antigènes ou des interactions idiotypiques ; c'est dans ces organes lymphoïdes secondaires qu'auront lieu les phénomènes d'expansion clonale et de différenciation des

lymphocytes en cellules effectrices, qui assurent l'adaptation du système immunitaire aux stimulations environnementales. L'efficacité de ces deux phases de différenciation repose sur l'efficacité des cellules B à produire les Ig évoquées précédemment.

2. Les Immunoglobulines: caractéristiques et fonctionnalité

Ces Ig sont des hétérodimères protéiques comportant 2 chaînes lourdes identiques (H - *Heavy*) et deux chaînes légères, identiques aussi (L - *Light*). Chacune de ces chaînes est composée d'un fragment constant (C) et d'un fragment variable (V) (figure 1). Le site de fixation à l'antigène est constitué par l'association entre les régions variables des chaînes H et L. Les propriétés effectrices sont quant à elles assurées par les domaines constants des chaînes lourdes. Il existe cinq classes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , ϵ , et α), pouvant être chacune associée aux deux types de chaînes légères (κ et λ). La combinaison entre chaîne lourde et chaîne légère définit les différentes Ig que sont les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA.

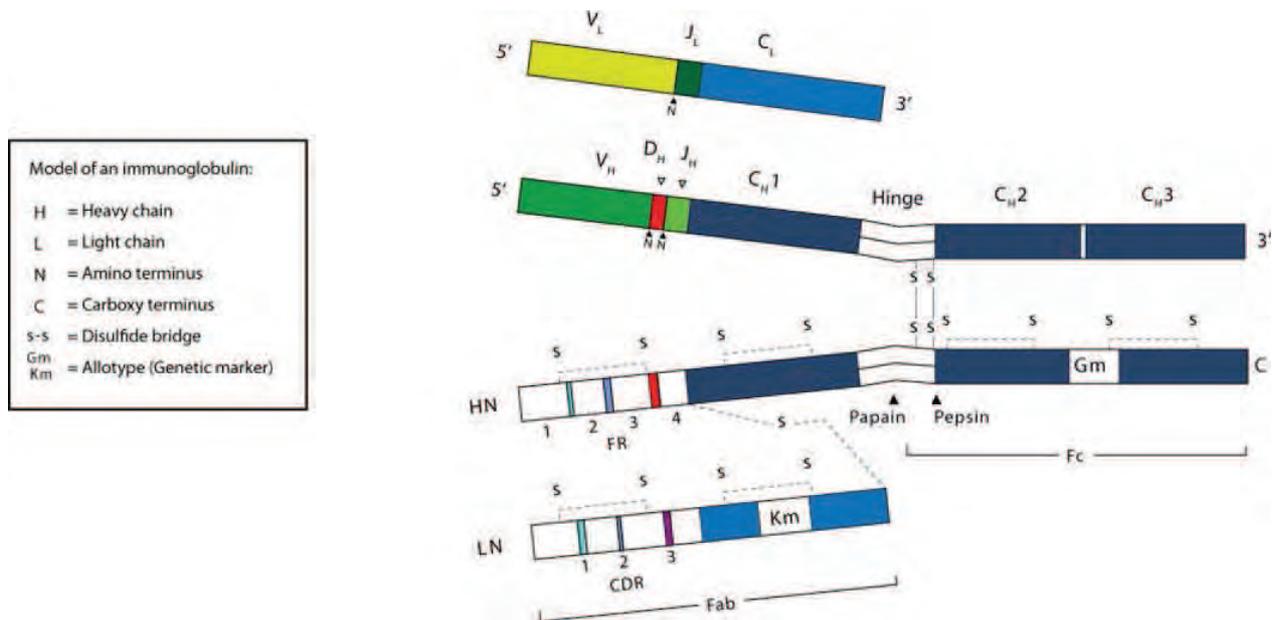


Figure 1: Structure d'une immunoglobuline. Le segment V_H (vert) correspond au domaine variable de la chaîne lourde ; le segment V_L est le domaine variable de la chaîne légère. Les domaines constants de la chaîne lourde sont ceux notés C_H ; le domaine constant de la chaîne légère est C_L . La région charnière est appelée "*Hinge*". D'après (1).

La fonctionnalité de ces Ig repose sur les phénomènes de recombinaison génique, qui se produisent au niveau des régions variables des chaînes H et L. Le but de ces remaniements de gènes est d'obtenir une diversité du répertoire de spécificité à l'antigène. C'est il y a 25 ans que ce concept de génération de la diversité des récepteurs à l'antigène est apparu, *via* une étude qui a démontré que le gène complet d'une Ig est généré à partir de séquences issues de plusieurs segments de gènes, qui sont soumis à une série de recombinaison sur des sites spécifiques de l'ADN. On parle alors de recombinaison V(D)J, pour *variable (diversity) joining* (figure 2). Lors de ce phénomène, la partie du gène des Ig codant pour les chaînes H est obtenue par la jonction de portions de gènes différentes, que sont les segments V_H , les segments D_H , et les segments J_H . La formation de la portion codante pour la région variable de la chaîne L repose sur la jonction de seulement 2 segments : $V_L + J_L$.

D'un point de vue chronologique, le réarrangement du gène de l'Ig est initié dans des précurseurs B très peu matures, au niveau de la chaîne lourde de l'Ig, et concerne les segments D_H et J_H (2) ; un peu plus tard, se produit le réarrangement entre les segments V_H et DJ_H . Ce point sera abordé plus en détail dans la sous partie sur les cellules pro-B, où il a lieu d'être.

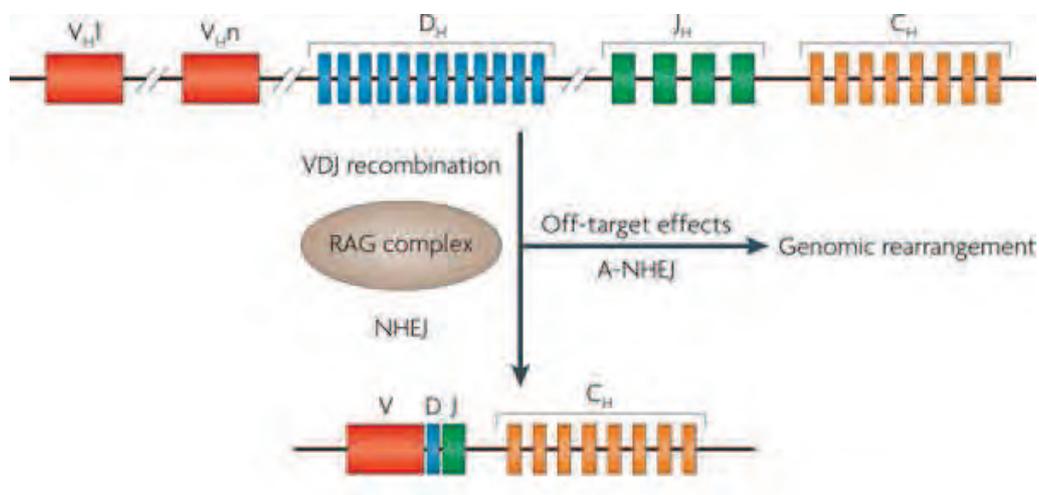


Figure 2: La recombinaison V(D)J, source de diversité des gènes codant pour les immunoglobulines dans les précurseurs B. La diversité des récepteurs aux antigènes, dans les cellules B, est le résultat de la recombinaison V(D)J. Ici, est représentée la recombinaison V(D)J qui se produit au niveau des chaînes lourdes. Les gènes codant pour les Ig comportent des segments V (*Variable*), D (*Diversity*) et J (*Joining*). Les recombinases RAG sont responsables de l'initiation de la recombinaison entre les différents segments. Elles agissent en tronquant des portions d'ADN entre ces différents segments, d'abord entre D et J, puis ensuite entre V et DJ. Adapté de (3).

Tous ces réarrangements géniques se produisent de façon séquentielle lors de la maturation des cellules B, et chacun d'entre eux est lié à une étape spécifique de la différenciation B.

B. La différenciation lymphocytaire B: Phase indépendante de l'antigène

1. Naissance des cellules B dans la moelle

C'est dans la moelle osseuse que se produisent les premières étapes de la différenciation B, qui conduisent à l'émergence du lymphocyte B immature à partir de la CSH. Cette moelle osseuse correspond au tissu situé au milieu des os dans l'organisme, et elle représente un microenvironnement de choix pour l'hématopoïèse précoce. C'est notamment parce qu'elle contient des cellules stromales, adhérentes, qui créent la niche microenvironnementale, et permettent de maintenir la viabilité des cellules hématopoïétiques, tout en fournissant des facteurs propices à leur développement. Ce sont les signaux émanant de ce microenvironnement médullaire, qui, couplés aux réarrangements de segments de gènes codant pour le BCR, assurent l'efficacité de la différenciation B. Au cours de cette différenciation, plusieurs précurseurs ont été identifiés dans la moelle osseuse, selon l'expression de certains marqueurs de surface: les pré-pro-B, les pro-B, les pré-B et les B immatures.

2. Les cellules pré-pro B

Les cellules pré-pro B constituent les précurseurs B les plus immatures présents dans la moelle. Elles sont issues des progéniteurs lymphoïdes communs, et n'ont pas encore réarrangé les gènes des Ig. Ces cellules n'expriment que très faiblement les gènes RAG-1 et RAG-2 (*Recombination Activating Genes*), 2 gènes spécifiques aux lymphocytes (4), qui interviennent dans l'initiation de la recombinaison des gènes des Ig (5). Ces cellules pré-pro B n'expriment pas le CD19, mais sont positives pour les marqueurs CD45, CD43 et c-kit.

3. Les cellules pro-B

Les cellules pro-B suivent les pré-pro B dans la différenciation lymphocytaire. C'est dans ces cellules que le marqueur CD19, spécifique de la lignée lymphocytaire B, apparaît. Les marqueurs CD10, CD34 et la TdT (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*) sont aussi retrouvés positifs dans ces cellules (6). C'est à cette étape de la différenciation qu'ont lieu les

premiers réarrangements V(D)J dans les gènes des Ig, selon une cinétique contrôlée. Ainsi, le stade pro-B précoce est caractérisé par la présence d'une jonction entre les segments D_H et J_H. Ces premiers réarrangements sont suivis de l'assemblage, dans les cellules pro-B tardives, entre les segments V_H et DJ_H déjà réarrangés. Ces événements de recombinaison V(D)J donnent lieu à des segments de gènes, qui, lorsqu'ils sont en phase de lecture correcte et sans codon stop, codent pour une région variable fonctionnelle. Ainsi, ils pourraient permettre la production d'une chaîne lourde μ HC intracytoplasmique, celle-ci étant détectable dans 5 à 10% des cellules pro-B CD19⁺/CD34⁺. Le conditionnel est de rigueur ici car les études ne sont pas toutes d'accord sur ce point.

Cette chaîne μ HC fait partie intégrante du pré-BCR, qui est lui même composé de 2 chaînes lourdes I μ et 2 chaînes SLC (*Surrogate Light Chain*) qui sont associées aux hétérodimères I α et I β . La SLC du pré-BCR est aussi composée de 2 protéines invariantes : VpreB et λ 5 (7). toutes ces protéines sont retrouvées, non assemblées, dans le cytoplasme des cellules au stade pro-B.

A cette étape de la différenciation, le réarrangement V(D)J est indispensable pour que la cellule passe au stade pré-B. Les cellules qui ont réarrangé leurs segments V(D)J de façon non fonctionnelle entrent en effet en apoptose (6).

4. Les cellules pré-B

La transition pro-B / pré-B est marquée par la perte d'expression des marqueurs TdT et CD34, ainsi que par l'acquisition du marqueur CD25, et de la chaîne lourde μ HC dans 95% des cellules pro-B. C'est alors que les protéines constituant le pré-BCR, dont nous avons parlé précédemment, vont s'associer et être exportées vers la membrane plasmique, permettant l'expression du pré-BCR sur les cellules pré-B. L'expression du pré-BCR marque l'entrée des cellules au stade pré-B, et la signalisation qui lui est spécifique leur permet d'entrer dans une phase d'expansion clonale. Mais aussi, le signal du pré-BCR va permettre d'inhiber la recombinaison V(D)J sur le deuxième allèle de l'IgH pour assurer l'exclusion allélique (4, 8). Ce mécanisme est décrit comme permettant l'expression à la surface cellulaire d'un BCR à spécificité unique. Il induit une diminution transitoire de l'expression des gènes RAG, afin d'empêcher la recombinaison du deuxième allèle : on parle alors d'activation monoallélique. Une fois qu'une recombinaison valable s'est produite dans les gènes codant pour les chaînes

lourdes, l'exclusion allélique est régie par le phénomène d'inhibition par rétrocontrôle, qui met fin aux réarrangements de gènes (4).

Pendant cette étape, la cellule pré-B sera sélectionnée de manière positive si elle exprime une I μ fonctionnelle, apte à s'associer à la SLC, ce qui lui permet de s'exprimer à la surface cellulaire. Ce phénomène est appelé la sélection positive des cellules pré-B (7). A cette étape, la quantité de cellules pré-B sélectionnées s'élève à approximativement 15 à 30% de la population cellulaire totale.

Plus tardivement dans le stade pré-B, les recombinaisons RAG sont ré-exprimées, ce qui permet alors le réarrangement des segments constants des chaînes légères, d'abord sur la chaîne κ , puis, si ce premier n'est pas fonctionnel, sur la chaîne λ . Cette exclusion allélique au locus des chaînes légères est elle aussi régie par le signal pré-BCR.

A l'issue de ces réarrangements géniques, et après le passage de différents points de contrôle qui assurent l'acheminement des précurseurs B depuis la moelle osseuse vers la périphérie, la cellule exprime un BCR avec deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, ce qui lui permet de passer du stade pré-B au stade B immature.

5. Les cellules B immatures

A cette étape, les cellules expriment le CD20, le CD22 et le CD40. Mais, le passage des cellules pré-B en cellules B immatures est marqué par le réarrangement de la région variable et de la région *joining* de la chaîne légère, donnant lieu à une chaîne légère fonctionnelle, permettant d'achever la formation du BCR. Ceci confère à la cellule une spécificité de reconnaissance à l'antigène. A cette étape, on estime que presque la moitié des cellules B immatures générées suite aux phénomènes de réarrangement de gènes sont auto-réactives, c'est-à-dire qu'elles reconnaissent les antigènes du soi (9). C'est alors que le BCR joue un rôle crucial dans le contrôle et l'élimination de ces cellules qui présentent un risque, selon 3 stratégies possibles: la première est la sélection négative, à savoir la destruction du clone par apoptose; la seconde est l'inactivation, qui conduit à une anergie des cellules B mises en cause (10); et enfin, la révision du récepteur, mécanisme de tolérance, qui va conduire à un changement de la spécificité du BCR dans les cellules, *via* la réactivation des recombinaisons

RAG et le réarrangement d'une nouvelle région V κ . Le maintien de ces BCR auto-réactifs pourrait, dans certains cas, donner lieu à des désordres auto-immuns.

L'expression, à la surface cellulaire, d'un BCR non auto-réactif et fonctionnel va permettre aux cellules B immatures de sortir de la moelle osseuse pour migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, où elles pourront alors subir les dernières étapes de leur maturation, notamment suite à leur rencontre avec l'antigène.

C. La différenciation lymphocytaire B: Phase dépendante de l'antigène

1. Les cellules B transitionnelles

A la sortie de la moelle, les cellules B immatures, munies d'un BCR fonctionnel, migrent dans le sang jusqu'à la rate. On parle alors de cellules B transitionnelles, qualifiées T1, qui se différencient ensuite en cellules T2 dans la rate. Ces cellules T2 évolueront elles-mêmes en cellules B matures si la rencontre avec l'antigène se produit. Cette étape représente un stade intermédiaire de la différenciation B, lors duquel la sélection périphérique se produit. Cette sélection consiste à éliminer par apoptose ou bien anergiser les cellules transitionnelles exprimant un BCR de trop forte ou trop faible affinité.

Les cellules non éliminées expriment alors en surface une IgM et une IgD, et vont pouvoir se différencier en cellules B matures. Il est important de noter que cette étape de maturation quasi terminale est très dépendante du signal BCR.

2. Les cellules B matures

Les cellules B matures sont celles qui ont survécu à la sélection périphérique, et qui seront capables ensuite de se différencier soit en lymphocytes B folliculaires conventionnels, soit en lymphocytes B de la zone marginale (11). Ces événements de différenciation se produisent dans la rate, et sont dépendant de l'intensité du signal BCR, et de la collaboration de Notch2. La voie NF-KB pourrait également jouer un rôle prépondérant dans le phénomène (11).

Les lymphocytes B folliculaires conventionnels ont une durée de vie limitée à quelques semaines, et constitueraient l'option de différenciation choisie par les cellules T2 exprimant fortement le BCR. Au contraire, les cellules différenciées en lymphocytes B de la zone marginale vont migrer dans un autre compartiment de la rate, où elles vont perdurer via l'acquisition de capacités d'auto-renouvellement et de survie indéfinie. A l'inverse des cellules

B folliculaires, celles-ci résulteraient de la différenciation de cellules transitionnelles T2 exprimant faiblement le BCR.

Les lymphocytes B folliculaires constituent 80% des cellules B de la rate adulte, et possèdent la capacité de coloniser les ganglions lymphatiques. L'étape suivante pour ces cellules avant la différenciation terminale, sur laquelle nous reviendrons ci-après, est leur activation suite à la rencontre avec l'antigène.

3. Cellules B matures: rencontre avec l'antigène et interactions microenvironnementales

La maturation des cellules B se poursuit sous l'effet de deux processus que sont la rencontre avec l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires, et les interactions entre cellules B et cellules stromales ou entre cellules B et cellules du système immunitaire (lymphocytes T auxiliaires ou macrophages). Parmi les organes lymphoïdes impliqués, il y a les amygdales, la rate, les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer. L'architecture de ces organes est absolument primordiale, puisque c'est elle qui permet la coopération et les contacts entre les différents types de cellules. Les ganglions lymphatiques, de manière analogue à ce qui est observé dans la rate, présentent 3 zones que sont la medulla, le paracortex et les follicules.

Les cellules folliculaires dendritiques (CFD) et les cellules réticulaires fibroblastiques (CRF) sont les principales cellules du microenvironnement qui sont impliquées dans l'initiation et le maintien d'une réponse immune efficace par les cellules B.

Les CFD sont restreintes aux follicules dans les organes lymphoïdes périphériques, et elles permettent aux cellules B de migrer et de se différencier, notamment *via*, une fois encore, le signal du BCR, mais aussi *via* la sécrétion de cytokines, chimiokines, et grâce à l'expression de molécules d'adhésion. Les CFD présentent l'Ag aux cellules B, sous la forme d'un complexe immun. Ceci est à l'origine des mécanismes de sélection des cellules B, car seules celles qui expriment un BCR de forte affinité reçoivent un signal de survie de la part des CFD. Elles lient alors l'Ag, l'internalisent et le présentent ensuite aux cellules T CD4⁺, préalablement activées par des cellules dendritiques (CD) au sein de la zone T. Cette interaction entre cellule B et cellule T se produit à l'interface entre la zone corticale et la zone paracorticale. Les peptides antigéniques sont présentés à la cellule T par la cellule B, dans les sillons de présentation des molécules du CMH de classe II présents à leur surface.

L'expression de certaines molécules de co-stimulation vient compléter cette interaction : par exemple, l'expression de CD80/CD86 sur les lymphocytes B permet la liaison au CD28 des lymphocytes T, et le CD40L exprimé par les lymphocytes T activés permet la fixation au CD40 sur les cellules B. Lors de cette étroite coopération entre cellules B et cellules T, les cellules T vont aussi favoriser la survie, la prolifération et la maturation des lymphocytes B (12), et ce par exemple en sécrétant de l'interleukine 2 (IL-2) ou de l'IL-4.

C'est dans le paracortex que sont majoritairement présentes les CRF. A cet endroit, elles sont responsables de la constitution d'un réseau de conduits, composé de différentes protéines de la matrice extra cellulaire (MEC). Ce système de connexion favorise le transport rapide d'Ag solubles depuis la périphérie vers les cellules dendritiques. Les cellules B pénètrent dans le ganglion lymphatique à travers les veinules endothéliales du paracortex, elles peuvent donc migrer le long de ces CRF jusqu'au follicule.

Les deux possibilités de devenir des cellules B suite à l'activation par leur rencontre avec l'Ag sont soit la différenciation en plasmocytes à IgM, à courte durée de vie, soit la migration vers les follicules où elles vont former des centres germinatifs (CG) (13).

L'ensemble des étapes de la différenciation qui se produisent depuis le stade pré-pro B et, jusqu'au stade cellules B matures est résumé dans la figure 3.

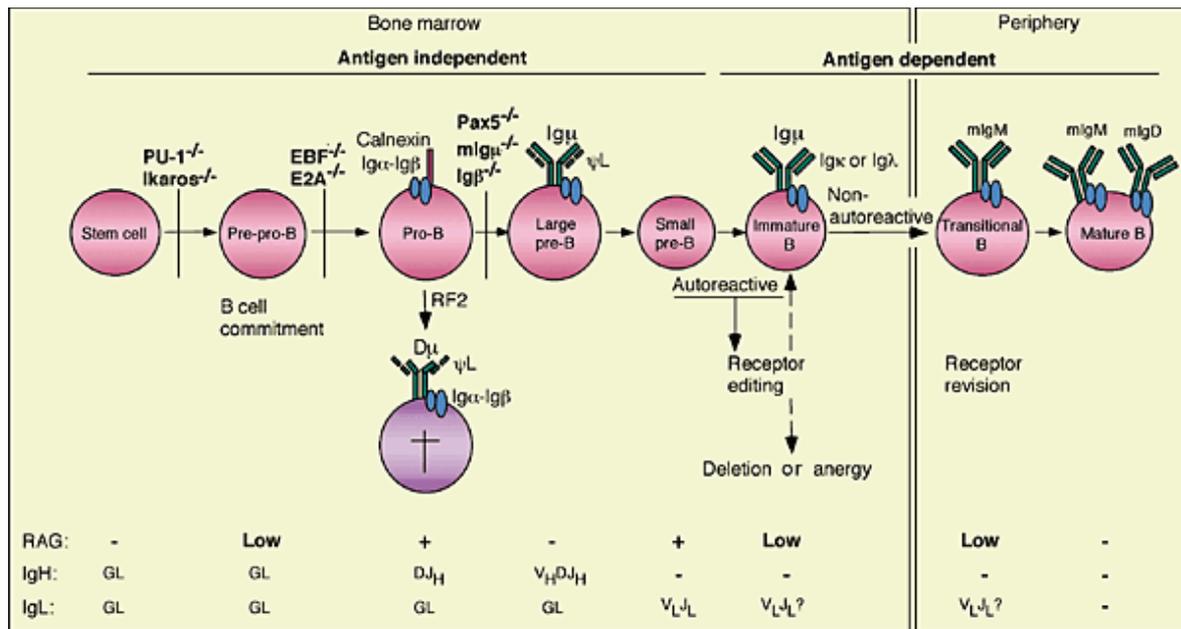


Figure 3: La différenciation des lymphocytes B. La différenciation lymphocytaire B débute dans la moelle osseuse, à partir de CSH. Sous l'influence de facteurs de transcription non détaillés dans le texte (Ikaros, PU-1, E2A, Pax5,...) les précurseurs vont évoluer jusqu'au stade de cellules B immatures, puis sortir de la moelle pour aller vers les organes lymphoïdes secondaires où ils achèveront leur différenciation grâce à la stimulation antigénique. Des phases de sélection se produisent à différentes étapes du processus, lors desquelles les cellules n'exprimant pas une immunoglobuline fonctionnelle ou d'affinité correcte seront éliminées. Ces mécanismes sont étroitement liés au niveau d'expression des recombinases RAG dans les cellules, et aux phénomènes de recombinaison V(D)J qui se produisent au niveau des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des Ig. GL: locus en configuration non accessible pour la recombinaison. D'après (14).

4. Le centre germinatif

Dans les organes lymphoïdes secondaires, l'immunisation avec l'Ag qui se produit suite au contact avec les cellules T provoque la prolifération des cellules B, induisant ainsi la formation de structures particulières appelées centres germinatifs.

Au départ, les cellules B IgM⁺ IgD⁺ sont disséminées au sein d'un réseau de CFD, c'est ce qu'on appelle le follicule primaire. S'en suit une prolifération rapide des cellules B, qui provoque leur délocalisation vers le côté du follicule, créant une zone entourant les CG appelée la zone du manteau : c'est ainsi que le follicule secondaire est créé. Après ces quelques jours d'intense prolifération, nécessaires pour que les CG se forment suite au contact avec l'Ag, la durée de vie de ces CG est de quelques semaines, leur taille maximale étant

atteinte au bout de 2 semaines. Les CG sont caractérisés par la présence de deux zones principales, dites zone sombre et zone claire. La zone sombre porte ce nom en raison de la forte densité cellulaire qui y est observée. Des cellules proliférantes appelées centroblastes y sont localisées. Dans la zone claire, ce sont des cellules de plus petite taille qui sont présentes ; elles sont appelées centrocytes, ne prolifèrent pas, et sont entourées d'autres cellules que sont les macrophages, les CFD et les cellules T. Outre des capacités de prolifération importantes, les cellules du CG sont extrêmement sensibles aux signaux apoptotiques qui les stimulent. En effet, dans le CG, aucune cellule n'exprime la protéine anti-apoptotique Bcl-2, alors que des protéines aux fonctions pro-apoptotiques sont, elles, fortement exprimées (Fas, p53, Bax) (15). Ceci est en quelque sorte un mécanisme de sélection, puisque cette sensibilité accrue des cellules à l'apoptose permet d'éliminer toutes les cellules B qui expriment un BCR non fonctionnel (16).

Les deux types cellulaires retrouvés dans le CG y subissent d'autres modifications qui permettent d'assurer la maturation des cellules B : les centroblastes sont soumis aux hypermutations somatiques, et les centrocytes à la commutation de classe.

- Dans la **zone sombre**, suite à la stimulation antigénique, les **centroblastes** subissent des modifications appelées les **mutations somatiques**, celles-ci ciblant essentiellement la région variable des gènes d'Ig (IgV) des cellules B activées,. Ces modifications génétiques permettent de moduler, et donc dans certains cas, d'augmenter, l'affinité du BCR pour l'antigène, et ce tout en entretenant la diversité du répertoire des anticorps. L'enzyme qui initie le processus de mutation somatique est AID (*Activation Induced cytidine Deaminase*). Elle agit, une fois activée, en générant des cassures double brin après avoir effectué la déamination de résidus déoxycytidine de l'ADN (17). Ces défauts doivent alors être réparés, et deux issues sont envisageables : soit la mutation est ignorée, et il y a transition C vers T après la réplication ; soit la mutation est éliminée, ce qui crée un site dépourvu de base, qui sera comblé par les polymérases translésionnelles après clivage de l'ADN par une endonucléase. La cytosine initiale pourra alors être soit substituée par une autre paire de base (transition ou transversion), soit conservée (18).

Ces mutations somatiques ont surtout lieu dans la zone sombre du CG où les centroblastes expriment AID. Elles peuvent également se produire dans d'autres gènes que ceux codant pour la chaîne légère des Ig, comme c-myc, ou Bcl-6 (19, 20).

- La maturation des cellules B se poursuit dans la **zone claire**, où un processus accru de sélection va toucher toutes les cellules qui ont un BCR qui a été nouvellement muté, afin d'en évaluer l'affinité pour l'Ag. Les cellules dont le BCR ne reconnaît pas l'Ag sont éliminées par apoptose. Au contraire, les cellules présentant un BCR d'affinité correcte seront sélectionnées par les CFD, puis présenteront l'Ag aux cellules T *follicular helper* (T_{FH}), qui leur enverront alors des signaux de survie et de différenciation. Les cellules B, appelées **centrocytes** à ce stade de la différenciation, sont alors prêtes à subir un second phénomène appelé la **commutation de classe**. Il s'agit d'un processus de recombinaison somatique lors duquel le segment réarrangé VDJ se rapproche d'un nouveau segment constant, codant pour les domaines constants d'une autre classe d'Ig. Elle se produit au niveau de régions appelées *Switch*, ou S, qui se trouvent à proximité des segments constants des chaînes lourdes. Ce mécanisme est irréversible, et hautement régulé, notamment par l'activité de l'enzyme AID (21), ou encore par la signalisation spécifique du CD40/CD40L, entre autres. Cette commutation de classe peut conduire à des modifications des fonctions effectrices des Ig, puisque celles-ci dépendent des régions constantes des chaînes lourdes, qui sont impactées par le phénomène. Plus concrètement, les centrocytes peuvent, grâce à ce phénomène, échanger leurs Ig de classe IgM et IgD par une IgG, une IgA ou une IgE. Ceci est primordial pour assurer la diversité fonctionnelle des anticorps.

La structure du CG, ainsi que les interactions cellulaires et les phénomènes de recombinaison qui s'y produisent sont récapitulées dans la figure 4. Les événements qui ont lieu dans le CG précèdent l'étape de différenciation terminale des cellules B, celle-ci pouvant donner lieu à deux types cellulaires différents, auxquels nous allons à présent nous intéresser.

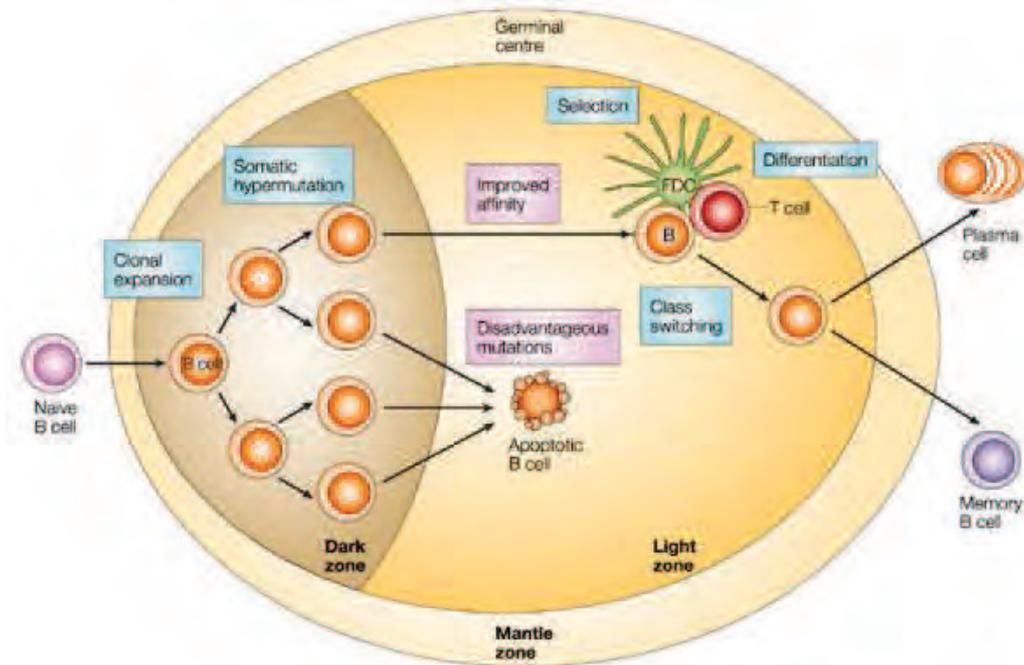


Figure 4: Organisation d'un centre germinatif. Le centre germinatif comporte une zone sombre, riche en centroblastes, où ont lieu les hypermutations somatiques. Les cellules migrent depuis cette région du CG vers la zone claire, où elles subissent une sélection, selon l'affinité de leur BCR pour l'Ag. Si les cellules sont sélectionnées, elles reçoivent des signaux de survie et de différenciation par leurs coopérateurs cellulaires (FDC pour *follicular dendritic cells* et T cell pour cellule T, potentiellement T *follicular helper* ici) ; les centrocytes subissent ensuite la commutation de classe, avant d'achever leur différenciation en plasmocytes ou cellules B mémoires, hors du CG. D'après (22).

8. La différenciation post - centre germinatif

A leur sortie du CG, les centrocytes peuvent se différencier en plasmocytes ou en cellules B mémoires, mais les facteurs qui régissent cette différenciation restent peu décrits. Toutefois, on sait que la différenciation plasmocytaire requiert l'inactivation des deux gènes Pax5 et Bcl-6. L'inhibition du facteur de transcription Pax5 va dans un premier temps donner lieu à la formation d'un pré-plasmablaste sécrétant peu d'anticorps. En suivant, l'inactivation de Bcl-6, suite à l'engagement du BCR et du CD40, va induire l'expression de *Blimp-1*, permettant ainsi la différenciation plasmocytaire (23). Ces plasmocytes sont des cellules sécrétrices d'anticorps, dont la durée de vie dépend de leur localisation. Dans la moelle osseuse, la durée

de vie des plasmocytes semble être allongée de plusieurs années par l'action des cytokines, et un microenvironnement favorable.

Pour ce qui est de l'évolution vers la cellule B mémoire, peu d'informations sont référencées à ce jour. Toutefois, il semblerait que Pax5 soit impliqué dans le phénomène, comme Bcl6 et le CD40 (16, 24, 25). Les cellules B mémoires ainsi formées rejoignent les lymphocytes B circulants, puis migrent vers des tissus lymphoïdes et colonisent certaines zones spécifiques, comme la zone marginale de la rate.

Les plasmocytes et cellules B mémoires représentent les deux acteurs essentiels pour la mise en place et le maintien d'une mémoire immunitaire efficace.

Ce premier chapitre introductif, consacré à la différenciation et à la physiologie du lymphocyte B, permet de poser les bases afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'apparition du lymphome folliculaire. Ce chapitre apporte des notions indispensables pour une meilleure compréhension de la physiopathologie de ce cancer des ganglions, auquel je me suis intéressé pendant ma thèse, et qui fait l'objet du second chapitre.

II. LE LYMPHOME FOLLICULAIRE

A. Les lymphomes malins non hodgkiniens

Les lymphomes malins non hodgkiniens (LNHs) et la maladie de Hodgkin (MH) sont les 2 grands types de syndromes lymphoprolifératifs qui existent chez l'Homme. Toutefois, les MH, qui se caractérisent par la présence de cellules de Reed-Sternberg, sont nettement moins fréquentes que les LNHs. Ces derniers représentent un groupe hétérogène de pathologies émergeant au niveau des tissus lymphoïdes, tels que les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, la rate ou le foie. On peut les subdiviser en 2 groupes selon qu'ils soient des néoplasmes de type B ou T, les LNHs de type T étant de très mauvais pronostic par rapport à ceux de type B. Ces LNHs représentent le sixième type de cancer chez l'homme (après les cancers de la prostate, du colon, du poumon, du mélanome, et de la vessie), et le cinquième chez la femme (après les cancers du sein, du colon, du mélanome et du poumon). Ils constituent 90% des cancers hématopoïétiques.

L'incidence des LNHs a doublé entre 1970 et 1990. Leur taux d'accroissement s'est actuellement stabilisé autour de 1-2%, mais leur incidence reste très élevée, avec notamment 66,360 nouveaux diagnostics aux USA en 2011. En Europe de l'ouest, en 2008, on estimait la proportion de nouveaux cas détectés à 10,5 /100 000 chez les hommes, et 7,5/100 000 chez les femmes (26). Avec 356 000 malades diagnostiqués dans le monde en 2008, ce qui compte pour 3% des cancers, ce type de lymphoprolifération maligne représente la dixième cause de décès par cancer, et ce depuis 2006 (27).

B. Le lymphome folliculaire: Epidémiologie et incidence

Parmi les LNHs, on distingue le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC), du lymphome folliculaire (LF). Le LBDGC est le plus répandu des cancers hématologiques, représentant 30 à 40% des lymphomes dans les pays de l'ouest. Le LF, second en fréquence, représente 20 à 30% des cas, mais il reste le premier type de LNH indolent en fréquence (28).

Ce cancer hématologique se caractérise par une évolution lente, avec une survie estimée de 8 à 12 ans en moyenne. On estime son incidence en France à 4 cas pour 100 000 individus (29). Cette pathologie reste incurable, et sa progression se caractérise par l'alternance de phases de réponses aux traitements et de phases de rechutes, avec une survie estimée à 4-5 ans après la

première récurrence de la maladie. L'incidence des LF a augmenté de 4,6% entre 1985 et 1992 en Europe (30).

Plusieurs facteurs épidémiologiques ont été avancés pour expliquer la recrudescence des cas isolés. Par exemple, les syndromes d'immunodéficience constituent des facteurs de risque pour le développement de LNHS. Les infections par certains pathogènes, le terrain familial, ou ont également été suggérés (31). L'exposition aux pesticides est quant à elle un facteur avéré de prédisposition au développement d'un LF (32, 33). Cependant, le pourcentage de cas concernés par ces études fait qu'elles ne suffisent pas, à elles seules, à expliquer cette incidence croissante.

C. Le lymphome folliculaire : Classifications & Pronostic

1. Généralités

La moyenne d'âge à laquelle a lieu le diagnostic se situe entre 55 et 60 ans. La maladie est fréquemment disséminée au diagnostic, avec des ganglions présents au niveau abdominal et thoracique, et souvent une infiltration médullaire.

Il est important de déterminer le stade de la maladie dès le dépistage, car bien que celui-ci n'ait pas systématiquement valeur pronostique, il conditionne la prise en charge thérapeutique. Plusieurs classifications du lymphome ont été avancées depuis les années 70, sur la base de paramètres à la fois morphologiques et moléculaires. Celles-ci sont déterminées par imagerie scanner, biopsie de la moelle osseuse et tests sanguins.

2. Classification de Ann-Arbor

On distingue 4 stades différents, selon la classification de Ann-Arbor, qui sont dépendants de la localisation et du nombre des aires atteintes:

Stade I: Le LF touche une seule région ganglionnaire ou une seule structure lymphoïde : rate, thymus, anneau de Waldeyer, par exemple. Plus rarement, un organe non lymphoïde peut être touché.

Stade II: Le LF est présent dans 2 régions ganglionnaires ou plus, mais du même côté du diaphragme.

Stade III: Des ganglions lymphatiques localisés des deux côtés du diaphragme sont affectés ; un organe adjacent ou la rate peuvent également être atteints.

Stade IV: Le foie, les poumons, les séreuses, ou encore des organes plus éloignés des aires ganglionnaires sont touchés.

Cette classification de Ann-Arbor ayant été élaborée initialement pour les MHs, dans lesquelles le stade au dépistage présente une forte valeur pronostique, elle n'est pas suffisante dans le cadre du LF, qui, lui, est caractérisé par une progression très hétérogène. Cette diversité évolutive est notamment démontrée par des cas de régressions spontanées, tout comme des cas très rapidement très agressifs.

3. Index pronostiques

C'est en 1993 que le premier index pronostique international (IPI) a été mis en place, pour les lymphomes de type agressif. Pour les LF, ce système de classification n'était pas complètement approprié, car seulement 1/5ème des patients atteints se retrouvait classé dans les groupes à risque élevé / élevé - intermédiaire (34). C'est pourquoi, en 2004, Philippe Solal-Céligny et collaborateurs ont établi un nouveau score, plus adapté, dénommé FLIPI (pour *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*), qui définit 5 paramètres de mauvais pronostic (34). Parmi ces facteurs ont été identifiés: un âge supérieur à 60 ans, un stade de Ann-Arbor compris entre III et IV, un taux d'hémoglobine inférieur à 120 g/L de sang, l'atteinte de 4 aires ganglionnaires ou plus, et enfin un taux sérique de LDH supérieur à la normale. En prenant en compte ces différents critères, 3 groupes peuvent être définis en fonction du score FLIPI: un groupe à faible risque (individus présentant 0 à 1 des facteurs définis ci dessus) ; un groupe à risque intermédiaire (présence de 2 facteurs), et enfin un groupe à risque élevé (entre 3 et 5 des facteurs sont identifiés chez le patient). Dans cette étude, les survies à 10 ans des 3 groupes sont respectivement de 71%, 51% et 36%.

En 2009, cet index FLIPI a été mis à jour avec le FLIPI-2, le premier étant considéré comme incomplet car ne prenant pas en compte l'introduction des anticorps monoclonaux thérapeutique anti-CD20 (rituximab) dans la thérapie du LF. Certains facteurs identifiés dans les nouvelles cohortes de patients traités ont alors été considérés pour la classification. L'âge et la concentration en hémoglobine restent des paramètres inchangés, auxquels viennent s'ajouter l'atteinte de la moelle osseuse, la concentration sérique de bêta-2-microglobuline, et

enfin un diamètre supérieur à 6cm de la plus grosse masse ganglionnaire (35). Cette dernière classification permet d'établir des groupes qui ne seront pas classés en fonction de la durée moyenne de survie qui les caractérise, mais plutôt en fonction de la durée de survie sans progression de la maladie. Malgré la validité du FLIPI2 (36), plusieurs travaux ont par la suite démontré que le score FLIPI classique conserve une valeur prédictive tout à fait robuste, même chez les patients traités par chimiothérapie couplée au rituximab (35, 37).

Un second score vient compléter le score FLIPI ; il s'agit du score GELF. Celui-ci n'est pas utilisé pour sa valeur prédictive, mais pour adopter une thérapeutique adaptée. Ce score représente un index d'agressivité naturelle de la maladie ; il tient compte de nouveaux paramètres que sont la taille (1 masse > 7cm ou plus de 3 sites > 3 cm), mais aussi de la présence de cytopénies ou d'épanchements, et enfin d'une lymphocytose très supérieure à la normale (>5000 cellules/mm³). La présence d'un seul des critères inclus dans cette classification justifie la prise en charge thérapeutique.

4. Classification histologique

Enfin, l'OMS a mis à jour en 2008 une classification basée sur des critères histologiques. Les 3 stades qui y sont définis reposent sur la proportion relative de centrocytes (petites cellules clivées) par rapport aux centroblastes (grandes cellules présentant des noyaux à chromatine fine, des nucléoles contre la paroi nucléaire, et un petit cytoplasme), par champ observé, dans la biopsie (38). Généralement, les stades 1 et 2 sont regroupés car ils représentent des LF de bas grade, font l'objet de la même stratégie thérapeutique, et comportent à la fois des centrocytes et des centroblastes mêlés ; plus précisément, le stade 1 présente entre 0 et 5 centroblastes par champ, le stade 2 en présentant entre 5 et 15. Le stade 3 est associé à un LF de haut grade, il comporte plus de 15 centroblastes par champ observé, et est subdivisé en 2 sous-groupes, en fonction de la persistance de centrocytes (grade 3A: centrocytes encore présents ; grade 3B: plages de centroblastes observées, sans centrocytes) (figure 5). La prise en charge du stade 3B se rapproche de celle adoptée pour les LBDGC. Certains variants ne sont pas pris en compte dans la classification de l'OMS, tels que les lymphomes centrofolliculaires cutanés ou diffus.

Toutes classifications confondues, on estime la survie moyenne à 10 ans dans 49% des cas.

La transformation en lymphome agressif (LBDGC) après quelques années survient chez 90% des patients.

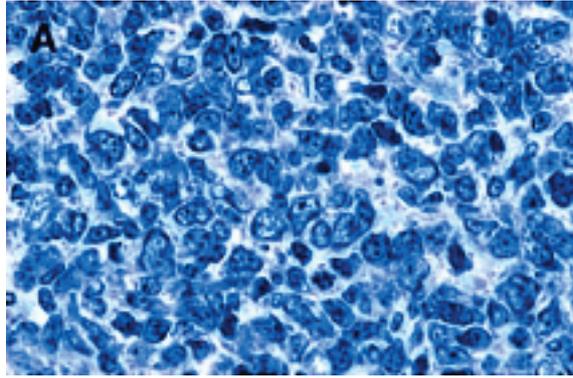


Figure 5: Coupe histologique d'un lymphome folliculaire de haut grade (3A). Les centroblastes sont les grosses cellules, qui sont ici largement prédominantes. Les centrocytes, cellules de taille petite à moyenne sur cette photographie, sont clivées, et apparaissent de couleur plus sombre. (Coloration Giemsa) D'après (39).

D. Le lymphome folliculaire: origine & phénotype

1. Généralités : Morphologie et origine

D'un point de vue morphologique, le LF présente toutes les caractéristiques du CG des organes lymphoïdes secondaires. Il se définit comme la prolifération de cellules malignes issues du centre germinatif. Outre les centrocytes et les centroblastes tumoraux, on y retrouve des cellules saines, telles que les lymphocytes T, quelques macrophages, ou encore des CFD, ces dernières étant organisées sous la forme d'un réseau hyperplasique et dissocié. Le LF se définit donc par une architecture nodulaire, plus ou moins diffuse.

C'est lors de la lymphopoïèse B, qui a lieu dans la moelle osseuse, que l'une des étapes initiatrices du LF se produit. En effet, cette lymphopoïèse, utile à la genèse du répertoire B, se caractérise par des processus accrus de réarrangement des gènes codant pour les Ig, propices à l'émergence d'altérations moléculaires. C'est une translocation chromosomique, sur laquelle nous reviendrons plus en détail ci-après (§I-3), qui permet à un lymphocyte B génétiquement modifié de subsister dans la moelle, et de transiter dans le CG d'un organe lymphoïde secondaire où, suite à la stimulation antigénique, elle subira d'autres modifications génétiques qui conduiront *in fine* à l'apparition du clone tumoral.

2. Phénotype

Les cellules tumorales de LF sont histologiquement différenciées. Leur phénotype est apparenté à celui des cellules de type B du CG. En effet, des marqueurs B spécifiques, tels que le CD19, le CD20, le CD22 et le CD79a, sont retrouvés sur les cellules tumorales de LF, associés à des marqueurs spécifiques du CG, que sont la centerine, BCL6, CD10 et CD38. Les cellules de LF expriment également des Ig de surface, à des niveaux d'expression variables, avec une prédominance pour l' IgM, suivie par l'IgG puis l'IgA. Enfin, les cellules de LF sont positives pour le récepteur CD95 (Fas), mais aussi pour les molécules CD40 et CD86, en général à des niveaux plus faibles que dans le CG (40). Dans plus de 80% des cas, elles sur-expriment la protéine BCL2 suite à la translocation chromosomique t(14;18) - voir plus bas. En revanche, elles sont habituellement négatives pour les antigènes CD5, CD43, FOXP1 et MUM1. La spécificité des CFD que nous avons évoquées plus haut peut être mise en évidence par les anticorps anti-CD21 et CD23. Contrairement aux ganglions réactionnels, les follicules tumoraux se caractérisent par un index de prolifération bas, illustré par un faible marquage pour l'antigène nucléaire Ki-67 (clone Mib-1), celui-ci étant inversement corrélé à la surexpression de Bcl2 (41).

3. Translocation t(14;18)

La translocation t(14;18)(q32;q21) est détectée dans 85% des cas de LF. Elle consiste en l'échange réciproque et équilibré de matériel entre les chromosomes 14 et 18. Celle-ci se produit suite à une cassure double-brin au niveau du chromosome 14, sur le locus de l'IgH, phénomène généralement attribué à un problème de clivage induit par RAG au cours de la recombinaison V(D)J (42). En parallèle, sur le chromosome 18, une fragilité des sites CpG induit la cassure au niveau du locus BCL2 (43). La résultante en est le placement du proto-oncogène BCL2 sous le contrôle du promoteur ($E\mu$) du gène codant pour les chaînes lourdes des Ig (IgH, segment JH) (figure 6). Cette translocation est directement responsable d'une surexpression du gène, et de la protéine Bcl2 sous sa forme fonctionnelle (44, 45). Or, Bcl2 est une protéine située sur la membrane de la mitochondrie, connue pour inhiber la mort cellulaire programmée (apoptose). Ce phénomène confère donc aux cellules lymphomateuses un avantage de survie dans le CG, où toutes les cellules sont au contraire négatives pour cette protéine, et extrêmement sensibles à l'apoptose.

Le dépistage du LF passe par une étape de détection de cette protéine Bcl2, *via* des approches d'immunohistochimie par exemple. Mais l'existence de multiples points de cassure dans le locus BCL2 peut engendrer des faux négatifs, si l'épitope reconnu est impacté par la translocation ; ces approches sont donc en général complétées par des techniques de biologie moléculaire, telles que le FISH, qui permet de détecter près de 95% des mutations de BCL2 sur le chromosome 18q21 à l'aide d'une sonde spécifique. Il est intéressant de noter que certains LF positifs pour Bcl-2 ne sont pas porteurs de la translocation t(14;18) (46).

Bien que l'expression de Bcl2 soit généralement considérée comme un marqueur typique du LF, elle n'est pas suffisante pour diagnostiquer la pathologie ni même pour l'expliquer, puisqu'elle est également retrouvée dans 15 à 20% des cas de LBDGC et de lymphomes du MALT (*Mucosa-associated lymphoid tissue*), et absente dans 5 à 10% des cas de LF (47, 48).

Il est intéressant de rappeler que ces LF n'exprimant pas Bcl-2, eux, impliquent Bcl-6, dont l'expression est alors liée à une autre translocation chromosomique, la t(3;14) (49). Bien que l'expression de Bcl-6 soit généralement associée à des cas de lymphomes plus agressifs, comme les LBDGC, une étude suggère que ces LF t(3;14)⁺ ne présentent pas un pronostic plus sombre que celui des LF t(14;18)⁺ (49).

Il semblerait que dans ces rares cas où Bcl-2 est absent, d'autres molécules impliquées dans la signalisation apoptotique, telles que Bcl-X_L ou Bad, inhibent la mort cellulaire dans les cellules B malignes de LF.

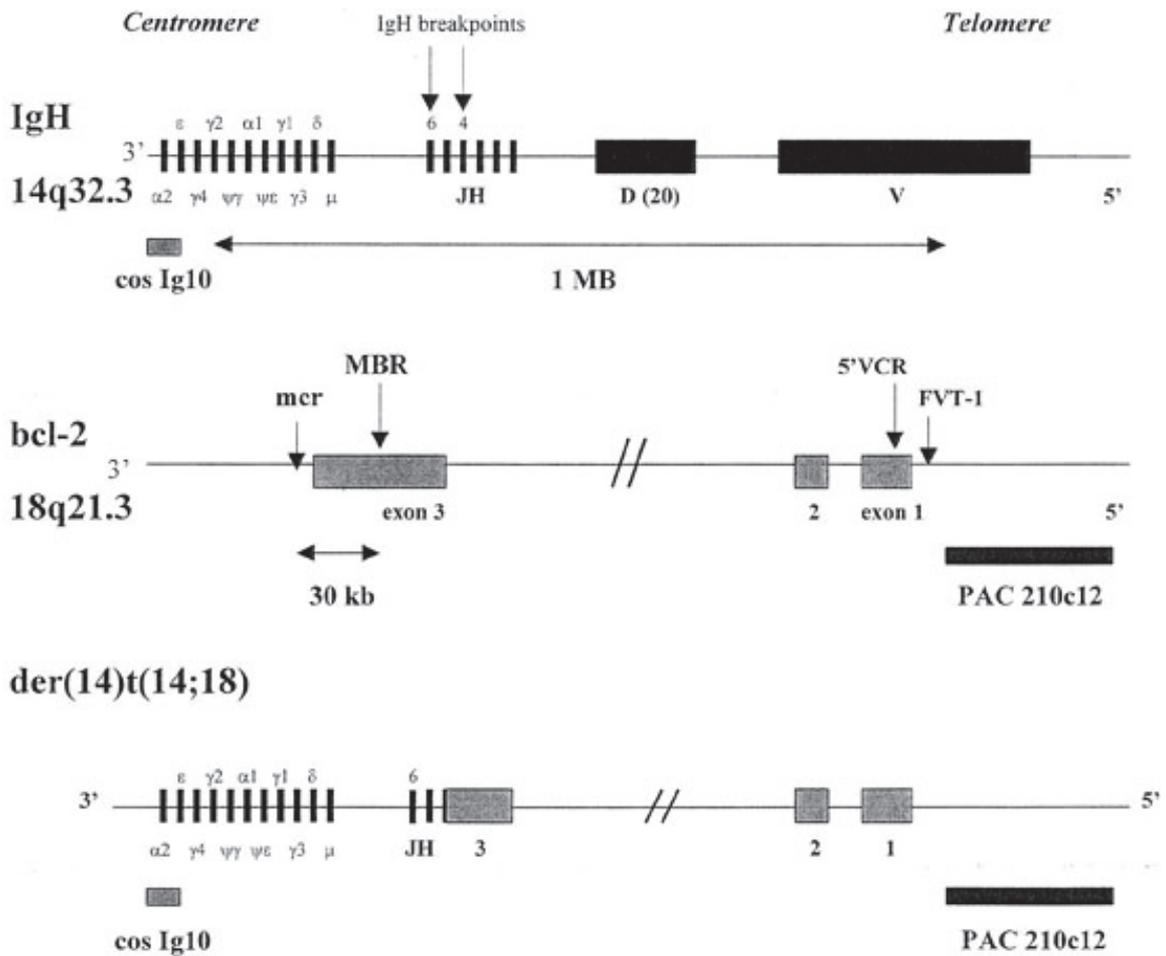


Figure 6: Mécanismes de la translocation chromosomique $t(14;18)$ dans le LF. Sur le chromosome 14, les points de cassure présents dans le locus de l'IgH se situent au niveau du segment JH ; sur le chromosome 18, dans le locus BCL2, les régions mcr, MBR et vcr (*Minor cluster region, Major Break Region, variable cluster region*) sont susceptibles d'être clivées. dans cet exemple, c'est le locus MBR qui est clivé. Le réarrangement entre les 2 chromosomes place BCL2 en amont du promoteur du gène codant pour l'IgH. D'après (50).

E. Lymphome Folliculaire: Succession d'anomalies moléculaires et altérations de la signalisation

1. Cumul d'anomalies génétiques

La translocation t(14;18) est retrouvée chez 45,7% des individus sains, dans les lymphocytes circulants, et son incidence augmente avec l'âge (51), mais ce sans pathologie lymphomateuse sous-jacente (52). De plus, un clone de lymphocyte B normal portant la translocation peut persister jusqu'à 3 ans chez un individu sain (53). Parallèlement, les souris transgéniques dans lesquelles le gène BCL2 est placé sous le contrôle du promoteur E μ de l'IgH ne développent pas spontanément de LF (54, 55). Ces données cumulées mettent en avant le fait que la translocation t(14;18), qui conduit à la surexpression de Bcl2, évènement initiateur dans le développement du LF, ne suffit pas, à elle seule, à en expliquer l'origine. Ce serait l'avantage de survie conféré initialement par l'expression de Bcl2 qui permettrait au clone transformé de persister, tout en accumulant des lésions oncogéniques nécessaires à la transformation en lymphome malin (figure 7).

En effet, ces anomalies génétiques secondaires sont indispensables pour une évolution en LF (56). Notamment, cinq anomalies chromosomiques récurrentes, retrouvées au minimum dans 20% des LF t(14;18) positifs, ont été identifiées par l'équipe de Höglund (57). Il s'agit de délétions sur le bras court (p) du chromosome 1 (32-36), le bras long (q) du chromosome 6 (11-27), ou d'insertions sur les chromosomes 7, 12 ou l'X. Mais des modifications supplémentaires ont été retrouvées chez 5% des patients, celles-ci affectant d'autres régions chromosomiques, telles que la 1q, ou la +der(18). Parmi ces évènements cytogénétiques additionnels, les insertions en 7, 1q et der(18) ainsi que les délétions en 6q ont été identifiées comme les plus propices à survenir juste après la translocation t(14;18) (57). Plusieurs études complémentaires établissent d'ailleurs des corrélations entre les altérations détectées et la survie des patients. Par exemple, les dommages touchant l'X ou les chromosomes 6q et 12 sont assimilés à des formes plus agressives ou des durées de survie moindres (58-60).

L'ensemble de ces données montre bien la diversité des lésions oncogéniques secondaires à la t(14;18). Néanmoins, peu d'altérations sont connues pour survenir dans une fraction conséquente des LF, ce qui explique que les mécanismes d'évolution en lymphome malin soient encore mal cernés.

Certaines équipes françaises se sont intéressé à ces points. Notamment, plusieurs travaux de l'équipe de Bertrand Nadel focalisent sur les évènements initiateurs de l'apparition du clone malin dans la pathologie lymphomateuse. Dans l'une de leurs études, ils démontrent que des cellules B en cours de maturation, et porteuses de la translocation t(14;18), sont capables de proliférer pendant leur transit dans le CG, chez des individus sains. Les auteurs suggèrent dans cette étude que la persistance de ces clones de cellules B positifs pour la translocation, aptes à proliférer, dans le sang de ces individus sains, est le signe qu'il existe des niches au sein desquelles le microenvironnement serait propice au maintien et à la prolifération suite à la stimulation antigénique (61). Ces données attestent bien de la complexité à décrire les mécanismes d'évolution du clone lymphomateux, puisque la majorité des individus positifs pour la translocation ne développeront jamais de LF: en effet, la prévalence des individus porteurs s'élève à 60% en moyenne, alors que celle des LF est de 0,3%. Finalement, on pourrait parler d'individus "à risque", qui en plus d'être porteurs de la translocation t(14;18), subiraient des modifications cellulaires et moléculaires permettant l'évolution du clone vers un phénotype de cellule B activée, à caractère monoclonal, précédant l'apparition du LF.

En ce sens, les travaux d'un autre groupe français, celui de Christian Bastard, gravitent autour de la *théorie de l'évolution intraclonale du LF*. Notamment, une de leur étude a porté sur l'étude des mutations dans la région S μ dans les biopsies de patients à différents temps (diagnostic, rechute, suivi...). Leurs données montrent que les rechutes peuvent être à la fois la conséquence de l'expansion du clone initialement responsable de la maladie, mais aussi de l'évolution clonale de certains sous clones, moins mutés, mais pouvant faire réapparaître la pathologie (62). Les auteurs parlent d'évolution non linéaire de la maladie, ce qui, là encore pointe du doigt la complexité des modalités évolutives des LF.

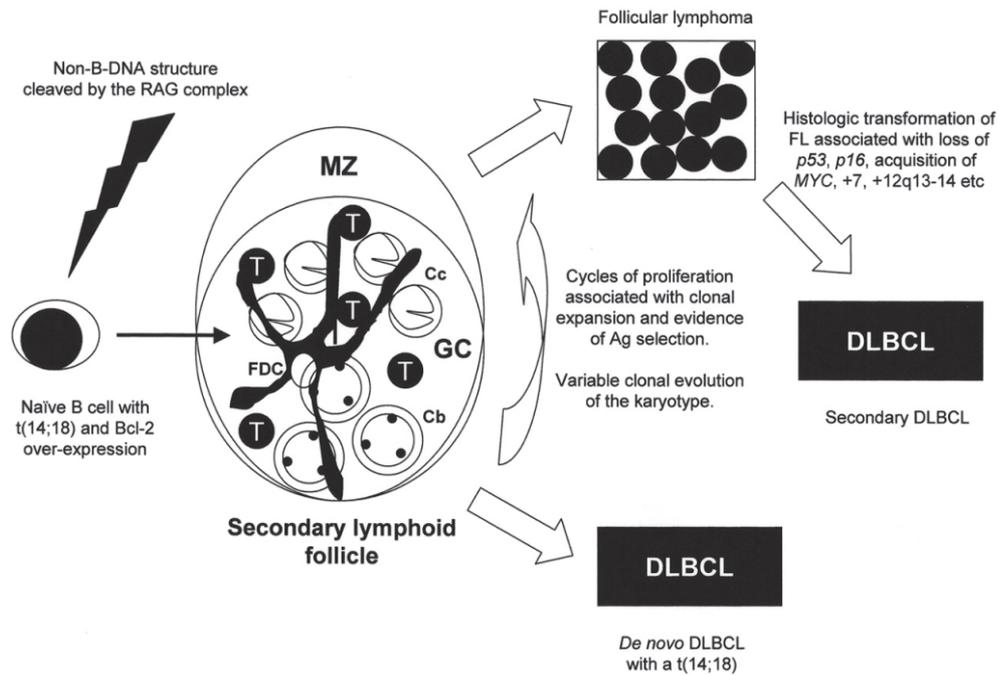


Figure 7: Accumulation d'altérations génétiques responsables de l'évolution en LF, et mécanismes de transformation proposés.

Suite à la translocation $t(14;18)$ qui se produit dans la moelle osseuse, le lymphocyte B transite jusqu'au CG, où il trouvera le microenvironnement favorable à sa prolifération (Lymphocytes T + CFD). Les divisions cellulaires induisent des altérations génétiques secondaires, elles-mêmes responsables de l'apparition du clone tumoral. Une accumulation trop importante de dommages conduira à une transformation histologique du LF en un lymphome plus agressif, proche du LBDGC, chez 30 à 50% des patients. Parmi les altérations impliquées dans le processus de transformation, ont été décrites des mutations de p53, des inactivations de p16, des sur-expressions de MYC ou encore des mutations supplémentaires sur les gènes BCL2 et BCL6. D'après (63).

2. La signalisation du BCR

L'hypothèse d'une stimulation chronique du récepteur B à l'antigène, dont nous avons déjà parlé dans le premier chapitre de ce manuscrit, a aussi été avancée afin de préciser la nature des lésions oncogéniques supplémentaires à la $t(14;18)$. Celle-ci a d'ailleurs été étayée par un travail de l'équipe de Giannelli, mettant en évidence une éradication des cellules B normales porteuses de la translocation suite à des traitements anti-viraux chez des patients atteints d'Hépatite C (64). Ces travaux ont laissé place à d'autres hypothèses, telles que des modifications de la fonction intrinsèque du BCR. Celles-ci peuvent en partie être associées à des changements de sa structure. Par exemple, un travail de l'équipe de Stevenson a mis en

évidence que 79% des patients atteints de LF sont porteurs d'une mutation au niveau du locus IgVH, responsable de l'accumulation de sites de N-glycosylation (65). Ce phénomène pourrait conduire à une sur-activation directe du BCR, ou encore à son activation indirecte *via* des interactions facilitées entre ces sites et les lectines présentes dans le microenvironnement du LF (66).

Outre la structure, la signalisation du BCR peut être mise en jeu. En effet, une signalisation accrue et plus durable du module BCR a été rapportée dans les lymphocytes B tumoraux, comparativement aux cellules B normales du même ganglion (67). De plus, dans notre équipe, la surexpression de Syk, composant proximal du BCR, a été mise en évidence dans les cellules de LF. Celle-ci conduit à une suractivation de la voie Syk/mTOR, elle même responsable d'une survie et d'une prolifération exacerbées (68). L'activation soutenue du signal BCR pourrait donc participer aux mécanismes d'oncogenèse propres aux LF.

F. Microenvironnement cellulaire dans le Lymphome Folliculaire

1. Généralités

Outre les dommages génétiques retrouvés dans les cellules de LF, leurs interactions fonctionnelles avec le microenvironnement immunitaire et les cellules stromales conditionnent fortement leur prolifération et leur survie. L'importance de ce microenvironnement est d'ailleurs démontrée par l'incapacité des expérimentateurs à cultiver *in vitro* des cellules de LF sans cellules stromales, ou stimulation du récepteur CD40 (69), récepteur qui appartient au module signalétique majoritairement impliqué dans les échanges entre les lymphocytes B et T. L'importance de la relation tumeur - hôte, déjà largement documentée dans certains désordres hématologiques tels que le myélome multiple (MM) (70, 71) ou la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (72, 73) a donc également une importance non négligeable dans le contexte du LF.

Les analyses immuno-histochimiques réalisées sur des coupes de tissus permettent d'en savoir plus à la fois sur les types cellulaires qui y sont retrouvés, mais également sur leur distribution intra-tissulaire. Notamment, différents sous-types de lymphocytes T (Follicular Helper, régulateurs ou cytotoxiques) sont retrouvés dans les échantillons, ainsi que des macrophages, des CFD, ou encore des cellules endothéliales.

Précisons que des avancées majeures sur l'étude de ce microenvironnement ont été réalisées grâce à des approches d'analyse d'expression de gènes. Néanmoins, dans cette partie, je ne développerai pas ce sujet, puisque le second chapitre introductif y sera entièrement consacré.

2. Cellules endothéliales et hypoxie

Dans les tumeurs solides, la présence et le rôle des **cellules endothéliales**, ainsi que leur rapport à l'angiogenèse, font l'objet d'importantes investigations, et ce depuis plus de 30 ans. En effet, elles sont indispensables pour la mise en place de l'angiogenèse tumorale, qui constitue une étape limitante pour la croissance de la tumeur (74, 75), mais aussi un mécanisme indispensable pour la dissémination métastatique (76). Or, dans les lymphomes, les études qui se sont intéressées à ces aspects restent peu nombreuses, bien qu'ils soient aussi caractérisés par une néo-angiogenèse (77, 78). Celle-ci est en partie stimulée par la production de facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), qui est retrouvé en concentration plus importante dans le sérum des patients atteints de LNHS (79), mais aussi, plus spécifiquement, de LF (80). Ce facteur de croissance est connu pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales, mais aussi des cellules primaires et lignées transformées de LLC (81). De plus, l'expression de ce facteur pro-angiogénique chez les patients atteints de LF (tissus, sérum) corrèle avec une moindre survie (82, 83). Un des facteurs environnementaux les plus décrits pour sa contribution à l'angiogenèse tumorale est l'hypoxie (84), à savoir la carence en oxygène d'un tissu, qui exerce ces fonctions *via* la protéine HIF1- α (85), pour *Hypoxia inducible factor 1, alpha*. Malgré ces observations, le statut et la fonction de HIF1- α ont été peu étudiés dans le LF. Un des travaux pionniers en la matière est l'étude menée par Stewart et collaborateurs (86), principalement basée sur des approches d'immuno-histochimie, qui révèlent une expression de la protéine dans 17 des 30 cas de LF étudiés. D'autres études plus récentes vont dans le même sens, et indiquent une positivité de ce marqueur chez près de 47% des patients, à des niveaux variables (87). Aucun indice pronostic n'est à ce jour associé à l'expression de la protéine dans les cas de LF, contrairement aux LBDGC, dans lesquels l'expression de la protéine confère un avantage de survie aux patients (88). Néanmoins, la réalité de la mise en place d'une vascularisation tumorale dans le LF (89), et son impact pronostic positif sur la survie des patients (90) mériteraient que des investigations plus approfondies soient réalisées.

3. Lymphocytes T, Cellules Natural killer et immuno-intervention

Les fonctions d'immunosurveillance sont principalement orchestrées par des lymphocytes de type T. La réponse immunitaire visant à éliminer les cellules tumorales repose principalement (mais pas uniquement) sur les lymphocytes T de type $\alpha\beta$, qui comprennent les lymphocytes T $CD8^+$ et les lymphocytes T $CD4^+$. Les lymphocytes T $CD8^+$ sont des cellules effectrices, c'est-à-dire qu'elles exercent une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales, alors que les lymphocytes T $CD4^+$ participent à la régulation de certaines fonctions lymphocytaires. Par exemple, ils sécrètent de l'IL-2, ce qui induit la génération de lymphocytes T $CD8^+$ mémoires (91). Mais ils produisent également de l'interféron γ (IFN γ), ce qui amplifie l'expression des molécules du CMH de classe I, et donc potentialise la reconnaissance des cellules anormales par les lymphocytes effecteurs T $CD8^+$.

- Ces **lymphocytes T $CD8^+$** , qui sont au départ "naïfs", se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) après stimulation par des cellules dendritiques qui leur présentent l'antigène. Ces cellules sont alors capables de reconnaître et d'éliminer les cellules cancéreuses qui expriment des marqueurs tumoraux associés aux molécules du CMH de classe I, et ce *via* 2 mécanismes: l'apoptose induite par des récepteurs de morts (FAS, le récepteur au *Tumor Necrosis Factor* - TNFr, TRAILr) et l'exocytose de granules lytiques comme les granzymes et la perforine. Ces CTL sont des types cellulaires auxquels est volontiers associée une activité anti-tumorale dans les tumeurs solides (92). Notamment, dans les cancers du colon, de l'œsophage, du sein, des ovaires ou encore dans les mélanomes, leur présence sur le site tumoral est un facteur de bon pronostic (93). Plus spécifiquement, dans le contexte du LF, ces observations restent vraies. L'infiltration des LF par les CTL a été documentée dès 1994 (94), et un infiltrat tumoral riche en lymphocytes T $CD8^+$ représente aussi un facteur de bon pronostic chez les patients (95, 96). Dans un travail très intéressant de l'équipe de Valitutti, la présence de lymphocytes T $CD8$ fonctionnels, compétents pour la lyse des cellules tumorales, a été mise en évidence en bordure du follicule tumoral, et pourrait être associée à une meilleure survie sans progression de la maladie suite au traitement standard actuel alliant chimiothérapie et anticorps monoclonaux (97).

Plusieurs études ont visé à évaluer la valeur pronostique de la présence de certaines sous-populations lymphocytaires dans le ganglion lymphomateux. Comme nous venons de le voir, la présence de T $CD8^+$ est plutôt de bon pronostic, mais les données sont plus complexes

quant aux **lymphocytes de type CD4⁺**. Il semblerait toutefois que le seul marqueur CD4 ne suffise pas à déterminer le pronostic, puisque les études sont contradictoires. Wahlin et collaborateurs montrent en effet qu'un infiltrat riche en lymphocytes T CD4⁺ est statistiquement associé à un mauvais pronostic dans le LF (98), alors qu'une étude antérieure suggérait l'inverse (96). Ceci est principalement lié au fait que les lymphocytes T CD4⁺ se subdivisent en plusieurs sous-catégories, à savoir les lymphocytes T helper 1 & 2 (TH1 et TH2), les lymphocytes T régulateurs (Treg), et les lymphocytes T follicular helper (T_{FH}). En effet, cette diversité des populations lymphocytaires de type CD4 explique la divergence des conclusions tirées dans ces 2 études: dans le premier travail, les auteurs s'intéressent au ratio cellules T CD4⁺ / cellules T CD8⁺ ; lorsque celui-ci est élevé, le pronostic est mauvais chez les patients. Il est alors précisé que les cellules CD4⁺ considérées n'expriment ni PD1 ni FOXP3, ce qui suggère que ce sont plutôt des cellules de type T_{FH} ou TH, qui sont associées à un mauvais pronostic quand elles prédominent. A l'inverse, dans l'étude menée par Alvaro et collaborateurs (96), le seul marqueur considéré est le CD4, ce qui ne permet pas de savoir exactement quelle est la sous-population de type CD4 impliquée dans le pronostic ; les auteurs suggèrent toutefois que la quantité de cellules exprimant le marqueur FOXP3 dans les tissus, avec une capacité à éliminer les lymphocytes de type TH, corrèle avec la quantité de cellules T CD4⁺. Ceci laisse supposer que, dans cette étude, les cellules de type CD4 associées à un pronostic favorable sont plutôt des cellules de type Treg.

- Parmi les différentes sous-populations lymphocytaires T CD4⁺, **les lymphocytes Treg**, caractérisés par l'expression du marqueur FOXP3, ont été étudiés dans les LF. On associe volontiers à ces cellules une activité pro-tumorale dans certains systèmes. En effet, chez l'animal, la déplétion systémique de ces cellules, notamment au moyen d'anticorps bloquant anti-CD25, induit une régression tumorale, celle-ci étant associée à une potentialisation de l'immunité anti-tumorale (99, 100). Les lymphocytes Treg périphériques isolés chez l'Homme exercent une activité immuno-suppressive *in vitro*, et leur présence en quantité importante dans les tumeurs de l'ovaire est associée à un mauvais pronostic (101), ce qui va dans le sens des observations effectuées chez l'animal. Toutefois, dans le domaine du lymphome, les études concernant les lymphocytes Treg génèrent des conclusions opposées à celles obtenues dans les carcinomes. En effet, dans le LF, la présence de lymphocytes Treg (FOXP3⁺ ou PD1⁺) en forte quantité est associée à une meilleure survie globale (102-104). Pourtant, de manière tout à fait contradictoire avec ces observations, dans les LNHS de type B, les

fonctions identifiées de ces lymphocytes Treg (dont les FOXP3⁺) sont de supprimer la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, mais aussi de diminuer la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T CD4⁺, et enfin de réduire l'activité effectrice de cellules telles que les CTL (105-107).

- **Les cellules Natural Killer (NK)** sont des lymphocytes à morphologie large et granuleuse, qui présentent une capacité naturelle accrue à éliminer les cellules tumorales *in vitro*, d'où leur appellation de *Natural Killer*. Comme les CTL, ces cellules sont capables d'induire la mort de cellules tumorales par exocytose de granules cytolytiques. Ces cellules représentent une classe distincte de lymphocytes, représentant 5 à 15% des lymphocytes périphériques chez l'adulte. Elles sont reconnaissables à leur phénotype CD56⁺/CD3⁻, et leur absence d'expression du TCR (*T cell receptor*). Il en existe 2 sous types, qui présentent un phénotype et des fonctions distincts, à savoir les NK CD56^{dim}CD16^{bright}, et les NK CD56^{bright}CD16^{dim}. Les premiers représentent 90% de la population totale de NK circulants, et sont, de par le fort niveau d'expression du CD16 qui les caractérise, ainsi que leur grande activité cytotoxique, des acteurs majeurs de l'ADCC. Les seconds constituent les 10% de NK circulants restants, et sont plutôt décrits comme sécrétant des cytokines telles que l'IFN γ , le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor*) ou le TNF α . La prolifération et les fonctions cytotoxiques et sécrétoires des cellules NK peuvent être régulées par diverses cytokines, comme l'IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 et l'IFN γ .

Les cellules NK expriment à leur surface des récepteurs inhibiteurs et activateurs, et leur activation est dépendante de l'intégration des signaux qui sont générés en aval de ces récepteurs. Ils fonctionnent donc différemment des cellules T, qui, elles, sont activées suite à la reconnaissance de peptides antigéniques par un seul récepteur, le TCR. De manière intéressante, les cellules NK agissent de manière inverse aux lymphocytes T vis-à-vis des molécules du CMH de classe I. En effet, c'est l'absence de déterminants du soi sur les cellules cibles qui est responsable de l'activation des NK. Parmi les molécules du CMH de classe I exerçant un pouvoir répresseur sur les fonctions NK, les HLA-A, B, C et E sont des ligands de récepteurs appelés les KIR inhibiteurs.

Les intégrines sont des molécules d'adhésion qui sont impliquées dans la formation de la synapse immunologique, évoquée précédemment. Plus spécifiquement, les intégrines β 1 et β 2 sont centrales dans l'association entre la cellule NK et sa cible. Loin d'être exhaustif, nous

citerons l'interaction entre le couple $\beta 2/CD11a$ (LFA-1 pour *lymphocyte function-associated antigen 1*) et les molécules ICAM-1, 2 et 3 (*intercellular adhesion molecules*), couplage démontré comme indispensable pour la dégranulation des vésicules lytiques (108).

L'activation des cellules NK résulte de l'absence de signaux inhibiteurs, de manière concomitante à la stimulation de récepteurs activateurs, les KIR activateurs, qu'elles expriment. Parmi eux, nous citerons le récepteur NKG2D, et le CD16, pour son implication dans la réponse ADCC (Cytotoxicité Cellulaire Dépendante de l'Anticorps), réponse cellulaire potentialisée par le traitement avec les anticorps monoclonaux utilisés en thérapie du LF. Les ligands du premier récepteur évoqué sont des protéines transmembranaires surexprimées par les cellules tumorales notamment (108) ; parmi elles, MICA-B (*MHC class I chain-related protein A - B*) et les ULBP 1-4 (*ULI6 Binding Protein*).

Plusieurs arguments permettent de soutenir la thèse d'une immunité anti-tumorale spécifiquement engagée par les cellules NK. Par exemple, un infiltrat riche en cellules NK est de bon pronostic dans les cancers colorectaux (109).

Enfin, plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer l'échappement des cellules tumorales aux effecteurs NK. Ils reposent principalement sur la dérégulation d'expression de ligands activateurs, dans le sens négatif ou positif (désensibilisation par stimulation chronique du récepteur). Certains ligands inhibiteurs peuvent aussi présenter un profil d'expression dérégulé: par exemple, dans le MM, la progression tumorale s'accompagne d'une hausse de l'expression des molécules HLA (110). Des modifications intrinsèques des cellules cibles cancéreuses peuvent aussi être envisagées pour contourner la réponse induite par les cellules NK (surexpression de PI-9, défaut de perméabilisation de la membrane plasmique par la perforine...).

Malgré ces propriétés anti-tumorales reconnues, le degré d'infiltration et d'activation de ces cellules NK est encore mal connu dans les LF. Un travail suggère toutefois que des cellules NK sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques de LF, et qu'elles sont principalement localisées en bordure des follicules tumoraux (111). Néanmoins, le marqueur utilisée dans cette étude, à savoir le CD57, n'est pas le plus classique pour reconnaître ces cellules. Le manque d'information au sujet de ces cellules NK dans le LF est à déplorer, car elles représentent des acteurs majeurs de la réponse immunitaire, notamment de l'ADCC, dont nous parlerons plus en détail ci-après.

- Enfin, les **cellules T $\gamma\delta$** représentent une autre population de lymphocytes, minoritaire par rapport à celles précédemment évoquées, dans le sang périphérique notamment, où elles ne représentent que 6% des lymphocytes T totaux. Dans les tissus lymphoïdes ou épithéliaux, cependant, leur présence est beaucoup plus importante, et peut représenter jusqu'à 50% de la population T. Ces cellules sont divisées en 2 classes, que sont les lymphocytes T V δ 1 et les T V γ 9V δ 2. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 représentent le type majoritaire de lymphocytes T $\gamma\delta$ circulants (70 à 90%). Cette classe de lymphocytes se distingue en différents sous-types, qui présentent des stades de maturation, des fonctions cellulaires et des phénotypes différents. Les principaux marqueurs pour les différencier sont le CD45RA, et le CD27, ainsi que le CD16, dans une moindre mesure.

Bien que ces cellules soient caractérisées par une reconnaissance antigénique plus restreinte que les autres lymphocytes, leur activité anti-tumorale est appuyée par plusieurs preuves. Notamment, dans des modèles murins dépourvus de lymphocytes T $\gamma\delta$ (TCR δ -/-), la susceptibilité de développer des cancers cutanés, suite à l'exposition *in situ* à des agents carcinogènes, est accrue (112).

Les fonctions effectrices des lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés ne sont pas très différentes de celles des lymphocytes T $\alpha\beta$: le potentiel cytotoxique *via* la libération de molécules lytiques, ainsi que l'activation des voies de mort passant par la voie FAS/FAS-L font partie de leur arsenal pour détruire les cellules du non-soi. De manière analogue aux cellules NK, leur activité peut être régulée par la signalisation induite par stimulation de récepteurs activateurs et inhibiteurs présents à leur surface. Par exemple, des lignées de lymphocytes T V γ 9V δ 2 établies après stimulation et amplification *in vitro* peuvent être activés *via* la stimulation de NKG2D, par la liaison avec ses ligands MICA-B (113). Ces données suggèrent que ces cellules pourraient être efficaces pour éliminer les cellules tumorales exprimant des ligands de NKG2D. De plus, ces cellules expriment aussi le CD16, ce qui pousse à penser qu'elles pourraient aussi participer à l'ADCC.

De plus, ces lymphocytes T V γ 9V δ 2 présentent des caractéristiques qui leur sont propres, à savoir leur aptitude à reconnaître, indépendamment du CMH, des antigènes non conventionnels de bas poids moléculaires, qui peuvent être de nature lipidique, ou bien des composés produits par des micro-organismes ou des cellules tumorales, et non phosphatés, appelés les phosphoantigènes (PAg). La mise en présence avec ces petits composés induit l'activation et la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2.

C'est chez l'animal que la réalité d'une immunosurveillance tumorale par les T $\gamma\delta$ a été démontrée, comme nous l'avons dit précédemment (112). Mais des données obtenues chez l'Homme viennent compléter ces travaux, puisque la réalité d'une réponse anti-tumorale par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 a été mise en évidence dans une étude clinique menée par Wilhelm et collaborateurs (114). Dans ce travail, les auteurs parviennent à amplifier spécifiquement des T V γ 9V δ 2 *in vivo*, chez 55% des patients atteints de LNHs de type B ou de MM réfractaires, par stimulation avec de faibles doses d'IL-2 et un PAG. Une régression tumorale est associée à cette amplification des $\gamma\delta$ chez 4 patients sur 5 (114). La présence de lymphocytes T V γ 9V δ 2 a aussi été rapportée dans certains cancers solides, comme celui des poumons ou du rein, et le maintien de leur potentiel cytotoxique après extraction des tumeurs est suggestif de leur activité anti-tumorale (115, 116).

Enfin, de manière plus spécifique aux désordres hématologiques de type B, il a été démontré que la quantité de lymphocytes T $\gamma\delta$ circulants était moins importante chez les patients atteints de lymphomes B, comparativement à des contrôles sains. Toutefois l'étude citée ici suggère que la proportion de $\gamma\delta$ infiltrés dans les ganglions malins est comparable à celle observée dans les ganglions réactifs hyperplasiques (117). Ceci est contradictoire avec l'étude de Braza et collaborateurs, qui démontre que les ganglions malins de LF sont plus riches en lymphocytes T V γ 9V δ 2 que les ganglions inflammatoires (118). Là encore, bien que des données suggèrent la présence de ces lymphocytes sur le site tumoral dans le LF, aucune donnée fonctionnelle ne vient compléter ces observations. On notera toutefois un travail montrant la capacité des lymphocytes $\gamma\delta$ à induire la lyse de cellules de LF, démontrée par la mise en présence de cellules purifiées à partir de sang périphérique de donneur sain avec des lignées cancéreuses de divers types de lymphomes B (119). Cependant, cette mise en situation reste éloignée de la situation *in situ*, notamment par son caractère allogénique, propice à la stimulation des effecteurs *via* la reconnaissance du non-soi.

Au total, nous retiendrons que ces cellules V γ 9V δ 2 sont dotées d'une activité cytotoxique naturelle contre les cellules de LF, mais qu'elles n'ont suscité que peu d'intérêt dans l'étude de la pathologie.

Il est dommage que des investigations plus poussées n'aient à ce jour pas été réalisées quant aux relations LF / cellules NK et lymphocytes T V γ 9V δ 2, car ces types cellulaires se prêtent bien à l'immuno-intervention.

Cette description non exhaustive mais approfondie des cellules NK et $\gamma\delta$ prend sa place dans cette partie introductive, même si elle ne fait pas l'objet d'un chapitre en soi, car ces cellules interviennent dans la seconde partie des résultats et les perspectives de mon travail de thèse.

4. Cellules folliculaires dendritiques, macrophages et progression tumorale

- Dans le ganglion tumoral, l'organisation entre les **CFD** et les cellules B malignes n'est pas sans rappeler l'organisation du CG "normal". Ces CFD sont caractérisées, entre autres, par leurs propriétés chémo-attractives vis-à-vis des cellules de LF. Par exemple, il a été démontré que *via* la sécrétion de CXCL13, elles attirent dans les follicules les cellules B malignes issues de plusieurs types de LNHS, qui elles, expriment fortement CXCR4 et CXCR5 (120). Ces cellules ont également été décrites pour induire des signaux prolifératifs et pro-survie dans les cellules de LF, notamment *via* des interactions entre VLA-4 / LFA-1, situés sur les cellules tumorales, et ICAM1 / VCAM1. De plus, ces cellules exercent une fonction de cellules présentatrices d'antigène, ce qui contribue à l'activation de la signalisation du BCR, permettant, là encore, l'expansion des cellules de LF. Enfin, ces cellules produisent des molécules comme BAFF, dont les effets anti-apoptotiques et pro-prolifératifs sur les lymphocytes B ont été démontrés dans divers types de LNHS (121). L'IL-15 produite par ces mêmes cellules permet elle aussi la prolifération des lymphocytes B de LF (122). Ces CFD présenteraient donc des fonctions majeures pour l'expansion et l'organisation des cellules de LF.

- Les **macrophages** sont des cellules immunitaires issues du lignage myéloïde, et provenant le plus souvent de la différenciation de monocytes. Leur nom leur vient de leur taille importante, et de leur capacité de phagocytose. Les premières études qui ont porté sur les macrophages dans les tumeurs solides ont montré la capacité de ces cellules à reconnaître et détruire les cellules tumorales (123). Toutefois, cette fonction est profondément détournée et altérée dans de nombreux cancers (124). Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) peuvent être à la fois des macrophages de type M1 et M2. Mais sur les sites tumoraux, une large prédominance des macrophages M2 a été observée. Ceci s'explique par l'absence de stimuli induisant une

polarisation vers le type M1, et la présence simultanée d'inducteurs de la polarisation vers le type M2 (cytokine IL-10 par exemple). Or, les macrophages de type 2 sont plutôt impliqués dans des phénomènes de remodelage tissulaire, de modulation de la réponse immunitaire, et de progression tumorale, contrairement aux macrophages de type M1, généralement associés aux mécanismes inflammatoires et décrits comme capables de détruire les pathogènes et les cellules tumorales (125). Il est aujourd'hui admis que ces TAM-2 facilitent la progression tumorale, de manière directe, en synthétisant des facteurs de croissance et des chimiokines, mais également de façon indirecte, en atténuant l'immunité adaptative, principalement via la sécrétion de TGF- β (*Transforming growth factor, bêta*), connu pour inhiber l'activation, la prolifération et l'activité des lymphocytes. Outre ces propriétés, les TAM-2 favoriseraient la dissémination des cellules tumorales, mais aussi l'angiogenèse tumorale (126, 127). Appliqué au lymphome, les macrophages intra-tumoraux sont parfois appelés les LAM (*Lymphoma-associated macrophages*). Certaines études associent, dans le LF, la présence d'un infiltrat riche en macrophages CD68+ à un mauvais pronostic (128, 129), comme l'indique la courbe de survie de la figure 8. Mais cette observation est à nuancer, puisqu'elle n'est pas confirmée chez les patients traités avec le rituximab, anticorps monoclonal anti-CD20 utilisé en thérapie du LF (130). Ces données suggèrent que le mauvais pronostic associé à la quantité importante de macrophages dans les LF peut être contrecarré par la thérapie avec les anticorps monoclonaux. Ces données sont d'ailleurs en accord avec l'étude de Taskinen (131), qui démontre que le sombre pronostic associé à une grande quantité de TAMs chez les patients traités par chimiothérapie conventionnelle n'est plus retrouvé quand les patients sont traités par immuno-thérapie plus chimiothérapie. Ces données soulignent la contribution potentielle de ces macrophages à l'efficacité des immuno-thérapies, ce qui concorde avec leur capacité à effectuer l'ADCC.

L'ensemble des interactions micro-environnementales décrites ci-dessus, qui constituent la balance entre les facteurs anti- et pro-tumoraux dans le LF, sont récapitulées et représentées dans la figure 9 (132).

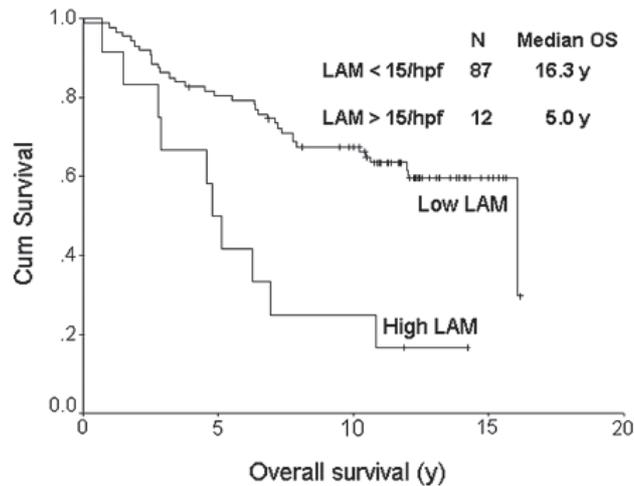


Figure 8: Courbe de survie en fonction de la quantité de macrophages dans la biopsie, chez les patients atteints de LF. Une forte concentration en macrophages (LAM) dans le ganglion folliculaire est un facteur de mauvais pronostic pour la survie globale des patients. D'après (128).

G. Lymphome folliculaire et échappement immunitaire

1. Concept d'immunité anti-tumorale et mécanismes d'immuno-évasion

Lors du développement et de la progression tumorales, les cellules malignes mettent en place des mécanismes qui leur permettent d'échapper aux réponses anti-tumorales de l'hôte.

L'hypothèse selon laquelle les cellules du système immunitaires sont capables de maîtriser la maladie néoplasique, en éradiquant les cellules cancéreuses avant que la maladie ne devienne détectable cliniquement, a donné lieu au concept d'immuno-surveillance. C'est chez la souris que ces notions ont été validées, puisqu'il a été montré que des animaux immunodéficients présentent un risque beaucoup plus important de développer des tumeurs, spontanément ou à la suite de traitements par des agents carcinogènes (133). Chez l'Homme, la démonstration de l'existence d'une immunité anti-tumorale reste plus complexe, mais elle existe bel et bien, et certaines observations cliniques constituent des arguments en sa faveur. Des cas d'immunodéficiences sont en effet propices au développement de cancers: les patients traités par immuno-suppresseurs (transplantation, maladies inflammatoires chroniques,...) représentent des groupes à risque plus élevé de développer des tumeurs (134, 135). D'autres

arguments démontrent ce concept d'immuno-surveillance anti-tumorale chez l'Homme: notamment, l'efficacité préventive et curative de certains vaccins (carcinome utérin par exemple), l'action bénéfique des thérapies menées avec l'IL 2 ou les traitements d'immuno-stimulation avec des antigènes tumoraux, ou encore la corrélation avérée entre la présence au sein des tumeurs de TILs (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*) et le meilleur pronostic des patients (136) (pour revue, voir (137)).

L'immunoediting des tumeurs est un concept basé sur le fait que la progression tumorale est dépendante du système immunitaire de l'hôte. Celui-ci se décompose en trois étapes. La première, dite phase d'élimination (immunosurveillance), se caractérise par la destruction des cellules tumorales. Toutefois, cette destruction peut être inefficace, et conduire à une phase d'équilibre, celle-ci étant décrite comme une étape durant laquelle les cellules immunitaires contrôlent l'expansion du clone tumoral, mais ne parviennent pas à l'éradiquer. Enfin, la dernière phase, dite d'échappement, est définie comme la prolifération totalement incontrôlée de la tumeur, qui échappe à toute pression du système immunitaire. On parle alors d' "*immune escape*".

Les processus mis en œuvre pour contribuer à cet échappement sont multiples. Par exemple, les cellules tumorales peuvent se rendre "invisibles" vis-à-vis des CTL, *via* la diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I. Cette diminution permet la survie, mais aussi la dissémination métastatique des cellules tumorales, dans le mélanome notamment (138).

L'inhibition des voies de mort induites par les CTL ou les cellules NK est un autre mécanisme d'échappement décrit. Par exemple, la sécrétion de FAS-L soluble, qui va induire la mort des cellules effectrices exprimant le récepteur FAS (139). Mais cette voie peut également être inhibée via la surexpression de protéines anti-apoptotiques comme FLIP (*FADD-like IL-1 β -converting enzyme inhibitory protein*). Certaines protéines connues pour contrecarrer l'effet cytolytique de la perforine et des granzymes, comme la serpine PI-9, ont également été décrites comme étant surexprimées dans une fraction conséquente des LNHS, et, dans une moindre mesure, dans certains cas de MH (140).

Enfin, le profil sécrétoire des cellules malignes peut être directement associé à une diminution de la réponse immunitaire anti-tumorale. Certaines molécules sécrétées par les cellules tumorales présentent des fonctions immunosuppressives, comme l'IL-10, le TGF- β , ou encore la prostaglandine E-2 (PGE2), ou l'indoléamine-2-3-déoxygénase (IDO) (141). D'autres

facteurs solubles sécrétés permettent l'établissement d'un microenvironnement pro-tumoral par les cellules cancéreuses elles-mêmes, *via* le recrutement de types cellulaires propices à la progression tumorale, tels que les macrophages ou les lymphocytes Treg, que nous avons décrits précédemment.

2. Application aux lymphoproliférations malignes de type B

Ces considérations ont également été étendues au domaine des LNHS. En effet, des défauts d'expression des HLA-I, en raison de lésions affectant le gène de la β 2-microglobuline, ont été décrites dans certains sous types de lymphomes, du système nerveux central notamment (142). Un travail plus récent de l'équipe de Riccardo Dalla-Favera confirme ces données chez les patients atteints de LBDGC, en ajoutant que des mutations et délétions affectant le gène codant pour le CD58 y sont retrouvées aussi, et ont la même conséquence (143).

Une autre adaptation cellulaire de la cellule tumorale décrit est le défaut de fixation de la perforine sur la membrane des cellules leucémiques, ceci empêchant leur lyse par le système perforine/granzyme dans les lignées cellulaires et cellules de patients atteints de leucémie aigüe myéloïde (AML) (144).

Mais la résistance des cellules tumorales au système immunitaire peut aussi résider dans leur capacité à détourner les fonctions cytotoxiques de certains effecteurs présents dans le microenvironnement, tels que les cellules NK ou les lymphocytes T par exemple. Ces cellules sont connues notamment pour agir *via* la stimulation du récepteur FAS. Or, les mécanismes décrits pour contourner ce phénomène sont nombreux: mutation du récepteur FAS, sécrétion de FAS-L (145) (qui va stimuler le récepteur FAS, présent en surface des cellules cytotoxiques, induisant ainsi leur mort), ou encore diminution de l'expression des récepteurs de mort tels que FAS, le récepteur au TNF, ou à TRAIL. Dans le LF aussi, ces détournements du système immunitaire de l'hôte par les cellules tumorales ont lieu. Ainsi, une étude récente de l'équipe de Ronald Lévy montre que les cellules tumorales de LF sont capables d'induire une conversion du phénotype lymphocytaire T CD4 en Treg, contrairement aux cellules B normales (146). Or, ces lymphocytes représentent une population immunitaire du microenvironnement qui possède des fonctions immuno-modulatrices favorables à la progression tumorale (147), comme évoqué précédemment. Très récemment, il a aussi été montré que l'IL-12 sécrétée par les cellules B lymphomateuses est responsable de

l'épuisement des lymphocytes T cytotoxiques présents sur le site tumoral. Cette étude révèle aussi que la présence de cette cytokine en concentration importante dans le sérum des patients est un facteur de mauvais pronostic (148).

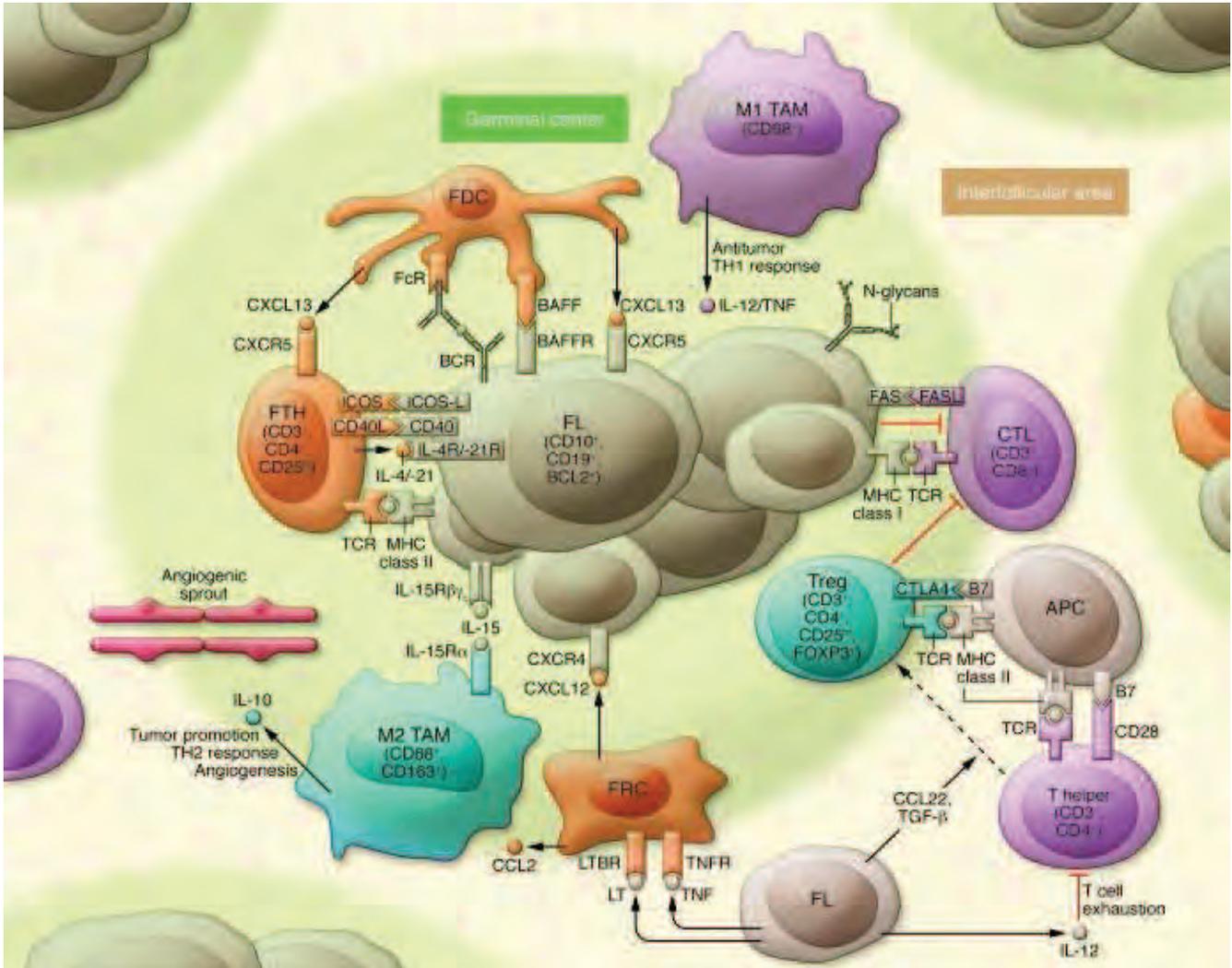


Figure 9: Modèle des interactions micro-environnementales dans le LF et contribution à la progression tumorale. Les différents types cellulaires non tumoraux présents dans le ganglion malin présentent des fonctions antagonistes. Les CFD favorisent la prolifération et la survie des cellules de FL *via* la production de cytokines et de facteurs de croissance ; les cellules immunitaires de type macrophage M2 et Treg représentent des facteurs de mauvais pronostic, en raison de leurs capacités à détourner les capacités d'immunosurveillance des effecteurs de l'immunité anti-tumorale (représentés ici par les macrophages de type M1, et les CTL). L'ensemble de ces interactions est propice au développement tumoral (chapitre suivant). D'après (132).

Enfin, des dysfonctions "mécaniques" de la réponse immunitaire ont fait l'objet d'investigations dans le domaine. Notamment, un défaut de formation de la synapse immunologique a été rapporté dans les LF et DLBCL (149). Or, la fonctionnalité de cette interaction moléculaire entre la cellule "tumorale" et la cellule effectrice de type CD8 est indispensable pour le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative.

H. Thérapie du lymphome folliculaire

Dans le LF, la prise en charge thérapeutique est essentiellement dépendante du stade de la maladie au diagnostic, mais aussi de l'état général du patient.

1. Standard thérapeutique

Moins de 10% des patients sont diagnostiqués alors que la maladie est à un stade précoce (I-II). Pour ceux-ci, la radiothérapie constitue le traitement de référence, puisque plusieurs études ont montré son impact bénéfique en terme de survie, sans récurrence de la pathologie. Ce type de traitement conduit en effet à une médiane de survie de 19 ans (150). Il faut toutefois nuancer, car certains patients diagnostiqués précocement ne reçoivent pas de traitement, et une étude rétrospective suggère que ceux-ci présentent une survie comparable à celle des patients traités (151).

Cependant, la vaste majorité des patients est diagnostiquée avec une maladie à un stade avancé. Pour ceux-ci, la prise en charge est variable : en effet, les patients asymptomatiques, et chez lesquels la maladie progresse lentement, sont soumis à des approches de "*watch and wait*". La première explication de ce choix thérapeutique est qu'il existe des cas de régression spontanée de la pathologie. De plus, les résultats de plusieurs essais cliniques indiquaient que la survie des patients sans symptômes, qui étaient traités immédiatement, n'était pas meilleure que celle des patients qui n'étaient pas traités (152, 153). Par le passé, seules la chimiothérapie et la radiothérapie étaient disponibles pour les patients symptomatiques. Notamment, un cocktail de molécules chimio-thérapeutiques, regroupées sous le nom de CHOP (cyclophosphamide - hydroxydaunomycin - oncovine - prednisone) a fait ses preuves en thérapie du LF, mais plus pour sa capacité à augmenter le taux de réponse des patients que pour rallonger leur survie. L'administration combinée d'interféron alpha, ou encore la

fludarabine, utilisée seule, ont aussi été utilisées, mais ces différentes options n'ont pas non plus permis d'augmenter le temps de survie des patients traités.

Cet arsenal thérapeutique s'est ensuite enrichi, notamment avec les greffes autologues ou allogéniques. La transplantation de cellules souches autologues couplée à de hautes doses de chimiothérapie présente un intérêt non négligeable. Parmi les points positifs qui lui sont attribués, une réponse plus durable et des avantages de survie. Mais elle reste soumise à controverse, notamment par sa contribution à l'émergence de complications secondaires majeures, telles que le développement de tumeurs solides ou de myélodysplasies ou leucémies aiguës (154).

Mais les progrès majeurs qui ont été réalisés en thérapie ont consisté en des approches d'immunothérapies. En effet, c'est le développement de l'anticorps monoclonal anti-CD20, appelé le rituximab (Mabthera[®]), qui a véritablement révolutionné le traitement du LF depuis ces 10 dernières années (155). Il s'agit d'un anticorps chimérique, c'est-à-dire qu'il possède une partie murine (domaines V_H et V_L d'un anticorps monoclonal de souris) et une partie humaine (région constante d'une I'gG1 humaine). Cette propriété diminue sa propension à générer des réactions immunogènes. Il a pour cible le CD20, antigène exprimé par les cellules tumorales. Il a d'abord été utilisé seul chez les patients. Il présentait alors un bénéfice somme toute médiocre avec un taux de réponse élevé (70%) mais pas de réponse complète. Ces observations ont conduit à utiliser le rituximab en combinaison avec les molécules de chimiothérapie classiques (CHOP). Cette modalité thérapeutique induit une réponse globale de 95%, dont près de 80% de réponse clinique complète, chez les patients. Ses effets moléculaires sont également surprenants, puisque les cellules de LF ne sont plus détectées dans le sang chez près de 50% des patients. L'efficacité avérée de cette association R-CHOP a fait qu'elle est devenue le traitement de référence en thérapie du LF en première ligne.

Le rituximab présente donc des bénéfices thérapeutiques avérés, mais ses mécanismes d'action semblent complexes : *in vitro*, 3 modes d'action lui sont associés (Figure 10).

Le premier mode d'action, à savoir l'effet direct, se produit par la fixation du rituximab sur sa cible, le CD20 de la cellule tumorale. Ceci induit l'engagement du CD20, mécanisme directement associé à sa translocation dans les radeaux lipidiques, où il va s'associer à des tyrosines kinases telles que Lyn, Fyn ou Lck. Ces tyrosines kinases vont alors être activées,

induisant ainsi l'activation de la PLC γ 2, ce qui génère un flux calcique intracellulaire. Ceci active les caspases, et conduit à une augmentation de l'apoptose (156). L'ADCC est le second mécanisme d'action décrit du rituximab. Comme nous l'avons dit ci-dessus, le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique, qui présente une partie murine variable qui reconnaît spécifiquement le CD20 humain, et une partie humaine constante, qui est le fragment constant (Fc) d'une IgG1 humaine. Ceci permet sa fixation à toute cellule effectrice exprimant des récepteurs au fragment Fc de l'IgG, à savoir les FC γ Rs, comme les NK, les neutrophiles ou les macrophages. Les FC γ Rs activateurs sont des récepteurs à motif ITAM. Leur activation suite à la fixation de l'IgG1 conduit à une phosphorylation dans ce motif ITAM, activant des voies de signalisation responsables de la libération d'immuno-modulateurs ou de molécules cytolytiques par les cellules effectrices. Enfin, le rituximab peut agir *via* la cytotoxicité dépendante du complément (CDC). Celle-ci est permise grâce à la fixation de la composante C1q du complément sur l'IgG1 (partie Fc) de l'anticorps. Ceci permet la liaison de cette partie Fc au C1qR de la cellule effectrice. La molécule majeure du complément, la C3b, est alors produite en quantité importante, ce qui génère des complexes d'attaque membranaires, responsables de la mort de la cellule cible tumorale.

La part relative de chacun de ces mécanismes d'action *in vivo* reste imprécise. On pourrait penser que l'action inhibitrice du rituximab sur la signalisation du BCR (157) sensibilise les cellules à l'apoptose induite par la chimiothérapie. Mais il est généralement admis que son mécanisme d'action majeur *in vivo* réside dans sa capacité à stimuler l'ADCC. Toutefois, la population effectrice qui serait responsable de cette réponse n'est pas encore totalement identifiée (NK, macrophages,...?).

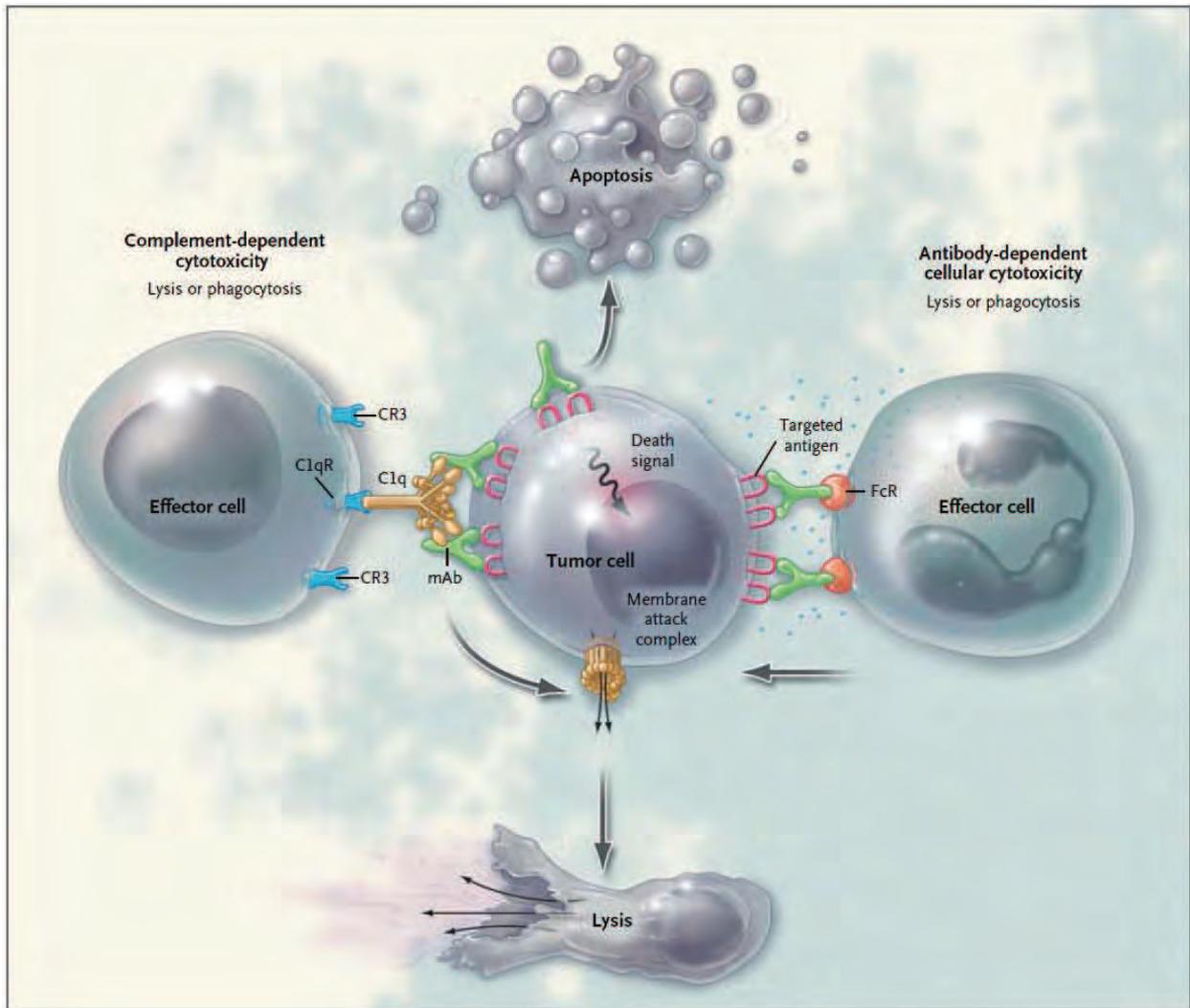


Figure 10: Mode d'action des anticorps monoclonaux thérapeutiques. Les 3 modes d'action suggérés pour des anticorps tels que le rituximab sont: **1-l'effet direct**, c'est à dire induction de mort par apoptose de la cellule tumorale suite à la fixation de l'anticorps sur le récepteur CD20. Cette liaison favoriserait l'inhibition de voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie, comme p38/MAPK, ERK, ou NF-KB (158, 159). **2-la cytotoxicité dépendante du complément** se produit grâce à la liaison de la partie Fc du rituximab à la sous-unité C1q du complément: ceci permet la fixation de l'anticorps sur le C1qR de la cellule effectrice, ce qui induit la production de CR3, molécule majeure du complément, par cette même cellule ; le complexe d'attaque membranaire qui en résulte induit la lyse de la cellule tumorale. **3-la cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC)** est possible grâce à l'activation de la cellule effectrice générée par la fixation simultanée de rituximab sur le récepteur CD20 de la cellule tumorale, et sur le récepteur CD16 (FC γ R) de la cellule effectrice (via son fragment Fc) ; l'effecteur ainsi activé sécrète des molécules lytiques responsables de la mort de la cellule tumorale. D'après (160).

2. Mécanismes de résistance

Malgré des résultats prometteurs associés à l'utilisation du rituximab en thérapie du LF, son action est parfois rendue inefficace par des mécanismes de résistance. Le phénotype de résistance au rituximab est souvent observé à la rechute, le taux de réponse étant alors divisé par deux (161). Le triple mode d'action du rituximab suggère trois types de mécanismes de résistance. Tout d'abord, l'effet direct est lié à la fixation de l'anticorps sur le CD20 de la cellule tumorale. Le niveau d'expression de cette protéine transmembranaire pourrait donc jouer un rôle dans la réponse au traitement. Ce premier point est confirmé par des études réalisées *in vitro*: des lignées cellulaires qui ont acquis une résistance au rituximab présentent en effet une moindre expression du CD20, à la fois au niveau du gène et de la protéine (162, 163). Cette "désensibilisation" pourrait être acquise et directement induite par le traitement initial, puisque chez les patients atteints de LNHs, il a été démontré que le taux d'ARNm codant pour le CD20, ainsi que le niveau d'expression de la protéine, diminuent fortement suite à un traitement par R-CHOP (164). L'activation intrinsèque de certaines voies de signalisation dans le LF pourrait conduire aux mêmes effets de résistance. Par exemple, notre équipe a montré que l'effet inhibiteur du rituximab sur la prolifération passe par l'inhibition du module PKC ζ /ERK/mTOR. Or, ce travail révèle que l'efficacité du rituximab est inhibée par l'expression d'un variant de la PKC ζ qui est constitutivement activé dans les cellules primaires et lignées de LF (165).

Le second mécanisme d'action du rituximab est l'ADCC, qui implique la fixation de la partie Fc de l'anticorps sur le récepteur CD16 (FC γ R) des cellules effectrices. Des travaux démontrent que la réponse clinique au rituximab est dépendante du polymorphisme du gène codant pour ce même récepteur dans les cellules NK (166). En effet, il avait été démontré avant cette étude que la mutation sur le gène codant pour le récepteur FCGR3A induit la substitution d'une valine par une phénylalanine, ce qui provoque une moins bonne fixation de l'IgG1 sur son récepteur ; l'étude de l'équipe de Hervé Watier établit une corrélation entre la présence de la mutation dans le gène (homozygote comme hétérozygote) et une moindre efficacité du traitement par le rituximab. La même équipe a démontré quelques années plus tard que l'activité ADCC des effecteurs NK est elle-même influencée par ce polymorphisme, dans le sens où la dose nécessaire pour induire la lyse des cibles est plus forte quand les cellules sont porteuses de la mutation (167).

Enfin, quelques molécules inhibitrices du complément ont été évoquées comme agissant dans la résistance au rituximab, puisque la lignée Ramos, insensible au rituximab, surexprime 2 d'entre elles que sont le CD55 et le CD59 (168).

3. Alternatives et nouvelles approches

La résistance au rituximab justifie le développement de nouvelles approches. Des stratégies vaccinales ont par exemple été entreprises. Le principe de celles-ci réside dans le caractère spécifique et propre à la tumeur, de la partie spécifique des Ig de surface, appelée le déterminant idiotypique. Le caractère "tumeur-spécifique" a fait de cet antigène une cible thérapeutique intéressante dans ce contexte. L'équipe de Ronald Lévy a mené la première étude (169) incluant des traitements avec des anticorps dirigés contre ces séquences idiotypiques (Id). Celles-ci ont donné quelques résultats prometteurs, avec des rémissions prolongées, mais qui se sont finalement avérées exceptionnelles. L'échec global de ce système est sûrement lié au fait que, contrairement à l'hypothèse initiale, les séquences idiotypiques sont spécifiques de chaque patient. La production "à façon", au cas par cas, impliquée par ce caractère requiert des procédés de fabrication fastidieux et coûteux. Des travaux supplémentaires ont de plus montré que l'efficacité anti-tumorale de l'injection n'était avérée que lorsque celle-ci était réalisée en présence d'une protéine vecteur, appelée le KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Néanmoins, sur les 3 études cliniques de phase III qui ont été réalisées sur l'administration KLH/Id, il n'y en a qu'une qui a permis un allongement global de la durée de réponse (170). Bien que les effets bénéfiques de cette vaccination idiotypique soient limités, ils restent suffisants pour prouver la réalité d'une spécificité de la réponse immunitaire anti-idiotypique dans le LF.

Plusieurs molécules prometteuses font ou ont fait l'objet d'essais cliniques avancés. Des progrès importants ont en effet permis de mieux comprendre les phénomènes de survie, de prolifération, et d'apoptose dans les LNHs. De plus, la dissection et la compréhension des voies de signalisation activées dans les LF ont fait émerger de nouvelles cibles potentielles pour sa thérapeutique. Parmi les molécules testées dans ces études, il y a des inhibiteurs de la signalisation : anti - Btk (PCI 32765), inhibiteur de PKC (Enzastaurin) ou du protéasome (Bortezomib), ce dernier présentant des résultats encourageants pour les LF, avec un taux de survie globale de 77% et une amélioration de la durée de survie (171). Des inducteurs de

l'apoptose ont également fait l'objet de telles études, comme notamment les anti-HDAC (*Histone deacetylase*) (172) ou les inhibiteurs de BCL2 (173). Enfin les inhibiteurs de la synthèse de l'ADN, et en particulier la bendamustine qui a démontré des effets très positifs en phase II pour des cas de lymphomes résistants (174) sont aujourd'hui validés dans la LLC et les LNHs (175). On pourrait envisager la combinaison de ces molécules émergentes avec le rituximab pour potentialiser le bénéfice thérapeutique.

Enfin, le succès des immuno-thérapies a suscité un intérêt croissant pour le développement de nouveaux anticorps à visée thérapeutique. Le rituximab est un anticorps de type I, ce qui sous-entend qu'il est responsable de la translocation du CD20 dans les radeaux lipidiques, qu'il active le complément, et qu'il induit un faible taux d'apoptose. Les anticorps développés ensuite, de type II, ne délocalisent pas le CD20, n'activent que peu la CDC, mais sont responsables d'une forte induction de l'apoptose. Parmi ces anticorps de type II, le GA101 (obinutuzumab), anticorps humanisé de troisième génération, est actuellement testé en clinique. Cet anticorps possède une partie Fc qui a été modifiée par ingénierie: l'afucosylation dans cette partie Fc induit une plus forte affinité pour le CD16, ce qui permet de contourner l'effet du polymorphisme du CD16 observé avec le rituximab. Un des intérêts majeurs que présente cet anticorps est donc sa capacité à induire une ADCC plus importante que le rituximab.

Bien que des progrès majeurs aient été réalisés durant les 20 dernières années en thérapie du LF, en rallongeant le temps de survie des patients, ou la survie sans progression de la maladie, cette pathologie reste incurable. Des études complémentaires restent donc indispensables pour mieux comprendre la maladie résiduelle, ainsi que les mécanismes de rechute.

III. L'ANALYSE DES TRANSCRIPTOMES DANS LE LYMPHOME FOLLICULAIRE

A. Généralités

La majorité des études menées pour caractériser la signature génique des LF a été entreprise afin d'établir des corrélations cliniques, diagnostiques, et même pronostiques. L'utilisation de ce type de technologies peut en effet permettre l'identification de gènes influençant la pathogenèse, la progression et le potentiel métastatique. Mais elles peuvent aussi aider à la classification des patients, sur la base de leur profil génétique. Enfin, la caractérisation de gènes impliqués dans la résistance aux traitements passe souvent par l'emploi de telles approches. L'objectif final est d'adapter la thérapeutique en fonction des profils obtenus, qui restent patients-dépendants.

Cependant, la littérature spécifique au LF reste très peu étayée dans ce domaine.

B. Principe

Une puce à ADN, ou *microarray*, est un support solide sur lequel sont fixées des séquences d'acides nucléiques séparées par des espaces réguliers. Le principe de base de ces puces est l'hybridation moléculaire qui se produit entre l'échantillon, composé d'un mélange d'acides nucléiques marqués avec des molécules fluorescentes, et les sondes nucléiques, de séquences connues, présentes sur le support. L'intensité du signal fluorescent résultant de cette hybridation détermine la qualité et la quantité d'acides nucléiques qui composent l'échantillon de départ (figure 11). Les membranes sur lesquelles sont fixées les séquences de référence peuvent être produites sur mesure, comme c'est le cas pour la "Lymphochip", utilisée dans une des premières études concernant les profils d'expression génique (PEG) dans les désordres hématologiques ((176), détail ci-après). Mais de plus en plus, la standardisation des procédés a conduit les expérimentateurs à utiliser des membranes commerciales, qui présentent l'avantage de recenser les gènes de l'intégralité du génome (ex: Affymetrix®). Les aspects limitant de ces approches sont qu'elles nécessitent de comparer un nombre d'échantillons suffisamment important pour en tirer des conclusions statistiquement robustes, et que les niveaux d'expression devront être validés en RT-qPCR pour plus de fiabilité. De

plus, la grande quantité de résultats générés par ces techniques requiert des outils analytiques puissants. Toutefois, des logiciels d'analyse complémentaires ont été développés, pour permettre d'associer la dérégulation des gènes à une signification biologique, comme notamment *Autocompare* (177), sur lequel je reviendrai très en détail dans la partie résultats, puisque son utilisation a été capitale dans le cadre de mon projet de thèse.

Certains avantages sont également avérés, tels que la sensibilité de la détection. Enfin, même si, dans l'absolu, les ARN messagers ne constituent qu'une seule étape de l'expression des gènes, leur abondance reflète dans la plupart des cas l'activité des protéines qu'ils codent, et ceux-ci restent plus simple à quantifier.

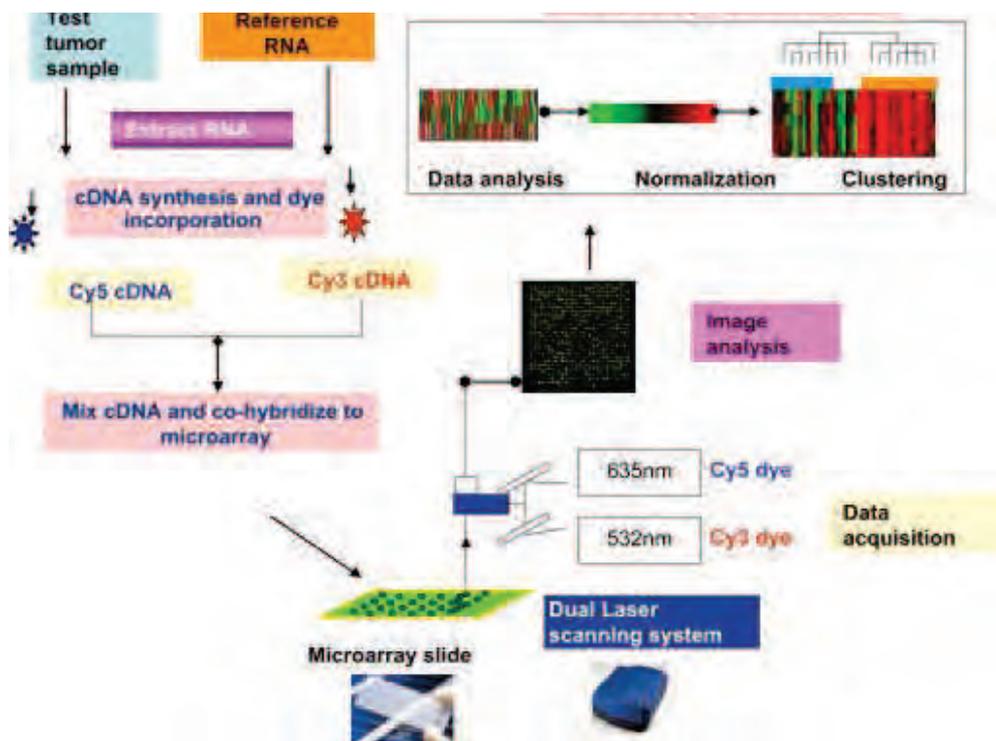


Figure 11: Principe des puces à ADN. Dans cet exemple, l'ARNm extrait de la tumeur est rétro-transcrit et marqué avec une molécule fluorescente (cyanine 5) ; en parallèle, l'ARNm de référence subit la même procédure mais avec une molécule émettant à une autre longueur d'onde (cyanine 3 ici). L'hybridation simultanée des 2 ADNc sur la puce génère un signal fluorescent, représentatif de la quantité de transcrit dans l'échantillon testé. D'après (159).

C. Profil moléculaire du LF: un centre germinatif malin, qui peut évoluer en forme agressive

1. Signature génique proche du CG normal

La quasi-totalité des travaux impliquant les approches d'analyse d'expression de gènes en hématologie a été menée par l'équipe de Louis M. Staudt, avec un intérêt prononcé pour le LBDGC, mais aussi le LF, dans une moindre mesure. Une des études pionnières en la matière est celle d'Alizadeh, publiée dans Nature en 2000, dont l'objectif principal était d'enrichir les systèmes de classification des LBDGC (176). En effet, quand cette étude a été initiée, le diagnostic clinique du LBDGC était très hétérogène, et ne présentait que peu de valeur prédictive. Ce travail a permis l'identification de 2 sous-types distincts de LBDGC, tant au niveau moléculaire que clinique: les LBDGC de type GCB (*Germinal Center B-cell like*) et les LBDGC de type ABC (*Activated B-cell like*). Le profil génétique du sous-type GCB reflète plutôt celui des centres germinatifs normaux, ce qui corrèle avec son phénotype (maintien de l'expression du CD10 notamment). Cette première forme de LBDGC est associée à un pronostic vital favorable, avec une survie estimée à 5 ans chez 76% des patients. Contrairement à ceux-ci, les ABC-LBDGC possèdent une signature transcriptionnelle très proche de celle retrouvée dans les cellules du sang périphérique qui ont été activées *in vitro* et présentent un pronostic nettement plus sombre, avec une survie estimée à 5 ans chez seulement 16% des patients. Ces données suggèrent que les différences moléculaires reflètent une différence clinique avérée, et que le LBDGC peut être discriminé en 2 maladies qui présentent des stades de différenciation et d'activation distincts. Quelques années plus tard, il sera même démontré que cette pathologie peut être subdivisée en 3 entités distinctes (178).

Dans l'étude d'Alizadeh, les auteurs ont pris en compte le LF et la LLC en plus du LBDGC afin de discriminer ces 3 hémopathies malignes en fonction de leurs profils moléculaires. Les données pouvant être exploitées pour le LF restent toutefois très limitées. On notera cependant que le LF et la LLC peuvent être différenciés du LBDGC sur la base du niveau d'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, ce qui était plus ou moins attendu du fait de leur caractère indolent et peu prolifératif. Ce point a d'ailleurs été confirmé dans une étude qui a suivi (179). De plus, le LF est différent de la LLC de par sa similitude vis-à-vis de la signature génique caractéristique des CG normaux. Ceci est nettement visible sur la "*Heat map*" obtenue dans cette étude (figure 12).

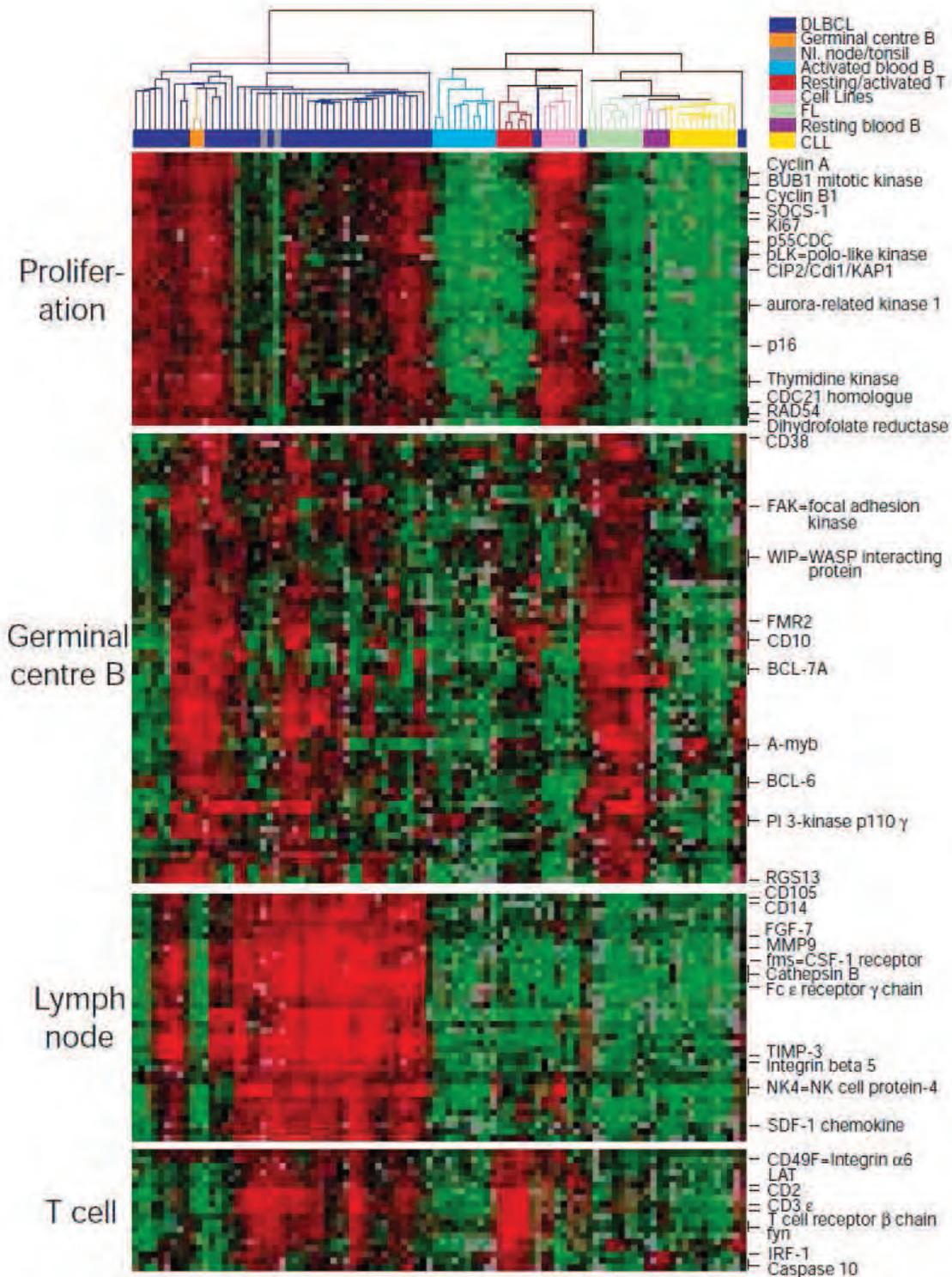


Figure 12: Regroupement hiérarchique des gènes qui sont dérégulés dans les différents échantillons, selon la fonction biologique ou le type cellulaire auquel ils sont associés. Les LF (vert clair) sur-régulent les gènes classés dans la fonction "Germinal Center B", ce profil étant très similaire à celui observé dans les échantillons de CG B normaux (orange). D'après (176).

L'homologie moléculaire entre les CG normaux et le LF a favorisé une étude qui s'est ensuite intéressé au différentiel entre les gènes exprimés dans des lymphocytes B purifiés à partir de CG normaux, et ceux présents dans des lymphocytes B malins purifiés à partir de LF (180). L'objectif était alors d'isoler de nouvelles cibles thérapeutiques et de mieux cerner le processus de transformation maligne. Les auteurs n'ont pu identifier que 65 gènes sur 588 (soit seulement 11%) dérégulés entre les cellules saines et les cellules malignes. Parmi les gènes sur-régulés, des régulateurs du cycle cellulaire, p21CIP1 et p16INK4a, connus pour leur implication dans le blocage à la transition G1/S. Des gènes impliqués dans les interactions micro-environnementales ont aussi été identifiés, ainsi que d'autres jouant le rôle de facteur de transcription dans la maturation et la différenciation B (PAX5 et Id-2). L'intérêt de ce travail est donc resté limité, puisqu'il n'a pas permis de révéler précisément ce qui pourrait expliquer le processus de transformation sain - malin ; il s'est plutôt contenté de confirmer, au niveau moléculaire, certaines caractéristiques physiologiques/phénotypiques déjà bien connues dans le LF (quiescence, stade de maturation,...). Ceci est peut être dû au nombre limité de patients inclus dans les cohortes (6 LF vs 6 amygdales) ou au caractère des LF choisis, tous considérés après traitement, lors du processus de rechute. Les auteurs de ce travail s'accordent à dire, une fois encore, que le LF possède un profil moléculaire très proche de celui observé dans le CG normal.

Enfin, une dernière étude suggère que les LF peuvent être subdivisés en 2 types : un dont la signature génique se rapproche de celle des tissus lymphoïdes sains, et un dont la signature en est plus éloignée (181), ce qui peut influencer la réponse aux traitements.

Le résumé non exhaustif de ces études constitue l'essentiel de ce qui est recensé dans la littérature quant au transcriptome du LF qui se rapproche de celui des CG.

2. Transformation agressive

Bien que le LF soit indolent dans une majorité de cas, il existe une réelle diversité en terme de temps de survie après le diagnostic. La transformation en forme plus agressive peut être à l'origine des cas présentant une moindre survie. L'analyse des PEG permet de discriminer les LF non transformés des LF transformés qui se rapprochent des LBDGC. Les gènes différentiels entre ces 2 entités cliniques sont impliqués dans la réponse immunitaire et les processus inflammatoires. Les LF transformés ont des caractéristiques moléculaires proches

des hyperplasies folliculaires, alors que les LF non transformés se rapprochent plutôt des tissus lymphoïdes normaux (182). Il s'avère aussi que cette transformation se produit par 2 voies distinctes, dont une est clairement associée à une activation de la prolifération. De manière intéressante, la signature moléculaire de tous ces LF transformés est proche de celle des LBDGC de type GCB-like, mais ne tend jamais vers celle des ABC-like (183).

D. Valeurs diagnostique et pronostique de l'analyse des profils d'expression génique dans le Lymphome Folliculaire

L'importance de la valeur diagnostique et prédictive évoquée précédemment dans le contexte du LBDGC a conditionné certaines études consacrées au LF qui ont eu lieu par la suite.

1. Diagnostic et classifications

Dans un souci d'amélioration des systèmes de classification pré-existants, et de meilleure prise en charge thérapeutique, une étude consacrée aux LF a été réalisée par Glas et collaborateurs en 2005 (184). Ce travail a permis d'identifier 81 gènes qui distinguent les LF indolents des LF agressifs, avec une efficacité avérée dans 93% des cas. La distinction des formes de LF sur la base de cette signature s'avère être aussi efficace au diagnostic qu'à la rechute, et présente l'avantage de classer aussi des cas délicats à "catégoriser" par les systèmes conventionnels. Les formes agressives sont plutôt associées à la sur-régulation de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la synthèse d'ADN, le métabolisme ou la signalisation intracellulaire. Quant aux formes plus latentes de FL, elles expriment plutôt des gènes associés à l'infiltrat immunitaire de la tumeur (macrophages, cellules T,...). Comme évoqué dans le chapitre précédent, même si la grande majorité des LF sont positifs pour la translocation t(14;18), certaines formes ne le sont pas, et présentent des caractéristiques moléculaires différentes. L'analyse des profils moléculaires est aussi efficace pour discriminer ces différents sous-types. La signature génique de ces LF "atypiques" est d'ailleurs enrichie en gènes qui sont retrouvés dans le profil des LBDGC de type ABC-like (48). Enfin, la nature des transcriptomes peut aussi être utilisée pour différencier efficacement une lymphoprolifération réactionnelle d'un lymphome (185).

La discrimination entre les différents grades, types de LF, et entre caractère malin / sain peut donc être effectuée en fonction du profil moléculaire. L'analyse du transcriptome représente donc un outil diagnostique fiable dans le LF.

2. Pronostic et réponse aux traitements

Une étude capitale dans le LF a été menée par l'équipe de Staudt en 2004, et avait pour objectif d'identifier les cellules d'origine du cancer, la nature des cellules malignes dans la biopsie, et les mécanismes oncogéniques qui peuvent donner lieu au LF (186). Mais les conclusions de ce travail ont été beaucoup plus loin que cela. En effet, l'utilisation d'un modèle statistique robuste, basé sur l'expression génique, a permis aux auteurs de prédire la probabilité de survie, et ce indépendamment des paramètres cliniques. L'étude a montré qu'il existait dans le LF deux PEG bien distincts, révélés par l'analyse de 191 biopsies de patients prélevées au diagnostic initial. La première signature identifiée est "*l'immune response 1*" (IR1), enrichie en gènes spécifiques des cellules T, et associée à un pronostic de survie favorable ; la seconde signature, "*l'immune response 2*" (IR2), comporte préférentiellement des gènes propres aux macrophages et aux cellules dendritiques, et est à l'inverse associée à un mauvais pronostic vital (figure 13). Des techniques de tri cellulaire réalisées à partir des biopsies ont ensuite été utiles pour associer ces signatures aux différents types cellulaires qui composent la tumeur. Le profil moléculaire des cellules lymphomateuses (CD19⁺) est proche de celui d'un CG, comme montré précédemment. Quant aux signatures IR1 et IR2, elles sont spécifiques des types cellulaires non tumoraux, en particulier les cellules immunitaires non B, retrouvés au sein des biopsies. C'est par conséquent l'infiltrat "non tumoral" qui conditionne le pronostic du LF, ce qui prouve bien la réalité fonctionnelle du microenvironnement dans cette pathologie. Ce travail met en avant l'importance des échanges qui se produisent entre le système immunitaire de l'hôte et les cellules tumorales dans le contrôle de la pathologie lymphomateuse. Un travail récent qui visait à améliorer le diagnostic et les thérapies, en caractérisant précisément le profil d'expression de gènes associés à une valeur pronostic, n'a fait que confirmer cette première étude (187).

Gene-Expression Signature	P Value for Contribution to Model in Test Set	Relative Risk of Death (95% CI)*	Effect of Increased Gene Expression on Survival
Immune-response 1	<0.001	0.15 (0.05–0.46)	Favorable
Immune-response 2	<0.001	9.35 (3.02–28.90)	Unfavorable

Figure 13: Prédiction de la survie en fonction des signatures géniques identifiées dans le LF. L'IR1 est un facteur de bon pronostic, et inversement pour l'IR2. La robustesse des résultats est prouvée par les valeurs statistiques ($p < 0,001$). (CI: intervalle de confiance) D'après (186).

L'association entre le profil transcriptomique du compartiment non tumoral au diagnostic et le pronostic de la maladie est donc avérée. Mais de manière intéressante, les caractéristiques moléculaires de ces mêmes cellules peuvent aussi prédire l'évolution de la maladie chez des patients qui ont été traités par R-CHOP. En effet, il existe une hétérogénéité de la réponse aux traitements, et il s'avère que des distinctions moléculaires sont observées entre des groupes de patients bons répondeurs, mauvais répondeurs, et non-répondeurs. Notamment, une faible expression, dans les tissus lymphomateux, des gènes SMAD1 et MARCO est corrélée à un temps avant échec du traitement (TTF) plus long, tout comme une plus forte expression du transcrit EPHA1. L'influence pronostique de ces gènes est associée à l'expression des protéines correspondantes dans les cellules non tumorales adjacentes (188). Néanmoins, les résultats de cette étude auraient mérité d'être confirmés à plus long terme, pour pouvoir établir des liens concrets entre le profil transcriptomique et la survie des patients après R-chimiothérapie. Ceci a été réalisé notamment dans les 3 formes cliniques identifiées de LBDGC (189): la signature génique caractéristique de la prolifération représente un facteur de mauvais pronostic pour la survie des patients post-R-chimiothérapie, ce qui n'est pas le cas pour la signature spécifique aux centres germinatifs B. Les signatures CMH de classe II et ganglions lymphatiques (*lymph node*) sont elles aussi favorables à la survie des patients, ce qui suggère que la réponse immunitaire qui se produit après traitement pourrait déterminer la survie des patients.

Enfin, d'autres travaux ont démontré que le transcriptome peut avoir une valeur prédictive quant à la réponse ultérieure aux traitements, et ce dès le diagnostic initial. L'étude de Bohlen

évoquée ci-dessus (§II-C-1), démontre que la signature transcriptionnelle qui caractérise les patients non répondeurs au rituximab se rapproche, dans la majorité des cas, de la signature génique la plus similaire à celle des tissus lymphoïdes sains. Les gènes retrouvés enrichis chez ces individus sont regroupés en fonctions cellulaires qui sont récapitulées dans la figure 14 (181). Toujours dans la même optique, il a été démontré que la signature génique au diagnostic reflète la réponse à la thérapie par CHOP (190). La signature spécifique des patients répondeurs se caractérise par la surexpression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, ou dans la mitose, ce qui reste plutôt en accord avec la nature des molécules chimiothérapeutiques, qui ont, globalement, une action inhibitrice sur la prolifération des cellules tumorales (agents alkylants, intercalants de l'ADN, inhibiteurs de la division cellulaire...).

Cytokine signaling
STAT4
STAT-induced STAT inhibitor 3
Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)
MRC OX-2 antigen
Small inducible cytokine, subfamily B, member 1 (GRO1)
Small inducible cytokine, subfamily A, member 2
Natural killer cell transcript 4
IFN-induced transmembrane protein 1 (LEU13)
IFN-induced transmembrane protein 2
IFN-induced transmembrane protein 3
IL-2 inducible T cell kinase
Protein tyrosine kinase binding protein
Neutrophil cytosolic factor 4
Complement
Complement component 4B
Complement component 1, s subcomponent
Complement component 1, q subcomponent, receptor 1
T cell receptor signaling
T cell receptor β
ζ -chain (TCR) associated protein kinase (70 kDa)
Tumor necrosis factor signaling
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
Tumor necrosis factor, α -induced protein 2
Jun B protooncogene
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
Growth arrest and DNA damage-inducible gene, β
FOS protooncogene
p75NTR-associated cell death executor

Figure 14: Liste des gènes sur-exprimés chez les patients non répondeurs au rituximab, classés par fonction biologique. Les fonctions cellulaires évoquées semblent toutes impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte. Les auteurs suggèrent que les cellules du ganglion folliculaire ont soit mis en place des mécanismes d'échappement, soit détourné le système immunitaire à leur profit, ce qui pourrait expliquer leur résistance à l'ADCC induite par le rituximab lors du traitement. D'après (181).

Globalement, les travaux qui ont porté sur l'expression génique des LF ont permis d'identifier différents sous-groupes, au diagnostic différentiel, et associés à des valeurs pronostiques diverses. Le rôle central du microenvironnement folliculaire a été mis en avant par ces analyses de profils moléculaires. La puissance de ces outils réside aussi dans leur aptitude à prédire la réponse aux traitements. On retiendra que le caractère constant des signatures observées dans le CG et le LF suggère que cette pathologie dérive de cellules différenciées, possédant un "phénotype moléculaire" de lymphocyte B du CG. Le petit nombre d'études réalisées est toutefois critiquable, mais il est sûrement lié au manque de constance dans les conclusions tirées, variables en fonction des puces à ADN utilisées, et des modèles statistiques élaborés pour interpréter les données.

IV. LES CULTURES EN TROIS DIMENSIONS EN CANCEROLOGIE EXPERIMENTALE

A. Généralités

A l'origine, ce sont les experts en embryologie qui ont observé l'importance du paramètre structural dans le développement et le "comportement" cellulaires. En recherche préclinique, les premières cultures en 3 dimensions (3D) de cellules tumorales ont été développées par les radiobiologistes, dans les années 70 (191). Pour ces pionniers dans le domaine, il semblait judicieux d'utiliser des modèles *in vitro* mimant l'architecture tumorale pour étudier les réponses cellulaires aux thérapies anticancéreuses. Le développement de tels systèmes d'étude était en effet largement justifié de par la relevance "limitée" des cultures en monocouche ou en suspension. De fait, les modèles d'étude en 3D semblaient - et semblent toujours - représenter des outils de recherche incontournables pour compléter les techniques disponibles, puisqu'ils constituent un excellent compromis entre les cultures cellulaires en monocouche et les approches *in vivo*.

De plus, les caractéristiques moléculaires et protéiques des cellules, lorsqu'elles sont cultivées en 3D, se sont avérées différentes à celles des cellules cultivées en suspension. Dans la plupart des cas, ces modifications rapprochent les cultures 3D de ce qui est observé dans les tumeurs.

Enfin, certaines approches de criblage de molécules thérapeutiques ont montré la faible valeur prédictive des cultures en monocouches. En utilisant des modèles de culture en 3D, qui miment mieux la physiopathologie, on peut espérer disposer de modèles plus performants pour cibler les nouvelles molécules.

B. Les différents types de modèles en trois dimensions

Les premières cultures en 3 dimensions développées par les radiobiologistes étaient réalisées avec des cellules d'origine animale (192, 193). Rapidement, l'extension aux lignées cellulaires humaines s'est avérée indispensable pour l'étude du cancer. Même s'il existe des types variés de modèles de culture en 3D, des nomenclatures différentes, et des méthodologies diverses pour les générer, tous ceux décrits dans la littérature ont été obtenus à partir de cellules

adhérentes, en particulier de lignées cellulaires épithéliales (figure 15), et carcinomateuses. Cependant, les lignées cancéreuses ne sont pas toutes aptes à produire spontanément des cultures 3D.

1. Nomenclature

Les modèles 3D sont recensés sous des appellations multiples, qui varient en fonction des auteurs. Toutefois, la dénomination la plus courante, pour l'étude du cancer, est le "**sphéroïde**", que l'on retrouve aussi nommé MCS ou MC(T)S pour *Multicellular (tumor) spheroid*. Parmi les synonymes rencontrés dans les études bibliographiques, le terme "tumoroïdes" fait référence à des cultures 3D hybrides, c'est-à-dire composées de différents types cellulaires retrouvés dans une même tumeur. Cette approche a été appliquée au cancer du sein notamment (194), et pourrait permettre d'évaluer la réponse thérapeutique différentielle entre ces divers types cellulaires composant les tumeurs. Dans d'autres travaux, ces mêmes systèmes de culture hybrides sont plutôt retrouvés sous le terme de sphéroïdes mosaïques (195, 196). Il en est de même pour les cultures 3D monocellulaires. Celles-ci sont recensées sous les noms de sphères, organoïdes, ou agrégats. Toutefois, agrégat est un terme généralement utilisé pour décrire une "masse" de cellules, et non une formation sphérique compacte et rigide (197).

2. Eventail de cultures en trois dimensions

Les modèles 3D référencés dans la littérature sont de plusieurs types. Les MC(T)S sont toutefois les modèles les plus couramment cités, et sont considérés comme les plus classiques dans l'étude du cancer. Ils ont d'ailleurs été utilisés dès les années 2000 pour le criblage de molécules chimiothérapeutiques. Au sens propre, un sphéroïde est une structure compacte, sphérique, soumise à des gradients de diffusion (oxygène, glucose...), autant de caractéristiques typiques d'une microrégion de tumeur. Nous reviendrons en détail sur ces aspects dans la suite du manuscrit (§III-C-1). Mais, outre ces sphéroïdes, des modèles dits de complexité intermédiaire existent.

Table I. Overview of some epithelial tumor cell lines of different origin that form spherical cultures with representative reference list.

Entity	Cell line	NIH-DTP screen	Literature
Squamous cell carcinoma	1483	—	(Sturgis et al. 1994)
	A431	—	(Ng et al. 1987; Casciari et al. 1988; Kwok & Sutherland 1991)
	CaSki	—	(Casciari et al. 1988; Kwok & Sutherland 1991; Lohr et al. 1995)
	FaDu	—	(Stuschke et al. 1992)
	HEp-2	—	(Kohno et al. 1988)
	HN-1	—	(Schwachofer et al. 1989)
	MDA 686LN	—	(Sturgis et al. 1994)
	MDA 886Ln	—	(Sacks et al. 1989; Nishikawa et al. 1990; Sturgis et al. 1994)
Lung/NSCLC	SQ5	—	(Nakayama 1991)
	A549*	+	(Ivascu & Kubbies 2006)
	NCI-H125	—	(Schwachofer et al. 1991)
	NCI-H322M	+	(Ivascu & Kubbies 2006)
	NCI-H40*	+	(Ivascu & Kubbies 2006)
SCLC	SK-MES-1	—	(Audran et al. 1994)
	DMS53	—	(Cate et al. 1984; Douple et al. 1985)
Colon	COLO 205*	+	(Ivascu & Kubbies 2006)
	DLD-1	+	(Nicholson et al. 1997; Mellor et al. 2005)
	HCT-15*	+	(Ivascu & Kubbies 2006)
	HCT-116	+	Information by word of mouth
	HT29	+	(Lees et al. 1981; Sutton et al. 1982; Sutherland et al. 1986; Simiantonaki et al. 2002; Lowthers et al. 2003)
	LoVo	—	(Soranzo et al. 1986; Soranzo & Ingrosso 1988; Pervez et al. 1989; Dolfini et al. 2005)
	LS174T	—	(Horan et al. 1985; Langmuir et al. 1989)
	SW620*	+	(Ivascu & Kubbies 2006)
WiDr ¹	—	(Chan et al. 1991; Banks et al. 1994; Jansen et al. 1994; Buffa et al. 2001; Mueller-Klieser et al. 2002)	
Pancreas	MIAPaCa2	—	(McLeod et al. 1997)
	Panc1	—	(McLeod et al. 1997)
Liver/hepatocellular carcinoma	Hep3B	—	(Lin et al. 2006)
	HepG2*	—	(Gorlach et al. 1994; Selden et al. 2000; Kelm et al. 2003; Ivascu & Kubbies 2006; Lambert et al. 2006; Lin et al. 2006)
Breast	Huh-7	—	(Tonary & Pezacki 2006)
	BT20	—	(Muller-Holzner et al. 1996)
	BT474	—	(Kunz-Schughart et al. 2001; Seidl et al. 2002)
	MCF-7	+	(Pourreau-Schneider et al. 1984; Olea et al. 1992; Kunz-Schughart et al. 2001; Kelm et al. 2003; Ivascu & Kubbies 2006)
	MDA-MB-231	+	(Ivascu & Kubbies 2006; Muir et al. 2006)
	MDA-MB-361	—	(Hoebel et al. 2004; Ivascu & Kubbies 2006)
	MDA-MB-468	+	(Ivascu & Kubbies 2006)
	SK-BR-3	—	(Kunz-Schughart et al. 2001; Ivascu & Kubbies 2006)
	T47D	+	(Ronen et al. 1990; Kunz-Schughart et al. 2001; Kan et al. 2001; Seidl et al. 2002; Ivascu & Kubbies 2006)
	MDA-MB-435 ²	+	(Stuschke et al. 1995; Ivascu & Kubbies 2006)
Ovary	NCI/ADR ^{RES}	+	(Walker et al. 2004; Ivascu & Kubbies 2006)
	IGR-OVI*	+	(Ivascu & Kubbies 2006)*
	MCAS	—	(Sonoda et al. 2003)
	OVCAR-3	+	(Bardies et al. 1992; Filippovich et al. 1996)
	OVCAR-5	+	(Casey et al. 2001)
Cervix	SKOV3*	+	(Makhija et al. 1999; Frankel et al. 2000; Casey et al. 2001; Ivascu & Kubbies 2006)*
	HeLa-S3	—	(Sommers & Alfieri 1998)
Kidney	SiHa	—	(Olive et al. 1996; Olive & Banath 1997; Durand & Sham 1998; Oloumi et al. 2000; Oloumi et al. 2002)
	786-0	+	(Lieubeau-Teillet et al. 1998)
	A498	+	(Heuser et al. 2003)
	(HEK)-293	—	(Talts et al. 2000; Ivascu & Kubbies 2006)
	UO-31	+	(Ivascu & Kubbies 2006)

Figure 15: Tableau recensant les lignées épithéliales cancéreuses formant des cultures 3D.

Des cellules transformées issues de divers tissus ont été utilisées pour de nombreuses études impliquant des modèles 3D. Extrait de (198).

Par exemple, les systèmes de multicouches de cellules (MCL pour *multicellular layer*) placées au dessus d'une membrane poreuse, permettent d'étudier la diffusion et le transport des drogues au travers d'un tissu (199-201) (figure 16). Parmi les travaux impliquant ces types de cultures, celui mené par Ian Tannock suggère que l'épaisseur du tissu tumoral, dans lequel de la MEC est accumulée, contribue à une diffusion plus compliquée des drogues, ce qui sous-entend des mécanismes de résistance aux médicaments anti-cancéreux.

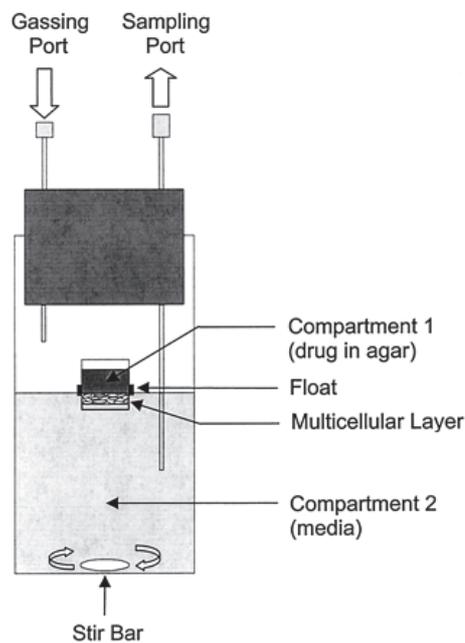


Figure 16: Principe des MCL. Le système développé par Tannock et collaborateurs consiste à placer la multicouche cellulaire dans le milieu de culture ; au dessus, dans le compartiment 1, les drogues sont incluses dans une solution d'agarose 1%. Les échantillons sont prélevés par le *sampling port*. L'ensemble du système est perfusé dans des conditions de culture standard. D'après (201).

D'autres approches expérimentales qualifiées de cultures 3D sont basées sur la culture de cellules isolées ou d'agrégats directement dans la MEC. Ces systèmes permettent l'étude des interactions entre les cellules tumorales et la MEC, et aussi la caractérisation des mécanismes de différenciation, migration et invasion tumorales, en partie conditionnés par le stress mécanique. En effet, dans les tumeurs, la MEC contribue à la rigidité du milieu environnant, et plusieurs travaux ont démontré que cette rigidité module les réponses cellulaires comme la

prolifération, la différenciation, ou encore l'induction de l'apoptose (202, 203). Le modèle développé par Bissel et collaborateurs, pour le cancer du sein, est un bon exemple pour illustrer ces approches (204). Dans cette étude, les auteurs ont mis au point un système de culture basé sur l'inclusion des cellules de l'épithélium mammaire (= cellules myoépithéliales) dans des milieux riches en MEC (collagène, Matrigel®) afin d'étudier leur activité fonctionnelle, en mimant l'environnement dans lequel elles se développent *in vivo*. Il ressort de ce travail que la capacité des cellules épithéliales mammaires à former des structures "acinus-like", polarisées et non proliférantes repose sur leur caractère sain et leur propension à produire de la laminine 1. En effet, leurs homologues tumorales génèrent au contraire des colonies cellulaires désorganisées, proliférantes, et non-polarisées, et synthétisent cette protéine matricielle en moindre quantité. Toute l'importance de recréer un environnement proche des conditions observées *in vivo* ressort de ce travail. Ces procédés, qui consistent finalement à inclure des cellules vivantes dans une matrice inerte, stable et peu toxique, ont été largement discutés dans la littérature (205, 206).

Les cultures *ex vivo* constituent elles aussi une part non négligeable de la littérature spécifique du 3D. Elles consistent à mettre en culture des fragments issus de biopsies, prélevés directement sur des tissus sains ou tumoraux. Ces systèmes présentent l'avantage de pouvoir travailler au cas par cas, en prenant en compte les variations interindividuelles. En effet, dans des cohortes de patients classés dans le même groupe histologique d'un cancer, des variabilités sont présentes, en terme de chimiosensibilité notamment. Plusieurs études démontrent le potentiel de ces systèmes, aussi bien pour la culture et le maintien *in vitro* de cellules tumorales primaires (207), que pour l'évaluation de la sensibilité aux drogues chimiothérapeutiques (208). Ces tests de chimiosensibilité mettent en jeu l'approche de FMCA (*Fluorometric microculture cytotoxicity assay*), expérience *ex vivo* à court terme, basée sur l'incorporation d'une sonde fluorescente (FDA : fluoresceine diacetate) qui ne sera clivée que dans les cellules viables, par les estérases intracellulaires ; la survie cellulaire est généralement évaluée au terme de 72h d'exposition continue aux drogues choisies. De manière intéressante, dans le domaine des hémopathies malignes, et plus précisément de la leucémie aigüe lymphoblastique (LAL), il a été démontré que les résultats obtenus à partir de ces tests FMCA sont étroitement corrélés avec la survie des patients chez lesquels les drogues efficaces *in vitro* ont été administrées (209).

D'autres exemples de cultures 3D beaucoup plus complexes ont été développés en cancérologie expérimentale. Parmi eux, les systèmes de bioréacteurs, dans lesquels des cellules peuvent être cultivées sur un réseau de capillaires artificiels permettant de mimer la perfusion. Mais ces approches restent très spécifiques de l'étude du métabolisme cellulaire (210), et sont le plus souvent employées pour mieux comprendre le fonctionnement des organes bio-artificiels (211, 212).

Parmi ces différents modes de culture en 3D, à part les sphéroïdes, il n'y en a que peu qui sont suffisamment bien caractérisés. Il paraît donc délicat de leur associer une réelle pertinence vis-à-vis de l'architecture tumorale, et des interactions environnementales qui se produisent dans les conditions physiopathologiques (cellules - cellules ou cellules - MEC par exemple). Il semble également ambitieux de conclure que parce qu'une partie des paramètres est conservée dans ces modèles de culture, la réponse cellulaire *in vitro* sera similaire à celle décrite *in vivo*.

En réalité, les seuls modèles qui présentent une majorité de ces caractères, et ce de manière très analogue aux tumeurs, sont les sphéroïdes.

3. Méthodologies pour l'obtention des sphéroïdes

Les premiers protocoles établis pour cultiver les cellules en 3D ont été mis au point à partir de cellules animales. Une des premières revues dépeignant l'histoire des sphéroïdes fait un état des lieux des techniques permettant d'obtenir des agrégats *in vitro* (213). De manière surprenante, ces techniques n'ont pas fondamentalement changé depuis les 20 dernières années. Au départ, toute culture 3D peut avoir 2 origines. Soit les cellules isolées sont stimulées pour qu'elles génèrent des colonies sphériques, soit leur agrégation est forcée, celle-ci étant suivie d'une croissance cellulaire sphérique.

Il est possible d'obtenir des sphéroïdes en empêchant les cellules d'adhérer dans les flasques de culture, tout en générant un mouvement continu. Pour créer ce mouvement permanent, les cellules peuvent être cultivées dans des flasques spéciales munies d'un système d'agitation intrinsèque (*spinner flask*), les flasques de culture peuvent même être directement placés sur un système de plateau agitant (*gyratory shaker*) ou rotatif (*roller tube*). Ces 3 approches expérimentales permettent une production à grande échelle de sphéroïdes de taille relativement homogène. Cependant, elles impliquent que les types cellulaires soient aptes à former spontanément des sphéroïdes, par simple manque d'adhésion à un substrat.

Plus récemment, les systèmes de bioréacteurs NASA, plus complexes, ont été développés pour produire des MCTS. Il s'agit d'un système de culture rotatif qui alimente constamment les cellules en nutriments et en milieu frais, d'où une grande constance des conditions de culture. Ce type de matériel est notamment recommandé pour les cellules primaires. Toutefois, ce dernier système reste onéreux et ses avantages doivent encore être démontrés.

Des puits de culture à fond plat préalablement revêtus avec de l'agarose permettent d'obtenir une surface concave adaptée à la culture de sphéroïdes en milieu liquide (214). D'autres systèmes comparables ont également fait leurs preuves pour la production de cultures 3D, à savoir le dépôt d'un mélange poly-HEMA / éthanol dans le fond rond de plaques de culture, ce qui empêche l'adhésion des cellules (197, 215, 216).

Certaines alternatives ont été proposées pour générer des sphéroïdes à partir de lignées qui ne sont pas adhérentes spontanément; parmi elles, l'ajout exogène de MEC (197) ou de méthylcellulose (217) dans les cellules lors des premières étapes de la formation des MCTS sont efficaces.

Enfin, une technique initialement mise au point pour cultiver les corps embryonnaires, dite méthode de goutte inversée (*Hanging drop*), a été ajustée pour la culture de sphéroïdes (218-220). Les agrégats étant maintenus en suspension dans le couvercle des boîtes de culture, cette technique est applicable seulement aux cultures à court terme, puisqu'il est impossible de renouveler le milieu ou de traiter les agrégats dans de telles conditions.

Je reviendrais plus en détail sur cette approche expérimentale dans la partie résultats, puisqu'elle constitue le point de départ de la méthodologie qui a été employée pour développer notre modèle de culture en 3D.

Les principales approches expérimentales permettant de produire des sphéroïdes sont récapitulées dans la figure 17.

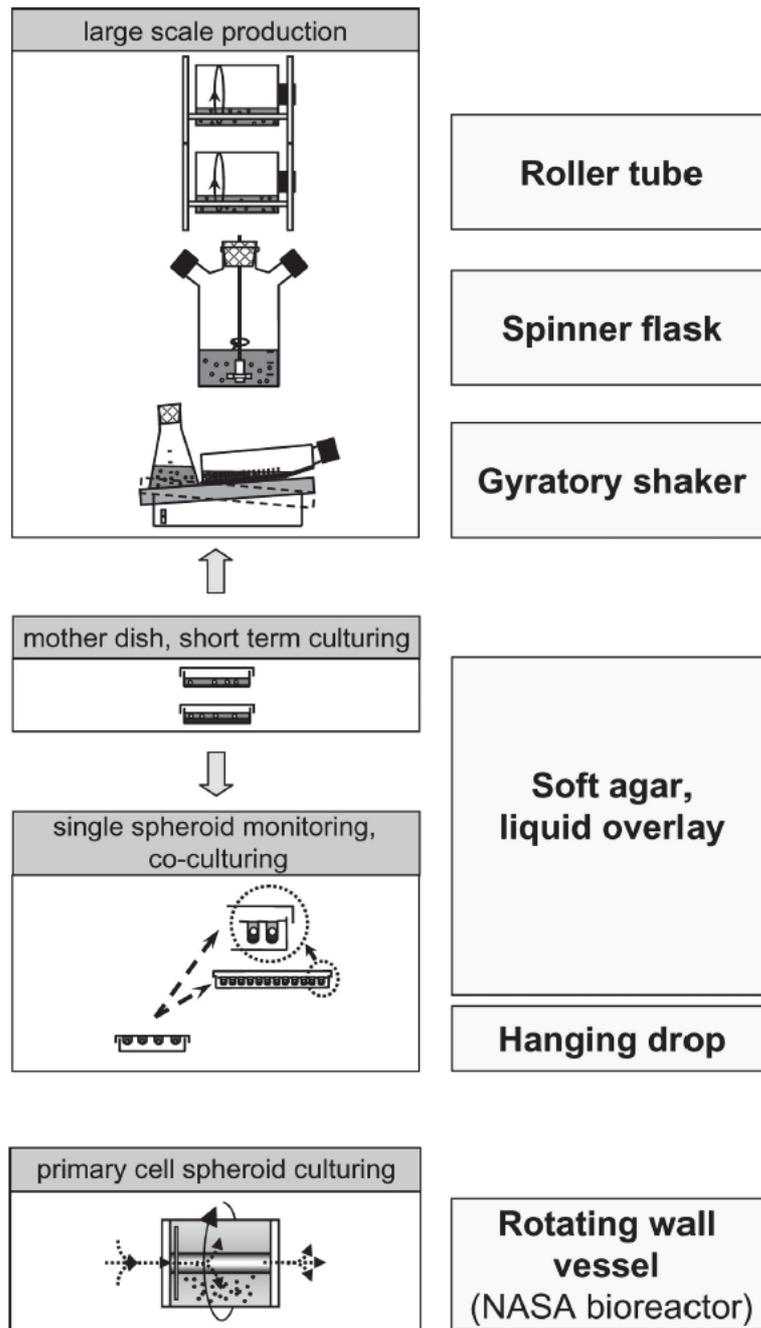


Figure 17: Techniques pour l'obtention de sphéroïdes. Différents procédés peuvent être utilisés pour générer des cultures 3D. L'emploi de chaque protocole dépend de l'application que l'on souhaite faire des MCTS obtenus: certains permettent une production homogène et à grande échelle ; d'autres sont plutôt adaptés pour les cultures à court terme ; enfin, des systèmes plus compliqués de bioréacteurs permettent de cultiver des sphéroïdes à partir de cellules primaires. D'après (198).

C. Le sphéroïde, une tumeur miniature

La structure 3D est un paramètre indispensable pour mimer les nodules tumoraux non vascularisés ou les microrégions des tumeurs solides. En effet, comme évoqué précédemment, les MCTS ressemblent beaucoup plus au contexte *in vivo*, pour ce qui est de l'architecture et de l'environnement. Leur géométrie presque parfaite, ainsi que l'arrangement des types cellulaires en couches concentriques, permettent l'émergence d'une hétérogénéité cellulaire dans les cultures 3D, ce qui est fréquemment le cas dans les tumeurs solides (figure 18).

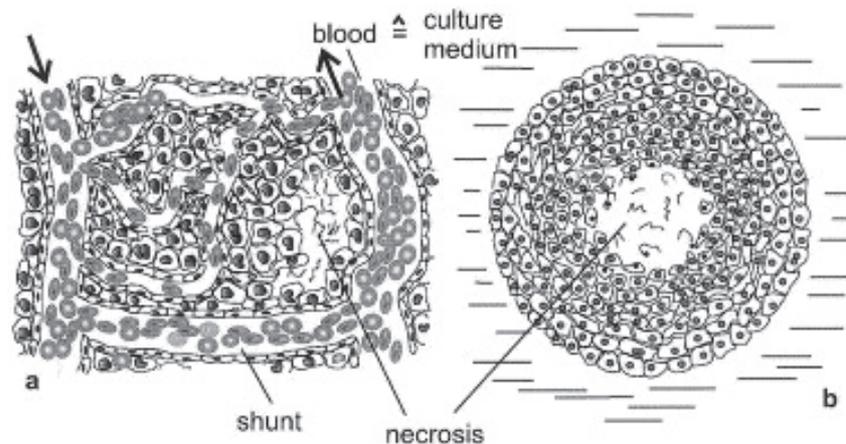


Figure 18: *Homologies entre sphéroïdes et microrégions tumorales.* L'organisation et l'hétérogénéité cellulaire des sphéroïdes (b) est très comparable à celle observée dans les tumeurs solides (a). Dans la tumeur, une circulation sanguine anarchique se met en place, et des corps nécrotiques peuvent apparaître dans les régions les plus éloignées des vaisseaux sanguins. Dans les sphéroïdes, plusieurs couches de cellules sont retrouvées : il est généralement admis que des cellules hyperproliférantes sont retrouvées en périphérie, (ici représentées par des cellules plus grosses) ; plus on s'approche du centre, et moins les cellules prolifèrent (taille plus petite). Enfin, selon la taille du sphéroïde, un cœur nécrotique peut être présent. Des gradients comparables sont donc mis en place dans les 2 systèmes. D'après (221).

1. Paramètres physiques mesurables

Le statut énergétique, l'approvisionnement en oxygène ainsi que la viabilité et la prolifération cellulaires représentent autant d'éléments qui permettent de rapprocher les modèles 3D *in vitro* et les tumeurs avascularisées *in vivo*. En effet, plusieurs travaux démontrent la mise en place de différents gradients dans les sphéroïdes, de manière comparable à ce qui se passe dans les tumeurs, quand on s'éloigne des vaisseaux sanguins. Par exemple, la distribution de

l'oxygène est meilleure en périphérie qu'au centre des MCTS, ce qui est à l'origine d'un phénomène d'hypoxie centrale (222). Il en est de même pour le glucose, qui est beaucoup plus accessible pour les cellules se trouvant en bordure des sphéroïdes. Inversement, les déchets métaboliques tels que le lactate sont accumulés, et retrouvés en plus forte concentration au centre des sphères. Le pH du milieu de culture est lui aussi impacté par ces phénomènes, et subit une acidification importante, dépendante toutefois des types cellulaires employés (223). Ces difficultés de diffusion gazeuses et énergétiques dans les MCTS influencent la prolifération des cellules qui les composent, qui diminue progressivement depuis la périphérie vers le centre (224). Enfin, on comprendra que le cumul de ces phénomènes puisse induire une nécrose centrale secondaire dans les sphéroïdes. Toutefois, cette nécrose reste type cellulaire-dépendante, et ne survient qu'au delà d'une certaine taille (500 - 600 μm). La figure 19 résume de manière non exhaustive les différents gradients mesurés dans les MCTS.

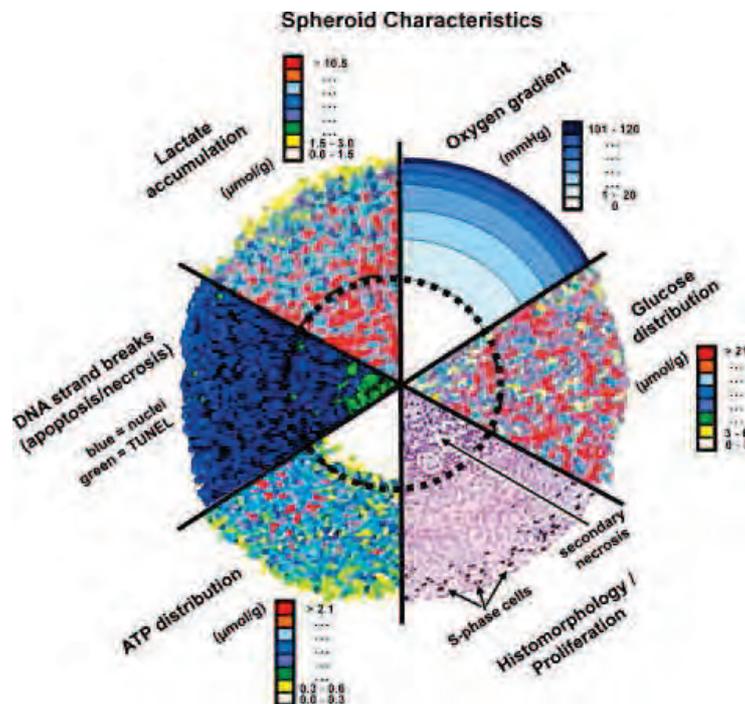


Figure 19: *Répartitions concentriques de la prolifération, de la viabilité et des métabolites/nutriments dans les MCTS.* La diffusion de l'oxygène est de plus en plus limitée quand on va vers le centre du sphéroïde, comme c'est le cas pour le glucose. Ceci se reflète par une moindre production d'ATP au centre du sphéroïde, et une diminution de la prolifération depuis l'extérieur vers l'intérieur. L'effet cumulatif avec la concentration centrale de métabolites induit l'émergence d'une nécrose centrale. La quantification des taux de métabolites, de nutriments, ainsi que les mesures d'activité mitochondriale (225) ont permis de montrer qu'au centre du sphéroïde, les cellules adaptent leur métabolisme afin de maintenir l'homéostasie tissulaire jusqu'à leur mort. D'après (226).

Pour conclure, les cellules qui se trouvent en périphérie des MCTS sont très représentatives de celles qui sont placées près des capillaires sanguins in vivo, contrairement aux cellules plus éloignées, qui sont quiescentes ou en voie de nécrose. Enfin, la présence de ces gradients métaboliques, ainsi que la distribution concentrique, est très comparable à la réalité des nodules tumoraux non vascularisés, les micrométastases, ou encore les régions intra-capillaires des tumeurs solides (pour revue, voir (198)).

2. Sphéroïdes et dérégulation des profils d'expression génique

Les MCTS ont des propriétés prolifératives et fonctionnelles qui sont directement liées aux contraintes environnementales. Ces caractères, associés à la complexité du réseau des interactions cellules - cellules et cellules - MEC qui se produisent en 3D, peuvent profondément impacter l'expression des ARN. Ainsi, de nombreuses études ont visé à comparer les signatures géniques des cellules cultivées en MCTS avec celles des cellules cultivées en suspension. Bien souvent, les modifications des cellules tumorales font que la signature 3D *in vitro* se rapproche de celle identifiée *in vivo*. Ceci est observé notamment dans les cultures de sphéroïdes établies à partir de cellules primaires: par exemple, les MCTS de cellules de gliomes présentent un profil moléculaire stable, et peu changé par rapport au profil identifié dans les tumeurs (biopsies). Inversement, les cultures monocouches produites à partir des mêmes cellules primaires ont une signature qui est considérablement modifiée, ces changements s'amplifiant avec la durée de culture (227). Mais ces caractéristiques restent vraies quand les sphéroïdes sont générés avec des lignées cellulaires stables. Par exemple, plusieurs travaux menés avec des lignées cancéreuses ovariennes ont démontré que le transcriptome caractéristique des sphéroïdes se rapproche de celui observé dans des xénogreffes murines, alors qu'encore une fois, les mêmes cellules cultivées en suspension présentent un profil nettement moins semblable (228, 229).

Parmi les gènes exprimés de manière différentielle, certains sont impliqués dans les mécanismes d'ancrage des protéines du cytosquelette ou dans la fixation des ARN (228). Dans les MCTS de lignées hépatiques, des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire sont sur-régulés (230), alors que des gènes connus pour leur rôle dans la réponse au stress cellulaire, ou codant pour des facteurs de croissance et les glucocorticoïdes sont, inversement, sous-exprimés (231). Des gènes associés à des fonctions de chimiorésistance sont fréquemment modulés entre les cellules 2D et les cellules 3D. Par exemple, il a été suggéré que le taux de

calcium intracellulaire pouvait moduler la réponse aux radio- et chimio-thérapies. Le gène S100A4, impliqué dans la régulation de l'homéostasie calcique, a été décrit comme sur-régulé dans plusieurs modèles 3D *in vitro*, à la fois animaux (232) et humains (233). Enfin, des gènes régulant la réparation des dommages ADN (p48) sont parfois sur-exprimés, alors que d'autres impliqués dans les mécanismes d'apoptose le sont moins (SKIP3, inhibiteur de NF-KB) (233), ce qui peut là encore expliquer la résistance aux médicaments anti-cancéreux.

De manière importante, ces modulations de transcriptome sont directement liées à l'architecture des sphères, et pas uniquement à la composition du milieu environnant, riche en MEC par exemple. En effet, Ghosh et collaborateurs ont comparé les transcriptomes de lignées cellulaires de mélanomes, cultivées soit en sphéroïdes, soit en monocouches, soit en monocouches sur un support riche en MEC (collagène). Dans ce travail, les profils moléculaires de toutes les cellules cultivées en suspension sont étroitement liés (différentiel de 5 gènes entre les conditions avec ou sans MEC), alors que les cellules 3D diffèrent de ces dernières par 179 gènes. Les transcrits en question sont généralement associées à une forte malignité de la tumeur cutanée (234). Cette étude illustre l'importance de la structure 3D dans la dérégulation de l'expression génique.

Plusieurs arguments permettent donc de rapprocher les profils moléculaires de cellules cultivées en 3D de ceux observés dans les tumeurs chez les patients (ou modèles *vivo*). Toutefois, il ne faut pas établir de raccourci trop rapide, car une étude a comparé les profils moléculaires de biopsies de cancer de la vessie avec des cellules primaires issues des mêmes cancers, cultivées en MCTS, en suspension, ou adhérentes à un support. Celle-ci confirme que l'architecture tissulaire des cellules cultivées en 3D est celle qui est la plus ressemblante aux tumeurs *in vivo*. Cependant, elle suggère aussi que la similitude entre MCTS et tumeurs, en terme d'expression génique, reste très dépendante des échantillons et des gènes considérés.

Les dérégulations des PEG observées en 3D en font un modèle plus pertinent que les cultures en suspension pour l'étude des cancers. Ces modifications peuvent influencer des voies de signalisation intracellulaire, qui représentent autant de cibles thérapeutiques potentielles, et de paramètres susceptibles de moduler la réponse aux traitements.

D. Le sphéroïde, modèle valide en recherche préclinique: chimiorésistance et progression tumorale associées à la structure tridimensionnelle

La différence de réponse aux drogues entre les cellules cultivées en monocouches et celles cultivées en 3D est une thématique qui a été largement investie. Les doses efficaces pour induire la mort cellulaire sont dépendantes des modes de culture, comme cela a été montré dans des lignées cancéreuses de colon par exemple, les concentrations efficaces étant généralement plus fortes quand les cellules sont en 3D (235, 236). Les mécanismes mis en jeu pour induire cette résistance peuvent être multiples, bien qu'ils aient pour origine commune l'architecture 3D, à la fois dans les tumeurs *in vivo* et dans les MCTS *in vitro*.

1. 3D et chimiorésistance multicellulaire

Dans un environnement 3D, la réponse aux traitements est déterminée par une multitude de facteurs: la pénétration des drogues, l'hypoxie, la répartition dans le cycle cellulaire, la dérégulation d'expression de protéines ciblées par les thérapies, ainsi que les changements phénotypiques, sont autant de paramètres qui peuvent influencer la sensibilité des cellules tumorales organisées en 3D. *In vivo*, la compaction et la répartition des vaisseaux sanguins sont également à considérer (figure 20). Ces observations ont donné naissance au concept de MCR, pour chimiorésistance multicellulaire (237). Cette propriété est acquise par toute cellule cancéreuse, à partir du moment où elle établit des contacts homotypiques, hétérotypiques ou même matriciels dans un microenvironnement structuré, *in vivo* comme *in vitro*.

La diminution de la diffusion des médicaments est en rapport avec la présence de barrières physiques créées par les interactions cellules - cellules et cellules - MEC, qui sont renforcées en 3D. L'exemple de Tannock avec les MCL, évoqué précédemment (§III-B-2), illustre bien ce phénomène (201). Dans le même sens, dans leur modèle de cellules mammaires cultivées dans une matrice riche en laminine, Mina Bissel et collaborateurs observent dans plusieurs lignées cellulaires une moindre sensibilité aux agents ciblant l'antigène Her2 quand elles sont cultivées en 3D (vs 2D). Mais, de manière encore plus importante, ils établissent aussi la preuve que la résistance aux médicaments anti-cancéreux, en 3D, est dépendante des interactions cellules - MEC, puisque l'utilisation d'un anticorps inhibiteur de l'intégrine bêta-1 (ligand matriciel) diminue, en 3D, la résistance vis-à-vis de 2 anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-Her2 (trastuzumab et pertuzumab) (238). Cette même équipe avait aussi

démonstré quelques années plus tôt que, dans les cultures en 3D, l'engagement de l'intégrine bêta 4 était impliqué dans la résistance à l'apoptose induite par Fas, étoposide ou TRAIL (239). Dans la même optique, Thurber et Wittrup ont développé un modèle prédictif pour évaluer la diffusion des macromolécules dans des MCTS (240). Dans cette étude, ils utilisent des fragments d'anticorps (scFV pour *single chain variable fragments*, soit des portions d'anticorps dépourvus de région constante - Fc) dirigés contre le CEA (*carcinoembryonic antigen*) et évaluent leurs capacités de pénétration dans les sphéroïdes de colon. Leurs conclusions sont que la distribution de l'anticorps est dépendante de multiples paramètres que sont entre autres la densité de l'antigène cible, la taille du sphéroïde, les durées de traitement, mais aussi la dose utilisée (figure 21).

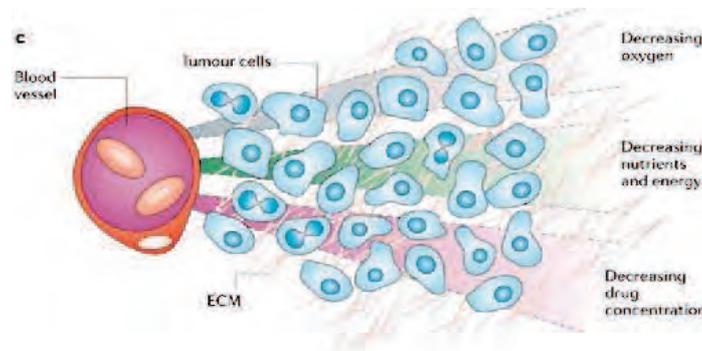


Figure 20: Modèle proposé de diffusion altérée des drogues *in vivo*. Plus les cellules sont éloignées des vaisseaux sanguins, et plus les ressources en nutriments et en oxygène sont faibles. La mise en place de tels gradients explique également la diffusion limitée des drogues, puisque pour agir efficacement, elles doivent d'abord être distribuées dans les vaisseaux sanguins, puis traverser la paroi vasculaire, et enfin être transportées efficacement jusqu'à l'espace interstitiel tumoral. Extrait de (241).

L'hypoxie, ou carence en oxygène, est un autre paramètre qui peut expliquer la résistance des cellules cultivées en 3D. C'est en radiothérapie que les premiers phénomènes de résistance induits par l'hypoxie ont été décrits. En effet, l'action biologique des radiations ionisantes nécessite impérativement la présence d'oxygène, puisque son efficacité passe par la production de radicaux libres oxygénés (242). Mais la résistance aux drogues chimiothérapeutiques peut elle aussi être impactée par l'hypoxie. Il est en effet connu que l'hypoxie peut moduler positivement l'expression de BCL2 dans les cellules endothéliales, ce qui leur confère un avantage de survie suite au traitement par l'IFN- γ (243). Un travail de

Yang et collaborateurs suggère aussi que dans des sphéroïdes de cancer du poumon, la résistance aux médicaments anti-cancéreux est liée au niveau d'expression de protéines de la famille de BCL2, puisque l'inhibition de l'expression de BCL2, BCL-XL et BCL-W ou Mcl-1 restaure la chimiosensibilité des cellules au traitement par le bortezomib (244). Les cultures 3D étant par définition hypoxique, on peut supposer que cette carence en oxygène conditionne la réponse thérapeutique dans ces modèles cellulaires, *via* la dérégulation d'expression de protéines régulant l'apoptose.

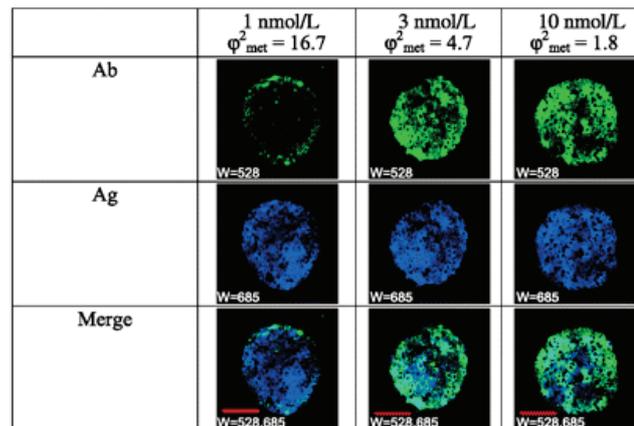


Figure 21: *Marquages immunohistochimiques montrant la diffusion des fragments d'anticorps dans les cultures 3D.* La diffusion des fragments d'anticorps dans la structure 3D est fonction de la dose utilisée pour le traitement, mais aussi du niveau d'expression de la cible dans l'échantillon. Ici, la dose saturante est atteinte dès 3nmol/L. Adapté de (240).

La mise en place des gradients nutritifs et gazeux décrits ci-dessus conditionne en partie la prolifération des cellules qui sont cultivées dans les MCTS. En particulier, c'est un ralentissement, voire un arrêt de la prolifération qui se produit en 3D. Cette caractéristique laisse entrevoir une moindre efficacité de traitements ciblant des cellules qui prolifèrent activement, comme c'est le cas pour de nombreuses molécules de chimiothérapie. Un exemple intéressant de ces mécanismes de résistance associé à la prolifération est celui décrit dans une étude de Mellor et collaborateurs. Ceux-ci ont développé des sphéroïdes à partir de cellules de colon, qui étaient soit quiescent, soit proliférant. Bien qu'ils soient tous des structures 3D, ceux-ci présentent des réponses variables en fonction des drogues utilisées, et du statut prolifératif (245).

Enfin, la culture de cellules en 3D peut être responsable de modifications phénotypiques directement responsables de l'échec des traitements. Par exemple, dans l'étude de Bissel et collaborateurs évoquée ci dessus (238), les auteurs démontrent que la signalisation intrinsèque en aval du récepteur Her2 est modifiée selon les conditions de culture (figure 22). Cette modification de la cible induite par la culture en 3D pourrait être responsable de l'échec de ce type de traitement. La surexpression de protéines fonctionnelles peut aussi être à l'origine de mécanismes de résistance en 3D. De fait, un travail réalisé par Wartenberg et collaborateurs démontre dans des sphéroïdes de pancréas, que les cellules de sphéroïdes acquièrent la P-gp (*P-glycoprotein*). Or, la P-gp agit comme une pompe, qui fixe et expulse certaines drogues (doxorubicine, vincristine, taxoïdes) en dehors du compartiment intracellulaire. La présence de cette protéine est directement responsable d'une moindre incorporation de doxorubicine dans les 3D, et d'un phénotype de MDR (*multidrug resistance*) classique (246).

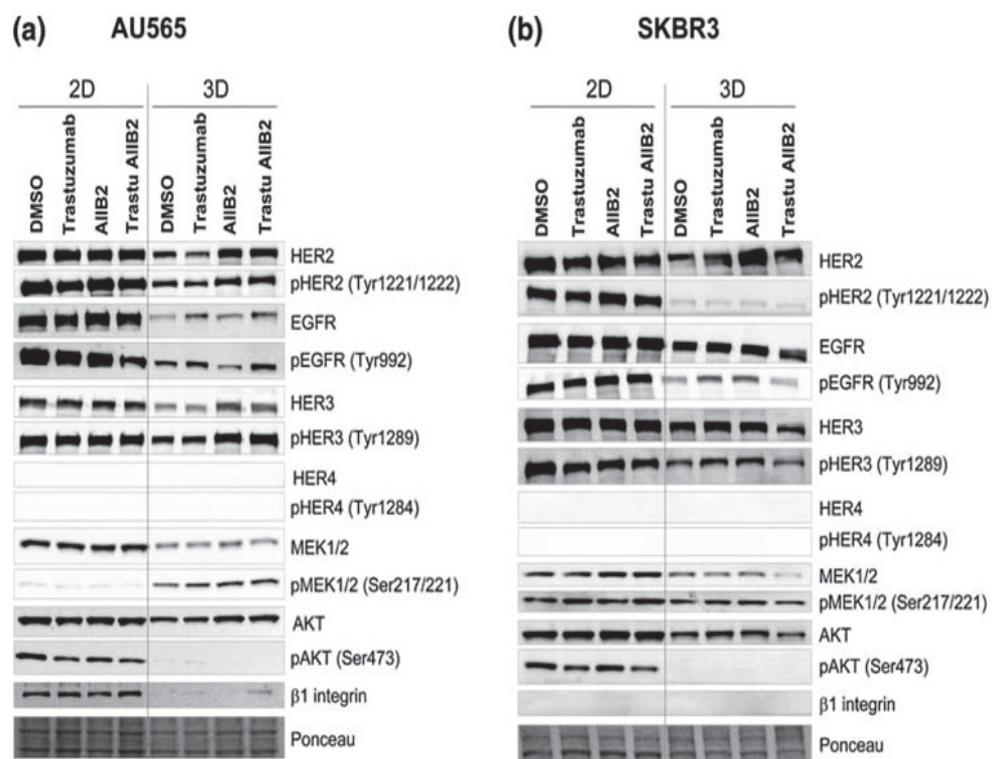


Figure 22: Modulation des voies de signalisation quand les cellules sont cultivées en 3D.

L'environnement architectural dans lequel sont cultivées les cellules conditionne les voies de signalisation potentiellement ciblées par les thérapeutiques. Dans le cancer du sein, les anticorps bloquant Her2 sont fréquemment utilisés en thérapie ; comme visible ici en (b), le niveau basal d'activation de Her2 est diminué quand les cellules sont en 3D. Les voies de signalisation en aval peuvent aussi être impactées, ce qui peut influencer la réponse à d'autres agents de thérapie (lapatinib, inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de Her2, aussi testé dans cette étude). Adapté de (238).

2. Modèles de co-cultures en 3D: progression tumorale et échappement immunitaire

Les cellules tumorales présentent à leur surface des peptides antigéniques, qui peuvent être reconnus par les différents types cellulaires impliqués dans l'immunité anti-tumorale, que sont notamment les CTL, les cellules NK,... On parle d'antigènes associés aux tumeurs (TAA). Toutefois, l'efficacité de la réponse immunitaire impliquant la reconnaissance de ces antigènes est très limitée *in vivo*. Comme c'est le cas dans le LF (§I-F-3 & 4 + §I-G), les tumeurs solides sont aussi capables de moduler leur microenvironnement, pour échapper à l'immunosurveillance. Par exemple, la production de certaines cytokines, ou la diminution de l'expression de certains antigènes cibles, peuvent expliquer l'échec des cellules immunitaires à contrôler la croissance tumorale. Mais ce qui semble encore plus intéressant, c'est que la structuration 3D des tumeurs pourrait jouer un rôle en elle-même dans ces phénomènes de d'immuno-évasion. C'est pourquoi, plus récemment, plusieurs expérimentateurs ont mis au point des modèles de co-cultures en 3D, afin d'étudier les mécanismes de migration, d'activation et de maturation des cellules immunitaires, quand elles sont en présence de cellules tumorales cultivées en MCTS.

L'utilisation de modèles de co-cultures a permis de montrer que quand les cellules cancéreuses sont cultivées en 3D, elles sont capables de modifier certaines fonctions des cellules immunitaires. Par exemple, quand des cellules de carcinome de vessie sont cultivées en 3D avec des monocytes, l'IL-1 et l'IL-6 sont retrouvées en plus grande quantité dans les surnageants de culture. Ceci induit une réponse pro-inflammatoire qui faciliterait la différenciation des monocytes en TAM (247). De manière intéressante, la culture en 3D du même type de cellules, mais non tumorales, avec des monocytes, n'induit pas cette sur-expression de cytokines. Un autre travail démontre que quand des fibroblastes tumoraux sont cultivés en 3D avec des monocytes, ils sur-expriment MCP-1 (*Monocyte chemoattractant Protein 1*) par rapport aux sphéroïdes de fibroblastes normaux. Ceci facilite l'infiltration des monocytes dans ces sphéroïdes tumoraux (248).

Enfin, certains systèmes de culture pluri-cellulaires ont permis de caractériser de nouvelles fonctions à ces cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral. C'est ainsi qu'a été identifiée la fonction pro-angiogénique des macrophages par exemple: quand des cellules de cancer mammaire sont cultivées en 3D en présence de macrophages, puis

implantées chez l'animal, la néo-angiogenèse qui a lieu est beaucoup plus importante que lorsque les cellules tumorales sont implantées seules (249).

Mais, d'un intérêt plus particulier pour notre étude, plusieurs travaux ont montré le rôle de la structure 3D dans les échecs de reconnaissance des cellules cancéreuses par les effecteurs de l'immunité anti-tumorale. Dans ce sens, Dangles-Marie et collaborateurs ont été les premiers à démontrer que l'incapacité des CTL à être activés par les cellules de lignées cancéreuses pulmonaires cultivées en 3D était corrélée à un défaut de présentation de l'antigène par les cellules tumorales. L'anergie des CTL est caractérisée par leur moindre production de cytokines quand ils sont en présence de cellules cultivées sous forme de MCTS, et ce sont des modifications au niveau des cibles qui expliquent ce défaut d'activité anti-tumorale. En effet, la protéine HSP70 est connue pour jouer le rôle de protéine chaperonne des antigènes produits dans les cellules, ce qui est directement responsable de leur adressage correct à la membrane plasmique par les molécules du CMH de classe I. Or, ce travail révèle que cette HSP est fortement sous-exprimée dans les cultures 3D comparativement aux cultures en suspension, ceci induisant une moindre présentation de l'antigène (250).

D'autres caractéristiques intrinsèques aux cultures 3D permettent de détourner l'immunosurveillance. Comme évoqué précédemment, les sphéroïdes sont caractérisés par la présence de gradients métaboliques, dont une surproduction de lactate au centre, liée en partie à la déprivation en oxygène, qui privilégie la voie de la glycolyse anaérobie. Or, il a été démontré que cet acide lactique est responsable d'une diminution de la prolifération des CTL, mais aussi d'une inhibition de leur activité cytotoxique, caractérisée par une moindre production de cytokines (IFN γ et IL-2), mais aussi par une expression moins importante de perforine et granzyme B, granules cytolytiques impliquées dans la lyse des cellules cibles (251). Cette surproduction d'acide lactique a également été rapportée dans les sphéroïdes de cellules de mélanome, et associée à une mauvaise reconnaissance par les CTL (252).

Des modulations d'expression d'antigènes cibles pour les CTL ont aussi été évoquées comme contribuant à ces phénomènes d'immuno-échappement. Par exemple, dans ces mêmes sphéroïdes générés à partir de lignées de mélanome, les antigènes de différenciation sont sous-exprimés par rapport aux cellules en suspension, comme c'est le cas pour les molécules HLA de classe I (252, 253). Ces phénomènes, cumulés à une surface réduite d'exposition aux CTL directement liée à la conformation 3D, seraient responsables de l'immuno-évasion. Toutefois, ces observations semblent restreintes à certains types cellulaires, puisque dans des

cultures 3D de cellules cancéreuses vésicales, le défaut d'activation des lymphocytes T n'implique pas de modification du niveau d'expression des molécules du HLA de classe I (254). Toutes ces études démontrent bien la propension des cellules, lorsqu'elles sont organisées en 3D, à mettre au point des stratégies qui contribuent à la progression tumorale en favorisant l'immuno-évasion.

Plusieurs travaux de l'équipe de Salem Chouaib, sur lesquels nous reviendrons plus en détail dans la partie discussion, mettent en avant le rôle de l'hypoxie sur la résistance des cellules cibles à la lyse induite par les CTL. Notamment, l'hypoxie réduit la sensibilité des cellules cibles aux CTL via l'amplification HIF-1 α dépendante de STAT3 (255). Ceci suggère que l'architecture 3D, propice à l'émergence de phénomènes d'hypoxie, pourrait favoriser la résistance de cellules cancéreuses à la lyse induite par les effecteurs anti-tumoraux.

L'ensemble des données recensées dans la littérature concernant les sphéroïdes met en avant le potentiel et la relevance de ces modèles pour l'étude des cancers. Ceci est vrai, premièrement, via leur grande homologie vis-à-vis des tumeurs solides humaines, au niveau architectural, "physique", et moléculaire. Ils représentent donc un outil puissant pour l'étude des problèmes thérapeutiques causés par les dysfonctions métaboliques, les gradients prolifératifs, l'hypoxie, et les interactions cellules - cellules et cellules - MEC en 3D.

BILAN BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL:

Le LF est une hémopathie maligne qui se développe dans les centres germinatifs B, liée à l'expansion d'un clone de lymphocyte B qui a accumulé des lésions oncogéniques. Cette pathologie est généralement indolente. *In situ*, le LF se caractérise par un index de prolifération bas, contrairement aux LBDGC, qui sont généralement très prolifératifs. Toutefois, une caractéristique majeure reste commune entre ces deux formes de tumeurs, à savoir leur croissance sous la forme d'une masse structurée en 3D.

Ce paramètre fondamental a largement été pris en compte dans l'étude des cancers solides. En effet, nombreux sont les modèles 3D qui ont été développés *in vitro*, et ce depuis 40 ans, pour l'étude des mécanismes de résistance aux thérapies notamment. Les travaux menés à partir de ces modèles 3D ont démontré que l'organisation spatiale est un déterminant crucial du comportement cellulaire, dans le sens où elle module des fonctions essentielles telles que la prolifération et la survie, mais aussi parce qu'elle modifie certaines caractéristiques moléculaires et signalétiques, ce qui peut conduire à l'émergence de mécanismes de chimiorésistance.

C'est pour cela que, dans notre équipe, a été développé, pour la première fois, un modèle de culture en 3D de cellules lymphomateuses, appelé MALC, pour *Multicellular Aggregates of Lymphoma Cells* (Brevet INSERM transfert, 2010), qui permet la culture de lignées lymphomateuses sous la forme d'agrégats, *in vitro*.

Le premier objectif de mon projet de thèse a été de caractériser les conséquences de la culture en 3D sur la signature moléculaire des cellules de LF, en utilisant ce nouveau modèle cellulaire. De plus, nous avons cherché à savoir si les signatures révélées dans le modèle de culture *in vitro* se rapprochaient de celles identifiées dans des échantillons de patients, afin de pouvoir en estimer la pertinence. En parallèle, nous avons voulu voir si ce mode de culture induisait des modifications fonctionnelles dans les cellules de LF.

L'objectif final de ce travail a donc été d'estimer **si, en quoi, et comment**, ces modifications liées à la structure 3D pouvaient contribuer, dans le LF: 1) aux mécanismes de résistance aux médicaments anti-cancéreux et 2) aux phénomènes d'immuno-évasion.

RESULTATS

I. ORGANISATION TRI-DIMENSIONNELLE DES CELLULES DE LYMPHOME FOLLICULAIRE, EXPRESSION GENIQUE, HYPOXIE ET CHIMIORESISTANCE

A. Méthodologie

Afin d'évaluer les conséquences de la culture en 3D sur la biologie des cellules de LF, un modèle de culture de type sphéroïde, établi à partir de lignées cancéreuses lymphomateuses, ou de cellules primaires de LF, était un pré-requis indispensable. C'est pourquoi, peu de temps avant mon arrivée dans l'équipe, Christine Jean et Guy Laurent avaient développé le modèle MALC, pour *Multicellular Aggregates of Lymphoma Cells*, technologie qui a fait l'objet d'un brevet auprès d'Inserm-transfert (2010).

Comme évoqué dans l'introduction, nombreuses sont les possibilités pour générer des cultures 3D. Cependant, comme les cellules lymphomateuses n'expriment pas de cadhérines, molécules impliquées dans les phénomènes d'adhésion intercellulaires, elles ne sont pas prédisposées, comme le sont les cellules épithéliales, à former des sphéroïdes. Il a donc fallu adapter les méthodologies précédemment décrites. En introduction, nous avons parlé de la technique de *Hanging Drop*, dite de goutte inversée, pour générer des sphéroïdes qui seront suivis sur le court terme. En parallèle, nous avons évoqué l'ajout de matrice exogène comme technique efficace pour forcer l'agrégation intercellulaire. Enfin, le revêtement du fond des plaques de culture avec certaines substances, qui permet une croissance sans adhésion des cellules, a été développé. Toute la technologie permettant de produire les MALC repose sur un mélange de ces 3 types d'approches, avec certaines adaptations.

Au départ, une suspension cellulaire est préparée à partir de cellules lymphomateuses. Dans celle-ci est ajoutée 1% de méthylcellulose, agent gélifiant qui va permettre de forcer les interactions cellules - cellules. Cette suspension est déposée goutte à goutte à l'intérieur du couvercle d'une plaque de culture, qui est ensuite retourné, sur la même plaque. Celle-ci est alors placée à l'étuve pour une durée de 24h. Cet intervalle de temps peut être considéré comme l'étape d'initiation de la formation de l'agrégat. En parallèle, le fond des puits de plaques "receveuses", qui seront utilisées pour la suite de la culture, est revêtu avec une solution d'agarose 4%. A l'issue de l'incubation, les agrégats formés dans les gouttes suspendues aux couvercles sont transférés dans les plaques receveuses, qui ont été

préalablement remplies avec du milieu de culture. Suite à la fusion de ce milieu de culture avec les gouttes du couvercle, les agrégats vont "tomber" au fond des puits accepteurs, sur l'agarose préalablement déposé. A la suite de cette étape, qualifiée de "transfert", les MALC peuvent se développer dans les puits de culture. Pour leur fournir un apport nutritionnel constant, leur milieu est remplacé tous les 5 jours. Cette méthodologie est illustrée dans la figure 23. Pendant les étapes de mise au point de cette technologie, il a été mis en évidence que plusieurs lignées de lymphome étaient aptes à produire des MALC (RL, Raji, Granta), contrairement à des cellules primaires de type B isolées à partir de sang périphérique de donneur sain, ou d'autres lignées (DOHH2, Karpas).

Lors de mon travail de thèse, j'ai utilisé ce modèle de culture à partir d'une lignée cellulaire unique, à savoir la lignée RL (fournie par l'ATCC : CRL-2261). Cette lignée cellulaire transformée de type lymphoblaste B a été obtenue à partir d'un individu caucasien porteur d'un LNH de type B. Elle exprime les marqueurs typiques de cellules B malignes de LF, à savoir le CD20, le CD19 et certaines Ig : celles de types M (IgM) et D (IgD) en surface, et l'IgM sécrétée, en faible quantité. Elle est également positive pour les antigènes de surface que sont CD21, CD22, Hle-1, HLA-DQ et HLA-DR. En parallèle, elle n'exprime ni le CD25, ni le TCR. Enfin, de manière très importante, elle est porteuse de la translocation t(14;18), alors qu'elle est négative pour l'Epstein Barr Virus (EBV). Nous avons donc sélectionné cette lignée cellulaire pour sa relevance vis-à-vis du LF. J'ai comparé plusieurs aspects des MALC produits selon la méthodologie décrites ci-dessus avec ceux observés dans les mêmes cellules RL, cultivées en suspension.

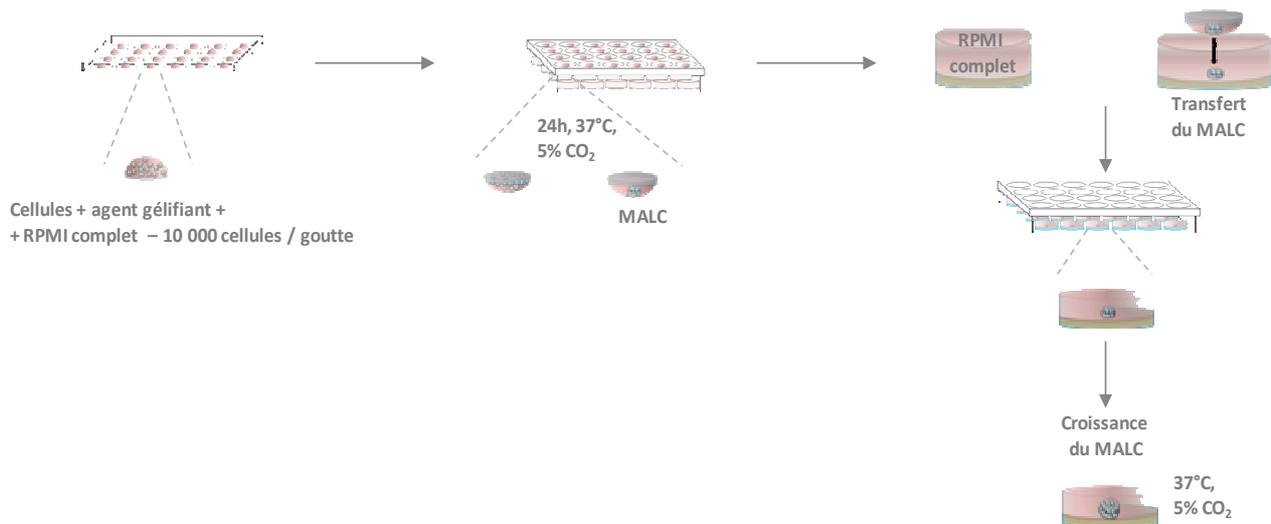


Figure 23: Méthodologie pour la culture en 3D de cellules lymphomateuses. La première étape de mise en culture des MALC consiste à déposer une suspension cellulaire additionnée de méthylcellulose à l'intérieur du couvercle d'une plaque de culture. Après retournement, les gouttes sont suspendues à ce couvercle, et incubées pendant 24h à l'étuve. Par fusion avec du milieu de culture placé dans des puits revêtus avec de l'agarose, les agrégats se détachent du couvercle et se déposent au fond des puits, sur le support d'agarose. Les MALC peuvent ainsi se développer au fond des puits de culture, et être suivis sur une durée moyenne de 20 jours, sans qu'une nécrose trop importante ne soit mise en place.

B. L'analyse de gènes : Autocompare & Genesis

1. Autocompare: principe

Dans la seconde partie introductive, nous avons évoqué la contribution des analyses de transcriptome sur la compréhension et la classification des lymphomes B. Ces approches sont très avantageuses, car elles permettent l'analyse simultanée d'un très grand nombre de gènes (puces à ADN comprenant tout le génome), ainsi que l'obtention de données extrêmement reproductibles. Toutefois, la grande quantité de résultats obtenus très rapidement nécessite un traitement informatique et statistique très important. Une fois ces données brutes transformées en valeurs exploitables, les interprétations peuvent s'avérer compliquées, et nécessitent des systèmes d'analyse assez complexes, telles que la méthode GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*). Cette méthode permet de déterminer si un groupe de gènes est significativement dérégulé entre 2 conditions biologiques (par exemple, donneur sain vs patient). Les groupes de gènes sont générés en fonction de leurs caractéristiques communes, comme par exemple,

leur implication dans une même fonction cellulaire, une localisation chromosomique identique, ou encore une régulation semblable (256). En résumé, ces analyses consistent à évaluer si des listes prédéfinies sont "enrichies" au sein d'une liste de gènes obtenue expérimentalement. Ceci facilite l'interprétation de ces importantes quantités de résultats.

Il existe plusieurs logiciels d'analyse d'enrichissement de gènes. Toutefois, ils ne sont pas toujours adaptés pour certains besoins spécifiques, car ils requièrent parfois des formats contraignants, mais surtout, peuvent contenir des listes de gènes qui sont trop exhaustives. C'est pour pallier à ceci que le logiciel *Autocompare* a été développé, dans notre équipe, par Frédéric Pont et Jean-Jacques Fournié. Il présente l'avantage majeur d'avoir été conçu sur mesure, pour les comparaisons de gènes impliqués dans les fonctions immunes, thématique développée dans notre équipe.

Autocompare permet de comparer une liste expérimentale avec de multiples listes de gènes de référence, mais aussi d'associer une signification biologique aux listes de gènes obtenues expérimentalement. Au départ, ce logiciel contient une collection de plus de 5000 listes de gènes de référence. Ces listes proviennent de signatures moléculaires issues de la littérature, publiées sur le site GSEA (MSigDB pour *Molecular Signature DataBase*), ou dans le système de classification PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*).

Parmi les listes de gènes avec lesquelles les données peuvent être comparées, on retrouve dans *Autocompare*:

- Biocarta
- GO (*Gene Ontology*) *molecular function*
- GO *biological process*
- GO *cellular components*
- Kegg *pathways*
- *Protein-PANTHER Pathway*

Dans chacune de ces listes initiales, les gènes sont regroupés en familles "fonctionnelles", nommées en fonction des réponses biologiques, des processus métaboliques, ou des voies de signalisation dans lesquels elles sont impliquées. En fonction de la liste sélectionnée, ce ne

sont pas les mêmes processus qui sont présents. Le choix de la liste, au départ, dépend donc des mécanismes que l'utilisateur souhaite identifier dans ses résultats.

Le principe de l'analyse réalisée avec *Autocompare* reste celui d'une analyse d'enrichissement de gènes, mais à plus grande échelle:

Les gènes dérégulés présents dans la liste expérimentale sont croisés avec ceux des familles fonctionnelles de la liste de référence. Ainsi, l'enrichissement en gènes présents dans chaque famille fonctionnelle peut être évalué. Le logiciel est capable de calculer la probabilité (*p-value*) pour qu'une famille de fonctions "de référence" soit significativement représentée dans la liste expérimentale. La taille de la liste expérimentale, ainsi que les nombres de gènes spécifiques à chaque famille entrent donc en compte pour le calcul des valeurs statistiques. Pour ces valeurs, le seuil de significativité est ajusté en fonction de la correction de Bonferroni, comme pour toute comparaison multiple.

Autocompare présente tout d'abord les résultats sous la forme d'un histogramme, qui récapitule les familles "enrichies", et les classe par ordre décroissant du nombre de gènes dérégulés par famille. En parallèle, le logiciel fournit un fichier texte récapitulant les familles de fonctions, classées par valeurs statistiques décroissantes. Enfin, un dernier fichier texte est généré, listant pour chaque famille de fonction quels sont les gènes qui sont spécifiquement dérégulés dans la liste expérimentale. Nous illustrerons la forme des résultats obtenus avec un exemple tiré des diverses analyses que nous avons réalisé avec *Autocompare* (figure 24).

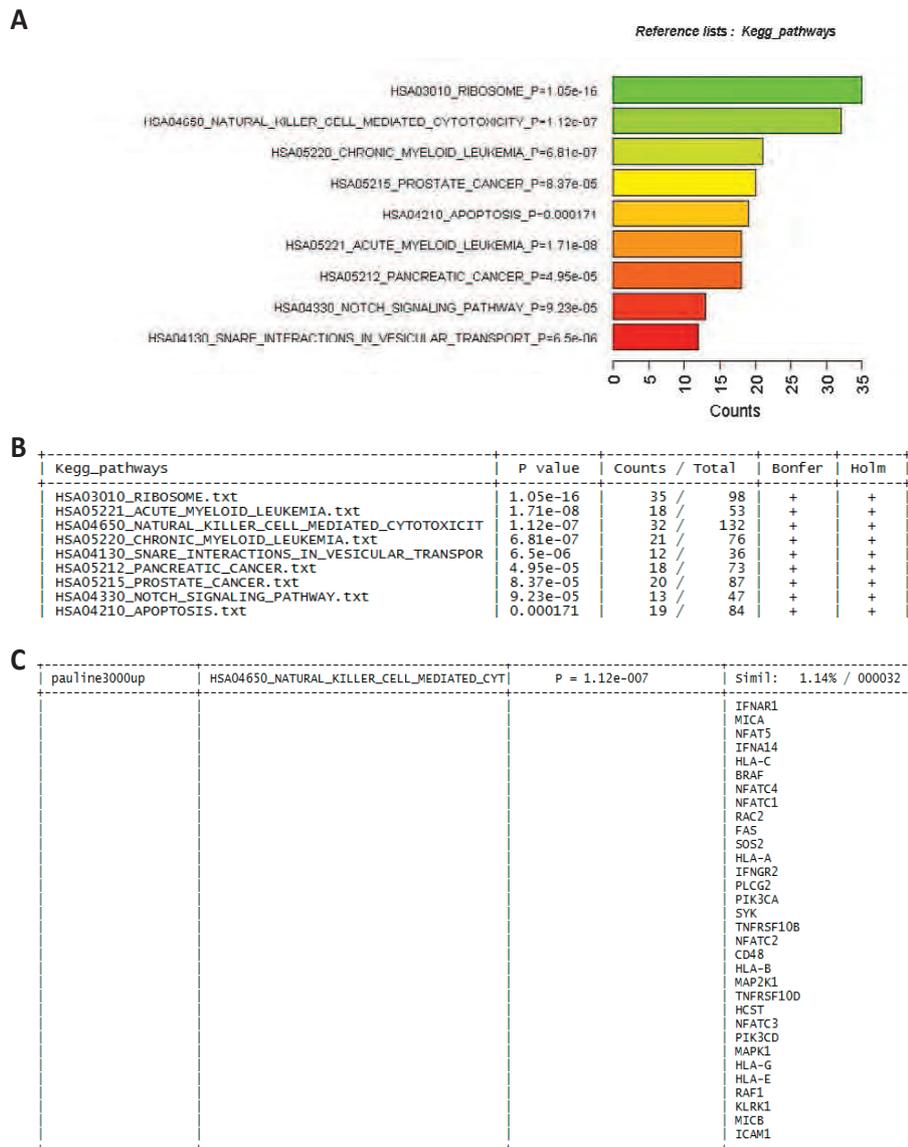


Figure 24: Résultats obtenus avec le logiciel Autocompare. Dans l'analyse de transcriptome prise en exemple, approximativement 7000 gènes étaient dérégulés entre les conditions comparées. Nous avons sélectionné les 3000 gènes sur-exprimés, et avons généré une liste, afin d'analyser les données dans *Autocompare*. La liste de référence que nous avons choisie pour cette analyse est la liste *Kegg_pathways*. (A). Histogramme représentatif des principales sous-familles de fonctions qui sont enrichies dans notre liste expérimentale. (B). Fichier texte classant les sous-familles par significativité statistique décroissante. (C). Détail des gènes dérégulés dans une sous-famille spécifique.

2. Application à notre étude

Pour mon projet de thèse, l'utilisation de ce logiciel *Autocompare* s'est révélée être absolument décisive. En effet, plusieurs des recherches que j'ai effectuées pendant ma thèse ont pour origine commune une analyse comparative de l'expression de gènes, *via* des approches de transcriptome.

Notamment, la première étude en cours de soumission s'appuie sur une analyse de transcriptome comparative entre des cellules RL cultivées en suspension et des cellules RL cultivées sous forme de MALC. Ce travail démarre sur la base de résultats obtenus avec le logiciel *Autocompare*, qui a été employé afin d'associer une signification biologique au profil de transcriptome induit par la culture en 3D. Grâce à *Autocompare*, nous identifions 4 familles majeures de fonctions dérégulées dans les MALC. La première est celle de la "Réponse à l'hypoxie", la seconde celle de la "Cascade I-KB kinase - NF-KB", la troisième celle de la "Régulation du cycle cellulaire", et enfin celle de la "Régulation négative de l'apoptose".

Les significations statistiques et les détails sont précisés dans le manuscrit qui est inclus dans la partie C de ce chapitre.

Dans chacune de ces 4 familles, il y a différents groupes de gènes, qui ont été précédemment identifiés et publiés dans des travaux car jouant un rôle dans la régulation du processus biologique. Pour ne citer qu'un exemple, dans la voie de la "Réponse à l'hypoxie", le transcrit HIF1-A est référencé.

Notre stratégie expérimentale a été d'étudier plus en détail chaque fonction biologique mise en évidence par *Autocompare*, en considérant chaque gène référencé dans la famille de fonction, afin d'identifier son profil de dérégulation.

3. Principe de l'étude parallèle avec les échantillons de tissus sains / malins : Genesis

La question que nous nous sommes posée était de savoir si ces 4 grandes familles de fonctions reflétaient la physiopathologie du LF. Nous avons donc effectué des comparaisons entre différents groupes, qu'ont été les "cellules RL en suspension", les cellules RL issues de "MALC", et des groupes pour lesquels nous avons obtenus les résultats de transcriptome dans la littérature, à savoir un groupe "CG normal", un groupe "lignées cellulaires B-EBV transformées", et enfin un groupe "LF". Ces résultats de transcriptomes avaient été déposés dans une base de données suite à un travail publié de l'équipe de L. Pasqualucci (66).

Suite à l'établissement de ces différents groupes, nous sommes revenus sur chacun des processus biologiques identifié par *Autocompare*, en nous intéressant à la dérégulation de chacun des gènes référencé à l'intérieur. Par exemple, 28 gènes sont inclus dans la voie de la "Réponse à l'hypoxie" (*le détail des gènes présents dans chaque voie fonctionnelle est détaillé dans la partie supplemental material de l'article présenté dans la partie C de ce chapitre*).

C'est à cette étape que le logiciel *Genesis* a été utile pour notre étude. Il s'agit d'un programme mis au point afin de permettre le *clustering* de gènes (257). Le-dit *clustering* est une méthode de classification de données. Ce type d'analyse permet d'organiser et de regrouper, de manière hiérarchisée, des profils d'expression de gènes (gènes ou groupes de gènes) dans différentes conditions expérimentales. L'avantage de *Genesis* est qu'il utilise plusieurs algorithmes pour calculer les différents *clustering* possibles dans une expérience donnée, et qu'il les montre simultanément afin que l'expérimentateur puisse sélectionner la méthode de *clustering* qui lui convient le mieux.

Dans notre cas, chaque gène de chaque famille de fonction *Autocompare* a été pris en compte et analysé entre les différents groupes. Le logiciel nous a été utile pour normaliser les niveaux d'expression entre les différents groupes (expériences différentes, mais réalisées sur des plates formes identiques, à savoir les *HG-U133-plus-2.0 Affymetrix microarrays*). Il a aussi servi à générer les *Heat maps* montrant la sur- ou la sous-régulation de chaque gène des voies considérées, dans les différents groupes établis au départ. Nous avons étudié toutes les solutions envisageables, obtenues en comparant les différents groupes possibles (B-EBV + LF comparativement aux CG normaux ; LF vs CG normaux ; ...) et avons sélectionné ceux qui

étaient le plus significatifs et le plus concluant pour notre étude afin de les intégrer dans l'article ci-après.

Pour illustrer un peu ces explications, nous citerons l'exemple de la première voie considérée, celle de la "Réponse à l'hypoxie", qui comporte 28 gènes. Après normalisation avec *Genesis*, nous identifions 7 gènes parmi les 28 de la voie qui sont sur-régulés dans les MALC comparativement aux cellules en suspension ($p < 0.01$) ; en parallèle, dans le groupe LF, comparativement au groupe CG normal, nous voyons 11 gènes sur les 28 qui sont significativement sur-régulés. Lorsque l'on s'intéresse plus en détail à l'intersection entre les différents groupes, nous voyons que parmi les 7 gènes acquis par les MALC, 3 sont communs au groupe LF, ce qui suggère que quand on cultive les cellules de LF en 3D, elles acquièrent un profil de transcriptome plus proche de celui identifié dans les biopsies de LF comparativement à celui observé dans les mêmes cellules, quand elles sont cultivées en suspension. Dans l'étude présentée ci-dessous, les conséquences fonctionnelles de ces dérégulations du profil de transcriptome spécifique à chaque famille de fonction identifiée par *Autocompare* ont ensuite été évaluées.

Toutes les données relatives à cette analyse bioinformatique, pour chacun des groupes considérés, sont expliquées et détaillées dans l'article présenté dans la section suivante de ce chapitre.

C. Article 1: *Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival and chemoresistance of Follicular Lymphoma.*

1. Introduction

L'hypoxie est une carence en oxygène qui résulte d'une balance déséquilibrée entre la consommation d'oxygène par des cellules et la quantité d'oxygène qui peut leur être fournie. C'est un phénomène qui peut être observé dans des contextes physiologiques, comme par exemple lors du développement embryonnaire, ou au cours des processus de cicatrisation (258, 259). Toutefois, l'hypoxie peut aussi contribuer à l'aggravation de certaines conditions pathologiques, comme les cancers par exemple, dans lesquels sa contribution à la néo-angiogenèse tumorale n'est plus à démontrer. L'hypoxie entraîne, au niveau moléculaire, la

stabilisation de protéines que sont les *Hypoxia Inducible Factors* (HIF), qui sont au nombre de 3. Dans certains types cellulaires, l'hypoxie induit l'activation de voies de signalisation en aval de récepteurs aux facteurs de croissance, potentiellement impliquées dans les processus de prolifération. Par exemple, elle régule positivement celle de la PI3K/Akt dans des lignées de fibrosarcomes (260) ou la voie p42/p44 MAPK dans des cellules endothéliales (261). Dans les tumeurs hématologiques, l'hypoxie n'a été que peu étudiée. Toutefois, il semble que les concentrations en oxygène conditionnent la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (262), et une étude a démontré, dans des modèles murins, que c'est en partie *via* la stabilisation de HIF1 α , qu'elle induit la quiescence des cellules souches hématopoïétiques (263). En fonction des modèles, l'expression de HIF1 α peut donc conduire à des régulations positives ou négatives de la prolifération. Dans le LF, le statut hypoxique est inconnu. Toutefois, on sait que la protéine HIF1 α est exprimée dans 50 à 60% des LF. Malgré ces observations, les conséquences fonctionnelles de cette expression de HIF1 α dans le LF n'ont jamais été étudiées à ce jour.

Pourtant, le LF, est une maladie généralement indolente, dans laquelle le marqueur de prolifération Ki-67 est très faiblement exprimé. En effet, 90% des cellules de la biopsie sont quiescentes, par opposition aux cellules présentes dans un ganglion réactionnel. Cette quiescence peut contribuer à la résistance aux traitements génotoxiques, surtout dans un contexte 3D, comme nous l'avons évoqué en introduction. Dans le LF, il n'est pas improbable que de tels phénomènes se produisent, puisque les cellules malignes sont majoritairement quiescentes, et que la pathologie reste incurable. En effet, même si des thérapies sont efficaces pour ralentir sa progression, la maladie résiduelle est toujours présente, et son existence se solde par des rechutes inévitables.

En première hypothèse, nous avons postulé que le faible degré de prolifération du LF était une modalité de réponse à l'hypoxie, et pouvait contribuer à l'émergence de mécanismes de résistance aux médicaments anti-cancéreux. Nous avons également voulu caractériser la signature moléculaire des cellules de LF quand elles sont cultivées en 3D, et les comparer aux signatures identifiées chez les patients, afin d'estimer la relevance du modèle MALC, support de ce travail.

Les données de transcriptome utilisées pour faire le parallèle avec les échantillons de patients avaient été publiées sur le site *GEO DataSets*, base de données publique référençant les

données d'expression de gènes obtenues dans des travaux acceptés pour publication. Ces résultats avaient été obtenus dans un travail de Compagno (66), démontrant la fréquence de mutations dans le gène codant pour TNFAIP3 (A20) dans les LBDGC de type ABC, et le rôle de ces inactivations de A20 dans l'agressivité de la maladie. Toutefois, même si les données publiées dans GEO comprennent des échantillons de LF, aucune partie de ce travail n'est consacrée à son étude.

Pour tester nos hypothèses, nous avons réalisé une étude comparative de l'expression génique entre des échantillons de cellules RL cultivées en suspension, ou sous forme de MALC. Les résultats de cette analyse ont constitué la base de tout le reste de l'étude. En effet, le logiciel *Autocompare* a révélé des familles de fonction enrichies dans nos échantillons de culture en 3D, comme dans les cellules primaires de LF, dont la signature hypoxique. Nous avons ensuite caractérisé les conséquences fonctionnelles de ces dérégulations de transcriptome, pour chacune des familles de fonction révélées. Enfin, nous avons évalué la contribution de l'hypoxie et de HIF1 α dans l'entrée en quiescence des cellules de LF, et les conséquences de la quiescence cellulaire en terme de résistance aux médicaments anti-cancéreux.

2. Article

Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival, chemoresistance, and sensitivity to immune effectors in Follicular Lymphoma

Pauline Gravelle^{*1,2,3,4,5}, Christine Jean^{*1,2,3,6}, Julien Familiades^{1,2,3,4,5}, Emilie Decaup^{1,2,3,4,5}, Amandine Blanc^{1,2,3,4,5}, Christine Bezombes^{1,2,3,4,5}, Camille Laurent^{1,2,7,8}, Jean-Jacques Fournié^{1,2,3,4,5}, and Guy Laurent^{1,2,3,4,5,9}

Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival, chemoresistance, and sensitivity to immune effectors in Follicular Lymphoma

Pauline Gravelle^{*1,2,3,4,5}, Christine Jean^{*1,2,3,6}, Julien Familiades^{1,2,3,4,5}, Emilie Decaup^{1,2,3,4,5}, Amandine Blanc^{1,2,3,4,5}, Christine Bezombes^{1,2,3,4,5}, Camille Laurent^{2,7,8}, Jean-Jacques Fournié^{1,2,3,4,5}, and Guy Laurent^{1,2,3,4,5,9}

Author's affiliations:

¹ INSERM UMR1037-Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France

² University of Toulouse III: Paul Sabatier, France

³ ERL 5294 CNRS, Toulouse, France

⁴ Institut Carnot Lymphome: CALYM, France

⁵ Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer: TOUCAN,

⁶ current address: Dept of Reproductive Medicine, Moores Cancer Center, UCSD, San Diego, CA, USA

⁷ INSERM UMR1047-Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan

⁸ France Department of Anatomopathology, Hospital Purpan, Toulouse, France

⁹ France Department of Hematology, Hospital Purpan, Toulouse, France

* Equal contribution of these authors

Text pages count: 27

Figures / tables count: 6 figures, 1 table ; 4 supplemental figures, 4 supplemental tables

Running head: Functional consequences of aggregated Lymphoma cell growth.

Grants numbers and Sources of support:

This work received institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Paul Sabatier, and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Authors acknowledge funding contracts from Institut National du Cancer (RITUXOP), Institut Carnot-Lymphome (CALYM) and Fondation de France (2009002593).

Corresponding author:

Pauline Gravelle, Cancer Research Center of Toulouse – Equipe 9, CHU Purpan, 31024 TOULOUSE cedex 3. Phone: +0033-56274 8398, Fax: +0033-56274 4558 ; E-mail: pauline.gravelle@inserm.fr, paulinegravelle@hotmail.com

The authors declare no competing financial interests.

Note: Supplementary data for this article are available at *The American Journal of Pathology* website.

ABSTRACT

Lymphomas grow as dense aggregates in patients, but whether this spatial organization affects lymphoma cell biology is unknown. Here we grew follicular lymphoma cells *in vitro* as multicellular aggregates of lymphoma cells (*MALC*) to investigate this question. Gene expression analysis revealed that 612 genes were differentially expressed when cells grew in MALC rather than in suspension. These genes correspond to response to hypoxia, activation of NFκB pathway and negative regulation of cell cycle, a gene signature also found in the transcriptomes from follicular lymphoma biopsies. Both pimonidazole staining, HIF1α accumulation, and VEGF-A release confirmed that cells in MALC actually respond to hypoxia. In adaptation to such conditions, they also displayed an activated NFκB pathway and a quiescent status far more frequently than in suspension. When cultured in three dimensions, FL cells display resistance to doxorubicin and bendamustine, two drugs largely used in FL therapy, compared to FL cultured in suspension. Finally, MALC were also found to be less sensitive to purified natural killer cells. To conclude, our study shows that, in FL, spatial organization result on dramatic changes in FL biology, including gene expression, proliferation, drug resistance and immune escape.

INTRODUCTION

Non Hodgkin lymphomas (NHL) represent a large group of cancers with 75,190 new cases in USA in 2011, with diffuse large B cell lymphomas (DLBCL) and follicular lymphomas (FL) as most frequent subtypes. In the last decade, patients with FL have benefited from the introduction of immunochemotherapy consisting in the association of genotoxic agents such as doxorubicin with rituximab, a chimeric monoclonal antibody (MoAb) directed against the membrane-associated CD20 antigen. FL is still generally considered as an incurable disease however, justifying further investigations of the molecular and cellular basis of its natural history and chemosensitivity.

This disease is characterized by low proliferation rate and subsequent slow tumor cells accumulation, natural chemoresistance reflected by relatively low incidence of molecular response to immunochemotherapy (about 50%), and immune escape illustrated by inevitable relapse even after complete remission, suggesting that immune effectors, including natural killer (NK) cells, are inefficient to eradicate minimal residual disease. However, the molecular basis of all these features remains to be elucidated although the t(14,18) and subsequent Bcl-2 overexpression has been shown to play a role in drug resistance and perhaps in negative regulation of cell proliferation^{1,2}.

To address such questions however, most *in vitro* studies so far involved cell suspensions that are not representative of the carcinoma-like architecture of FL spherical tumors *in vivo*. The 3D organization of spheroid carcinomas drives proliferation and survival adaptations by harnessing gene expression and signaling pathways to high cell density, stress, hypoxia and low access to nutrients^{3,4}. Further studies have shown that spatial organization confers intrinsic tumor cell resistance to genotoxic compounds⁵ as well as ionizing radiation, due to hypoxia⁶. Finally, grow in aggregates results in decreased sensitivity to immune effectors such as cytotoxic T lymphocytes (CTL)⁷⁻⁹.

Here, we designed a novel method of 3D *in vitro* culture of NHL cells to generate "Multicellular Aggregates of Lymphoma Cells" (MALC), and used these as a model to address such

questions. Investigating the biological characteristics of FL cells grown in MALC revealed for the first time that this spatial organization deeply affects gene expression, cell proliferation and survival as an adaptation to hypoxic conditions and beyond, to chemotherapeutic drugs and NK cells.

MATERIAL & METHODS

Cell lines and reagents

The t(14,18)⁺ FL ATCC RL cell line was cultured at 37°C in humidified 5% CO₂ in complete medium. Hypoxia experiments were performed in hypoxic chamber (0,1% O₂) or with 10µM cobalt chloride (CoCl₂). PKH67 and plasmids were obtained from Sigma-Aldrich. VEGF-A concentrations were determined by using the kit QIA51 (Merck Millipore, Molsheim, France).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from healthy donors (Etablissement Français du Sang, CHU Purpan, Toulouse) and separated by Ficoll-Hypaque density gradient (GE Healthcare). Negative selection of Natural killer (NK) cells was performed with the EasySep™ Human NK Cell Enrichment Kit, according to the manufacturer's instructions (STEMCELL, Grenoble, France). The purity of the enriched NK cells (around 95%) was evaluated by flow cytometry using a CD56 PE-Cy5 antibody (BD Biosciences, le Pont de Claix, France) and a CD3-PE-Cy7 antibody (Beckman Coulter, Roissy CDG, France).

Multicellular Aggregates of Lymphoma Cells (MALC)

MALC were produced by an adaptation of the hanging drop method¹⁰. Cell suspensions (500, 000 cells/ml) were prepared in complete medium containing 1% Methocult® (Stemcell, Grenoble, France) and 20 µl of this suspension were dropped in coverplates of a 24-well culture plate. After 24h incubation, all drops were transferred by returning the coverplate onto a dish previously coated with 1% agarose (Invitrogen, Saint Aubin, France). All the MALC culture medium was then renewed every 5 days. The number of cells in MALC was estimated by trypan blue counting, their volume was

calculated by measuring two diameters (L= longest diameter and l= shortest diameter) and using the formula $V = 4/3 \times \pi \times L \times l^2 / 2^3$.

Cell imaging

RL cells were stained by PKH67 (Sigma-Aldrich) prior to MALC preparation. Samples were kept in culture medium at room temperature (RT) during acquisitions. MALC were visualized on the fluorescein channel of a LSM 7 MP Laser Scanning biphoton microscope (Zeiss, Le Pecq, France), with 20x plan apochromat objective , numerical aperture=1, dry. Series of 90 to 150 z-sections were taken at 1- μ m distance. Images were produced with ZEN-2008-LE software (Zeiss) and analyzed with Imaris 3.1 (3D-software).

Western-blots

MALC were dissociated, washed with PBS, lysed in Cytobuster (Merck Millipore, Molsheim, France) and Western blots were performed as described¹¹. Antibodies used were against: α -TUBULIN (Sigma-Aldrich), β -ACTIN (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), HIF1A (Cayman Biochem, Montluçon, France), phospho-Ser536 NF κ B-P65, NF κ B-P65 (total), P21 (Cell Signaling, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), and P27 (Santa Cruz Biotechnologies, Le-Perray-en-Yvelines, France), peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit or anti-mouse Ig (Jackson Immunoresearch Laboratories, Montluçon). Cell fractionation was described elsewhere¹².

Flow cytometry

All stained cells were analyzed with LSRII flow cytometer (BD), and data were processed using DIVA 6.1.2 software (BD).

Phenotype

MALC were dissociated with mechanical forces in PBS, cells were washed with cold PBS and stained with the next fluorochromes conjugated antibodies ; briefly, PE conjugated ICAM/CD54 (Beckman

Coulter, Roissy CDG, France), FITC conjugated HLA-ABC, PE conjugated HLA-E (eBiosciences, Paris, France), FITC conjugated FAS antibody (Beckman Coulter, Roissy CDG, France) were incubated on cells for 20 mn at 4°C, and then washed with cold PBS prior analyze by flow cytometry.

Degranulation assay, CD107a expression

For degranulation assay, MALC cells or RL cells in suspension were harvested and incubated at 37°C with NK cells at a 1 to 1 ratio for 4h. Reactions were stopped on ice, cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-human CD107a (BD Pharmingen) or isotype matched control Ab in staining buffer containing 1% FCS. Fluorescence was analyzed by Flow Cytometry.

Pimonidazole assay

Oxygen deprivation was measured with HypoxyprobeTM-1 plus kit (HPI, Souffelweyersheim, France). MALC were incubated in medium containing 100µM pimonidazole for 2 hours at 37°C, and then dissociated, washed, fixed with PFA 2% for 15mn at RT, washed again and finally incubated for 20mn with 1% of FITC-conjugated anti-pimonidazole antibody.

5-bromo-2-deoxyuridine incorporation assay and cell cycle analysis

MALC medium was replaced by medium containing 10µM BrdU and incubated 1 hour at 37°C, MALC were then dissociated and washed (PBS 0.5% BSA). 100 µL of ice cold ethanol was added on cells and incubated (20 min at RT). Cells were washed and incubated in 500 µL of 2M HCl buffer (20 min at RT) prior to incubation (5 min) with 0.1 M Na₂B₄O₇ - pH 8.5. Anti-BrDU-FITC (BD, Le-Pont-de-Claix, France) was added on cells (20 min at RT). Cells were then washed twice and incubated (30 min, RT in the dark)with 10 µg/mL propidium iodide (Invitrogen, Saint-Aubin, France) and 500 µg/mL RNase A (Invitrogen).

High resolution cell cycle analysis

Quiescent cells were detected by the High Resolution Cell Cycle Analysis technique¹³. After fixation (20mn RT in ice-cold ethanol), cells were stained for Ki-67 (clone Ki-67, Biolegend, Saint Quentin en Yvelines, France) , washed, labeled with 7-AAD (BD) for 30 mn at RT, to visualize their DNA content.

The raw percentages from cytometry were shown as ratios: induction of quiescence (Fold Change) = (% quiescent among treated cells) / (% quiescent among untreated cells).

Cell cycle fractionation

We used cell cycle fractionation technique¹⁴ to sort the quiescent and cycling viable cells from MALC. The DNA content were stained with 10 μ g/mL Hoechst 33342 (Invitrogen) for 45mn at 37°C, washed and stained with 2 μ M Pyronin Y (Sigma-Aldrich) for 45mn at 37°C. Quiescent cells are pyronin Y^{dull} and Hoechst²ⁿ, whereas proliferating cells are pyronin Y^{bright}. To sort cells for culture, this technique was replaced by a single Pyronin Y staining. Drug sensitivity of both cells was evaluated by Trypan blue counting.

Cytotoxicity assay

The sensitivity of cells to NK cytotoxicity was measured by a conventional 4-h⁵¹Cr release assay by using triplicate cultures in round-bottom 96-well plates. Target cells (1 \times 10⁶ cells) (suspension RL cells or cells dissociated from MALC) were labeled with 100 μ Ci ⁵¹Chromium (Sodium chromate, 1 mCi/ml, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). After 1 h incubation at 37°C, cells were washed 3 times in RPMI. NK effector cells were added to ⁵¹Cr labeled target cells in replicate at various effector to target ratios (10:1, 5:1, 2,5:1, and 1,25:1) in a total volume of 200 μ l RPMI containing 5% FCS per well of 96-well round-bottomed microtiter plates. Microtiter plates were centrifuged at 1200 rpm for 5 min and incubated at 37°C. After 4 h of culture, 50 μ l cell free supernatants were transferred to Lumaplate (Perkin-Elmer) and the radioactivity was measured on a TopCount (Perkin-Elmer). The specific cytotoxicity was calculated. Spontaneous release was determined from wells containing target cells alone. Maximum release was determined from wells containing target cells lysed in 1% Triton X-100. Percent-specific cytotoxicity was calculated conventionally as described earlier.

Immunohistochemistry of MALC

Aggregates were transferred in agarose-precoated transwells (R&D, Lille, France). Medium was replaced by 10% buffered formalin for fixation, MALC were embedded in agarose and then in paraffin. Immunostaining was performed on sections obtained with an automated stainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Antibodies used were: anti Ki-67 (clone MIB-1, Biolegend), anti-Pimonidazole (HPI). After incubation with antibodies, sections were incubated with the avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, CA) followed by staining with DAB chromogen solution.

Lentivector production and RL cell transduction

The pLKO.1-puro-CMVTagFP635TM vector was used for all transduction experiments. HIF1A gene inhibition used the sequences sh3810 and sh10819 (see suppl. Fig 1) and as control, shc013 (empty vector). RL cells were transduced with lentivector particles carrying these constructs produced by the Inserm UMR1037 vector facility (CRCT, Toulouse, France). After subcloning of transduced cells and puromycin selection, the subclones specified in text were used.

Gene expression analysis

RNA was extracted from cells grown either in suspension or in MALC,. cDNA were prepared from 200 ng RNA per sample, and hybridized to HG-U133-plus-2.0 Affymetrix microarrays (Genomic facility, Lyon, France). Raw datas corresponding to both experiments (MALC#2D & quiescent#cyclling) are available on NCBI Gene Expression Omnibus website : GEO dataset GSE41856. Additional raw data files from purified germinal center cells (GC, n=10), follicular lymphoma cells purified from biopsies (FL, n=38) and 5 B-EBV lymphoblastoid cell lines were downloaded from the NCBI GEO website (GEO dataset GSE12195¹⁵). Raw data were normalized with RMA (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>), log2 converted and collapsed to 20606 unique gene with GSEA (www.broadinstitute.org/gsea/). The 612 'experimental' genes that were differentially expressed by cells from MALC (fold change ≥ 2 , p-value < 0.05 versus cells in suspension) were

analyzed with Autocompare ¹⁶ (<https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products/data-mining>). Expression levels of genes shared by reference pathways and experimental geneset were compared between sample groups as specified in text. For these comparisons, expression levels were normalized and heatmaps were generated by Genesis software (<http://genome.tugraz.at>). Significantly differently expressed genes were defined according to the FDR-corrected Q-value.

Statistics

Comparisons of datasets or gene expression levels between the specified groups of samples were based on two-sided Student's *t* test of paired samples or of groups of unequal variance, according to the datasets. As specified in text, p-values of <1% or <5% were considered significant. Gene enrichment analysis was based on hypergeometric distributions and Bonferroni corrections for multiple comparisons ¹⁷.

RESULTS

Growth in MALC impacts gene expression

We produced MALC from the RL cell line and maintained these for 3 weeks by *in vitro* cell cultures. On average, MALC were visible by eye and routinely reached volumes of about 30 mm³ within 3 weeks of culture. Visualization of 3 days-old MALC from PKH67-stained RL cells by biphoton microscopy showed oblate spheroids composed of a dense and homogeneous cell population (Fig 1A-B). Immunohistochemistry of 10 days-old MALC revealed a CD20⁺, CD10⁺, CD5⁻ and CD34⁻ phenotype that was similar to that seen in 2D cultures and typical of FL cells (data not shown).

We then investigated the gene expression pattern of cells from this 3D structure. mRNA from RL cells grown either in conventional 2D (exponential phase) or in MALC (10 days culture) were isolated and hybridized on Affymetrix microarrays. Comparison of gene expression patterns in both conditions revealed that more than 7,000 genes were differentially expressed in MALC ($p < 0.05$), 612

of which displayed significant changes of expression level (>2-fold, both up and down) (Fig 1C). The functional significance of the 612 genes most differentially expressed by MALC cells was analyzed by using Autocompare for matches with the Gene Ontology's (GO) Biological Process compendium. As a whole, these genes were significantly involved in negative regulation of cellular process (38 genes, $p = 2.27 \times 10^{-5}$), negative regulation of biological process (39 genes, $p = 2.82 \times 10^{-5}$) negative regulation of cellular metabolic process (18 genes, $p = 0.0004$), and anti-apoptosis (10 genes, $p = 0.002$). More specifically, these 612 genes were involved in response to hypoxia (5 genes, $p = 0.00106$), I- κ B kinase - NF- κ B cascade (9 genes, $p = 0.00538$), negative regulation of apoptosis (11 genes, $p = 0.00389$) and regulation of cell cycle (11 genes, $p = 0.0156$) (Fig 1C). These genes are listed in Supplemental Table 1.

Thus, FL cells could stably grow in tridimensional aggregates. In such conditions, they displayed a distinct gene expression pattern which reflected adaptation to hypoxia, induction of pro-survival pathway and, most surprisingly, an anti-proliferative status.

MALC modelizes hypoxia occurring in FL

We first asked if such conditions might be representative of authentic FL nodules, in terms of molecular profile. To assess this, we looked for the gene signature "response to hypoxia" in MALC, and compared it with the one of FL cells from biopsies relative to normal GC. In this aim, we downloaded transcriptomes from a single study comprising such samples¹⁵ and compared the expression level of the 28 genes defining the 'response to hypoxia' according to GO-Biological Process database. Seven out of these 28 genes were differentially upregulated in MALC vs 2D ($p < 0.01$), including the above-mentioned five genes (Fig 1C) with fold change >2 and p -value >0.05 (Supplemental Table 1). In addition, 11 out of the 28 genes were also significantly upregulated ($p < 0.01$) in FL cells relative to normal GC (Supplemental Fig 2), 3 of which were upregulated and shared with MALC (Fig 2A, Supplemental table 2).

This suggest that by culturing FL cell lines in 3D, they acquire a gene expression profile closer to the one observed in FL biopsies.

The next point was to investigate whether this gene signature of response to hypoxia actually reflected the presence of hypoxic conditions in MALC. To test this, RL cells were grown in 2D normoxic or hypoxic conditions and in MALC. Hypoxia was determined in these samples through flow cytometry-based analysis of hypoxic cells following the pimonidazole assay (Fig 2B). This experiment showed that classical 2D cultures do not comprise hypoxic cells unless they are maintained for 48hrs in hypoxic chambers. By contrast, nearly half of the cells were in hypoxia when grown in MALC. Further immunohistochemistry of pimonidazole-stained MALC showed that hypoxic cells were mostly located in the core of MALC (Fig 2B). Hence the gene signature of MALC reflected the sensing of hypoxic conditions in the center of MALC. Since adaptation to hypoxic conditions usually involves stabilization of the HIF1A protein¹⁸, we asked whether HIF1-A was present in the cell lysates from MALC. The western blots showed that HIF1-A protein in MALC was expressed to the same extent as in 2D culture submitted to severe hypoxia conditions (0.1% O₂) (Fig 2C). Furthermore, since HIF1 α protein induces the production of pro-angiogenic factors such as VEGF-A¹⁹, we asked whether this also occurs in MALC. VEGF-A production was found to be increased in MALC relative to 2D culture (Fig 2D). Thus, a functional pathway induced by hypoxia was identified in MALC.

NF κ B is found activated in MALC

The NF- κ B pathway is reportedly found activated in NHL cells²⁰, so we wondered whether this feature was also recovered in the MALC model. The above-depicted gene expression signature of MALC (Fig 1C) encompasses up-regulation of a set of 9 genes corresponding to 'I- κ B kinase-NF- κ B cascade'. At this point, we wondered if this activation pattern might be found in FL nodules. To address this possibility, we compared the gene signature of MALC vs 2D with the one of FL vs normal GC cells (see above) in terms of the 102 genes involved in the 'NF- κ B cascade' as they are listed in the GO Biological Process compendium. Sixteen out of these 102 genes were differentially regulated in MALC vs 2D ($p < 0.01$). In addition, we found that 66 out of the 102 'NF- κ B cascade' genes were significantly ($p < 0.01$) deregulated in FL nodules relative to normal GC (Supplemental Fig 3), and 7 of

which were similarly deregulated in both MALC and FL samples, 6 of them being upregulated ; PTPLAD1 is the only downregulated gene in FL as in MALC (Fig 3A, supplemental table 3). Of note, these 65 'NF- κ B cascade' genes were also differentially expressed by the constitutively activated B-EBV cell lines^{21, 22}. Furthermore, among the genes deregulated by both MALC and FL cells, both *PTPLAD1*, *CASP8*, *TNFAIP3* and *CFLAR* are wired through a functional network of protein interaction defined as 'I- κ B kinase-NF- κ B cascade' by the STRING database (<http://string-db.org>) (Fig 3B). These genes are listed in Supplemental Table 3.

We were thus prompted to check if the NF- κ B pathway was really activated at cellular level. To this aim, we analysed the phosphorylation status and nuclear translocation of RelA-p65 protein in RL cells grown either in suspension or in MALC. We found that both total RELA-P65 and its Ser536-phosphorylated form were accumulated in MALC, compared to 2D culture (Fig 3C). In addition, the RELA-P65 protein was more abundant in the nuclear fraction of cells grown in MALC than in the same nuclear fraction of cells grown in 2D (Fig 3D). Finally, we investigated the expression of ICAM1, a protein regulated by the NF- κ B pathway²³. We found that indeed ICAM1 was overexpressed in MALC relative to 2D cultures (Fig 3E).

Thus, a functional NF- κ B pathway was found in MALC.

MALC growth induces a cell cycle exit

We next investigated cell cycle regulators in MALC vs 2D as well as in FL vs normal GC. Thus, *CDKN1B*, *CDT1*, *DDB1*, *HCFC1*, *PKMYT1*, *PPM1G* and *UBE2C*, all were similarly deregulated in both MALC (relative to 2D) and in the FL biopsy samples (relative to normal GC) (Fig 4A, supplemental Figure 4, supplemental table 4): *CDKN1B* was the only one upregulated in MALC as in FL, the others genes were all under-expressed in both groups. This transcriptome profile was highly suggestive of low proliferation rate.

These results encouraged us to investigate possible differences in terms of cell proliferation between MALC and 2D culture. The volume of MALC increased with time (Fig 4B). During the first week of *in*

in vitro culture, cells from MALC grew quickly but slower than in 2D (mean doubling time of 42 hours, versus 31 hours, respectively), and increased from 10,000 cells at day 0 to roughly 600,000 at day 7. After one week, MALC proliferation was sustained with a mean doubling time of 7 days. Along the culture however, the cell death rate remained consistently below 10%. Cell cycle, when analyzed by BrdU/PI double staining, revealed that cells from MALC accumulated in G0/G1 phase after 7 days of culture, while their S-phase decreased (Fig 4C). We hypothesized that this might result from cell cycle exit rather than G1/S blockade, and thus tested this by high resolution cell cycle analysis of Ki-67/7-AAD double staining. We found a progressive increase of cells with 7-AAD^{diploid}, Ki-67^{negative} phenotype revealing accumulation of quiescent cells in MALC. Quiescent cells represented 49% of all cells in 3 week-old MALC (Fig 4D). Loss of Ki-67 expression without associated necrosis was confirmed by immunohistochemistry in MALC (Fig 4D). In addition, both P27 (CDKN1B) and P21 (CDKN1A) regulators of quiescence entry in fibroblasts^{24, 25} were more abundant in cells from MALC than in 2D (Fig 4E).

Thus, grow in aggregates resulted in dramatic decrease in cell proliferation and entry into quiescence. Since hypoxia induces quiescence in hematopoietic stem cells²⁶, we questioned whether the quiescent MALC cells arose by adaptation to hypoxic conditions. To answer this, RL cells were cultured for 2 days in either hypoxic or normoxic conditions and were analyzed for cell cycle status as above. The hypoxic cultures comprised 3-times more quiescent cells than in the normoxic cultures (Fig 4F). Along the response to hypoxia, stabilization of the HIF1A protein mediates cell cycle arrest in mouse embryonic fibroblasts and splenic B lymphocytes²⁷. Thus, we investigated the role of HIF1A in the quiescence of MALC cells. To that aim, RL cells grown in suspension were treated with the HIF1A protein stabilizer CoCl₂, and the induced quiescent cells were measured. First, CoCl₂-treated RL cells comprised twice more quiescent cells than in the untreated counterpart. By contrast, CoCl₂-treated RL cell clones previously transduced with various shRNA targeting HIF1A gene did not enter into quiescence (Fig 4G). Altogether, these results suggests that, in MALC, hypoxia, through a HIF1A dependent mechanism, regulated cell cycle exit and subsequent MALC expansion.

Gene expression changes and their functional consequences in quiescent cell subpopulation

Based on segregation between cycling and quiescent cells, we hypothesized that the latter displayed specific changes in gene expression profile, compared to the former, and that these changes might account for chemoresistance.

Thus, MALC were sorted by flow cytometry after double staining for pyronin Y/Hoechst 33342, yielding purified quiescent cells of pyronin Y^{dull}, Hoechst 33342^{diploid}, and Ki-67^{dull} phenotype as well as their cycling counterparts (Fig 5A). In “quiescent” cell fraction, more than 80% of cells were Ki67 negative. These cells recovered full proliferative potential after 3 days (Figure 5B). The transcriptomes of quiescent and cycling cells were then produced and analyzed by Affymetrix microarrays as above: 4,273 genes were differentially expressed by quiescent cells relative to the cycling ones. As illustrated in Table 1, the most significant changes involved negative regulation of proliferation, overexpression of drug transporters, tolerance to DNA damage, and inhibition of apoptosis. Moreover, the major doxorubicin target²⁸ topoisomerase II- α was strongly (10-fold reduction) down-regulated at both mRNA (Table 1) and protein levels (not shown). All these changes in quiescent MALC cells suggest a coordinated process converging towards protection and survival. To check whether actually, quiescent cells were more chemoresistant, we compared the sensitivity of these and cycling cells to the FL drugs doxorubicin, rituximab, bendamustin and rapamycin. The quiescent cells were more resistant to doxorubicin and bendamustin but not to rituximab or rapamycin (Fig 5C).

Sensitivity of MALC cells to NK cells

Finally, we asked whether 3D organization could modulate FL cell resistance to NK cells. Thus, we performed Cr⁵¹ release assay by co-culturing cells either dissociated from MALC aggregates, or in suspension with NK cells. A dramatic decrease in sensitivity of the former to NK cells at each E:T ratio was indeed observed (Fig 6A). However, by using anti-CD107A, we found no differences

between NK cells cultured with 3D cells and NK cells cultured with 2D cells, suggesting that NK degranulation was similar (Fig 6B). Moreover, we found no differences between 3D and 2D FL cells for the expression of Fas receptor as well as HLA class I molecules (HLA-A, B, C; E) (Fig 6C).

DISCUSSION

This study depicts for the first time a method for *in vitro* 3D culture of FL cells. This method sets appropriate conditions to produce stiff spheroid-like aggregates growing stably for over three weeks. The resulting MALC show interesting characteristics such as compatibility with immunohistochemistry and biphoton microscopy imaging, as well as capacity for drug testing. Our study shows indeed that MALC represents an unvaluable model for screening new genotoxic drugs and therapeutic monoclonal antibodies in lymphoma as spheroids have been used for preclinical studies of targeted therapy in solid tumors^{29,30}.

This study shows that the expansion of MALC comprised two-steps. During the first week, FL cells actively proliferated and thus MALC grew quickly while later, cell cycle exit of an increasing rate of MALC cells progressively stopped its growth, as reported for prostate carcinoma cell-derived spheroids³¹. Isolated Ki-67^{negative} cells did overexpress the *CDKN1A*^(p21), *CDKN1B*^(p27) and *MXI-1* genes which mediate quiescence in various cellular models³²⁻³⁴. In a deterministic interpretation, we view quiescence as an adaptive response to defective nutrient, oxygen and glucose supply, and the resulting acidosis. Moreover, both experimental studies and mathematical modelizations support the general concept of a metabolic deterioration gradient increasing in the spheroid^{35, 36}. Accordingly here, hypoxia was located in the core of MALC. The fact that hypoxia induced cell cycle exit in 2D cultures suggest its role of quiescence promoter in MALC. We showed that HIF1A mediates this effect, and that HIF1A possibly acts by transcriptionally reactivating genes causing quiescence. This is supported by the regulatory role of HIF1A over P27³⁷. The contribution of hypoxia to the G0 status

of MALC cells does not rule out however, those of additional stresses such as mechanical compression by high cell densities or stiffness due to extracellular matrix (data not shown).

At the protein level, our study reveals interesting similarities between MALC and FL clinical settings, including reduced Ki67 expression (REF classification OMS) and increased HIF1A expression in biopsies^{38, 39}, elevated VEGF-A concentration in serum⁴⁰. At the genomic level, we have found major differences in terms of gene expression between MALC and 2D cultures, both at the quantitative (more than 7000 genes) and qualitative (up to 10-fold variation). Among these modifications we have detected several set of genes involved in 'response to hypoxia', 'cell proliferation inhibition' and 'activation of NF- κ B pathway' by using the Autocompare software, a method which has been previously validated⁴¹. Bioinformatic meta-analysis of Compagno's transcriptome dataset¹⁵ pinpointed interesting similarities in gene expression profile between FL biopsies and MALC. Thus, it is possible that previous studies based on conventional (suspension) cultures have underestimated these pathways shown here as conditioned by aggregation. This is obviously the case for the NF κ B pathway, which has received very little attention in FL⁴² compared to DLBCL²⁰. We nevertheless propose here that HIF1A or NF κ B-targeting drugs might represent interesting candidates for FL therapy.

Our study showed that in MALC, the quiescent cells were chemoresistant not only to doxorubicin, an anthracycline used for years in the treatment of FL, but also to bendamustine, an alkylating agent with promising potential for therapeutic combinations in this disease. Interestingly with MALC, we did not find significant differences between cycling and quiescent cells in terms of sensitivity to Rituximab and mTOR inhibitor. The high degree of chemoresistance raises several hypotheses related to doxorubicin mechanism of action. Indeed, after trans-membrane penetration, this drug operates through radical oxygen species (ROS) production⁴³ as well as DNA double strand breaks due to topoisomerase II/DNA covalent interaction and subsequent apoptosis. Transcriptome analysis

suggested that quiescent cells exhibit defense mechanisms against each intoxication step. Among these, there is overexpression of detoxifying enzymes, together with anti-apoptotic signaling through enhanced NF- κ B, BCL2 and PKC pathways. Furthermore, the topoisomerase II alpha target of doxorubicin²⁸ was decreased. Reduction in DNA damage controllers such as *CHEK1* and *BRCA1* may also increase tolerance to DNA breaks induced by drugs, ionizing radiation or even endogenous ROS production, although it might also favor DNA instability.

Our study shows that MALC acquire resistance to NK cells. This mechanism may contribute to immune escape. However, the mechanism by which MALC become resistant to NK remains to be identified. We were unable to detect significant changes in the expression of molecules involved in the recognition of target by NK cells or in the intoxication process including Fas expression (see Fig 6A) or the expression of PI-9, a granzyme B inhibitor (data not shown). Another hypothesis could involve defect in the formation of the immunological synapse as it has been described for FL cells derived from patients co-incubated with autologous NK cells⁴⁴. In the same perspective, the sensitivity of MALC to other immune effectors, such as CTL should be also investigated.

To conclude, our study based on MALC, a new *in vitro* model, shows that aggregated growth of FL tumor cells profoundly affects their proliferation, signaling pathway, cellular defenses, and sensitivity to immune effectors. MALC model should provide new targets for increasing sensitivity to genotoxic drugs and immune intervention.

ACKNOWLEDGEMENTS:

Authors acknowledge access to CRCT vectorology platform, CPTP flow cytometry facility, ProfileXpert genomic and microgenomic facility (Univ Lyon), and Pathology service of Hospital Purpan (Toulouse).

The authors also thank Laura Pasqualucci's team for their transcriptomes data collection.

Author's contribution:

PG realized experiments, analyzed and interpreted data, made the figures and wrote the paper. CJ realized experiments, analyzed and interpreted data. JF performed data mining and statistical analysis. ED and AB performed experiments. CB provided IHC pictures. CL provided samples and interpreted IHC. JJF and GL interpreted data and wrote the paper.

REFERENCES:

- [1] Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V, Gascoyne RD, Chan WC, Braziel RM, Rimsza LM, Weisenburger DD, Delabie J, Jaffe ES, Lister A, Fitzgibbon J, Staudt LM, Hartmann EM, Mueller-Hermelink HK, Campo E, Ott G, Rosenwald A: Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood* 2009, 114:826-34.
- [2] Masir N, Campbell LJ, Goff LK, Jones M, Marafioti T, Cordell J, Clear AJ, Lister TA, Mason DY, Lee AM: BCL2 protein expression in follicular lymphomas with t(14;18) chromosomal translocations. *Br J Haematol* 2009, 144:716-25.
- [3] Mayer B, Klement G, Kaneko M, Man S, Jothy S, Rak J, Kerbel RS: Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology* 2001, 121:839-52.
- [4] Zietarska M, Maugard CM, Filali-Mouhim A, Alam-Fahmy M, Tonin PN, Provencher DM, Messon AM: Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Mol Carcinog* 2007, 46:872-85.
- [5] Wartenberg M, Frey C, Diedershagen H, Ritgen J, Hescheler J, Sauer H: Development of an intrinsic P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in quiescent cell layers of large, multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer* 1998, 75:855-63.
- [6] Overgaard J: Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol* 2007, 25:4066-74.
- [7] Dangles-Marie V, Richon S, El-Behi M, Echchakir H, Dorothée G, Thiery J, Validire P, Vergnon I, Menez J, Ladjimi M, Chouaib S, Bellet D, Mami-Chouaib F: A three-dimensional tumor cell defect in activating autologous CTLs is associated with inefficient antigen presentation correlated with heat shock protein-70 down-regulation. *Cancer Res* 2003, 63:3682-7.
- [8] Feder-Mengus C, Ghosh S, Weber WP, Wyler S, Zajac P, Terracciano L, Oertli D, Heberer M, Martin I, Spagnoli GC, Reschner A: Multiple mechanisms underlie defective recognition of melanoma cells

cultured in three-dimensional architectures by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Br J Cancer* 2007, 96:1072-82.

[9] Ghosh S, Rosenthal R, Zajac P, Weber WP, Oertli D, Heberer M, Martin I, Spagnoli GC, Reschner A: Culture of melanoma cells in 3-dimensional architectures results in impaired immunorecognition by cytotoxic T lymphocytes specific for Melan-A/MART-1 tumor-associated antigen. *Ann Surg* 2005, 242:851-7, discussion 8.

[10] Timmins NE, Nielsen LK: Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol Med* 2007, 140:141-51.

[11] Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, Haure MJ, Titeux M, Tonasso L, Quillet-Mary A, Baudouin C, Charveron M, Laurent G: Human keratinocytes acquire cellular cytotoxicity under UV-B irradiation. Implication of granzyme B and perforin. *J Biol Chem* 2006, 281:13525-32.

[12] Méndez J, Stillman B: Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* 2000, 20:8602-12.

[13] Jordan CT, Yamasaki G, Minamoto D: High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations. *Exp Hematol* 1996, 24:1347-55.

[14] Gothot A, Pyatt R, McMahel J, Rice S, Srour EF: Assessment of proliferative and colony-forming capacity after successive in vitro divisions of single human CD34+ cells initially isolated in G0. *Exp Hematol* 1998, 26:562-70.

[15] Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, Bertoni F, Ponzoni M, Scandurra M, Califano A, Bhagat G, Chadburn A, Dalla-Favera R, Pasqualucci L: Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009, 459:717-21.

[16] Pont F., Tosolini M., Ycart B., J.J. F: nwCompare and AutoCompare Softwares for Proteomics and Transcriptomics Data Mining – Application to the Exploration of Gene Expression Profiles of Aggressive Lymphomas *Integrative proteomics*, 2012.

- [17] Pont F, Fournié JJ: Sorting protein lists with nwCompare: a simple and fast algorithm for n-way comparison of proteomic data files. *Proteomics* 2010, 10:1091-4.
- [18] Bárdos JI, Ashcroft M: Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1755:107-20.
- [19] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996, 16:4604-13.
- [20] Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM: Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 2001, 194:1861-74.
- [21] Laherty CD, Hu HM, Opiari AW, Wang F, Dixit VM: The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 1992, 267:24157-60.
- [22] Guasparri I, Bubman D, Cesarman E: EBV LMP2A affects LMP1-mediated NF-kappaB signaling and survival of lymphoma cells by regulating TRAF2 expression. *Blood* 2008, 111:3813-20.
- [23] Roebuck KA, Finnegan A: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 1999, 66:876-88.
- [24] Rivard N, L'Allemain G, Bartek J, Pouyssegur J: Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem* 1996, 271:18337-41.
- [25] Perucca P, Cazzalini O, Madine M, Savio M, Laskey RA, Vannini V, Prosperi E, Stivala LA: Loss of p21 CDKN1A impairs entry to quiescence and activates a DNA damage response in normal fibroblasts induced to quiescence. *Cell Cycle* 2009, 8:105-14.
- [26] Guitart AV, Hammoud M, Dello Sbarba P, Ivanovic Z, Praloran V: Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp Hematol* 2010, 38:847-51.

- [27] Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS: Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003, 23:359-69.
- [28] Nelson EM, Tewey KM, Liu LF: Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, 81:1361-5.
- [29] Weigelt B, Lo AT, Park CC, Gray JW, Bissell MJ: HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat* 2010, 122:35-43.
- [30] Jeong EK, Lee SY, Jeon HM, Ju MK, Kim CH, Kang HS: Role of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 in multicellular resistance to docetaxel in MCF-7 cells. *Int J Oncol* 2010, 37:655-61.
- [31] Sauer H, Ritgen J, Hescheler J, Wartenberg M: Hypotonic Ca²⁺ signaling and volume regulation in proliferating and quiescent cells from multicellular spheroids. *J Cell Physiol* 1998, 175:129-40.
- [32] Liu H, Adler AS, Segal E, Chang HY: A transcriptional program mediating entry into cellular quiescence. *PLoS Genet* 2007, 3:e91.
- [33] Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB: Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* 2000, 183:18-27.
- [34] Ezoë S, Matsumura I, Satoh Y, Tanaka H, Kanakura Y: Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Cycle* 2004, 3:314-8.
- [35] Tindall MJ, Dyson L, Smallbone K, Maini PK: Modelling acidosis and the cell cycle in multicellular tumour spheroids. *J Theor Biol* 2012, 298:107-15.
- [36] Labarbera DV, Reid BG, Yoo BH: The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012, 7:819-30.
- [37] Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV: Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* 2001, 276:7919-26.

- [38] Evens AM, Schumacker PT, Helenowski IB, Singh AT, Dokic D, Keswani A, Kordeluk E, Raji A, Winter JN, Jovanovic BD, Holmgren A, Nelson BP, Gordon LI: Hypoxia inducible factor-alpha activation in lymphoma and relationship to the thioredoxin family. *Br J Haematol* 2008, 141:676-80.
- [39] Stewart M, Talks K, Leek R, Turley H, Pezzella F, Harris A, Gatter K: Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 2002, 40:253-60.
- [40] Fruchon S, Kheirallah S, Al Saati T, Ysebaert L, Laurent C, Leseux L, Fournié JJ, Laurent G, Bezombes C: Involvement of the Syk-mTOR pathway in follicular lymphoma cell invasion and angiogenesis. *Leukemia* 2012, 26:795-805.
- [41] Pont F, Familiades J, Déjean S, Fruchon S, Cendron D, Poupot M, Poupot R, L'faqih-Olive F, Prade N, Ycart B, Fournié JJ: The gene expression profile of phosphoantigen-specific human $\gamma\delta$ T lymphocytes is a blend of $\alpha\beta$ T-cell and NK-cell signatures. *Eur J Immunol* 2012, 42:228-40.
- [42] Leich E, Hartmann EM, Burek C, Ott G, Rosenwald A: Diagnostic and prognostic significance of gene expression profiling in lymphomas. *APMIS* 2007, 115:1135-46.
- [43] Kuznetsov AV, Margreiter R, Amberger A, Saks V, Grimm M: Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. *Biochim Biophys Acta* 2011, 1813:1144-52.
- [44] Ramsay AG, Clear AJ, Kelly G, Fatah R, Matthews J, Macdougall F, Lister TA, Lee AM, Calaminici M, Gribben JG: Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood* 2009, 114:4713-20.

TABLES

Family / Function	Genes symbols	Folds	p value (student t test)
Quiescence	CDKN1B	2,11	1,46E-03
	MXI 1	1,96	1,50E-05
	CDKN1A	1,32	4,96E-02
Detoxification	TXNDC13	1,87	2,47E-03
	GSTA1	1,65	6,13E-03
	GSTM4	1,62	6,71E-03
Survival	BCL2	2,11	1,98E-04
	RELA	1,68	2,98E-03
	REL	1,59	5,51E-03
	PKC eta	1,52	2,28E-02
	RELB	1,5	2,52E-02
	CASP3	0,73	4,83E-02
DNA damage tolerance	CHEK1	0,25	3,22E-05
	BRCA1	0,22	1,19E-04
Drug resistance	ABCA1	1,68	3,82E-02
	ABCA7	1,65	1,11E-02
	ABCD4	1,48	6,84E-03
Drug targets	TOP2A	0,11	3,04E-06

Table 1: Changes in selected genes occurring in quiescent cells sorted from MALC, relative to cycling cells.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: MALC imaging, modelization and gene expression. **A.** Fluorescence image of PKH67 MALC was captured by two-photon microscopy 2 days after transfer. **B.** Analysis and 3D-reconstitution were performed with Imaris 3.1 (3D-software). **C.** Heat map represents the clustering of genes deregulated in RL cells cultured in suspension (**2D**) or as aggregates (**MALC**).

Figure 2: Response to hypoxia. **A.** Venn diagram represents genes included in “Response to hypoxia” GO Biological process acquired by MALC, compared to 2D RL, and by FL nodules, compared to normal GC. **B.** Pimonidazole staining in RL cells grown in 2D normoxia, 2D hypoxia, or in MALC. Analysis was performed with flow cytometry. Additional pimonidazole staining was realized by IHC. **C.** Western blot analysis of HIF1A was performed with protein extracts from RL cells grown in 2D normoxia, 2D hypoxia, or in MALC. **D.** ELISA dosage of VEGF-A in 2D normoxia or in MALC.

Figure 3: NF- κ B pathway activation in MALC. **A.** Venn diagram represents genes included in “I κ B kinase-NF κ B cascade” GO Biological process, regulated in a similar manner in MALC (compared to RL grown in 2D), and in FL nodules (compared to normal GC). **B.** Functional interaction network part of NF- κ B pathway. **C.** Western blot analysis of total and phosphorylated (Ser536) forms of RELA-P65 in RL grown in suspension and in MALC (3 samples). **D.** Western blot analysis of RELA-P65 in nuclear extracts of RL grown in suspension or in MALC (2 samples). **E.** ICAM1 expression in MALC cells relative to 2D was analyzed by flow cytometry. Results are presented as mean fluorescence intensity (MFI) values.

Figure 4: Negative regulation of cell cycle. **A.** Venn diagram represented genes included in “regulation of cell cycle” GO Biological process, regulated in a similar manner in MALC (compared to RL grown in 2D), and in FL nodules (compared to normal GC). **B.** Number of cells *per* MALC was evaluated by Trypan Blue counting, and volume was calculated using the formula described in *Material and Methods*, at different culture time. **C.** Cell cycle regulation in 2D RL and MALC was studied by BrdU/PI co-staining. **D.** Quiescence entry of MALC cells was quantified by *high resolution cell cycle analysis*. Quiescence was also measured by IHC staining for Ki-67 at day 7 and day 21. **E.** Western blot analysis of P27 and P21 was performed with protein extracts from 2D RL in suspension and from MALC at day 7-14-21. **F.** Quantification of quiescence entry in RL cells grown in 2D normoxia and 2D hypoxia. **G.** Effects of CoCl₂ in 2D RL cells: wild type (ATCC), transduced with empty vector, and transduced with HIF1A shRNA (sh3810-1, 3810-2, 3810-3 and sh10819-2).

Figure 5: Entry to quiescence and chemoresistance in MALC. **A.** Sorting efficacy of HO/PY staining. **B.** Growth potential of quiescent cells. **C.** Differential sensitivity of quiescent and proliferating cells to drugs.

Figure 6: MALC display resistance to NK cell lysis independently of degranulation modification by effector or phenotypic modification onn target cells. **A.** ⁵¹Cr release assay. Results are presented as percentages of specific lysis obtained for the different effector / target ratios. **B.** Degranulation of NK cells cultured for 4h either with MALC cells or suspension cells, was measured by CD107A staining with PE-Cy5 antibody and detected by flow cytometry. **C.** HLA A, B, C and E and FAS expression in MALC cells relative to 2D, was analyzed by flow cytometry. Results are presented as mean fluorescence intensity (MFI) values.

Figure 1

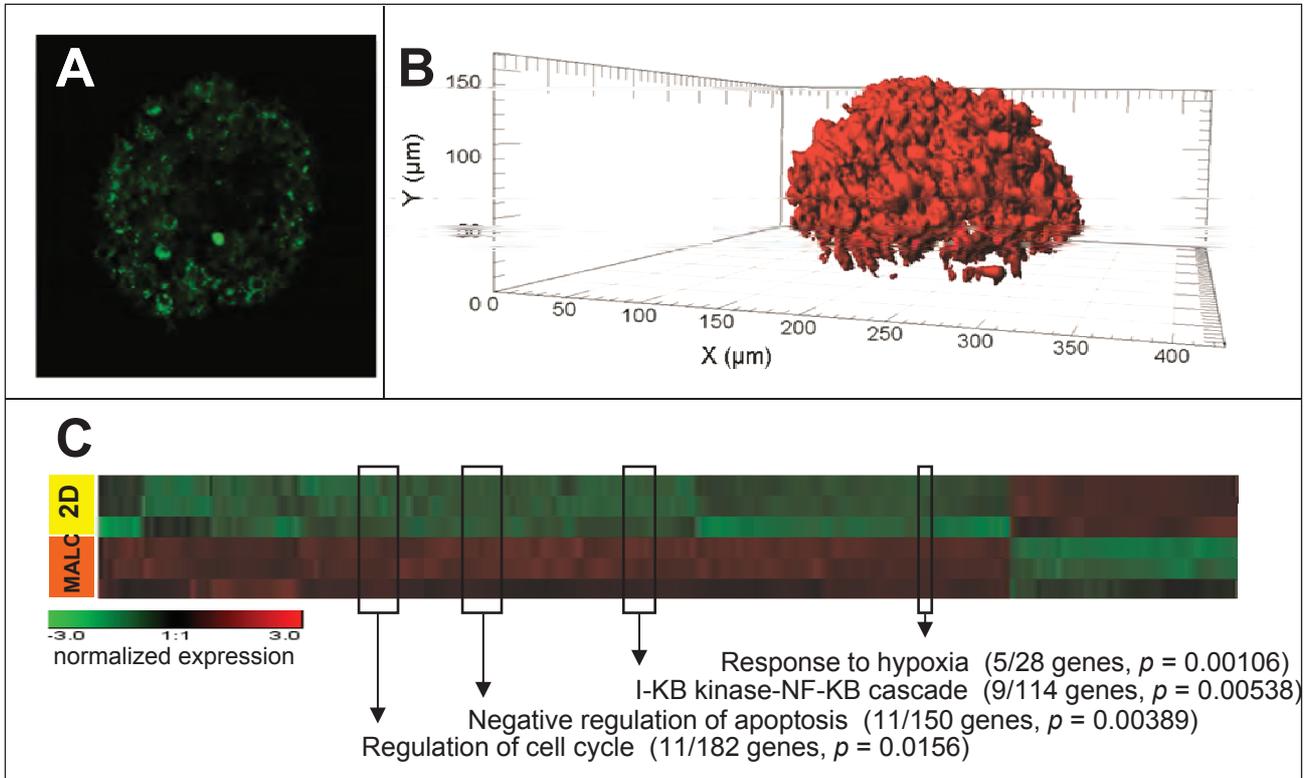


Figure 2

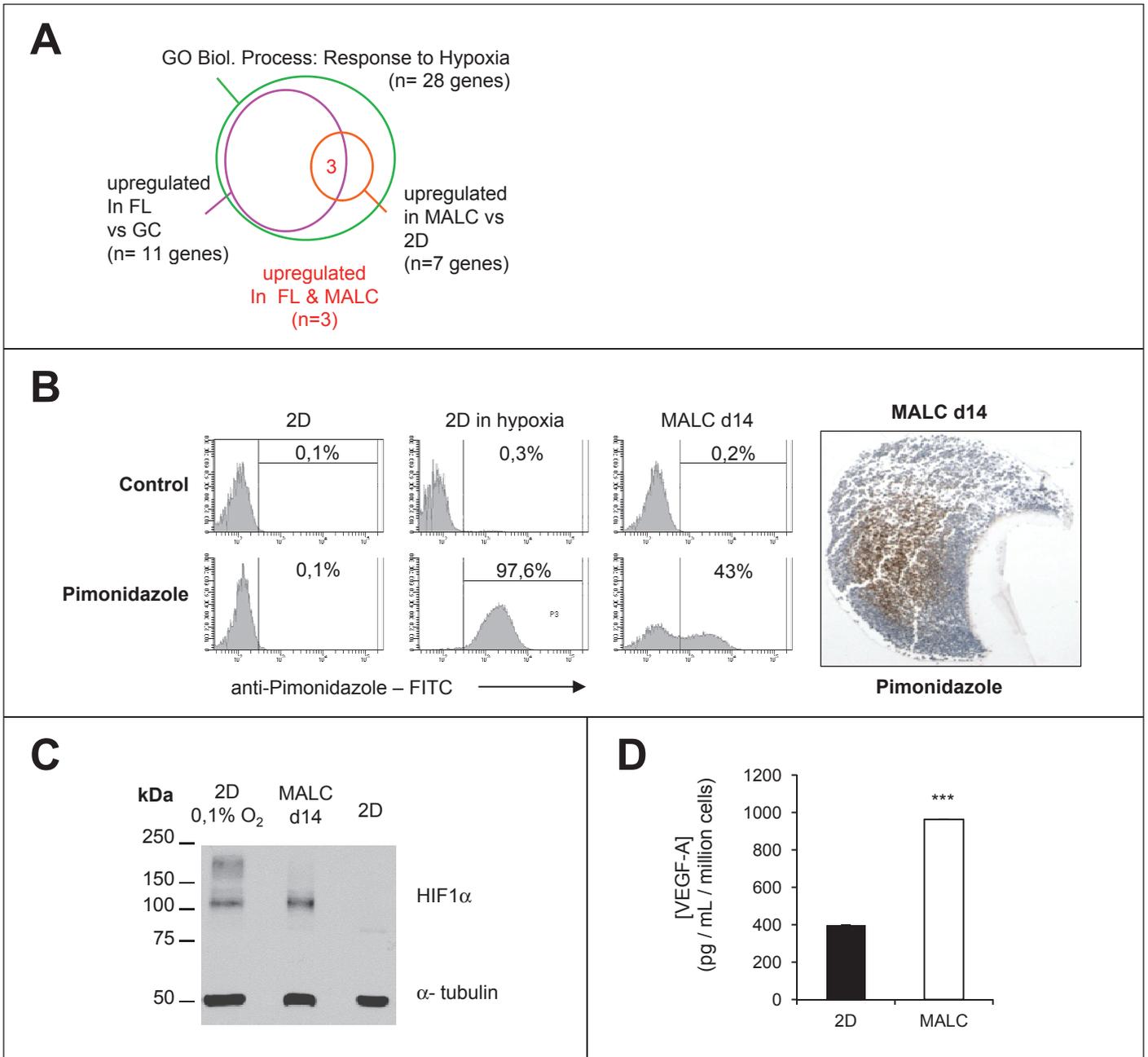


Figure 3

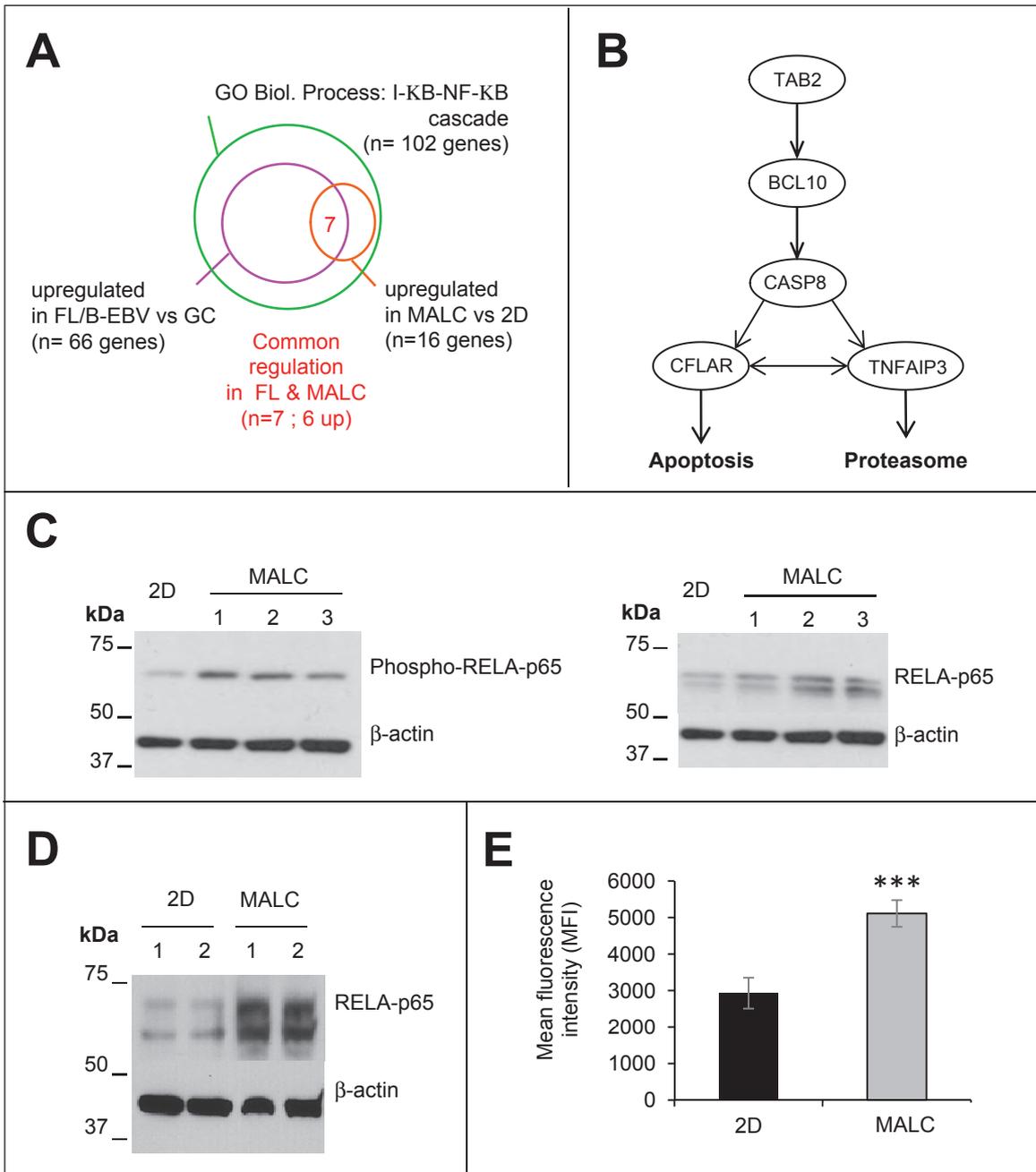


Figure 4:

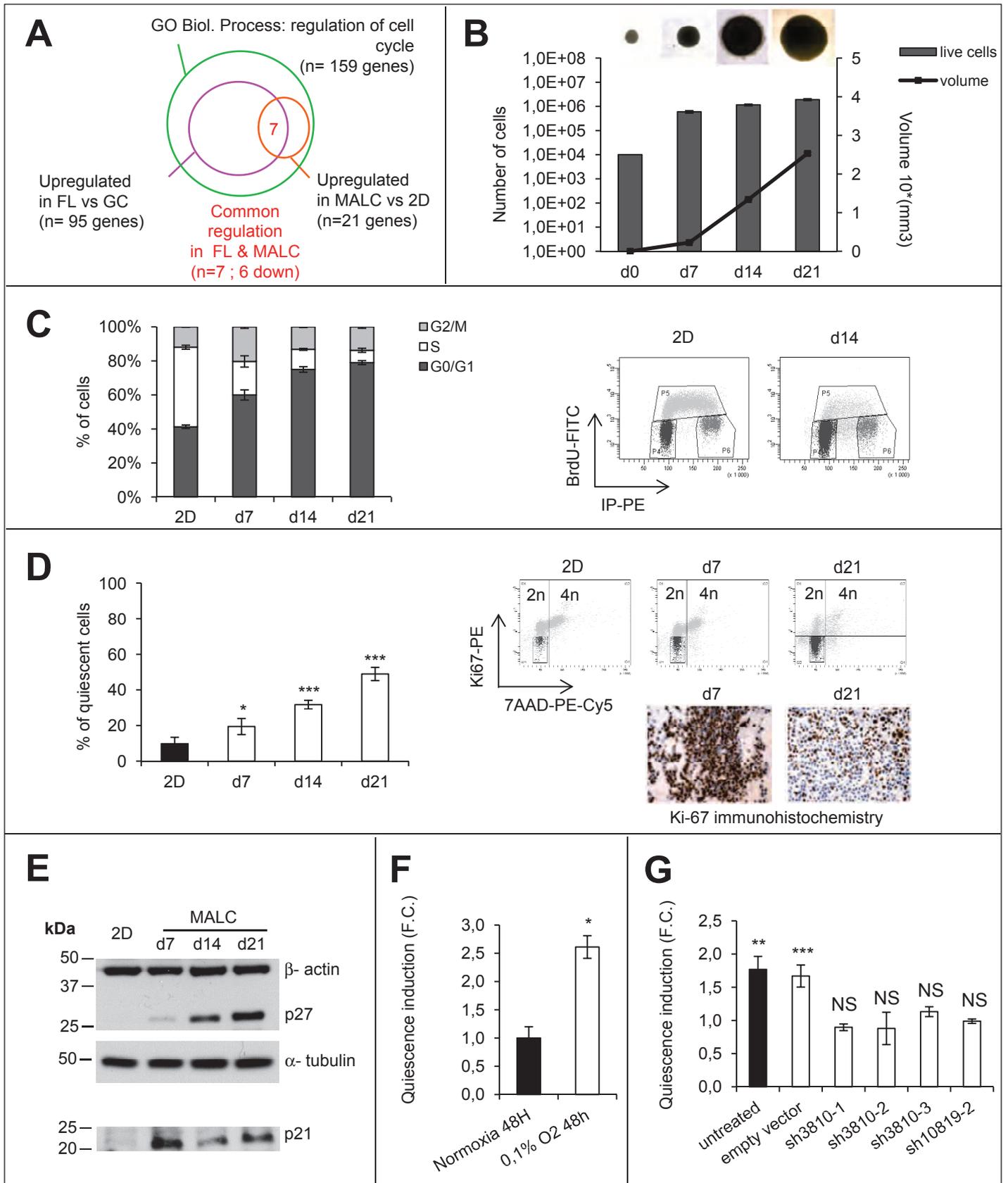


Figure 5

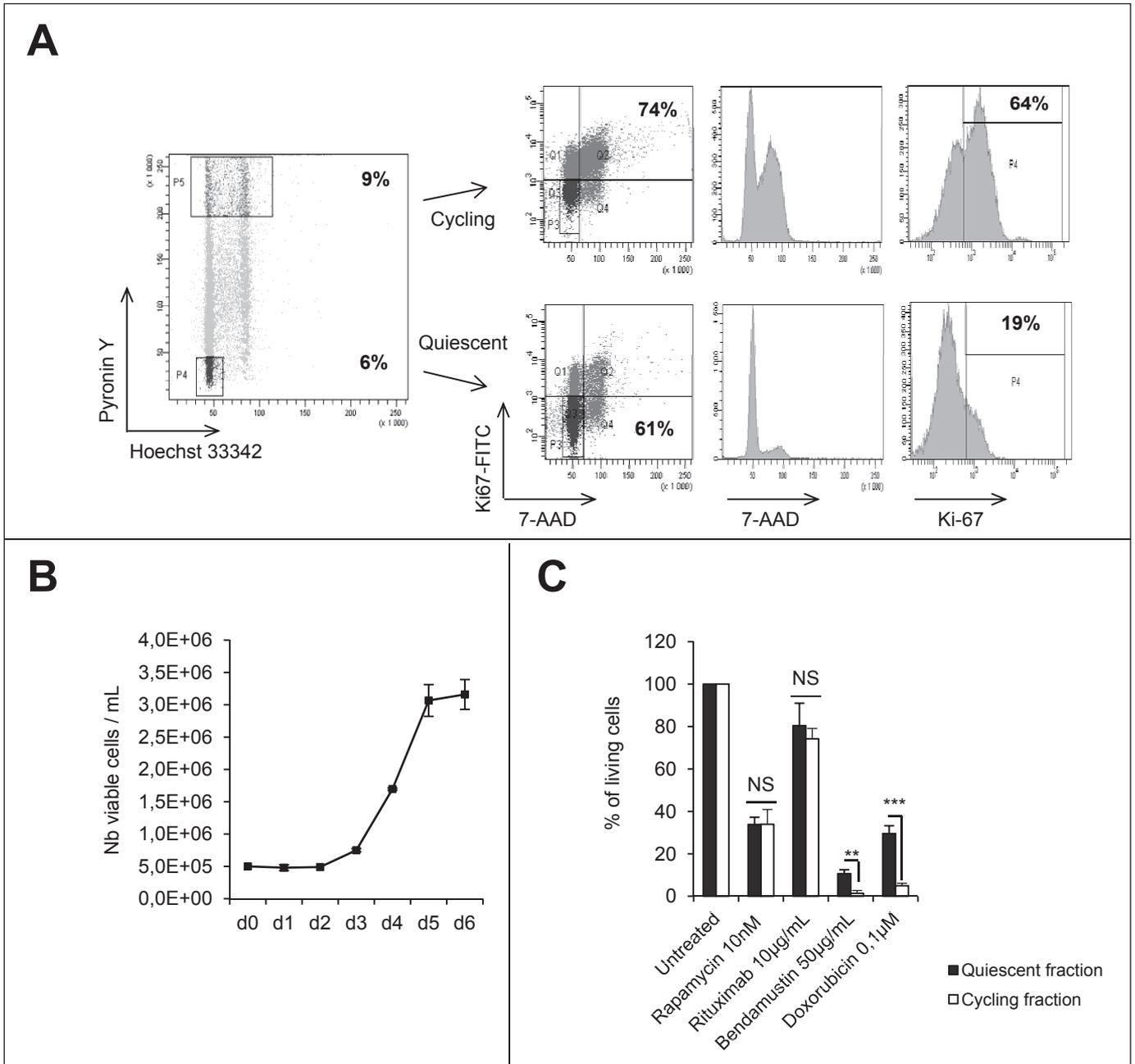
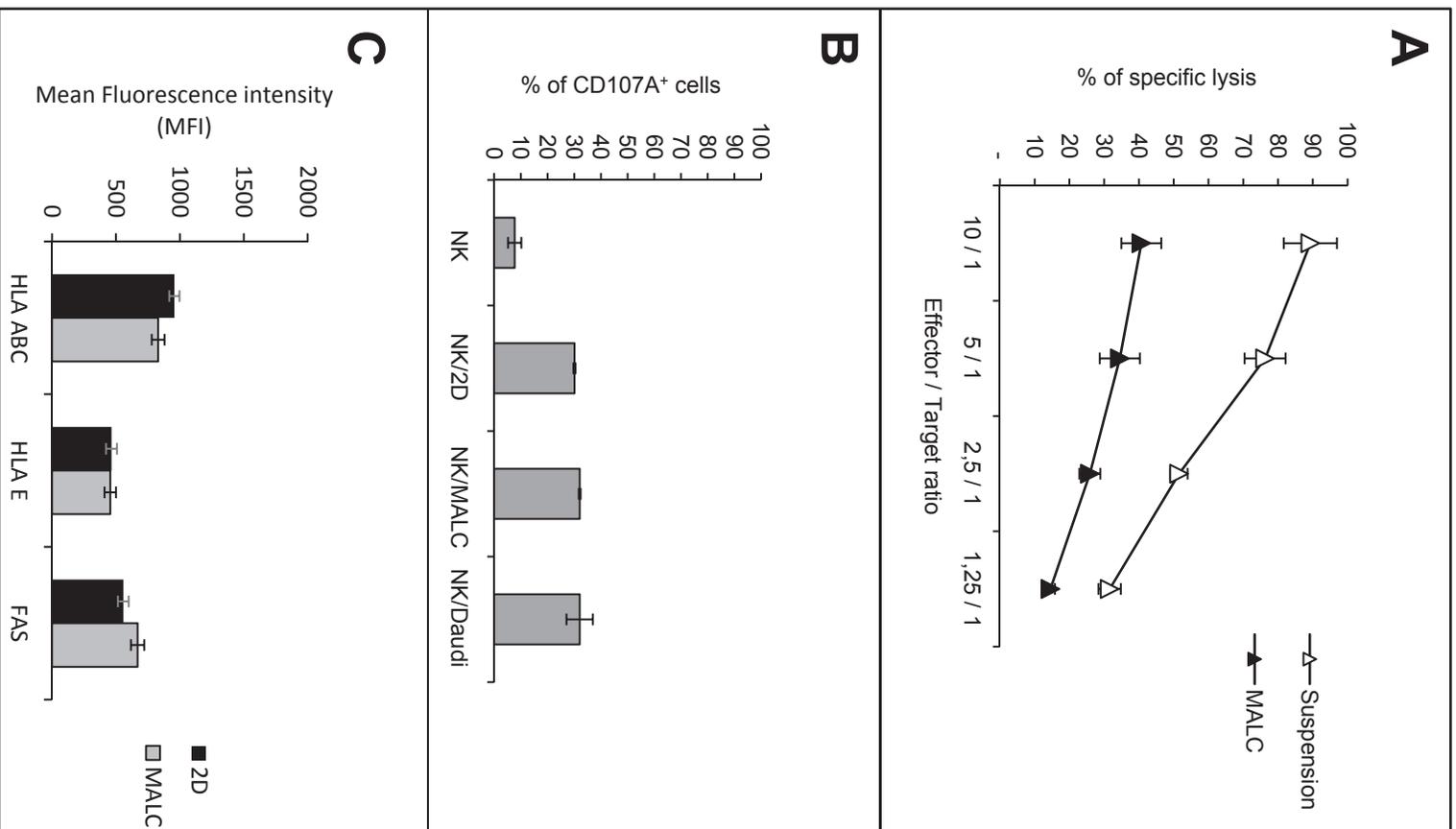


Figure 6



Supporting informations:

Supplemental table 1: Deregulated genes included in main pathways revealed by Autocompare.

Gene symbols are listed for each functional pathway considered. Fold change considered are > 2 (induction or repression).

Response to hypoxia	IkB kinase-NFkB cascade	Negative regulation of apoptosis	Regulation of cell cycle
CXCR4	MAP3K3	FAIM3	CDC6
VEGFA	TRAF5	NOTCH2	TIPIN
BNIP3	TNFAIP3	VEGFA	NOTCH2
EGLN1	IRAK2	BCL2A1	FOXN3
CD24	CFLAR	BNIP3L	GADD45A
	SQSTM1	CFLAR	SESN1
	LGALS1	HRK	CDC25A
	LITAF	NOL3	CDKN1B
	HTR2B	BNIP3	ATM
		TNFAIP8	CDC45L
		TNFRSF10D	HEXIM2

Supplemental table 2: GO biological process “Response to hypoxia”. Summary of the whole geneset of the pathway and of upregulated genes in different experimental and pre-published samples. Interaction summarizes genes upregulated in FL vs GC as in MALC vs 2D. Intersection recapitulates genes commonly upregulated between groups.

Response to hypoxia			
All	GC vs FL	MALC	Intersection
CHRNA7	NARFL	CXCR4	CD24
MT3	ARNT2	CD24	EGLN1
NARFL	HSP90B1	PLOD1	VEGF
ANG	EPAS1	SMAD3	
EGLN2	PLOD2	BNIP3	
ARNT2	HIF1A	EGLN1	
CLDN3	CD24	VEGF	
HSP90B1	SMAD4		
CHRNA7	BNIP3		
PDIA2	EGLN1		
EPAS1	VEGF		
PLOD2			
HIF1A			
TGFB2			
ALAS2			
PML			
EP300			
NF1			
CREBBP			
CXCR4			
CD24			
PLOD1			
SMAD3			
SMAD4			
BNIP3			
EGLN1			
VEGF			

Supplemental table 3: GO biological process “IκB-NFκB cascade”. Summary of the whole geneset of the pathway and of deregulated genes in different experimental and pre-published samples. Intersection recapitulates genes similarly up- or down-regulated in FL vs GC and in MALC vs 2D.

I-κB kinase NF-κB cascade				I-κB kinase NF-κB cascade (next)				I-κB kinase NF-κB cascade (next)			
All	GC vs B-EBV & FL	MALC	Intersection	All	GC vs B-EBV & FL	MALC	Intersection	All	GC vs B-EBV & FL	MALC	Intersection
GPR177	GPR177	PTPLAD1	PTPLAD1	STAT1	TNFAIP3			ZDHHC17			
EDARADD	F2R	SLC20A1	BCL10	TNFSF15	HTR2B			CASP1			
TRAF2	OTUD7B	UBE2N	TNFAIP3	BST2	LGALS1			LGALS9			
F2R	FKBP1A	IKBKG	CASP8	ECT2	TNFRSF10B			ERC1			
OTUD7B	TNFSF14	SLC35B2	CFLAR	GOLT1B	TRAF3IP2			NDFIP2			
FKBP1A	TSPAN6	BCL10	LITAF	TFG	SQSTM1			CARD8			
TNFSF14	FASLG	TNFAIP3	MAP3K7IP2	TRADD	CASP8			ECOP			
TMED4	MAP3K3	TMEM101		VAPA	CFLAR			CD40			
TSPAN6	TMEM9B	RIPK2		MALT1	RPL17			MAP3K7IP2			
FASLG	PLK2	BCL3		NDFIP1	LITAF			REL			
MAP3K3	GJA1	CASP8		NEK6	SLC44A2			TNFSF10			
NUP62	TLR6	IRAK2		CC2D1A	RELA			RHOH			
TMEM9B	FAF1	MIB2		LTBR	RHOC			TRIM38			
PLK2	TRIM13	CFLAR		IRAK1BP1	ZDHHC17			ZNF675			
GJA1	CARD10	LITAF		ZDHHC13	CASP1						
TLR6	RIPK1	MAP3K7IP2		ECM1	CD40						
FAF1	TIAF1			ATP2C1	MAP3K7IP2						
TRIM13	FLNA			MAP3K7	REL						
TRIP6	SECTM1			TICAM1	TNFSF10						
CARD10	PTPLAD1			CXXC5	RHOH						
RIPK1	SLC20A1			APOL3	TRIM38						
TRAF6	PRDX4			TNFRSF1A							
PLEKHG5	IRAK1			BCL10							
CANT1	HMOX1			TNFAIP3							
CARD9	MIER1			TMEM101							
TIAF1	PPM1A			HTR2B							
FLNA	RHOA			LGALS1							
SECTM1	STAT1			TNFRSF10B							
IKBKE	ECT2			TRAF3IP2							
PTPLAD1	GOLT1B			RIPK2							
SLC20A1	TFG			SQSTM1							
UBE2N	TRADD			BCL3							
IKBKG	VAPA			CASP8							
SLC35B2	MALT1			IRAK2							
PPP5C	NDFIP1			MIB2							
CHUK	LTBR			CFLAR							
PRDX4	IRAK1BP1			RPL17							
IRAK1	ZDHHC13			LITAF							
FADD	ATP2C1			SLC44A2							
VISA	MAP3K7			RELA							
HMOX1	CXXC5			RHOC							
MIER1	APOL3			TRAF5							
PPM1A	TNFRSF1A			BIRC2							
RHOA	BCL10			EEF1D							

Supplemental table 4: GO biological process “Regulation of cell cycle”. Summary of the whole geneset of the pathway and of deregulated genes in different experimental and pre-published samples. Intersection recapitulates genes similarly up- or down-regulated in FL vs GC and in MALC vs 2D.

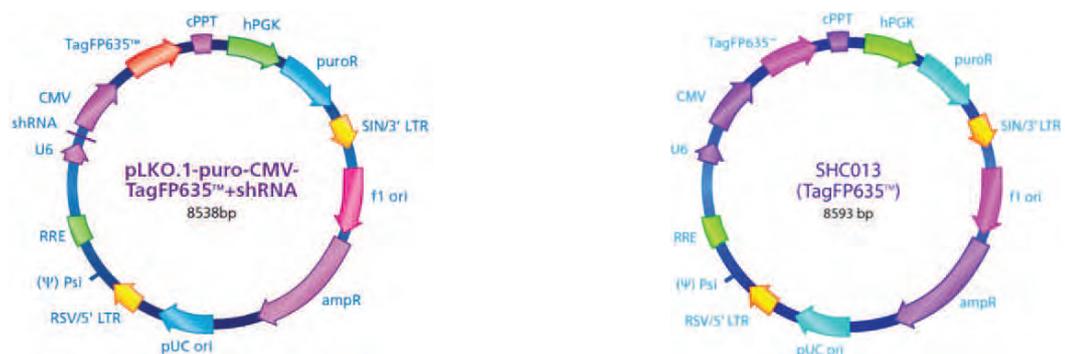
Regulation of cell cycle				Regulation of cell cycle (next)				Regulation of cell cycle (next)				Regulation of cell cycle (next)			
All	GC vs FL	MALC	Intersection	All	GC vs FL	MALC	Intersection	All	GC vs FL	MALC	Intersection	All	GC vs FL	MALC	Intersection
AIF1	AIF1	ATM	CDKN1B	CDK5R1	ERN1			GTPBP4	SPHK1			PPP1R15A			
ALOX15B	ANLN	BCCIP	CDT1	CDK5RAP1	FANCG			HCFC1	TBRG4			PPP1R9B			
ANAPC2	ATR	CCNG1	DDB1	CDK5RAP3	FBXO5			HERC5	TBX3			PRMT5			
ANLN	BIRC5	CD28	HCFC1	CDK7	FOXC1			HEXIM1	TGFA			PTEN			
APBB1	BMP2	CDK5RAP1	PKMYT1	CDKN1B	GAS1			HEXIM2	TIMELESS			PTPRC			
APBB2	BRSK1	CDKN1B	PPM1G	CDKN1C	GAS7			HPGD	TIPIN			RAD1			
APC	BTG3	CDT1	UBE2C	CDKN2A	GMNN			HUS1	TP53			RAD17			
ASNS	BUB1	CUL2		CDKN2B	GTF2H1			IL8	TP53BP2			RAD9A			
ATM	BUB1B	DDB1		CDKN2C	HCFC1			ING4	TRIAP1			RASSF1			
ATR	CCNA2	EIF4G2		CDKN2D	HEXIM1			INH4	TTK			RB1			
BCCIP	CCND1	ERCC2		CDKN3	HEXIM2			INHBA	UBE2C			RBBP8			
BIRC5	CCND2	HCFC1		CDT1	HPGD			JMY	UHMK1			RHOB			
BMP2	CCND3	ING4		CHEK1	HUS1			KHDRBS1	UHRF2			RINT1			
BMP7	CCNE2	MFN2		CHEK2	IL8			KNCT1	ZAK			RPRM			
BRSK1	CCNT1	PKMYT1		CHFR	JMY			LATS1	ZWINT			RUNX3			
BTG3	CD28	PPM1G		CITED2	KHDRBS1			LATS2				SERTAD1			
BUB1	CDC16	RAD9A		CKS1B	KNCT1			MAD2L1				SESN1			
BUB1B	CDC25A	SMAD3		CKS2	LATS2			MAD2L2				SMAD3			
C9ORF127	CDC25C	TBRG4		CUL1	MAD2L1			MADD				SMC1A			
CCNA2	CDC2L5	TRIAP1		CUL2	MAD2L2			MAP2K6				SPHK1			
CCND1	CDC45L	UBE2C		CUL3	MAP2K6			MAPK12				STK11			
CCND2	CDC6			CUL4A	MFN2			MFN2				TBRG1			
CCND3	CDC7			CUL5	MLF1			MLF1				TBRG4			
CCNE2	CDK5RAP3			DDB1	NEK2			MNAT1				TBX3			
CCNG1	CDKN1B			DHRS2	NOTCH2			MYC				TGFA			
CCNG2	CDKN1C			DIRAS3	NUSAP1			NBN				TGFB1			
CCNK	CDKN2B			DLG1	PCBP4			NEK11				TGFB2			
CCNT1	CDKN2C			EIF4G2	PKMYT1			NEK2				TIMELESS			
CD28	CDKN2D			ERCC2	PPM1G			NEK6				TIPIN			
CDC16	CDKN3			EREG	PPP1R13B			NOTCH2				TP53			
CDC23	CDT1			ERN1	PPP1R15A			NPM2				TP53BP2			
CDC25A	CHEK1			FANCG	PTEN			NUSAP1				TRIAP1			
CDC25C	CHEK2			FBXO5	RAD1			PA2G4				TTK			
CDC2L5	CKS1B			FOXC1	RAD17			PCBP4				UBE2C			
CDC37	CKS2			GADD45A	RASSF1			PIN1				UHMK1			
CDC45L	CUL3			GAS1	RBBP8			PKMYT1				UHRF2			
CDC6	CUL4A			GAS7	RHOB			PLAGL1				ZAK			
CDC7	CUL5			GML	RINT1			PML				ZBTB17			
CDK10	DDB1			GMNN	RUNX3			PPM1G				ZWINT			
CDK2	EIF4G2			GTF2H1	SESN1			PPP1R13B							

Supplemental figure 1: shRNA used for HIF1A gene inhibition. A. Sequences specific for each selected clone. **B.** Plasmids maps.

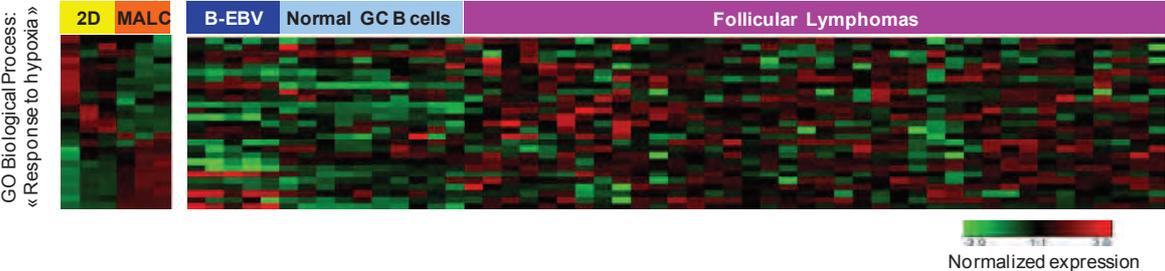
A

sh3810: CCGGGTGATGAAAGAATTACCGAATCTCGAGATTCGGTAATTCTTTCATCACTTTTT
sh10819: CCGGTGCTCTTTGTGGTTGGATCTACTCGAGTAGATCCAACCACAAAGAGCATTTTTT
shc013: empty vector

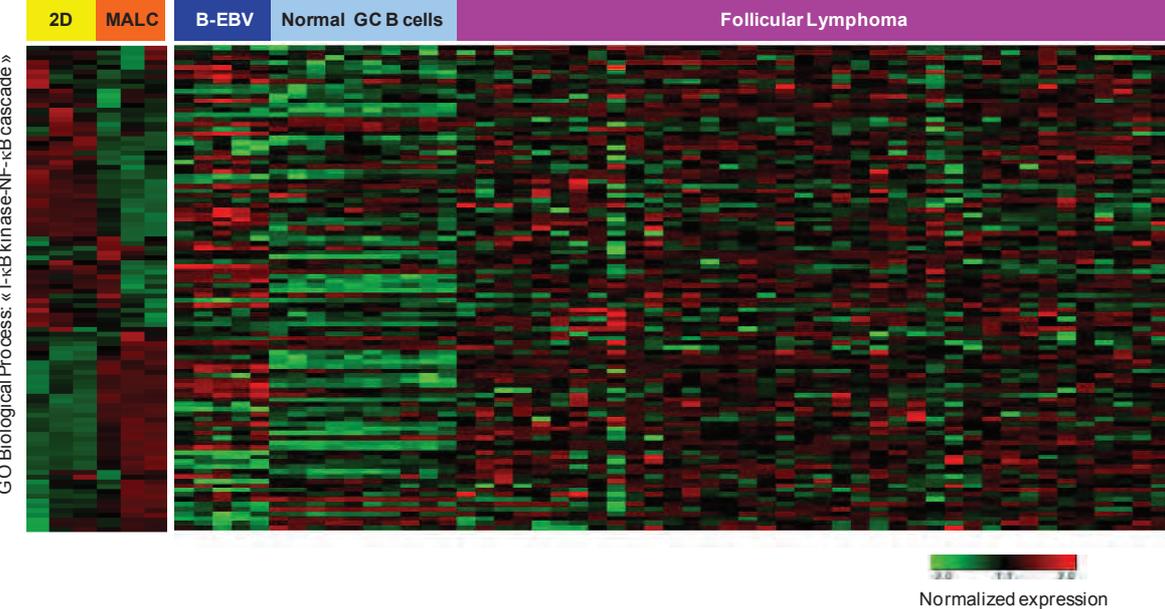
B



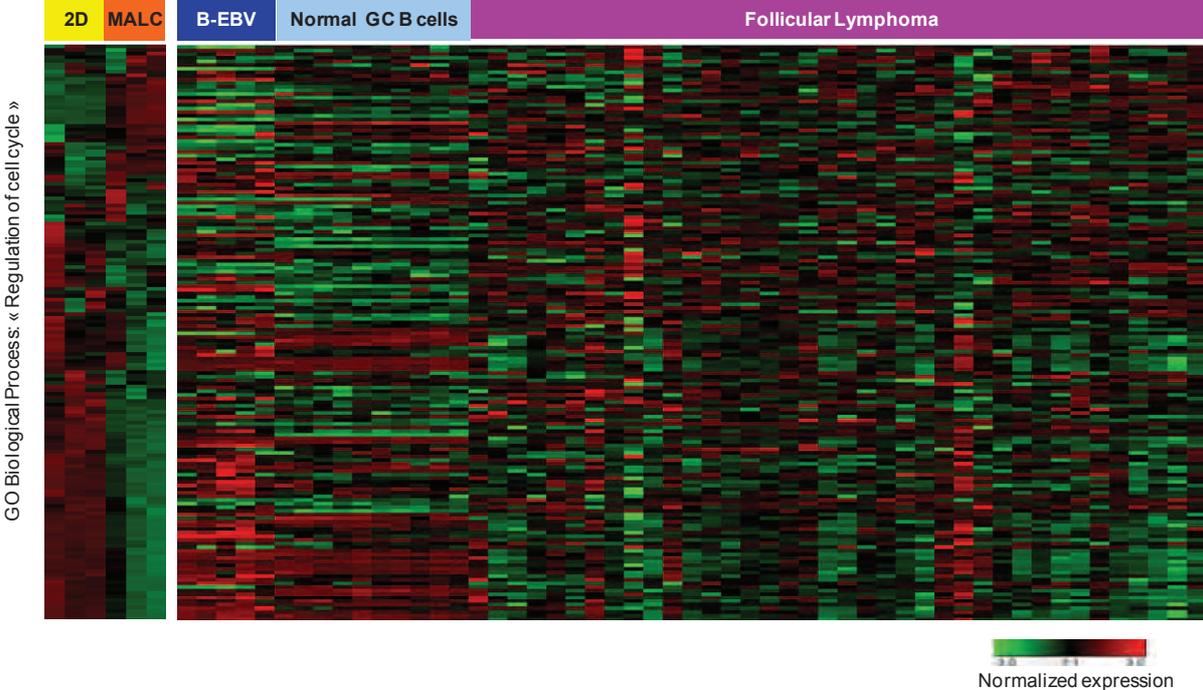
Supplemental Figure 2: GO biological process “Response to hypoxia”. Heat map represents the clustering of genes deregulated in MALC (MALC) relative to 2D - RL cells (2D) or in Follicular nodules relative to normal GC.



Supplemental Figure 3: GO biological process “IκB kinase-NFκB cascade”. Heat map represents the clustering of genes deregulated in MALC (MALC) relative to 2D - RL cells (2D) or in Follicular nodules and B-EBV cell lines relative to normal GC.



Supplemental Figure 4: GO biological process “Regulation of cell cycle”. Heat map represents the clustering of genes deregulated in MALC (MALC) relative to 2D - RL cells (2D) or in normal GC relative to Follicular nodules.



3. Conclusion, résultats complémentaires et perspectives de l'étude

- Dans ce premier article, nous montrons, pour la première fois, qu'il est possible de cultiver des cellules de LF en 3D. La méthode développée permet de produire des agrégats qui présentent une rigidité comparable à celle des sphéroïdes, et qui peuvent être suivis sur le long terme.

La première conséquence que nous observons est la dérégulation du transcriptome quand les cellules de LF sont cultivées en 3D, caractéristiques déjà évoquées dans les modèles *in vivo* (xénogreffes) et *in vitro* (sphéroïdes) de cancers solides (§III-C-2). De manière surprenante, presque 1/3 des gènes sont régulés de manière différentielle quand les cellules de LF sont en 3D. Parmi ces 7000 gènes dérégulés, 612 le sont d'un facteur supérieur ou égal à x2 ou /2. L'utilisation du logiciel *Autocompare* nous a permis de mettre en évidence que 4 familles de fonctions étaient significativement enrichies dans les échantillons de MALC:

- la réponse à l'hypoxie
- la cascade de signalisation I kappa B - NF kappa B
- la régulation du cycle cellulaire
- la régulation négative de l'apoptose

Le fil conducteur de ce travail est un recoupement entre les gènes qui sont enrichis dans les MALC, et ceux qui sont enrichis dans les échantillons de FL: pour les familles fonctionnelles auxquelles nous nous sommes intéressé, il est très intéressant de voir que la signature moléculaire caractéristique des MALC est toujours plus proche de celle des LF que celle des cellules cultivées en suspension. L'identification de ces familles et cette homologie vis-à-vis des échantillons de patients nous a poussé à mesurer les conséquences fonctionnelles des dérégulations de transcriptome dans les cellules de MALC.

Nous mettons en évidence que la culture 3D induit des phénomènes d'hypoxie, démontrés par l'incorporation d'une sonde, le pimonidazole, qui forme des adduits avec les protéines intracellulaires uniquement quand les cellules sont en manque d'oxygène (264). Au niveau moléculaire, cette hypoxie se traduit par une augmentation de l'expression de la protéine

HIF1 α , ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de VEGF par les cellules. De manière intéressante, l'expression de cette protéine est aussi détectée dans les coupes de ganglions lymphomateux, à des niveaux d'expression variables, dans 60% des cas. De plus, l'augmentation de la concentration de VEGF est aussi observée dans le sérum des patients atteints de LF, comparativement aux donneurs sains (80). Néanmoins, le parallèle avec la clinique ne peut être établi pour ce qui est du statut hypoxique des tissus lymphoïdes malins. En effet, même si plusieurs traceurs, couplés à des molécules radiomarquées, sont disponibles pour détecter l'hypoxie par des techniques d'imagerie de tomographie par émission de positons (TEP, ou PET-scan), aucune de ces molécules n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché en France à ce jour.

Nous prouvons que la voie pro-survie NF-KB est activée dans les MALC comparativement aux cellules en suspension, *via* l'augmentation de la phosphorylation de p65 (Ser536), la translocation nucléaire accrue de p65, et la surexpression de la molécule ICAM-1. Bien que cette voie soit généralement considéré comme déterminante dans le LBDGC, aucune étude à ce jour n'a montré son implication dans le LF. Des investigations plus poussées mériteraient d'être menées dans ce domaine, toujours afin d'en améliorer la thérapeutique.

Enfin, nous démontrons que la prolifération est fortement impactée par ce mode de culture. Un ralentissement dans la progression dans le cycle cellulaire a été démontré par des analyses d'incorporation de BrdU - Iodure de propidium. Les données obtenues dans ces analyses nous ont fait penser que ce ralentissement de la prolifération était dû à un blocage à la transition G1-S dans le cycle cellulaire. Nous nous sommes alors intéressé au statut de CDC25A, phosphatase impliqué dans la progression dans le cycle. Des expériences de Western Blot et de RT-qPCR nous ont permis de montrer que CDC25A est régulé négativement dans les MALC, aussi bien au niveau transcriptionnel que protéique (figure 25). Nous avons donc pensé que c'était cette protéine qui était responsable du blocage dans le cycle. Mais des expériences supplémentaires ont privilégié une autre hypothèse. En effet, en utilisant des techniques d'analyse du cycle cellulaire "à haute résolution", décrites dans les années 90 (265) nous avons montré que les cellules de MALC entrent progressivement en quiescence. En effet, elles perdent l'expression du marqueur Ki-67, sans qu'il y ait d'augmentation du score nécrotique (figure 4 de l'article). Cette observation est intéressante, dans le sens où ce phénotype est très semblable à celui observé dans les échantillons de patients. Cette sortie de cycle corrèle à une augmentation de l'expression de 2 protéines connues pour stopper la

progression dans le cycle cellulaire et favoriser l'entrée en quiescence : p27-Kip1 et p21-Cip1 (figure 4 de l'article).

La dernière étape de ce travail a été de caractériser la fraction quiescente, viable, isolée à partir des MALC. Ceci s'est avéré être plus compliqué qu'attendu, et de nombreuses mises au point ont été nécessaires pour y parvenir. Toutefois, nous avons pu montrer que les cellules quiescentes isolées à partir des MALC sont plus résistantes aux anthracyclines et aux agents alkylants que les cellules cyclantes. A première vue, cette caractéristique de cellules quiescentes est plutôt attendue. Toutefois, les résultats présentés dans l'article sont obtenus 4 jours après le traitement (soit 4 jours après le tri), et, sur le même panel, nous montrons que les cellules quiescentes non traitées, 4 jours après la remise en culture, ont retrouvé des capacités de prolifération identiques à des cellules normales, puisqu'elles atteignent la densité de 2 millions par millilitre. Cette observation laisse penser que ces cellules perdent leur caractère quiescent, mais conservent une capacité de résistance aux médicaments anti-cancéreux résiduelle vis-à-vis des agents ciblant les cellules en prolifération, et ce de manière durable dans le temps. On pourrait, en extrapolant toutefois, penser que ce type de phénomène est responsable de la persistance de la maladie.

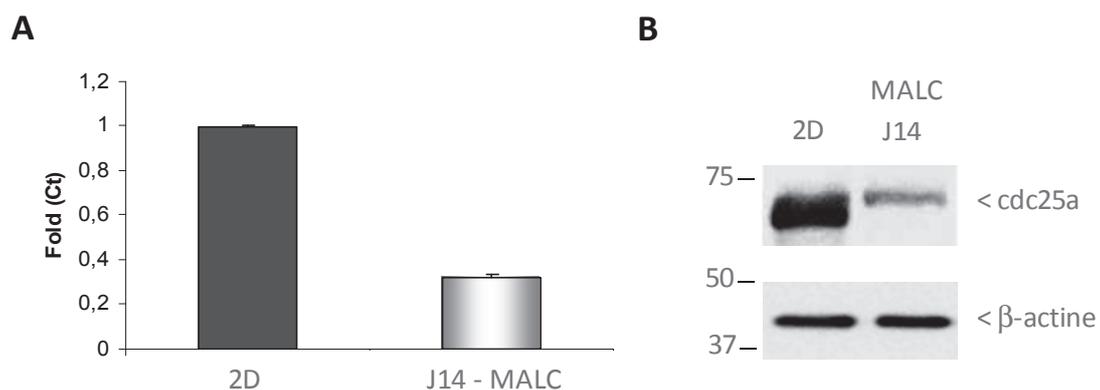


Figure 25: Régulation négative de *cdc25a* dans les MALC. La phosphatase CDC25A est sous-exprimée dans les MALC comparativement aux cellules en suspension, aux niveaux transcriptionnel et protéique. **A.** Niveau d'expression du transcrit codant pour CDC25A, dans les cellules en suspension et dans les MALC, révélé par RT-qPCR. **B.** Expression protéique de *cdc25a* en 2D et dans les MALC, analysée par WB.

Nous avons également caractérisé le transcriptome de ces cellules quiescentes, comparativement à leurs analogues "cyclantes". Dans l'article, nous avons présenté certains gènes cibles qui étaient dérégulés, et que nous avons sélectionnés en fonction des thématiques développées précédemment. Toutefois, il est intéressant de noter que plusieurs gènes de la famille "réponse à l'hypoxie" sont sur-régulés dans les échantillons quiescents (VEGF, HIG2,...), ce qui nous conforte dans l'hypothèse que l'hypoxie contribue au caractère quiescent des cellules de LF. Il pourrait être intéressant d'approfondir l'étude de la signature spécifique de cette sous-population quiescente, voire même de la comparer aux échantillons issus de biopsies de LF, pour voir si elle s'en rapproche plus encore que le profil de la population cellulaire entière de MALC.

Pour conclure, ce travail démontre que l'organisation 3D est un paramètre déterminant pour la biologie des cellules de LF. Le caractère quiescent, très spécifique du LF, et pourtant inexistant dans les lignées cellulaires en suspension, est reproduit dans ce contexte. De plus, un rapprochement du profil moléculaire est observé entre les cellules de MALC et les échantillons de LF, ce qui témoigne de la relevance de ce modèle pour l'étude de la pathologie lymphomateuse. Ces modifications phénotypiques induites par la culture à haute densité se produisent *via* l'adaptation des cellules à des conditions de stress très importantes. L'homologie de ces caractéristiques avec la "vraie vie" suggère que le paramètre structural ne doit surtout pas être négligé dans les études menées sur le LF.

4. Etude complémentaire : Accumulation & Régulation de la matrice extracellulaire cellulaire dans les lymphomes folliculaires, application au modèle MALC

En parallèle de cette étude soumise à "The American Journal of Pathology", nous nous sommes intéressé aux composants matriciels dans le système de culture MALC. Afin de ne pas négliger ces données, que j'ai obtenues pendant ma première année de thèse, et qui ont fait l'objet d'investigations poussées bien que non abouties, je vais maintenant les présenter en tant que résultats complémentaires au travail que je viens d'aborder.

Au départ, une des hypothèses fondatrices du projet de recherche était que les cellules de lymphome cultivées en 3 dimensions sont capables de synthétiser des protéines de la matrice extracellulaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons voulu caractériser différents composants protéiques de la MEC, dans différents types de supports développés pour cette étude, comme des MCS de cellules de LF, et des MALC. La présence de protéines matricielles a ainsi été évaluée dans plusieurs des modèles cellulaires préparés dans le cadre du projet. Dans un premier temps, des échantillons de MCS (obtenus à partir de la lignée DOHH2), cultivés en milieu semi-liquide (agarose), ont été observés au microscope biphotonique, pour évaluer l'émission du signal de seconde harmonique (SGH – excitation à 810nm), spécifique des fibres du collagène de type I. Comme montré sur la figure 26, la culture des DOHH2 sous la forme d'agrégats est favorable à la synthèse de ces fibres collagéniques.

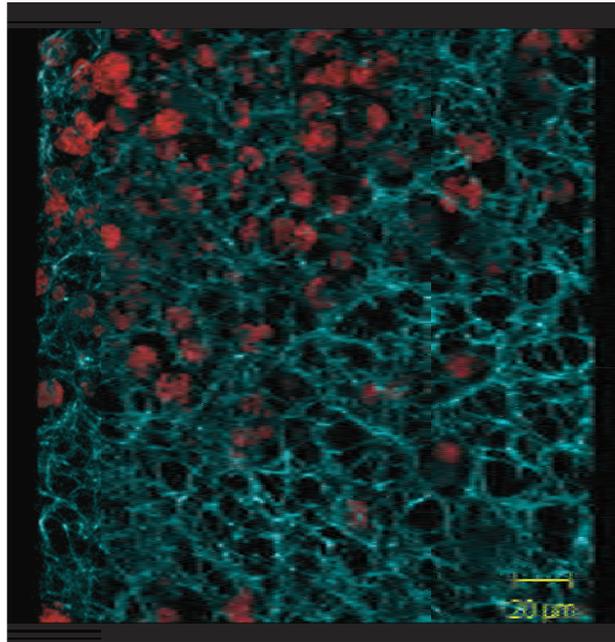


Figure 26: *La culture en 3 dimensions des cellules de LF est propice à la synthèse de fibres de collagène.* Un signal de seconde harmonique est généré quand les cellules sont cultivées en 3D, comme ici dans des MCS de lignée de lymphome DOHH2.

En parallèle, la présence de protéines matricielles non fibrillaires, telles que la fibronectine et la laminine, a été évaluée dans les MALC, ainsi que dans les xéno greffes murines, par des marquages immuno-histochimiques. Les acquisitions mettent en évidence la présence de fibronectine et de laminine dans les xéno greffes (figure 27-B & D); les marquages réalisés sur les échantillons de MALC sont moins intenses mais laissent penser que, de manière similaire à ce qu'il se passe *in vivo*, des protéines de la MEC sont accumulées dans les cellules de lymphome cultivées en 3D, *in vitro* (figure 27-A & C). D'autres colorations immuno-histochimiques telles que le Masson-Trichrome ou encore l'Acide Périodique de Schiff (P.A.S.), qui permettent la détection des fibres de collagène, ont été réalisées sur des MALC de 10 jours. Ces marquages se sont révélés négatifs (résultats non montrés).

L'étude n'a pas été étendue aux biopsies de tumeurs humaines, mais ce point devrait être abordé dans la continuité du projet.

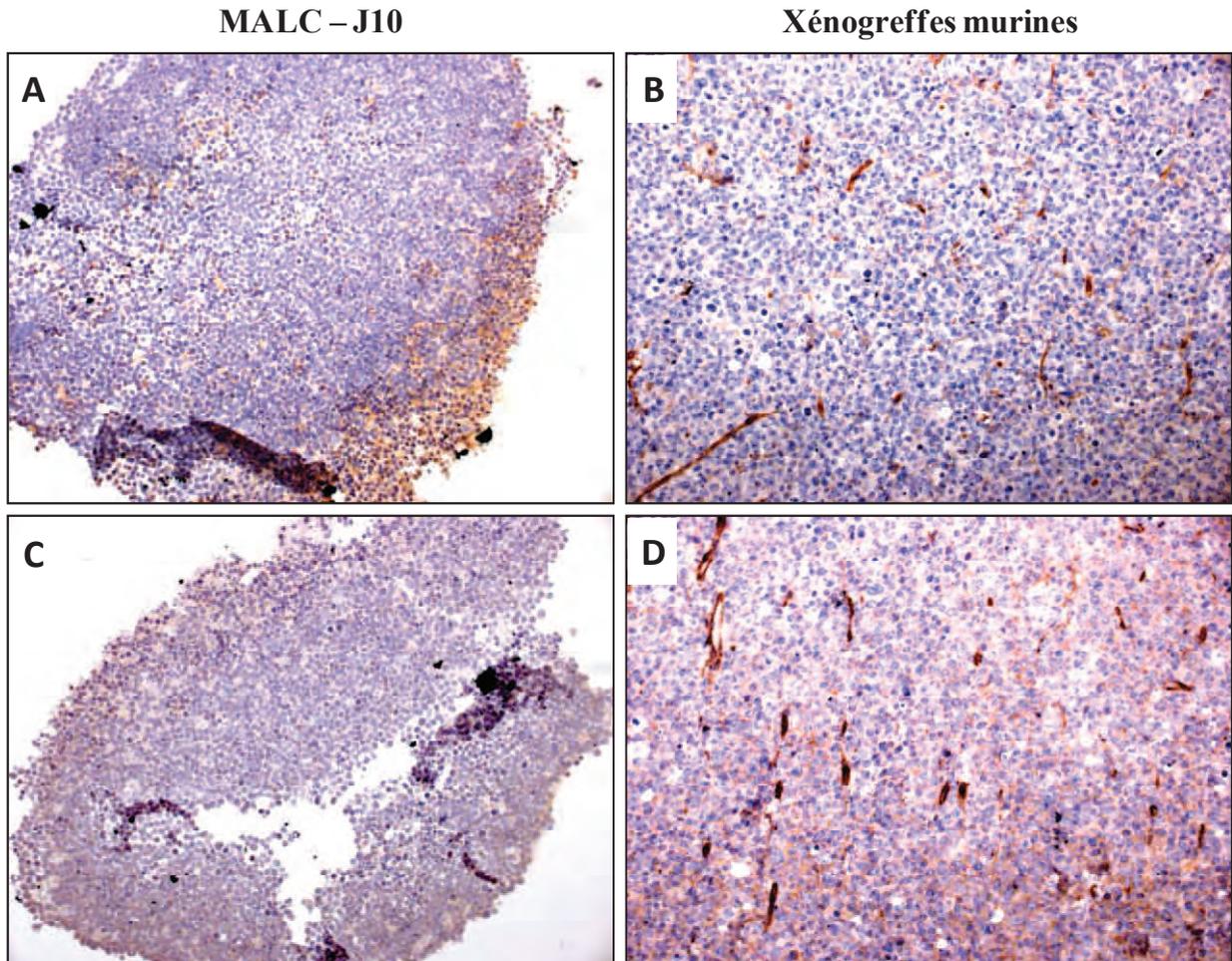


Figure 27: *La culture en 3 dimensions des cellules de LF favorise la production de protéines matricielles d'adhérence.* Des marquages immunohistochimiques pour la fibronectine [A,B] et pour la laminine [C,D] ont été réalisés sur différents modèles utilisés pour l'étude du LF : MALC de 10 jours [A,C] et xéno greffes murines (injection sous cutanée de cellules RL) [B,D]. Grossissement : x20.

Par la suite, nous avons cherché à caractériser les mécanismes de synthèse de ces composants protéiques matriciels, dans les MALC.

L'étude des mécanismes de régulation de la synthèse de matrice extracellulaire a été initiée par une approche de Western Blot. Des échantillons issus de cultures traditionnelles (2D) et de MALC ont été comparés en terme d'expression de plusieurs protéines matricielles. Il ressort de cette analyse comparative que les cellules cultivées à haute densité sont capables de produire de la matrice extracellulaire (figure 28). Selon les protéines considérées, plusieurs

cinétiques de régulation peuvent être mises en évidence. Notamment, la fibuline V, le collagène IV, et la laminine sont plus exprimées dans les MALC que dans les cellules en suspension, avec un maximum à 10 jours de culture. La fibronectine, quant à elle, est accumulée de façon temps dépendante dans les MALC. Enfin, la vitronectine est plus exprimée en 3D que dans les cellules en suspension, à tous les temps de culture choisis (figure 24).

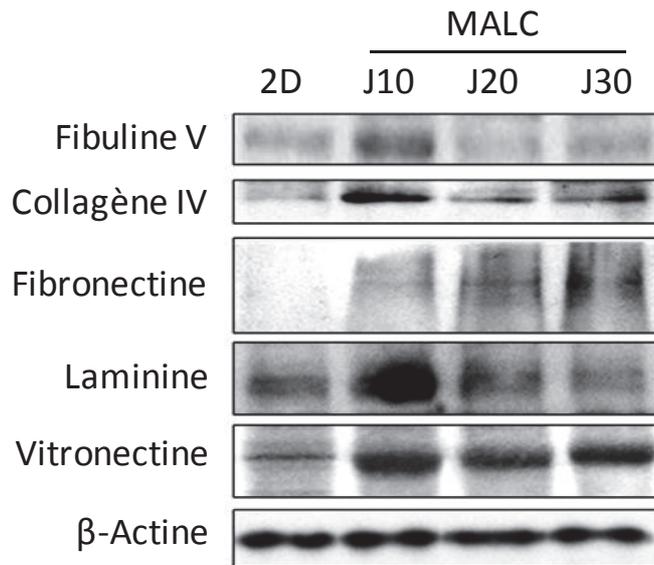


Figure 28: *Accumulation de protéines matricielles dans le modèle MALC.* L'expression des protéines de la MEC en fonction du temps de culture a été analysée par *Western Blot*.

La régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes codant pour certaines des protéines matricielles détectées en Western Blot a été ensuite analysée par des approches de RT-qPCR, en système *Sybr-Green*[®]. Notamment, l'expression des transcrits codant pour la laminine (chaîne γ 1, *transcrit LAMC1*), le collagène (chaîne α 1, *transcrit COL1A1*) et la vitronectine (*transcrit VTN*) a été comparée dans des échantillons obtenus à partir de cellules cultivées en 2D ou sous la forme de MALC. Il ressort de ces analyses que les transcrits *LAMC1* et *COL1A1* sont fortement surexprimés dans les MALC de 10 jours par rapport aux cellules en 2D (figure 29-A & B). Ces mêmes transcrits diminuent mais restent surexprimés dans les MALC de 20 jours, et enfin sont significativement sous-exprimés à 30 jours de culture. Le

transcrit codant pour la vitronectine n'est quant à lui pas modifié à 10 jours de culture, puis sous-exprimé dans les MALC jusqu'à la fin de la culture (figure 29-C).

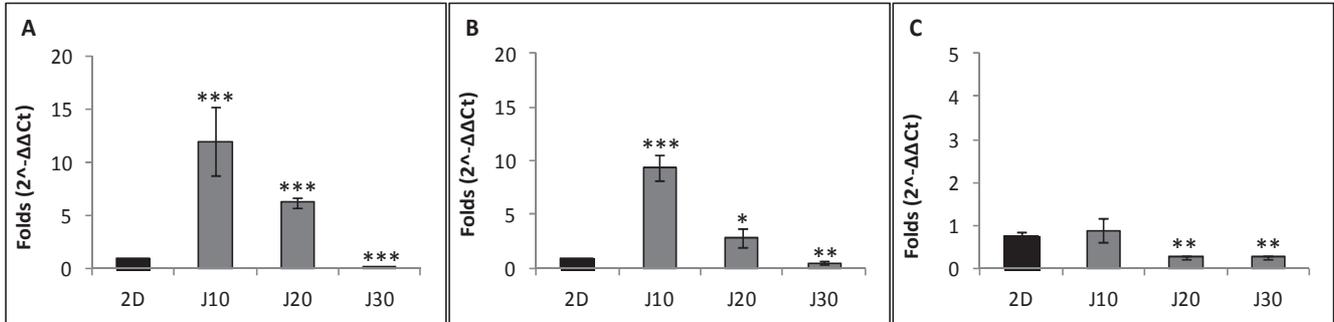


Figure 29: Régulation transcriptionnelle de gènes codant pour des protéines de la MEC dans les MALC, comparativement aux cellules en suspension. Des analyses de RT-qPCR (Sybr-green) ont été réalisées à partir d'ARN extraits de cellules cultivées en suspension (2D) ou de MALC à différents temps de culture (J10-J20-J30) [Light cycler 480, Roche]. Les gènes codant pour la chaîne gamma 1 de la laminine [A], pour la chaîne alpha 1 du collagène I [B] et pour la vitronectine [C] ont été analysés dans les différents échantillons.

Dans l'ensemble, les mécanismes de régulation de la synthèse de composants matriciels apparaissent comme étant très complexes, car même si certaines protéines matricielles sont surexprimées dans les MALC, les transcrits codant pour ces mêmes protéines ne sont pas systématiquement modulés de manière identique au niveau transcriptionnel, au même temps de culture.

En plus de ces résultats concernant la présence et la régulation de protéines matricielles dans les échantillons de LF (MALC, xéno greffes, MCS), nous avons aussi étudié les mécanismes de dégradation des composants de la MEC dans les MALC. Pour cela, nous nous sommes intéressé aux métalloprotéases matricielles (MMP), qui sont des protéases présentant des fonctions majeures dans les phénomènes de remodelage de la MEC. L'expression de la protéine MMP9 a d'abord été évaluée dans les MALC et les RL cultivées en 2D, par Western

Blot (figure 30). De manière intéressante, le niveau d'expression de MMP9 est nettement augmenté dans les cultures 3D, par rapport à ce qui est observé dans les cellules en suspension.

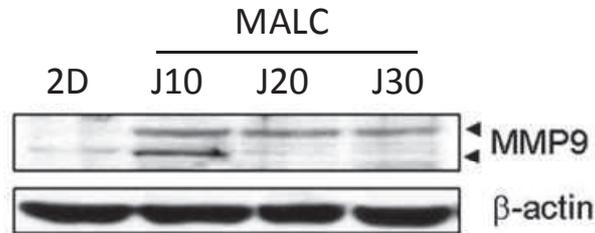


Figure 30: *Accumulation de métalloprotéases induite par l'organisation tridimensionnelle des cellules de LF.* Des lysats obtenus à partir de culture en suspension de LF (2D) ou de MALC à 3 temps de culture ont été analysés en Western Blot. MMP9 est exprimée plus fortement dans les cellules cultivées sous forme de MALC.

L'activité transcriptionnelle des gènes codant pour les métalloprotéases MMP1 et MMP9 a ensuite été évaluée, par la même méthode que pour les protéines matricielles (*cf. figure 29*). Le transcrite codant pour la protéase MMP1 est sous-exprimé dans les MALC, à 10 et 30 jours de culture, alors qu'il est sur-exprimé à 20 jours de culture, en comparaison avec les cellules en 2D (figure 31-A). Pour ce qui est du transcrite codant pour MMP9, il est significativement sous-exprimé à tous les temps de culture considérés (figure 31-B).

Ces mécanismes de régulation des MMP, combinés à ceux décrits plus haut pour les protéines de la MEC, montrent la difficulté à établir des corrélations entre les différents niveaux de régulation des protéines / protéases impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire.

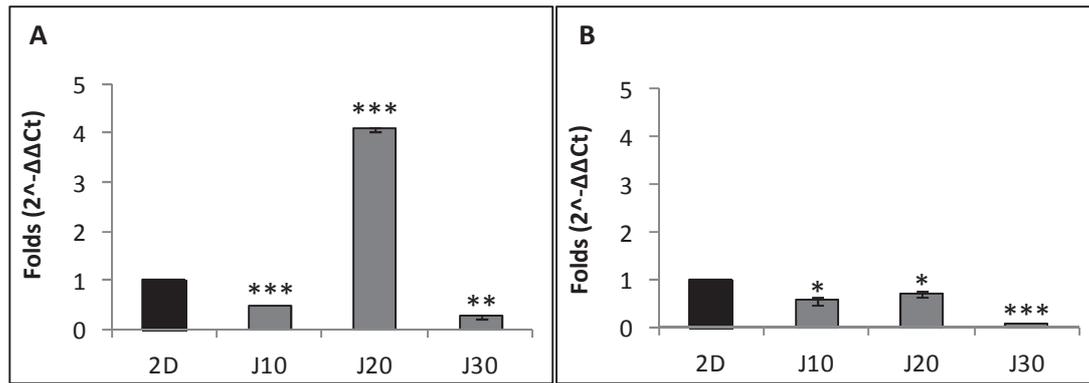


Figure 31: Régulation transcriptionnelle de gènes codant pour des métalloprotéases. Des analyses de RT-qPCR (Sybr-green) ont été réalisées à partir d'ARN extraits de cellules cultivées en suspension (2D) ou de MALC à différents temps de culture (J10-J20-J30) [Light cycler 480, Roche]. Le gène codant pour MMP1 [A] est sous-exprimé à J10 et J30, alors qu'il est sur-exprimé à J20. A l'inverse, le gène codant pour MMP9 [B] est régulé négativement dans les MALC, à tous les temps de culture, par rapport aux cellules en suspension.

Au total, l'ensemble de ces données suggère que le remodelage matriciel est intense dans le système MALC, résultat d'une balance entre des mécanismes de synthèse accrus et une dégradation plus importante elle aussi. Les résultats obtenus montrent la difficulté à établir des corrélations entre les différents niveaux de régulation et la présence des protéines matricielles dans les échantillons cellulaires. C'est une des raisons pour lesquelles cet aspect du projet n'a pas été développé de manière plus approfondie.

Un autre aspect limitant à la poursuite de cette thématique est qu'aucune fonction n'a pu être attribuée à cette MEC dans les MALC. Pour cela, des expériences de blocage au moyen d'anticorps bloquant l'intégrine bêta 1 (sous-unité transductrice du signal mise en évidence dans les MALC, activée suite à la fixation de la protéine matricielle sur l'intégrine qui lui est spécifique) avaient été réalisés. L'absence de données significatives en suivant cette stratégie nous a poussé à stopper les investigations pour privilégier l'étude présentée ci-dessus.

Toutefois, on pourrait envisager d'autres approches, comme notamment l'utilisation de métalloprotéases recombinantes, pour déterminer plus efficacement la fonction de la MEC dans les MALC. On peut penser par exemple qu'elle constitue une barrière physique à

l'efficacité de certains traitements (anticorps par exemple), qu'il serait intéressant de tester sur les MALC. Néanmoins, le rôle "physiologique" de cette MEC reste encore incertain à ce jour.

Ce travail met toutefois en relief un aspect intéressant qui sera abordé dans la partie discussion : les MALC sont composés d'un type cellulaire unique, à savoir des lymphocytes B malins ; or, dans les pathologies malignes, il est généralement admis que la synthèse de MEC est à attribuer aux cellules de type fibroblastique. L'étude réalisée sur les MALC suggère que dans le LF, ce n'est pas le cas, et que les cellules malignes elles mêmes sont capables de synthétiser les protéines composant leur environnement, leur niche, et qui sont propices à leur organisation 3D. Ce point fait partie des résultats inattendus inhérents à mon travail.

Je reviendrai plus en détail sur le rôle potentiel de cette MEC dans les MALC, et les perspectives de travail qui lui sont associées, dans la partie *Discussion* du manuscrit. Le fait d'aborder et d'étayer cet aspect du projet représente en effet une ouverture intéressante et ouvre des perspectives nombreuses à mon étude.

II. ORGANISATION TRI-DIMENSIONNELLE DES CELLULES DE LYMPHOME FOLLICULAIRE ET IMMUNO-EVASION.

A. Préambule

En introduction, dans le chapitre consacré à la pathologie du LF, j'ai évoqué les phénomènes propices à l'expansion tumorale, et ce malgré la présence d'effecteurs cytotoxiques compétents pour la lyse. Parmi les cellules impliquées dans cette surveillance anti-tumorale, les caractéristiques propres aux cellules NK et aux lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ ont été plus développées, puisque les premiers ont été utilisés dans l'article dont je vais parler à présent, et que les seconds sont impliqués dans les résultats préliminaires qui font partie des perspectives inhérentes à mon projet de thèse.

B. Article 2: Innate predisposition to immune escape in follicular lymphoma cells.

1. Introduction

En introduction de ce manuscrit, l'intérêt des modèles de culture en 3D, pour les études centrées sur l'activité des effecteurs immuns vis-à-vis de cellules tumorales organisées en 3D, a été argumenté. Cette approche n'a jamais été développée dans le LF, puisqu'aucun modèle n'était disponible pour mimer cette organisation. Dans cette brève communication, nous discutons du potentiel des cellules malignes de LF à échapper aux cellules immunitaires, grâce à leurs capacités intrinsèques, potentiellement liées à leur organisation 3D.

En particulier, nous nous sommes intéressé aux cellules NK dans cette étude ; en effet, dans le LF, bien que la présence de cellules NK ait été démontrée *in vivo* (111), aucune donnée fonctionnelle ne vient enrichir cette observation, mis à part le travail d'Alan Ramsay, qui évoque leur inefficacité à former des synapses immunologiques fonctionnelles dans cette même pathologie (149).

Nous avons donc choisi d'utiliser le modèle MALC pour aborder ces aspects, et mieux caractériser certaines fonctions de ces cellules NK, spécifiquement dans le LF.

Dans cette discussion, nous nous basons sur des données expérimentales, à savoir l'analyse du transcriptome des cellules RL cultivées en suspension ou en 3D, et sur les résultats d'un test classique de lyse au chrome visant à évaluer la cytotoxicité induite par des cellules NK de donneur sain vis-à-vis de ces mêmes cellules.

2. Article

Oncoimmunology | 4, 555–556, July 2012 © 2012 Landes Bioscience

AUTHOR'S VIEW

Innate predisposition to immune escape in follicular lymphoma cells

Pauline Gravelle,^{1,2,3} Christine Jean,^{1,2,3} Wilfried Valleron,^{1,2} Guy Laurent^{1,2,3,4} and Jean-Jacques Fournié^{1,2,3,*}

¹INSERM UMR1037, Cancer Research Center of Toulouse; Toulouse, France; ²Université Toulouse III Paul-Sabatier; Toulouse, France; ³ERL 5294 CNRS, BP3028, Hospital Purpan; Toulouse, France; ⁴Department of Haematology, Hospital Purpan; Toulouse, France

Keywords: lymphoma, aggregates, immune escape models, transcriptome

Abbreviations: MALC, multicellular aggregates of lymphoma cells; IDO, Indoleamine 2,3-dioxygenase

Innate predisposition to immune escape in follicular lymphoma cells

Pauline Gravelle,^{1,2,3} Christine Jean,^{1,2,3} Wilfried Valleron,^{1,2} Guy Laurent^{1,2,3,4} and Jean-Jacques Fournié^{1,2,3,*}

¹INSERM UMR1037; Cancer Research Center of Toulouse; Toulouse, France; ²Université Toulouse III Paul-Sabatier; Toulouse, France; ³ERL 5294 CNRS, BP3028, Hospital Purpan; Toulouse, France; ⁴Department of Haematology, Hospital Purpan; Toulouse, France

Keywords: lymphoma, aggregates, immune escape models, transcriptome

Abbreviations: MALC, multicellular aggregates of lymphoma cells; IDO, Indoleamine 2,3-dioxygenase

Tumor-intrinsic immuno-resistance is a prerequisite for emergence of follicular lymphomas. Here we show that in vitro, such cells are more resistant to immune cytotoxicity when grown as follicle-mimicking tridimensional aggregates than when grown as cell suspensions. So in patients, this innate adaptation to tumor immunity might precede its selective pressure.

The cure of non-Hodgkin lymphomas (NHL) largely depends upon cytotoxic lymphocytes recruited during therapy, but most NHL cells appear relatively resistant to their action. It is thus important to understand how they do so. A hallmark of follicular lymphoma is their growth as dense aggregates in lymph nodes, a feature however lacking from all in vitro studies which currently involve cell suspensions only.

Here we grew lymphoma cells in vitro as tridimensional multicellular aggregates (MALC) to test whether such a mode of cell growth promotes some degree of immuno-resistance. In this aim, MALC of the t(14,18)⁺ follicular lymphoma cell line RL were produced in vitro by a modified “hanging drop” method.^{1,2} This type of cell growth formed compact ovoid aggregates reaching a diameter of ~1 mm by three weeks of culture, which were never produced in the usual cell suspensions in culture flasks. We then asked whether these two kinds of cell growth induced different gene expression profiles. So, the transcriptomes from RL cells grown for 10 d either as MALC or cell suspensions were produced on Affymetrix microarrays (HG-133 plus 2.0) and

analyzed by Autocompare.³ 451 genes were significantly upregulated in cells grown as MALC comparatively to cell suspensions ($> 4\times$, $p < 0.05$). These were enriched for genes upregulated in the central area of tumors relative to periphery ($p = 10^{-20}$)⁴ and for genes regulated by the histone-lysine N-methyltransferase gene EZH2 ($p = 10^{-12}$).⁵ The upregulated MALC genes also reflected the highly relevant hallmarks of follicular lymphoma cells: induction of anti-apoptotic functions ($p = 0.0002$), pro-survival NF κ B cascade ($p = 0.0006$) and response to hypoxia ($p = 0.002$). Further, the 241 most downregulated MALC genes ($< 0.5\times$, $p < 0.05$) indicated shut down of cytokine/cytokine receptor interactions ($p = 10^{-7}$) and chemokine signaling ($p = 10^{-5}$). So, lymphoma cells grown in vitro as MALC present a gene expression pattern which is not only highly relevant of follicular lymphoma cells in vivo, but also suggests a pre-adaptation to selective pressure from immunity. This view was strengthened when the lymphoma cells grown either in culture flasks or MALC were dissociated and compared as targets in classical 4 h ⁵¹Cr-release lysis assays by allogeneic NK cells from different

healthy donors. The lymphoma cells were more resistant to NK lysis when grown as MALC than when grown as cell suspensions (Fig. 1).

Various lymphoma cell-intrinsic immuno-escape pathways such as altered HLA-I, CD58,⁶ IDO⁷ and deficient immune synapses⁸ have been identified. We now propose that growth as cell aggregates represent another tumor cell-intrinsic pathway of immuno-resistance for follicular lymphomas. The transcriptome of follicular lymphoma cells grown as MALC was characteristic of deeply intra-tumoral cancer cells⁴ and reflected regulation by known drivers of lymphomagenesis.⁹ Together with these features, cells from MALC showed more anti-apoptotic and “immunosilent” gene expression profiles and they showed higher resistance to NK lysis than cells in suspension. So when grown aggregated in vitro, the lymphoma cells show a remarkable tumor-intrinsic pre-adaptation to further immune pressure. These observations suggest that natural lymphomagenesis in lymphoid organs from patients might also involve such an “innate” predisposition to immune escape.

*Correspondence to: Jean-Jacques Fournié; Email: jean-jacques.fournie@inserm.fr
Submitted: 01/04/12; Revised: 01/10/12; Accepted: 01/12/12
<http://dx.doi.org/10.4161/onci.19365>

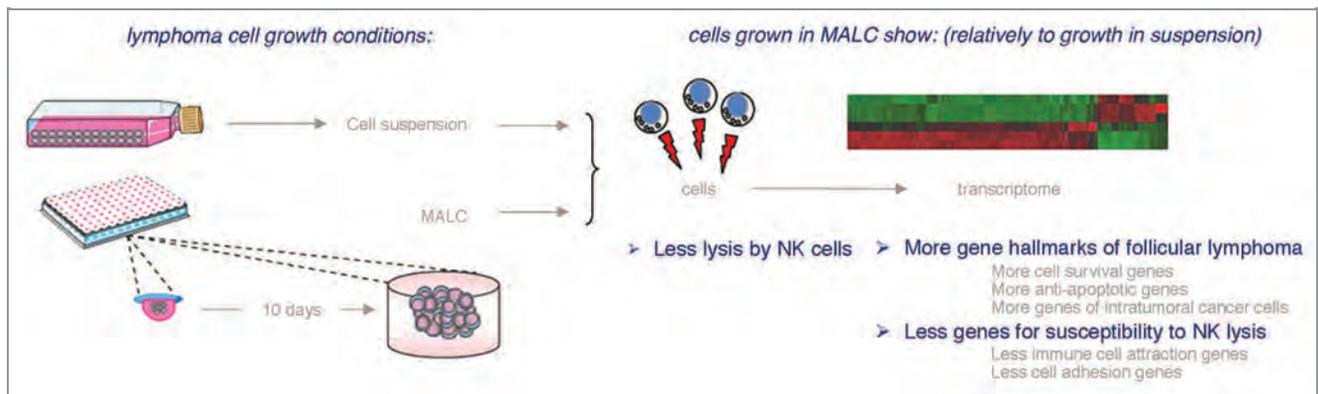


Figure 1. Follicular lymphoma cell growth in vitro as MALC increases immune resistance.

References

1. Timmins NE, Nielsen LK. Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol Med* 2007; 140:141-51; PMID:18085207; http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-443-8_8
2. 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; 15:851-7; PMID:19188155; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1685>
3. Pont F, Familiades J, Déjean S, Fruchon S, Cendron D, Poupot M, et al. The gene expression profile of phosphoantigen-specific human $\gamma\delta$ T lymphocytes is a blend of $\alpha\beta$ T-cell and NK-cell signatures. *Eur J Immunol* 2012; 42:228-40; PMID:21968650; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201141870>
4. Nakamura T, Kuwai T, Kitadai Y, Sasaki T, Fan D, Coombes KR, et al. Zonal heterogeneity for gene expression in human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67:7597-604; PMID:17699763; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0874>
5. Nuytten M, Beke L, Van Eynde A, Ceulemans H, Beullens M, Van Hummelen P, et al. The transcriptional repressor NIPP1 is an essential player in EZH2-mediated gene silencing. *Oncogene* 2008; 27:1449-60; PMID:17724462; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210774>
6. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, Holmes AB, Bhagat G, Murty VV, et al. Combined genetic inactivation of β 2-microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2011; 20:728-40; PMID:22137796; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.006>
7. Ninomiya S, Hara T, Tsurumi H, Hoshi M, Kanemura N, Goto N, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor tissue indicates prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Ann Hematol* 2011; 90:409-16; PMID:20938662; <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-010-1093-z>
8. Ramsay AG, Clear AJ, Kelly G, Fatah R, Matthews J, Macdougall F, et al. Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood* 2009; 114:4713-20; PMID:19786615; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-04-217687>
9. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med* 2010; 362:1417-29; PMID:20393178; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0807082>

3. Perspectives et résultats complémentaires de l'étude

Dans cet article, nous évoquons les propriétés intrinsèques des cellules de LF à contourner le système immunitaire, et en particulier les cellules NK. Nous avons initié cette étude suite à des résultats des analyses de transcriptomes, identiques à celles décrites dans la partie I des résultats. En effet, l'analyse réalisée avec le logiciel *Autocompare*, en croisant nos données expérimentales avec le compendium de Kegg, a révélé que deux voies étaient profondément sous-régulées dans les MALC comparativement aux cellules en suspension, à savoir la voie "cytokine - cytokine receptor interaction" et la voie "chemokine signaling" ; les gènes inclus dans ces voies et sous-régulés dans les MALC sont récapitulés dans la figure 32.

A

Gènes	Fold Change	p value
RELT	0,835	0,004
CCR3	0,797	0,001
PDGFRB	0,872	0,047
EGFR	0,900	0,005
CXCR6	0,920	0,001
EPO	0,873	0,042
IL1R1	0,918	0,046
AMHR2	0,859	0,045
IL2RG	0,855	0,015
IL12RB1	0,714	0,020
CXCL14	0,924	0,020
CXCL12	0,842	0,015
TNFRSF10A	0,812	0,020
CNTFR	0,847	0,044
IL8RA	0,931	0,010
CCL26	0,867	0,013
TNFRSF13B	0,883	0,022
IL4R	0,582	0,042
HGF	0,873	0,023
IL1RAP	0,844	0,021
INHBB	0,845	0,017
LIFR	0,940	0,035
IL3RA	0,802	0,045
CSF2RA	0,837	0,043

B

Gènes	Fold Change	p value
GRK1	0,855	0,001
PIK3CB	0,953	0,047
CCR3	0,797	0,001
ADCY3	0,581	0,001
HRAS	0,573	0,049
GSK3B	0,819	0,003
GRK4	0,601	0,018
PIK3R1	0,879	0,049
CXCR6	0,920	0,001
BRAF	0,923	0,460
AKT3	0,922	0,012
CXCL14	0,924	0,020
ARRB1	0,871	0,024
CXCL12	0,842	0,015
AKT1	0,739	0,021
FOXO3	0,999	0,978
PAK1	0,796	0,005
TIAM1	0,770	0,016
CCL26	0,867	0,013
IKBKG	0,783	0,010
PIK3R2	0,849	0,071
GRK6	0,764	0,000
RASGRP2	0,966	0,300
KRAS	0,924	0,005
RAF1	0,897	0,050
CHUK	0,601	0,023
ROCK1	0,905	0,017
NFKBIB	0,771	0,031
CRK	0,852	0,018
PAR3	0,920	0,049

Figure 32: Tableaux récapitulant les transcrits éteints dans les MALC comparativement aux cellules en suspension, dans les voies "cytokine - cytokine receptor interaction" et "chemokine signaling". A. Gènes de la voie "cytokine - cytokine interaction". B. Gènes de la voie "chemokine signaling".

Notamment, on retrouve sous-exprimés dans les MALC des récepteurs aux interleukines (IL4R, IL3RA,...), diverses molécules impliquées dans la migration des cellules immunitaires (famille CXCL,...), ou encore dans les processus inflammatoires et l'immunité adaptative (cytokines CCL, récepteurs CCR,...). Des molécules de la signalisation sont aussi sous-régulées, comme AKT (1 & 3), RAF, ou ROCK (...).

Suite à ces analyses bioinformatiques, nous avons évalué les conséquences fonctionnelles que ces dérèglements pourraient avoir sur les cellules de MALC du point de vue de la résistance vis-à-vis des effecteurs anti-tumoraux que sont les cellules NK. Après purification de cellules NK à partir de sang périphérique de donneur sain, nous avons donc confronté ces effecteurs cytotoxiques à des cellules RL cultivées soit en suspension, soit sous la forme de MALC, dans des tests classiques de cytotoxicité, basés sur le relargage de chrome 51 (^{51}Cr). Les résultats obtenus dans ces tests sont évocateurs d'une forte résistance des cellules des cellules de LF, lorsque celles-ci sont cultivées en 3D, à la lyse induite par les cellules NK. En effet, dans un rapport effecteur / cible de 10 contre 1, les cellules en suspension sont lysées à hauteur de 90%, alors que les cellules de MALC ne le sont qu'à 40%, soit une diminution de moitié de la lyse (figure 33).

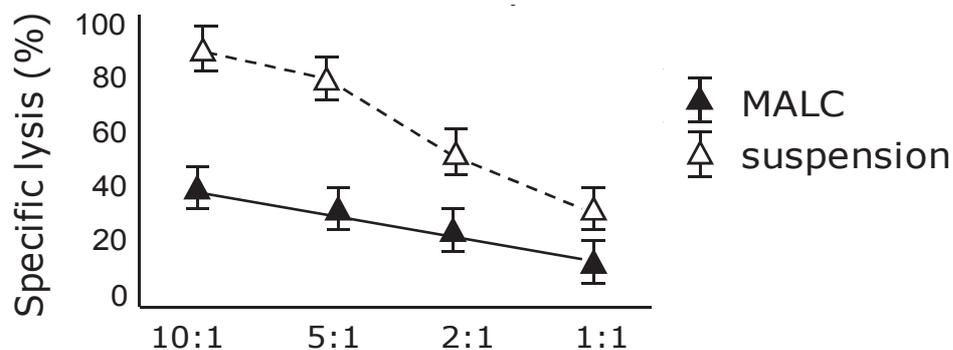


Figure 33: Les cellules cultivées sous la forme de MALC sont plus résistantes que les cellules en suspension à la lyse induite par les effecteurs NK. Les cellules NK ont été testés contre les cellules RL cultivées en suspension ou en MALC dans un test de relargage du ^{51}Cr , pendant 4 heures. Les résultats sont présentés sous la forme des pourcentages de lyse spécifique obtenus en fonction des différents rapports cellules effectrices / cellules cibles.

Après avoir obtenu ces données, nous avons cherché à expliquer ces mécanismes de résistance. En introduction, nous avons décrit l'étude de Ghosh et collaborateurs, qui démontraient que l'inefficacité de lyse des CTL vis-à-vis des lignées cancéreuses de mélanome était en partie due à une surface d'exposition réduite des molécules du CMH de classe I, directement liée à l'organisation 3D des MCTS. L'effet que nous observons ne peut pas s'expliquer par de telles hypothèses, puisque le chargement préalable des cellules cibles au ^{51}Cr avant la mise en présence avec les effecteurs implique une étape de comptage, et donc de dissociation des agrégats.

Nous avons pensé tout d'abord que ces mécanismes de résistance étaient liés au fait que la culture 3D induisait des modifications de l'expression de molécules fonctionnelles exprimées à la membrane, au niveau des cibles. Nous avons donc comparé, par cytométrie de flux, le phénotype des cellules cultivées en suspension avec celui des cellules cultivées sous la forme de MALC, en considérant plusieurs molécules connues pour lier les récepteurs KIRs activateurs ou inhibiteurs des cellules NK. Nous avons alors observé une diminution du niveau d'expression des HLA-ABC, ce qui pourrait expliquer une baisse d'activité des CTL, mais pas des cellules NK. En 3D, nous observons également une légère augmentation de l'expression du récepteur Fas, ce qui ne va pas non plus dans le sens de la résistance à la lyse NK. Le seul marqueur dérégulé de manière très importante dans les MALC est ICAM1. Toutefois, nous observons une surexpression de ce marqueur, ce qui est encore une fois contradictoire avec une moindre efficacité de lyse. Notamment, car une étude suggère que cette molécule est impliquée dans le recrutement des cellules T et NK activées par l'IL2 dans des sphéroïdes de lignées cellulaires de gliome (266). Cette augmentation d'expression d'ICAM, molécule d'adhésion, pourrait peut-être s'expliquer par la mise en place de jonctions inter-cellulaires renforcées dans les MALC. Ces données phénotypiques ne permettent donc pas d'expliquer une différence de lyse de 50% entre les cellules en suspension et les cellules de MALC (figure 29-A).

Nous avons également analysé le niveau d'expression du transcrite codant pour la serpine PI-9 dans les MALC comparativement aux cellules en suspension, par RT-qPCR. Toutefois, là encore, nous n'observons pas de modification qui permette d'expliquer la résistance des cellules à la lyse NK (figure 29-B). Nous n'avons pas non plus observé de différence d'accrochage de la perforine sur les cellules 2D vis-à-vis des cellules 3D (résultats non montrés).

Les données phénotypiques ainsi que l'analyse du niveau d'expression de la serpine sont présentés dans la figure 34.

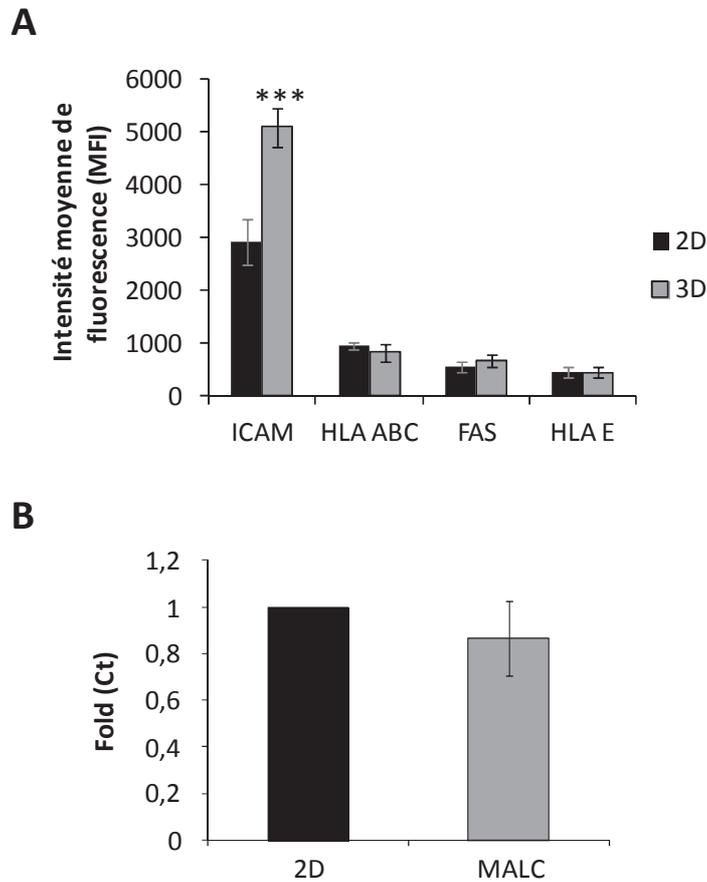


Figure 34: *Analyse comparative du phénotype des cellules RL cultivées en suspension ou sous la forme de MALC.* **A.** Analyse de l'expression des ligands des récepteurs KIR activateurs et inhibiteurs des cellules NK, sur les cellules RL cultivées en suspension ou sous la forme de MALC. Les résultats sont présentés sous la forme de MFI (*Mean Fluorescence Intensity*). **B.** Niveau d'expression du transcrite codant pour PI-9, l'inhibiteur de perforine, en suspension et dans les MALC, révélé par RT-qPCR.

Cette absence de modification des cibles nous a poussé à étudier le statut des effecteurs. Notre hypothèse étant de considérer que les cellules cultivées sous la forme de MALC sont capables d'induire l'anergie des effecteurs NK. Pour évaluer ce postulat, nous avons réalisé différents tests, tels que la mesure du niveau d'expression du CD69, marqueur d'activation des cellules NK (267). Nous avons alors observé une augmentation de l'expression du CD69 quand les

cellules NK étaient en présence de cellules de MALC, comparativement aux cellules NK confrontées aux cellules RL en suspension (Figure 35-A). Le CD107a (LAMP1) est un autre marqueur de l'activité NK, plus spécifiquement surexprimé à la suite de la dégranulation des cellules effectrices (268). Nous avons donc comparé l'expression du CD107a sur les cellules NK, selon qu'elles soient en présence de cellules RL en suspension ou de cellules RL cultivées sous forme de MALC. Nous avons sélectionné comme contrôle positif dans ces tests des cellules Daudi. Ces cellules n'expriment pas de molécules du CMH de classe I, elles induisent une bonne activation des cellules NK. Là encore, nous n'observons pas de différence significative au niveau de l'expression du CD107a dans les différentes conditions testées (Figure 35-B). Enfin, afin de déceler d'éventuelles différences dans le seuil d'activation des cellules NK selon la cible à laquelle ils étaient confrontés, nous avons analysé l'expression du récepteur activateur NKG2D sur les cellules NK, dans les mêmes conditions que pour le CD107a. Son expression reste stable, que les cellules NK soient seules ou en présence des différentes cibles, 2D, 3D ou Daudi (Figure 35-C). L'ensemble de ces données suggère donc que les effecteurs ne subissent pas d'anergie induite par les cellules RL cultivées sous forme 3D. Ces données ne nous permettent donc pas d'expliquer le moindre relargage de ^{51}Cr par les cellules de LF cultivées en 3D.

De manière intéressante, un travail réalisé très récemment par l'équipe de Jean Feuillard a démontré le rôle de B7-H1 dans la susceptibilité à la lyse par les NK et les CTL, en système autologue, dans des lignées de lymphome de Burkitt ; dans leur travail, ils montrent que c-myc réprime l'expression de B7-H1. Or l'utilisation d'anticorps bloquant B7-H1 dans leurs lignées restaure la sensibilité des cellules à la lyse par les effecteurs (269). Dans les MALC, nous observons une diminution de l'expression de c-myc, ce qui pourrait expliquer une sur-expression de B7-H1, ce qui expliquerait l'immuno-échappement des cellules de MALC. Il serait donc intéressant d'analyser le niveau d'expression de B7-H1 dans les MALC et les cultures en suspension.

C'est la raison pour laquelle nous évoquons la possibilité que des propriétés intrinsèques sont directement dérégulées par la culture à haute densité, comme par exemple une diminution de la perméabilité de la membrane plasmique, qui pourrait expliquer un moindre effet des molécules cytolytiques.

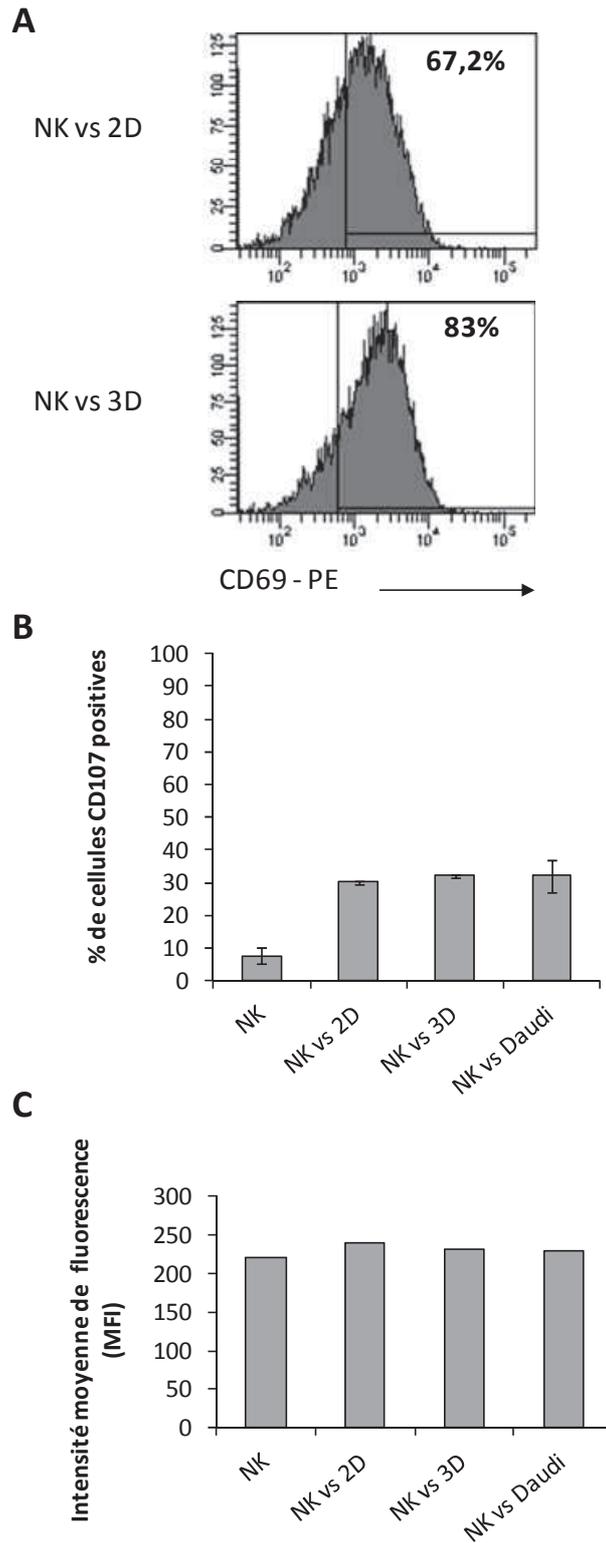


Figure 35: Expression de marqueurs d'activation sur les cellules NK en fonction des différentes cibles. **A.** Détection du CD69 sur les cellules NK selon leur mise en présence avec des cellules RL en suspension, ou des cellules de MALC (3D), par cytométrie de flux. **B.** Analyse du pourcentage de cellules NK exprimant le CD107a, en fonction des cibles. **C.** Niveau d'expression de NKG2D sur les cellules NK, en fonction des cibles: les résultats sont présentés sous la forme d'intensité moyenne de fluorescence.

Le défaut de formation de la synapse immunologique décrit dans les LF (149) est une piste envisageable dans notre système. Dans leur démonstration, Ramsay et collaborateurs effectuent un travail en 2 temps: premièrement, ils co-cultivent des lymphocytes T avec des lymphocytes B issus de donneurs sains, ou de patients atteints de LF ou de LBDGC. Puis, ils purifient ces mêmes lymphocytes T afin de les mettre en présence de cellules cibles et d'évaluer leur efficacité à former des synapses. Les lymphocytes issus de culture avec des lymphocytes B normaux restent tout à fait aptes à former des conjugués, alors que ceux issus de co-culture avec des lymphocytes B malins sont nettement moins efficaces, ce qui se traduit notamment par un moindre recrutement des protéines de la synapse immunologique (F-Actine, LFA-1,...). D'ailleurs, dans leur travail, ils utilisent également des cellules NK, qui établissent également des contacts synaptiques avec leurs cibles (270), et obtiennent les mêmes résultats qu'avec les lymphocytes T quand les cellules sont pré-incubées avec les lymphocytes B issus de LF. On pourrait envisager ce type de méthodologie à partir de cellules RL cultivées en suspension ou sous la forme de MALC, pour voir l'impact que ces cellules peuvent avoir sur la formation de la synapse entre les cellules NK et leurs cibles.

Enfin, la trogocytose est un phénomène qui a été initialement mis en évidence dans des études impliquant des lymphocytes T CD8⁺. Elle se traduit par un échange de matériel membranaire entre une cellule effectrice et sa cible. Il s'agit d'un processus actif et unidirectionnel de transfert de molécules, et dépendant des récepteurs à l'antigène (271). De nombreux types cellulaires peuvent effectuer cette trogocytose, dont, d'un intérêt particulier pour nous, les cellules NK (272). Or, dans ces mêmes cellules NK, il a été démontré récemment que cette trogocytose pouvait induire l'immuno-échappement des cellules tumorales. En effet, Caumartin et collaborateurs ont montré qu'il y avait trogocytose de la molécule tolérogène HLA-G1, depuis des cellules de lignées cancéreuses de mélanome et de lymphoblastome vers les cellules NK, qu'elles soient des lignées transformées ou bien issues de sang périphérique de donneur sain. Dans leur étude, le transfert de cette molécule vers la cellule NK est responsable d'une diminution de la prolifération, ainsi que d'une moindre activité cytotoxique des effecteurs, ce qui conduit à l'immuno-échappement des cellules tumorales, et ce en quelques minutes seulement (273). Appliqué à notre étude, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un phénomène comparable se produise, ce qui pourrait expliquer la résistance des cellules

en 3D à la lyse NK. Nous avons effectué quelques tests en ce sens, mais des mises au point sont encore nécessaires afin de confirmer ou d'infirmier ces hypothèses..

Ce second travail suggère que la culture sous forme 3D des cellules de LF leur permet d'échapper à la lyse par les cellules du système immunitaire, et notamment les cellules NK. Cette étude devra toutefois être approfondie afin de caractériser les mécanismes par lesquels les cellules deviennent résistantes à la lyse.

DISCUSSION GENERALE - PERSPECTIVES

Mon travail de thèse a eu pour objet principal l'étude de l'influence de la structuration 3D des LF sur la biologie des cellules B malignes. En particulier, ont été étudiés les effets de la culture en 3D sur la régulation génique et les mécanismes de résistance aux médicaments et effecteurs de l'immunité. Même si mon travail de thèse a contribué à l'identification de certains processus impliqués dans cette résistance, certaines inconnues subsistent, et plusieurs hypothèses peuvent être discutées pour étoffer notre travail. Nous les évoquerons après avoir discuté de la valeur du modèle MALC pour les études précliniques, qu'elles concernent le criblage de nouveaux médicaments ou des approches d'immunothérapie cellulaire.

I. PERTINENCE DU MODELE MALC EN RECHERCHE PRECLINIQUE.

Une des applications les plus prometteuses des modèles "sphéroïdes" est le criblage de composés actifs en recherche préclinique. Le développement du modèle MALC permet, **pour la première fois dans le LF**, de prendre en compte l'impact de l'organisation spatiale sur la réponse aux traitements. Il présente donc une opportunité unique d'évaluer les réponses aux stratégies thérapeutiques, en recréant des conditions plus proches de la situation *in vivo*, comparativement aux modèles de culture traditionnels en suspension.

Les avantages du modèle MALC pour les recherches précliniques sont multiples, puisque la technologie qui a été brevetée est peu coûteuse, et permet l'obtention d'agrégats relativement homogènes en termes de volume et de nombre de cellules par MALC. De plus, il est possible de générer un nombre important d'agrégats en peu de temps, ce qui constitue un atout pour la reproductibilité des tests de criblage.

L'application du MALC à l'établissement d'un chimiogramme est concevable, par analogie aux tests FMCA décrits en introduction (§III-B-2), le MALC pourrait être ainsi utilisé pour prédire à l'échelle individuelle la sensibilité à des médicaments ou à des combinaisons de médicaments.

L'application du MALC à la mesure de l'efficacité de nouveaux anticorps. En particulier, nous pensons que les MALC représentent un outil très adapté pour les approches

immunothérapeutiques par anticorps, qui prendront une place croissante dans la thérapie du LF. Ainsi, dans notre laboratoire, en partenariat avec Roche-Glycart, dans le modèle MALC, l'effet du rituximab a été comparé à celui du GA101, anticorps monoclonal dit de troisième génération que nous avons évoqué en introduction (ANNEXE 1).

L'application des MALC à la mesure de l'efficacité des « immuno-modulateurs ». Une série de composés prennent une place croissante dans l'arsenal thérapeutique des lymphomes : les IMiDs[®]. Utilisés seuls ou en association avec le rituximab, l'efficacité de ces molécules n'est plus à démontrer. Leur mécanisme d'action semble impliquer les fonctions de reconnaissance des cellules immunitaires : augmentation de l'expression des ligands de NKG2D au niveau des cellules cibles(274), facilitation de la constitution de la synapse immunologique (149, 275). La modélisation 3D permettrait d'approfondir l'effet de ces molécules sur les effecteurs de l'immunité et par exemple mesurer l'impact des IMiDs[®] (lénalidomide) sur l'intensité de l'immuno-infiltration.

L'application des MALC à la thérapie cellulaire. Une des perspectives à envisager avec le modèle MALC serait de l'utiliser dans des modèles de co-cultures, et en particulier d'évaluer l'efficacité anti-tumorale d'effecteurs cellulaires de l'immunité adaptative ou innée, utilisés seuls ou en présence d'anticorps.

****MALC et T $\gamma\delta$*** : ainsi, nous avons initié des tests comparatifs de l'efficacité de lyse induite par les lymphocytes T $\gamma\delta$, vis-à-vis de cellules de LF cultivées en suspension ou en 3D et pré-traitées par le rituximab. Dans notre expérience, nous observons une activation plus importante des cellules $\gamma\delta$ (CD107a) et une meilleure lyse des cibles quand les sont pré-traitées avec le rituximab (figure 36). Un travail récent de Braza et collaborateurs démontre que les lymphocytes T $\gamma\delta$ isolés à partir de sang de patient sont capables de tuer les cellules B malignes, en système autologue comme allogénique, et que cet effet est potentialisé par le traitement avec des anticorps anti CD20, comme le rituximab, et plus encore le GA101 (276). Il pourrait être intéressant de voir si cet effet est conservé quand on utilise les MALC.

****MALC et cytokines*** : plusieurs cytokines sont candidates pour des immuno-interventions. Parmi celles-ci l'IL15 dont on connaît l'effet stimulant sur les fonctions NK. Dans le laboratoire, Quillet-Mary et collaborateurs ont montré que cette cytokine pouvait amplifier considérablement l'ADCC médiée par le rituximab en présence de cellules NK (*article en*

révision, *Journal of Immunology*). Une des perspectives de ce travail est d'évaluer cette approche en 3D, notamment en présence de GA101. Ce travail en cours.

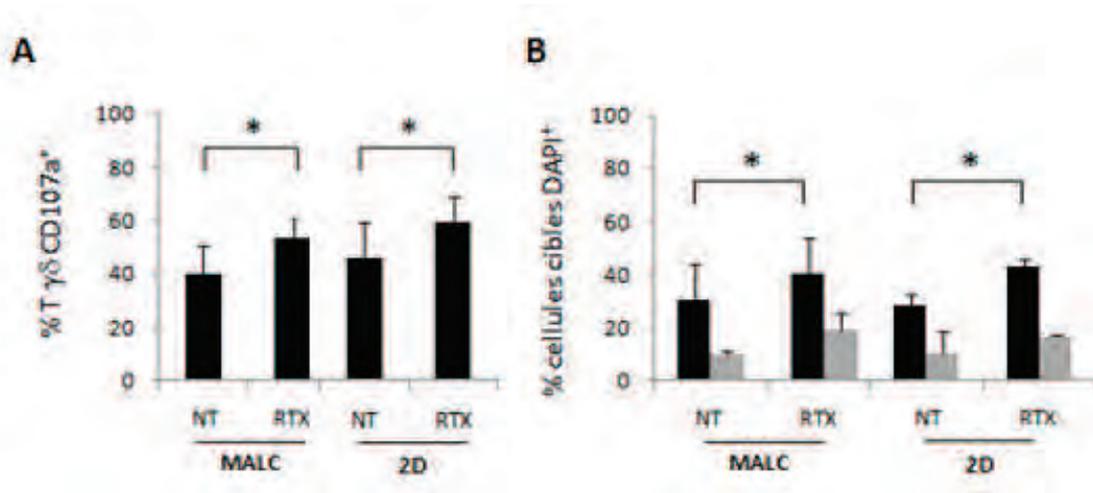


Figure 36: *Activité de dégranulation des lymphocytes T $\gamma\delta$ et mort induite par ces effecteurs en fonction de la nature 2D ou 3D des cibles, et du traitement par le rituximab.* Légende panel

B: barres noirs: avec effecteurs $\gamma\delta$; barres grises: sans effecteurs $\gamma\delta$. Rapport effecteur / cible : 1/1.

II. ROLE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS LA BIOLOGIE 3D DES CELLULES DE LYMPHOME FOLLICULAIRE

A. Matrice extracellulaire et Lymphome Folliculaire :

L'accumulation de MEC dans les tissus lymphomateux humains a été décrite de longue date (277, 278), comme dans tout cancer. L'interprétation généralement donnée à ce phénomène est que la MEC ainsi accumulée est produite par les cellules du stroma et principalement par les fibroblastes, éventuellement stimulés par des facteurs pro-fibrosant dont le TGF- β (279).

Dans le modèle MALC, nous avons observé que certaines protéines de la MEC sont produites, de façon variable selon le temps de culture (cf. §IC3 - *résultats complémentaires* - dans la section *RESULTATS - Partie I*). Or les MALC sont générés à partir d'un type cellulaire unique, le lymphocyte B malin. Notre étude montre donc que les cellules B

malignes, sous l'influence de l'organisation spatiale, sont capables de produire de la MEC et que, dans les lymphomes, la contribution respective des cellules tumorales et des cellules accessoires devient plus incertaine.

B. Dépôt de matrice extracellulaire et résistance aux médicaments anti-cancéreux.

L'hypothèse d'un rôle de la MEC dans la résistance aux médicaments anti-cancéreux est plausible pour deux raisons. D'une part, la mise en contact de la MEC avec les intégrines des cellules de LF devrait conduire à l'activation de signaux de survie. D'autre part et surtout, cette interaction devrait avoir pour effet de réduire la prolifération cellulaire. Cette hypothèse est étayée par les travaux de R. Jain qui démontrent que les cellules sont cultivées sous forme de sphéroïdes, l'activation de la mécanotransduction est responsable de l'inhibition de la prolifération (280).

Dans les MALC, nous avons observé l'accumulation temps dépendante de la protéine p27. Cette observation renforce l'hypothèse car, dans certains systèmes, la régulation de p27 est dépendante des signaux induits par la MEC. Par exemple, la stimulation de l'intégrine VLA4 ($\alpha 4\beta 1$) suite à l'adhésion à la fibronectine induit une surexpression de la protéine p27 dans des lignées cellulaires cancéreuses de myélome (281). L'accumulation de p27 est alors responsable d'une inhibition de la prolifération et d'une protection vis-à-vis d'une série de médicament anti-cancéreux dont la doxorubicine et le cyclophosphamide. Ce phénomène représente la base moléculaire de la CAM-DR, pour *Cell adhesion Mediated Drug Resistance*. La production de MEC, qui, dans notre système s'accompagne d'une régulation négative de la prolifération, pourrait donc induire des phénomènes de chimiorésistance d'un type apparenté à celui de la CAM-DR.

Toutefois, ces considérations sont à nuancer, car l'accumulation matricielle peut également induire une régulation positive de la prolifération. En effet, l'impact du signal intégrine sur la prolifération dépend de la rigidité du support protéique. Des travaux démontrent en ce sens qu'une importante rigidité est propice à l'induction de ERK et de la cycline D1, donc à une activation de la prolifération. A l'inverse, une forte compliance (faible rigidité) sera plutôt favorable à une inhibition de ERK et une induction de p27 (282), concourant ainsi à un

blocage de la prolifération. Une protéine telle que la fibronectine est généralement considérée comme un support plutôt "mou", alors que le collagène, sous la forme de fibres polymérisées, est beaucoup plus rigide. Dans les MALC, plusieurs protéines matricielles aux compliances différentes sont présentes simultanément, ce qui rend délicate l'évaluation de la rigidité "globale" dans le système de culture, et complique les interprétations.

C. Accumulation de matrice extracellulaire et limite de diffusion des drogues.

Outre les études de Tannock, basés sur les MCL (201), que nous avons présentés en introduction (§III-B-2), des travaux plus récents suggèrent que la composition en MEC observée dans les modèles de culture en 3D peut représenter une véritable barrière physique, constituant un obstacle à la pénétration des drogues (283), modélisant ainsi une réalité observée *in vivo* (241). En particulier, on peut évoquer la contribution négative du collagène dans la biodiffusion des médicaments anti-cancéreux et des immunoglobulines (284).

D. Accumulation de matrice extracellulaire et immuno-infiltration.

La MEC pourrait contribuer à des défauts d'immuno-infiltration dans les tumeurs. Bien que des travaux dans ce domaine soient peu nombreux dans la littérature, on peut citer, en faveur de cette hypothèse, une étude récemment publiée d'Hélène Salmon. Elle y évoque la rigidité remarquable des fibres matricielles présentes dans le stroma tumoral, et l'orientation particulière des lymphocytes T en bordure de ces fibres ; en effet, ceux-ci sont contraints de se disposer de façon parallèle aux fibres, ce qui limite leur accès aux cellules tumorales (285). De manière encore plus intéressante, leur travail établit une corrélation entre une moindre présence de matrice et la présence de cellules effectrices à proximité des cellules tumorales (286). Appliqué aux MALC, il se pourrait que la MEC qui recouvre les cellules freine l'action des molécules cytolytiques dégranulées par les NK. Ces questions peuvent déboucher sur un authentique projet immunopharmacologique basé sur l'inhibition de la production de MEC (ou la diminution de la rigidité matricielle) afin de favoriser l'immuno-infiltration.

E. L'accumulation de matrice extracellulaire dans les MALC obéit à des mécanismes encore incertains.

Toutefois, elle peut s'expliquer par divers types de stress (pour revue, voir ANNEXE 2).

- Rôle du stress mécanique: Le stress mécanique est directement lié à la structuration 3D des tumeurs et à leur croissance dans un espace confiné. Ceci induit en effet une augmentation de la pression hydrostatique ainsi que de fortes tensions. Ces forces mécaniques sont transmises à la cellule *via* les intégrines, ce qui active la signalisation FAK. En retour, ces signaux régulent des fonctions cellulaires telles que l'activation des intégrines et la synthèse de composants matriciels. En d'autres termes, le stress mécanique serait propice à l'accumulation de matrice, qui induirait à son tour une amplification de la réponse cellulaire au stress mécanique, en favorisant l'accumulation de MEC, et ainsi la création d'une boucle d'auto-amplification. Ces observations suggèrent que l'organisation 3D pourrait être en soi propice à la synthèse de MEC. Dans ce sens, il a été démontré que des sphéroïdes issus de lignées de cancers du sein produisent deux fois plus de collagène que les mêmes cellules en suspension (283). Il est probable que la culture en 3D des cellules de LF puisse avoir les mêmes conséquences, ce qui serait responsable des phénomènes de résistance (drogues et effecteurs) que nous avons évoqués plus haut (modèle hypothétique, figure 37).

- Rôle du stress hypoxique: un second type de stress que nous avons identifié dans les MALC pourrait aussi induire cette production de MEC, à savoir l'hypoxie, connue pour réguler la production de certains composants matriciels (287).

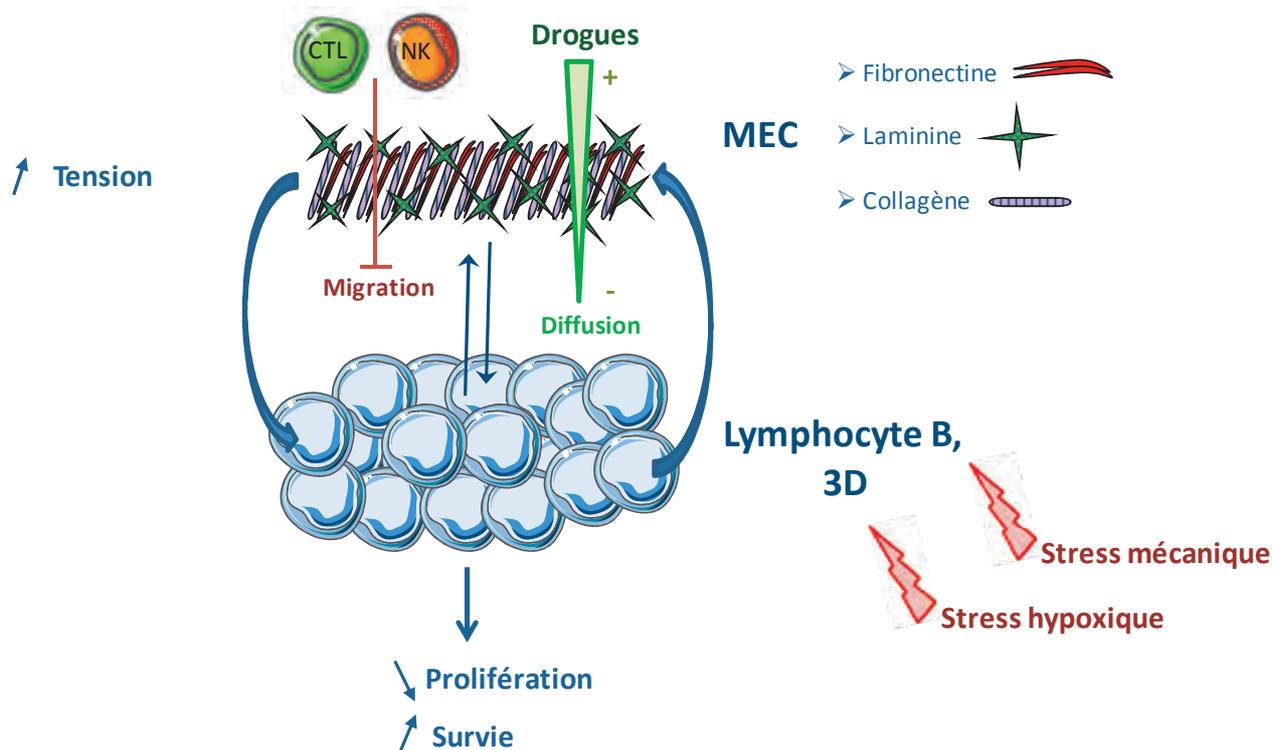


Figure 37: *Conséquences fonctionnelles de l'accumulation de la MEC dans les MALC, modèle hypothétique.* Selon notre hypothèse, les cellules de LF, sous l'influence du stress mécanique et de l'hypoxie, activent la production de MEC. La signalisation activée par la liaison de la MEC sur les intégrines induit elle-même une synthèse accrue de MEC (boucle d'auto-amplification). La signalisation induite par la MEC via les intégrines inhibe la prolifération cellulaire, responsable de la chimiorésistance. En parallèle, la MEC accumulée constitue une barrière physique qui limite la diffusion des drogues et perturbe la migration des effecteurs immunitaires, diminuant leur accès aux cellules tumorales. Ces effets convergent vers la protection des cellules B malignes.

III. RÔLE DE L'HYPOXIE DANS LA BIOLOGIE 3D DES CELLULES DE LYMPHOMME FOLLICULAIRE

A. Hypoxie et Lymphome Folliculaire

Dans le modèle MALC, nous avons montré que les cellules étaient soumises à un fort degré d'hypoxie. La réalité de l'hypoxie est basée sur l'expression de HIF1 α , la détection de la sonde hypoxique pimonidazole, et enfin l'analyse de l'expression génique qui a révélé

l'activation d'un module "réponse à l'hypoxie" dans les échantillons de MALC. Dans les échantillons tumoraux de LF, des observations similaires peuvent être faites: en effet, nous avons parlé en introduction de l'expression de HIF1 α retrouvée dans les LF (86, 87). De plus, l'analyse que nous avons faite avec *Autocompare*, à partir d'échantillons primaires de patients atteints de LF, révèle aussi l'activation de la réponse à l'hypoxie. Ces données pourraient être complétées par des analyses utilisant d'autres marqueurs, comme GLUT-1, ou encore par l'emploi de sonde de type pimonidazole *in vivo*. Ce marqueur est en effet très spécifique de la teneur locale en oxygène, et a été employé dans certains cancers, dans le cadre d'essais cliniques (288).

B. Hypoxie et résistance aux médicaments anti-cancéreux

Les résultats que nous obtenons dans les MALC démontrent que l'hypoxie, via HIF1 α , est responsable de la régulation négative de la prolifération dans les cellules de LF. Le lien entre HIF et prolifération est possiblement spécifique du LF. En effet, la surexpression de HIF1 α a été documentée par immunohistochimie dans d'autres pathologies lymphomateuses dont le LBDGC, alors que la prolifération y est très intense.

L'inhibition de la prolifération induite par l'hypoxie protège les cellules contre les médicaments anti-cancer phase dépendants. Ce lien hypoxie-prolifération réduite-résistance aux médicaments anti-cancéreux a été déjà décrit dans d'autres tumeurs. Par exemple, l'hypoxie induit un blocage dans le cycle, dans la phase G1, dans les cellules de lignées de carcinome oral à cellules squameuses, ce qui leur confère une résistance au 5-Fluorouracil (289).

L'hypoxie peut contribuer à la résistance aux médicaments anti-cancéreux par d'autres mécanismes. Bien que nous n'ayons pas traité ce sujet dans notre travail, certains arguments plaident pour le rôle du pH. Dans les MALC celui-ci pourrait être diminué en réponse à l'hypoxie, notamment *via* la production d'acide lactique. Or, des travaux ont montré que l'efficacité de la doxorubicine était impactée par ces valeurs de pH, et démontrent en particulier son incorporation réduite en cas de pH bas (290). De manière indirecte, l'hypoxie pourrait donc contribuer à des défauts d'activité de cette drogue en thérapie du LF.

C. Hypoxie et immuno-évasion

L'hypoxie pourrait également contribuer à l'inefficacité de la lyse induite par les cellules de l'immunité anti-tumorale, et en particulier les CTL (pour revue, voir (255)).

L'hypoxie peut diminuer l'activité des effecteurs. Elle est en effet décrite pour diminuer leur efficacité vis-à-vis des cellules tumorales, ce qui en fait un élément idéal pour expliquer les mécanismes de résistance que nous avons développés dans le second travail que j'ai présenté dans la partie résultats. Le lactate (voir plus haut) interfère négativement avec les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T (251).

L'hypoxie peut réduire la sensibilité des cibles aux effecteurs. Un travail récent de l'équipe de Salem Chouaib démontre que le stress hypoxique induit une résistance des cellules de carcinome pulmonaire à la lyse des CTL. Plus précisément, ce travail révèle que l'accumulation de VEGF sous l'influence de l'hypoxie confère une protection des cellules tumorales vis-à-vis des effecteurs par un mécanisme dépendant de STAT3 impliquant possiblement Akt (291). Or, nous avons observé que le VEGF s'accumule dans les MALC tandis que d'autres travaux ont parfaitement identifié le récepteur au VEGFR (VEGFR 2) dans les cellules de LF (82). Il est donc possible que, dans notre modèle, *via* VEGF, l'hypoxie facilite la protection des cellules de LF vis-à-vis des cellules NK par un mécanisme similaire à celui décrit par S. Chouaib pour les CTL. Une autre étude de Salem Chouaib et collaborateurs suggère qu'une surexpression du miR210 par l'hypoxie est responsable d'une résistance exacerbée à la lyse par les CTL possiblement *via* un set de gènes dont PTPN1, qui est impliqué dans la régulation de l'expression de récepteurs cytokiniques au niveau des cellules tumorales (292). Pour avancer sur cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer la sensibilité des cellules de LF aux effecteurs NK après culture en chambre d'hypoxie afin de confirmer ou infirmer les hypothèses avancées par le groupe de Salem Chouaib.

Au total, notre travail suggère que, dans les MALC, les cellules de LF sont soumises de manière concomitante à différents types de stress, et en particulier à un stress mécanique et un stress métabolique intense, dominé par l'acidification et l'hypoxie. Dans ces circonstances de stress, la réponse cellulaire s'oriente vers deux composantes principales :

1- une production accrue de MEC, facilitant la cohésion cellulaire, pour le maintien de la structure 3D.

2- l'inhibition de la prolifération, afin de ménager les ressources métaboliques et énergétiques, et ainsi prévenir l'épuisement.

Ces deux mécanismes d'adaptation favorisent la protection cellulaire vis-à-vis des agents cytotoxiques et des effecteurs de l'immunité anti-tumorale. La fraction cellulaire épargnée est responsable de la rechute. (*modèle hypothétique, figure 38*).

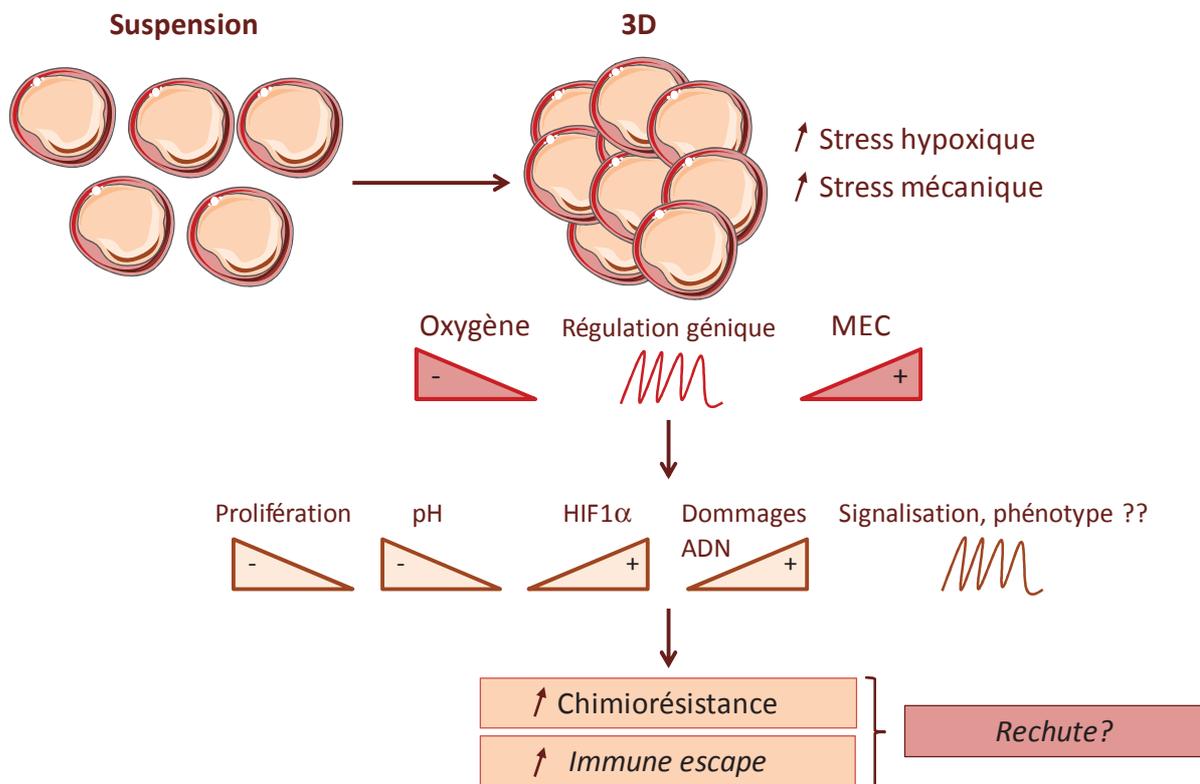


Figure 38: *Modèle hypothétique des adaptations ayant lieu dans les MALC.* La culture à haute densité est propice à l'apparition de stress, qui induisent la modification de paramètres pouvant expliquer la résistance aux médicaments anti-cancéreux et l'immuno-échappement qui conduisent aux rechutes dans le LF.

La biologie des MALC reflète donc une réponse collective d'une population tumorale, réponse initiée dans des conditions de stress, mais *in fine* favorable au développement durable de la tumeur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S41-52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046. PubMed PMID: 20176268; PubMed Central PMCID: PMC3670108.
2. Fuxa M, Skok JA. Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(2):129-36. doi: 10.1016/j.coi.2007.02.002. PubMed PMID: 17292598.
3. Mani RS, Chinnaiyan AM. Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2010;11(12):819-29. doi: 10.1038/nrg2883. PubMed PMID: 21045868.
4. Schlissel MS. Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(11):890-9. doi: 10.1038/nri1225. PubMed PMID: 14668805.
5. Ye M, Graf T. Early decisions in lymphoid development. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(2):123-8. doi: 10.1016/j.coi.2007.02.007. PubMed PMID: 17306518.
6. LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood.* 2000;96(1):9-23. PubMed PMID: 10891425.
7. Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):195-205. doi: 10.1038/nri2491. PubMed PMID: 19240758.
8. Geier JK, Schlissel MS. Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements. *Semin Immunol.* 2006;18(1):31-9. doi: 10.1016/j.smim.2005.11.001. PubMed PMID: 16386923.
9. Nemazee D. Does immunological tolerance explain the waste in the B-lymphocyte immune system? Experiment and theory. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;764:397-401. PubMed PMID: 7486554.
10. Niirio H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(12):945-56. doi: 10.1038/nri955. PubMed PMID: 12461567.
11. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):767-77. doi: 10.1038/nri2656. PubMed PMID: 19855403.
12. Klaus GG, Humphrey JH, Kunkl A, Dongworth DW. The follicular dendritic cell: its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunol Rev.* 1980;53:3-28. PubMed PMID: 7009406.
13. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(1):15-27. doi: 10.1038/nri2454. PubMed PMID: 19079135.
14. Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol.* 2000;1(5):379-85. doi: 10.1038/80816. PubMed PMID: 11062496.
15. Martinez-Valdez H, Guret C, de Bouteiller O, Fugier I, Banchereau J, Liu YJ. Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *J Exp Med.* 1996;183(3):971-7. PubMed PMID: 8642300; PubMed Central PMCID: PMC2192366.
16. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):22-33. doi: 10.1038/nri2217. PubMed PMID: 18097447.
17. Bross L, Fukita Y, McBlane F, Démollière C, Rajewsky K, Jacobs H. DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity.* 2000;13(5):589-97. PubMed PMID: 11114372.
18. Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:1-22. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740. PubMed PMID: 17328676.

19. 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*. 1998;280(5370):1750-2. PubMed PMID: 9624052.
20. Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L, et al. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(20):11816-21. PubMed PMID: 9751748; PubMed Central PMCID: PMCPMC21723.
21. 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. PubMed PMID: 11007474.
22. Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(10):801-12. doi: 10.1038/nri1201. PubMed PMID: 14523386.
23. 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. PubMed PMID: 11067898.
24. Scheeren FA, Naspetti M, Diehl S, Schotte R, Nagasawa M, Wijnands E, et al. STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nat Immunol*. 2005;6(3):303-13. doi: 10.1038/ni1172. PubMed PMID: 15711548.
25. Arpin C, Déchanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Brière F, et al. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science*. 1995;268(5211):720-2. PubMed PMID: 7537388.
26. www.cancerresearchuk.org.
27. Michallet AS, Coiffier B. Recent developments in the treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood Rev*. 2009;23(1):11-23. doi: 10.1016/j.blre.2008.05.002. PubMed PMID: 18620786.
28. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89(11):3909-18. PubMed PMID: 9166827.
29. Solal-Celigny P. Prognosis of follicular lymphomas. *Clin Lymphoma*. 2005;6(1):21-5. PubMed PMID: 15989702.
30. Cartwright R, Brincker H, Carli PM, Clayden D, Coebergh JW, Jack A, et al. The rise in incidence of lymphomas in Europe 1985-1992. *Eur J Cancer*. 1999;35(4):627-33. PubMed PMID: 10492638.
31. Vose JM, Chiu BC, Cheson BD, Dancy J, Wright J. Update on epidemiology and therapeutics for non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:241-62. PubMed PMID: 12446426.
32. Agopian J, Navarro JM, Gac AC, Lecluse Y, Briand M, Grenot P, et al. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2009;206(7):1473-83. doi: 10.1084/jem.20082842. PubMed PMID: 19506050; PubMed Central PMCID: PMCPMC2715093.
33. Chiu BC, Dave BJ, Blair A, Gapstur SM, Zahm SH, Weisenburger DD. Agricultural pesticide use and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;108(4):1363-9. doi: 10.1182/blood-2005-12-008755. PubMed PMID: 16621961; PubMed Central PMCID: PMCPMC1566872.
34. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*. 2004;104(5):1258-65. doi: 10.1182/blood-2003-12-4434. PubMed PMID: 15126323.

35. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, Lopez-Guillermo A, Vitolo U, et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol*. 2009;27(27):4555-62. doi: 10.1200/JCO.2008.21.3991. PubMed PMID: 19652063.
36. Arcaini L, Merli M, Passamonti F, Rizzi S, Ferretti V, Rattotti S, et al. Validation of follicular lymphoma international prognostic index 2 (FLIPI2) score in an independent series of follicular lymphoma patients. *Br J Haematol*. 2010;149(3):455-7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08065.x. PubMed PMID: 20064149.
37. Buske C, Hoster E, Dreyling M, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) with respect to treatment outcome. *Blood*. 2006;108(5):1504-8. doi: 10.1182/blood-2006-01-013367. PubMed PMID: 16690968.
38. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J. Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Ann Oncol*. 2000;11 Suppl 1:3-10. PubMed PMID: 10707771.
39. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rüdiger T, Wilhelm M, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*. 2002;99(10):3806-12. PubMed PMID: 11986240.
40. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007;21(1):18-29. doi: 10.1038/sj.leu.2404426. PubMed PMID: 17039231.
41. Masir N, Campbell LJ, Goff LK, Jones M, Marafioti T, Cordell J, et al. BCL2 protein expression in follicular lymphomas with t(14;18) chromosomal translocations. *Br J Haematol*. 2009;144(5):716-25. doi: BJH7528 [pii]
10.1111/j.1365-2141.2008.07528.x. PubMed PMID: 19120369.
42. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*. 1985;229(4720):1390-3. PubMed PMID: 3929382.
43. Tsai AG, Lu H, Raghavan SC, Muschen M, Hsieh CL, Lieber MR. Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. *Cell*. 2008;135(6):1130-42. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.035. PubMed PMID: 19070581; PubMed Central PMCID: PMCPMC2642632.
44. Bakhshi A, Wright JJ, Graninger W, Seto M, Owens J, Cossman J, et al. Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(8):2396-400. PubMed PMID: 3104914; PubMed Central PMCID: PMCPMC304658.
45. López-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, McLaughlin P, Smith T, Pugh W, et al. Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood*. 1999;93(9):3081-7. PubMed PMID: 10216105.
46. Séité P, Hillion J, d'Agay MF, Gaulard P, Cazals D, Badoux F, et al. BCL2 gene activation and protein expression in follicular lymphoma: a report on 64 cases. *Leukemia*. 1993;7(3):410-7. PubMed PMID: 8383256.

47. Bierman PJ, Sweetenham JW, Loberiza FR, Taghipour G, Lazarus HM, Rizzo JD, et al. Syngeneic hematopoietic stem-cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a comparison with allogeneic and autologous transplantation--The Lymphoma Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol.* 2003;21(20):3744-53. doi: 10.1200/JCO.2003.08.054. PubMed PMID: 12963703.
48. Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V, et al. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood.* 2009;114(4):826-34. doi: blood-2009-01-198580 [pii] 10.1182/blood-2009-01-198580. PubMed PMID: 19471018; PubMed Central PMCID: PMC2716022.
49. Jardin F, Gaulard P, Buchonnet G, Contentin N, Leprêtre S, Lenain P, 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. doi: 10.1038/sj.leu.2402707. PubMed PMID: 12399977.
50. Godon A, Moreau A, Talmant P, Baranger-Papot L, Geneviève F, Milpied N, et al. Is t(14;18)(q32;q21) a constant finding in follicular lymphoma? An interphase FISH study on 63 patients. *Leukemia.* 2003;17(1):255-9. doi: 10.1038/sj.leu.2402739. PubMed PMID: 12529690.
51. Schüler F, Dölken L, Hirt C, Kiefer T, Berg T, Fusch G, et al. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int J Cancer.* 2009;124(4):958-63. doi: 10.1002/ijc.23958. PubMed PMID: 19030176.
52. Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, Price CG, Young BD, van Ommen GJ, et al. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene.* 1991;6(12):2271-6. PubMed PMID: 1766674.
53. 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. doi: 10.1038/sj.leu.2404035. PubMed PMID: 16307019.
54. 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. doi: 10.1038/349254a0. PubMed PMID: 1987477.
55. Strasser A, Harris AW, Cory S. E mu-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulin-secreting cells but not T cells. *Oncogene.* 1993;8(1):1-9. PubMed PMID: 8423986.
56. Staudt LM. A closer look at follicular lymphoma. *N Engl J Med.* 2007;356(7):741-2. doi: 10.1056/NEJMcibr067155. PubMed PMID: 17301308.
57. Höglund M, Sehn L, Connors JM, Gascoyne RD, Siebert R, Säll T, et al. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;39(3):195-204. doi: 10.1002/gcc.10314. PubMed PMID: 14732921.
58. Viardot A, Möller P, Högel J, Werner K, Mechttersheimer G, Ho AD, et al. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002;20(23):4523-30. PubMed PMID: 12454108.
59. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, Lenormand B, Bigorgne C, Kunlin A, et al. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood.* 1994;84(4):1043-9. PubMed PMID: 8049424.

60. Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med.* 1987;316(2):79-84. doi: 10.1056/NEJM198701083160204. PubMed PMID: 3537802.
61. Roulland S, Navarro JM, Grenot P, Milili M, Agopian J, Montpellier B, et al. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med.* 2006;203(11):2425-31. doi: 10.1084/jem.20061292. PubMed PMID: 17043145; PubMed Central PMCID: PMCPMC2118129.
62. Ruminy P, Jardin F, Picquenot JM, Parmentier F, Contentin N, Buchonnet G, et al. S(mu) mutation patterns suggest different progression pathways in follicular lymphoma: early direct or late from FL progenitor cells. *Blood.* 2008;112(5):1951-9. doi: 10.1182/blood-2007-11-124560. PubMed PMID: 18515657.
63. Winter JN, Gascoyne RD, Van Besien K. Low-grade lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:203-20. doi: 10.1182/asheducation-2004.1.203. PubMed PMID: 15561684.
64. Giannelli F, Moscarella S, Giannini C, Caini P, Monti M, Gragnani L, et al. Effect of antiviral treatment in patients with chronic HCV infection and t(14;18) translocation. *Blood.* 2003;102(4):1196-201. doi: 10.1182/blood-2002-05-1537. PubMed PMID: 12689948.
65. 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. PubMed PMID: 11895794.
66. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 2009;459(7247):717-21. doi: nature07968 [pii] 10.1038/nature07968. PubMed PMID: 19412164; PubMed Central PMCID: PMCPMC2973325.
67. Irish JM, Czerwinski DK, Nolan GP, Levy R. Kinetics of B cell receptor signaling in human B cell subsets mapped by phosphospecific flow cytometry. *J Immunol.* 2006;177(3):1581-9. PubMed PMID: 16849466.
68. 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;108(13):4156-62. doi: 10.1182/blood-2006-05-026203. PubMed PMID: 16912221.
69. Küppers R. Prognosis in follicular lymphoma--it's in the microenvironment. *N Engl J Med.* 2004;351(21):2152-3. doi: 10.1056/NEJMp048257. PubMed PMID: 15548773.
70. Noonan K, Borrello I. The immune microenvironment of myeloma. *Cancer Microenviron.* 2011;4(3):313-23. doi: 10.1007/s12307-011-0086-3. PubMed PMID: 21866321; PubMed Central PMCID: PMCPMC3234331.
71. Braga WM, Atanackovic D, Colleoni GW. The role of regulatory T cells and TH17 cells in multiple myeloma. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:293479. doi: 10.1155/2012/293479. PubMed PMID: 22489248; PubMed Central PMCID: PMCPMC3318676.
72. Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:96-103. doi: 10.1182/asheducation-2011.1.96. PubMed PMID: 22160019.
73. Audrito V, Vaisitti T, Serra S, Bologna C, Brusa D, Malavasi F, et al. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia offers novel therapeutic options. *Cancer Lett.* 2013;328(1):27-35. doi: 10.1016/j.canlet.2012.08.012. PubMed PMID: 22910767.

74. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57. doi: 10.1038/35025220. PubMed PMID: 11001068.
75. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*. 1971;133(2):275-88. PubMed PMID: 4332371; PubMed Central PMCID: PMCPMC2138906.
76. Folkman J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev*. 1990;9(3):171-4. PubMed PMID: 1705485.
77. Vacca A, Ribatti D, Fanelli M, Costantino F, Nico B, Di Stefano R, et al. Expression of tenascin is related to histologic malignancy and angiogenesis in b-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 1996;22(5-6):473-81. doi: 10.3109/10428199609054786. PubMed PMID: 8882961.
78. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Fanelli M, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Eur J Haematol*. 1996;56(1-2):45-53. PubMed PMID: 8599993.
79. Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H. A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90(8):3167-72. PubMed PMID: 9376599.
80. Fruchon S, Kheirallah S, Al Saati T, Ysebaert L, Laurent C, Leseux L, et al. Involvement of the Syk-mTOR pathway in follicular lymphoma cell invasion and angiogenesis. *Leukemia*. 2012;26(4):795-805. doi: 10.1038/leu.2011.248. PubMed PMID: 21926965.
81. Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane W, et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest*. 2000;106(4):511-21. doi: 10.1172/JCI8978. PubMed PMID: 10953026; PubMed Central PMCID: PMCPMC380247.
82. Jørgensen JM, Sørensen FB, Bendix K, Nielsen JL, Funder A, Karkkainen MJ, 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(10):1647-60. doi: 10.1080/10428190903156729. PubMed PMID: 19701853.
83. Labidi SI, Ménétrier-Caux C, Chabaud S, Chassagne C, Sebban C, Gargi T, et al. Serum cytokines in follicular lymphoma. Correlation of TGF- β and VEGF with survival. *Ann Hematol*. 2010;89(1):25-33. doi: 10.1007/s00277-009-0777-8. PubMed PMID: 19582455.
84. Lewis CE, De Palma M, Naldini L. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res*. 2007;67(18):8429-32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1684. PubMed PMID: 17875679.
85. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(15):8104-9. PubMed PMID: 9223322; PubMed Central PMCID: PMCPMC21564.
86. Stewart M, Talks K, Leek R, Turley H, Pezzella F, Harris A, et al. Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*. 2002;40(3):253-60. doi: 1357 [pii]. PubMed PMID: 11895491.
87. Evens AM, Schumacker PT, Helenowski IB, Singh AT, Dokic D, Keswani A, et al. Hypoxia inducible factor-alpha activation in lymphoma and relationship to the thioredoxin family. *Br J Haematol*. 2008;141(5):676-80. doi: BJH7093 [pii] 10.1111/j.1365-2141.2008.07093.x. PubMed PMID: 18422776; PubMed Central PMCID: PMCPMC2894542.

88. Evens AM, Sehn LH, Farinha P, Nelson BP, Raji A, Lu Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} expression predicts superior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2010;28(6):1017-24. doi: JCO.2009.24.1893 [pii] 10.1200/JCO.2009.24.1893. PubMed PMID: 20048181; PubMed Central PMCID: PMCPMC2834428.
89. Dușe AO, Ceașu RA, Cîmpean AM, Ioniță H, Raica M, Gaje P. Heterogeneity of malignant non-Hodgkin lymphoma-associated blood vessels. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53(4):985-8. PubMed PMID: 23303022.
90. Koster A, van Krieken JH, Mackenzie MA, Schraders M, Borm GF, van der Laak JA, et al. Increased vascularization predicts favorable outcome in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(1):154-61. PubMed PMID: 15671540.
91. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*. 2006;441(7095):890-3. doi: 10.1038/nature04790. PubMed PMID: 16778891; PubMed Central PMCID: PMCPMC2776073.
92. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29(8):1093-102. doi: 10.1038/onc.2009.416. PubMed PMID: 19946335.
93. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde BJ, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Immunol*. 2007;178(5):2617-21. PubMed PMID: 17312099.
94. Leger-Ravet MB, Devergne O, Peuchmaur M, Solal-Celigny P, Brousse N, Gaulard P, et al. In situ detection of activated cytotoxic cells in follicular lymphomas. *Am J Pathol*. 1994;144(3):492-9. PubMed PMID: 7510456; PubMed Central PMCID: PMCPMC1887084.
95. Wahlin BE, Sander B, Christensson B, Kimby E. CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 Pt 1):388-97. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1734. PubMed PMID: 17255259.
96. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, Lopez C, Jaén J, Bosch R, et al. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol*. 2006;24(34):5350-7. doi: 10.1200/JCO.2006.06.4766. PubMed PMID: 17135637.
97. Laurent C, Müller S, Do C, Al-Saati T, Allart S, Larocca LM, et al. Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study. *Blood*. 2011;118(20):5371-9. doi: 10.1182/blood-2011-04-345777. PubMed PMID: 21856865.
98. Wahlin BE, Aggarwal M, Montes-Moreno S, Gonzalez LF, Roncador G, Sanchez-Verde L, et al. A unifying microenvironment model in follicular lymphoma: outcome is predicted by programmed death-1--positive, regulatory, cytotoxic, and helper T cells and macrophages. *Clin Cancer Res*. 2010;16(2):637-50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2487. PubMed PMID: 20068089.
99. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999;59(13):3128-33. PubMed PMID: 10397255.
100. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 1999;163(10):5211-8. PubMed PMID: 10553041.

101. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10(9):942-9. doi: 10.1038/nm1093. PubMed PMID: 15322536.
102. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, Villamor N, Colomo L, Martinez A, et al. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(9):1470-6. doi: 10.1200/JCO.2008.18.0513. PubMed PMID: 19224853.
103. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood.* 2006;108(9):2957-64. doi: 10.1182/blood-2006-04-018218. PubMed PMID: 16825494.
104. Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, Davies AJ, Jordan S, MacDougall F, et al. Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol.* 2006;24(31):5052-9. doi: 10.1200/JCO.2006.06.4642. PubMed PMID: 17033038.
105. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Attenuation of CD8(+) T-cell function by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 2006;66(20):10145-52. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1822. PubMed PMID: 17047079; PubMed Central PMCID: PMCPMC2680600.
106. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2006;107(9):3639-46. doi: 10.1182/blood-2005-08-3376. PubMed PMID: 16403912; PubMed Central PMCID: PMCPMC1895773.
107. Hilchey SP, De A, Rimsza LM, Bankert RB, Bernstein SH. Follicular lymphoma intratumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells. *J Immunol.* 2007;178(7):4051-61. PubMed PMID: 17371959.
108. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev.* 2006;214:73-91. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x. PubMed PMID: 17100877.
109. Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, Chaput N, Zitvogel L. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol.* 2008;9(5):486-94. doi: 10.1038/ni1580. PubMed PMID: 18425105.
110. Rey J, Veuillen C, Vey N, Bouabdallah R, Olive D. Natural killer and gammadelta T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors. *Trends Mol Med.* 2009;15(6):275-84. doi: 10.1016/j.molmed.2009.04.005. PubMed PMID: 19487160.
111. Perambakam S, Naresh K, Nerurkar A, Nadkarni J. Intra-tumoral cytolytic cells: pattern of distribution in B-cell non Hodgkin s lymphoma. *Pathol Oncol Res.* 2000;6(2):114-7. PubMed PMID: 10936786.
112. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science.* 2001;294(5542):605-9. doi: 10.1126/science.1063916. PubMed PMID: 11567106.
113. Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol.* 2005;175(4):2144-51. PubMed PMID: 16081780.
114. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood.* 2003;102(1):200-6. doi: 10.1182/blood-2002-12-3665. PubMed PMID: 12623838.

115. Zocchi MR, Ferrarini M, Rugarli C. Selective lysis of the autologous tumor by delta TCS1+ gamma/delta+ tumor-infiltrating lymphocytes from human lung carcinomas. *Eur J Immunol.* 1990;20(12):2685-9. doi: 10.1002/eji.1830201224. PubMed PMID: 1702723.
116. Choudhary A, Davodeau F, Moreau A, Peyrat MA, Bonneville M, Jotereau F. Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol.* 1995;154(8):3932-40. PubMed PMID: 7706731.
117. Kuriyama Y, Kawanishi Y, Otawa M, Utsumi K, Ohyashiki K. Circulating and tumor-infiltrating gamma delta T Cells in patients with B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2000;39(3-4):321-7. doi: 10.3109/10428190009065831. PubMed PMID: 11342312.
118. Braza MS, Caraux A, Rousset T, Lafaye de Micheaux S, Sicard H, Squiban P, et al. gammadelta T lymphocytes count is normal and expandable in peripheral blood of patients with follicular lymphoma, whereas it is decreased in tumor lymph nodes compared with inflammatory lymph nodes. *J Immunol.* 2010;184(1):134-40. doi: 10.4049/jimmunol.0901980. PubMed PMID: 19949101.
119. Sicard H, Al Saati T, Delsol G, Fournié JJ. Synthetic phosphoantigens enhance human Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes killing of non-Hodgkin's B lymphoma. *Mol Med.* 2001;7(10):711-22. PubMed PMID: 11713370; PubMed Central PMCID: PMC1950000.
120. Trentin L, Cabrelle A, Facco M, Carollo D, Miorin M, Tosoni A, et al. Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas. *Blood.* 2004;104(2):502-8. doi: 10.1182/blood-2003-09-3103. PubMed PMID: 15001469.
121. He B, Chadburn A, Jou E, Schattner EJ, Knowles DM, Cerutti A. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J Immunol.* 2004;172(5):3268-79. PubMed PMID: 14978135.
122. Epron G, Ame-Thomas P, Le Priol J, Pangault C, Dulong J, Lamy T, et al. Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia.* 2012;26(1):139-48. doi: 10.1038/leu.2011.179. PubMed PMID: 21788945.
123. Whitworth PW, Pak CC, Esgro J, Kleinerman ES, Fidler IJ. Macrophages and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 1990;8(4):319-51. PubMed PMID: 2182211.
124. Lawrence T. Inflammation and cancer: a failure of resolution? *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(4):162-5. doi: 10.1016/j.tips.2007.02.003. PubMed PMID: 17331592.
125. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011;121(3):985-97. doi: 10.1172/JCI44490. PubMed PMID: 21317534; PubMed Central PMCID: PMC3049372.
126. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-95. doi: 10.1172/JCI59643. PubMed PMID: 22378047; PubMed Central PMCID: PMC3287223.
127. Clear AJ, Lee AM, Calaminici M, Ramsay AG, Morris KJ, Hallam S, et al. Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. *Blood.* 2010;115(24):5053-6. doi: 10.1182/blood-2009-11-253260. PubMed PMID: 20375314; PubMed Central PMCID: PMC2890144.
128. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, Shumansky K, Spinelli JJ, Gill K, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood.* 2005;106(6):2169-74. doi: 10.1182/blood-2005-04-1565. PubMed PMID: 15933054.

129. Alvaro T, Lejeune M, Camacho FI, Salvadó MT, Sánchez L, García JF, et al. The presence of STAT1-positive tumor-associated macrophages and their relation to outcome in patients with follicular lymphoma. *Haematologica*. 2006;91(12):1605-12. PubMed PMID: 17145596.
130. Canioni D, Salles G, Mounier N, Brousse N, Keuppens M, Morchhauser F, et al. High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial. *J Clin Oncol*. 2008;26(3):440-6. doi: 10.1200/JCO.2007.12.8298. PubMed PMID: 18086798.
131. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Nyman H, Eerola LM, Leppä S. A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clin Cancer Res*. 2007;13(19):5784-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0778. PubMed PMID: 17908969.
132. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3424-31. doi: 10.1172/JCI63186. PubMed PMID: 23023713; PubMed Central PMCID: PMC3461914.
133. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):836-48. doi: 10.1038/nri1961. PubMed PMID: 17063185.
134. Buell JF, Gross TG, Woodle ES. Malignancy after transplantation. *Transplantation*. 2005;80(2 Suppl):S254-64. PubMed PMID: 16251858.
135. Bruyand M, Dabis F, Vandenhende MA, Lazaro E, Neau D, Leleux O, et al. HIV-induced immune deficiency is associated with a higher risk of hepatocarcinoma, ANRS CO3 Aquitaine Cohort, France, 1998-2008. *J Hepatol*. 2011;55(5):1058-62. doi: 10.1016/j.jhep.2011.02.017. PubMed PMID: 21354449.
136. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306. doi: 10.1038/nrc3245. PubMed PMID: 22419253.
137. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1137-46. doi: 10.1172/JCI31405. PubMed PMID: 17476343; PubMed Central PMCID: PMC1857231.
138. Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S. beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest*. 1998;101(12):2720-9. doi: 10.1172/JCI498. PubMed PMID: 9637706; PubMed Central PMCID: PMC508863.
139. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994;263(5154):1759-62. PubMed PMID: 7510905.
140. Bladergroen BA, Meijer CJ, ten Berge RL, Hack CE, Muris JJ, Dukers DF, et al. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood*. 2002;99(1):232-7. PubMed PMID: 11756176.
141. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):715-27. doi: 10.1038/nri1936. PubMed PMID: 16977338.
142. Jordanova ES, Riemersma SA, Filippo K, Schuurin E, Kluin PM. Beta2-microglobulin aberrations in diffuse large B-cell lymphoma of the testis and the central

- nervous system. *Int J Cancer*. 2003;103(3):393-8. doi: 10.1002/ijc.10824. PubMed PMID: 12471623.
143. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, Holmes AB, Bhagat G, Murty VV, et al. Combined genetic inactivation of β 2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2011;20(6):728-40. doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.006. PubMed PMID: 22137796.
144. Lehmann C, Zeis M, Schmitz N, Uharek L. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood*. 2000;96(2):594-600. PubMed PMID: 10887123.
145. O'Connell J, Houston A, Bennett MW, O'Sullivan GC, Shanahan F. Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. *Nat Med*. 2001;7(3):271-4. doi: 10.1038/85395. PubMed PMID: 11231613.
146. Ai WZ, Hou JZ, Zeiser R, Czerwinski D, Negrin RS, Levy R. Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Int J Cancer*. 2009;124(1):239-44. doi: 10.1002/ijc.23881. PubMed PMID: 18814264; PubMed Central PMCID: PMCPMC2631275.
147. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med*. 2001;7(12):1339-46. doi: 10.1038/nm1201-1339. PubMed PMID: 11726975.
148. Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, Niki T, Hirashima M, Novak AJ, et al. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1271-82. doi: 10.1172/JCI59806. PubMed PMID: 22426209; PubMed Central PMCID: PMCPMC3314462.
149. Ramsay AG, Clear AJ, Kelly G, Fatah R, Matthews J, Macdougall F, et al. Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood*. 2009;114(21):4713-20. doi: 10.1182/blood-2009-04-217687. PubMed PMID: 19786615; PubMed Central PMCID: PMCPMC2780306.
150. Guadagnolo BA, Li S, Neuberger D, Ng A, Hua L, Silver B, et al. Long-term outcome and mortality trends in early-stage, Grade 1-2 follicular lymphoma treated with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;64(3):928-34. doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.08.010. PubMed PMID: 16243446.
151. 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. doi: 10.1200/JCO.2004.10.086. PubMed PMID: 15024027.
152. Ardeshtna KM, Smith P, Norton A, Hancock BW, Hoskin PJ, MacLennan KA, et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;362(9383):516-22. PubMed PMID: 12932382.
153. Brice P, Bastion Y, Lepage E, Brousse N, Haioun C, Moreau P, et al. Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol*. 1997;15(3):1110-7. PubMed PMID: 9060552.
154. Ruiz-Soto R, Sergent G, Gisselbrecht C, Larghero J, Ertault M, Hennequin C, et al. Estimating late adverse events using competing risks after autologous stem-cell transplantation in aggressive non-Hodgkin lymphoma patients. *Cancer*. 2005;104(12):2735-42. doi: 10.1002/cncr.21492. PubMed PMID: 16284986.

155. Keating GM. Rituximab: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, low-grade or follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Drugs*. 2010;70(11):1445-76. doi: 10.2165/11201110-000000000-00000. PubMed PMID: 20614951.
156. 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 Mol Dis*. 2000;26(2):133-43. doi: 10.1006/bcmd.2000.0287. PubMed PMID: 10753604.
157. Kheirallah S, Caron P, Gross E, Quillet-Mary A, Bertrand-Michel J, Fournié JJ, et al. Rituximab inhibits B-cell receptor signaling. *Blood*. 2010;115(5):985-94. doi: 10.1182/blood-2009-08-237537. PubMed PMID: 19965664.
158. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene*. 2007;26(25):3629-36. doi: 10.1038/sj.onc.1210365. PubMed PMID: 17530016.
159. Iqbal J, Liu Z, Deffenbacher K, Chan WC. Gene expression profiling in lymphoma diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22(2):191-210. doi: 10.1016/j.beha.2009.05.001. PubMed PMID: 19698928.
160. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2008;359(6):613-26. doi: 10.1056/NEJMra0708875. PubMed PMID: 18687642.
161. Cheung MC, Haynes AE, Meyer RM, Stevens A, Imrie KR, Members of the Hematology DsSGotCCOPiE-BC. Rituximab in lymphoma: a systematic review and consensus practice guideline from Cancer Care Ontario. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(2):161-76. doi: 10.1016/j.ctrv.2006.10.005. PubMed PMID: 17240533.
162. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H, et al. Acquirement 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. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1254. PubMed PMID: 18316581.
163. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res*. 2007;67(3):1270-81. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2184. PubMed PMID: 17283164.
164. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, Nakamura S, 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. doi: 10.1182/blood-2008-08-175208. PubMed PMID: 19246561.
165. 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;111(1):285-91. doi: 10.1182/blood-2007-04-085092. PubMed PMID: 17855629.
166. 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 FcgammaRIIIa gene. *Blood*. 2002;99(3):754-8. PubMed PMID: 11806974.
167. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res*. 2004;64(13):4664-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2862. PubMed PMID: 15231679.
168. 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. *Leuk Res*. 2006;30(5):625-31. doi: 10.1016/j.leukres.2005.09.008. PubMed PMID: 16289746.

169. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*. 2002;99(5):1517-26. PubMed PMID: 11861263.
170. Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, Janik JE, Muggia FM, Gockerman JP, et al. Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(20):2787-94. doi: 10.1200/JCO.2010.33.3005. PubMed PMID: 21632504; PubMed Central PMCID: PMC3139394.
171. O'Connor OA. Marked clinical activity of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with follicular and mantle-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2005;6(3):191-9. doi: 10.3816/CLM.2005.n.046. PubMed PMID: 16354324.
172. M. K, L. P, AP. N. A phase II study of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in relapsed or refractory indolent non Hodgkin's lymphoma. A California Cancer Consortium Study [Abstract]. *Blood*. 2008.
173. Lheureux S, Le Moulec S. [Molecules involved in apoptosis regulation as therapeutic targets in oncology]. *Bull Cancer*. 2011;98(9):1029-36. doi: 10.1684/bdc.2011.1381. PubMed PMID: 21700547.
174. Friedberg JW, Cohen P, Chen L, Robinson KS, Forero-Torres A, La Casce AS, et al. Bendamustine in patients with rituximab-refractory indolent and transformed non-Hodgkin's lymphoma: results from a phase II multicenter, single-agent study. *J Clin Oncol*. 2008;26(2):204-10. doi: 10.1200/JCO.2007.12.5070. PubMed PMID: 18182663.
175. Reeder CB, Ansell SM. Novel therapeutic agents for B-cell lymphoma: developing rational combinations. *Blood*. 2011;117(5):1453-62. doi: 10.1182/blood-2010-06-255067. PubMed PMID: 20978267.
176. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11. doi: 10.1038/35000501. PubMed PMID: 10676951.
177. Pont F., Tosolini M., Ycart B., J.J. F. nwCompare and AutoCompare Softwares for Proteomics and Transcriptomics Data Mining – Application to the Exploration of Gene Expression Profiles of Aggressive Lymphomas Integrative proteomics [Internet]. 2012.
178. Rosenwald A, Staudt LM. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003;44 Suppl 3:S41-7. PubMed PMID: 15202524.
179. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*. 2002;8(1):68-74. doi: 10.1038/nm0102-68. PubMed PMID: 11786909.
180. Husson H, Carideo EG, Neuberg D, Schultze J, Munoz O, Marks PW, et al. Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood*. 2002;99(1):282-9. PubMed PMID: 11756183.
181. Bohlen SP, Troyanskaya OG, Alter O, Warnke R, Botstein D, Brown PO, et al. Variation in gene expression patterns in follicular lymphoma and the response to rituximab. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):1926-30. doi: 10.1073/pnas.0437875100. PubMed PMID: 12571354; PubMed Central PMCID: PMC3149935.
182. Glas AM, Knoops L, Delahaye L, Kersten MJ, Kibbelaar RE, Wessels LA, et al. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25(4):390-8. doi: 10.1200/JCO.2006.06.1648. PubMed PMID: 17200149.
183. Davies AJ, Rosenwald A, Wright G, Lee A, Last KW, Weisenburger DD, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct

- oncogenic mechanisms. *Br J Haematol.* 2007;136(2):286-93. PubMed PMID: 17278262; PubMed Central PMCID: PMCPMC2532951.
184. Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, Witteveen AT, Kibbelaar RE, Velds A, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood.* 2005;105(1):301-7. doi: 10.1182/blood-2004-06-2298. PubMed PMID: 15345589.
185. Loi TH, Campain A, Bryant A, Molloy TJ, Lutherborrow M, Turner J, et al. Discriminating lymphomas and reactive lymphadenopathy in lymph node biopsies by gene expression profiling. *BMC Med Genomics.* 2011;4:27. doi: 10.1186/1755-8794-4-27. PubMed PMID: 21453471; PubMed Central PMCID: PMCPMC3080274.
186. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med.* 2004;351(21):2159-69. doi: 10.1056/NEJMoa041869. PubMed PMID: 15548776.
187. Janikova A, Tichy B, Supikova J, Stano-Kozubik K, Pospisilova S, Kren L, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma and its implication for clinical practice. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(1):59-68. doi: 10.3109/10428194.2010.531412. PubMed PMID: 21133732.
188. Harjunpää A, Taskinen M, Nykter M, Karjalainen-Lindsberg ML, Nyman H, Monni O, et al. Differential gene expression in non-malignant tumour microenvironment is associated with outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and CHOP. *Br J Haematol.* 2006;135(1):33-42. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06255.x. PubMed PMID: 16925574.
189. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346(25):1937-47. doi: 10.1056/NEJMoa012914. PubMed PMID: 12075054.
190. Björck E, Ek S, Landgren O, Jerkeman M, Ehinger M, Björkholm M, et al. High expression of cyclin B1 predicts a favorable outcome in patients with follicular lymphoma. *Blood.* 2005;105(7):2908-15. doi: 10.1182/blood-2004-07-2721. PubMed PMID: 15576476.
191. Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1970;18(5):491-5. PubMed PMID: 5316564.
192. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1971;46(1):113-20. PubMed PMID: 5101993.
193. Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA. Phytohemagglutinin (PHA)-induced transformation of lymphocytes from patients with cancer. *Cancer.* 1971;27(3):574-8. PubMed PMID: 5279329.
194. Vamvakidou AP, Mondrinos MJ, Petushi SP, Garcia FU, Lelkes PI, Tozeren A. Heterogeneous breast tumoroids: An in vitro assay for investigating cellular heterogeneity and drug delivery. *J Biomol Screen.* 2007;12(1):13-20. doi: 10.1177/1087057106296482. PubMed PMID: 17166827.
195. Boyd M, Mairs SC, Stevenson K, Livingstone A, Clark AM, Ross SC, et al. Transfectant mosaic spheroids: a new model for evaluation of tumour cell killing in targeted radiotherapy and experimental gene therapy. *J Gene Med.* 2002;4(5):567-76. doi: 10.1002/jgm.293. PubMed PMID: 12221650.
196. Boyd M, Mairs RJ, Keith WN, Ross SC, Welsh P, Akabani G, et al. An efficient targeted radiotherapy/gene therapy strategy utilising human telomerase promoters and

- radioastatine and harnessing radiation-mediated bystander effects. *J Gene Med.* 2004;6(8):937-47. doi: 10.1002/jgm.578. PubMed PMID: 15293352.
197. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen.* 2006;11(8):922-32. doi: 10.1177/1087057106292763. PubMed PMID: 16973921.
198. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol.* 2007;83(11-12):849-71. doi: 10.1080/09553000701727531. PubMed PMID: 18058370.
199. Hicks KO, Ohms SJ, van Zijl PL, Denny WA, Hunter PJ, Wilson WR. An experimental and mathematical model for the extravascular transport of a DNA intercalator in tumours. *Br J Cancer.* 1997;76(7):894-903. PubMed PMID: 9328149; PubMed Central PMCID: PMCPMC2228074.
200. Padrón JM, van der Wilt CL, Smid K, Smitskamp-Wilms E, Backus HH, Pizao PE, et al. The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;36(2-3):141-57. PubMed PMID: 11033303.
201. Tannock IF, Lee CM, Tunggal JK, Cowan DS, Egorin MJ. Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2002;8(3):878-84. PubMed PMID: 11895922.
202. Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol.* 1999;1(5):E131-8. doi: 10.1038/13043. PubMed PMID: 10559956.
203. Dike LE, Chen CS, Mrksich M, Tien J, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999;35(8):441-8. doi: 10.1007/s11626-999-0050-4. PubMed PMID: 10501083.
204. Gudjonsson T, Rønnov-Jessen L, Villadsen R, Bissell MJ, Petersen OW. To create the correct microenvironment: three-dimensional heterotypic collagen assays for human breast epithelial morphogenesis and neoplasia. *Methods.* 2003;30(3):247-55. PubMed PMID: 12798139; PubMed Central PMCID: PMCPMC2933212.
205. Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(9):675-88. doi: 10.1038/nrc1695. PubMed PMID: 16148884.
206. Muralidhar RV, G. J, P. S. Development of high-density cultivation systems by bioencapsulation. . *CURRENT SCIENCE*, VOL. 81, N° 3; 10 AUGUST 2001.
207. Ochs RL, Fensterer J, Ohori NP, Wells A, Gabrin M, George LD, et al. Evidence for the isolation, growth, and characterization of malignant cells in primary cultures of human tumors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003;39(1-2):63-70. doi: 10.1290/1543-706X(2003)0392.0.CO;2. PubMed PMID: 12892529.
208. Berglund A, Glimelius B, Bergh J, Brodin O, Fjällskog ML, Hagberg H, et al. Selection of chemotherapy by ex vivo assessment of tumor sensitivity to cytotoxic drugs: results of a clinical trial. *Med Oncol.* 2002;19(3):151-9. doi: 10.1385/MO:19:3:151. PubMed PMID: 12482125.
209. Nygren P, Kristensen J, Jonsson B, Sundström C, Lönnnerholm G, Kreuger A, et al. Feasibility of the fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA) for cytotoxic drug sensitivity testing of tumor cells from patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1992;6(11):1121-8. PubMed PMID: 1434793.
210. Gillies RJ, Galons JP, McGovern KA, Scherer PG, Lien YH, Job C, et al. Design and application of NMR-compatible bioreactor circuits for extended perfusion of high-density mammalian cell cultures. *NMR Biomed.* 1993;6(1):95-104. PubMed PMID: 8457432.

211. C. L, B. D, E. D. Bioartificial livers (BAL): current technological aspects and future developments. 15 January 2001;181:14. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)00539-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0376-7388(00)00539-1).
212. Dulong JL, Legallais C, Darquy S, Reach G. A novel model of solute transport in a hollow-fiber bioartificial pancreas based on a finite element method. *Biotechnol Bioeng.* 2002;78(5):576-82. doi: 10.1002/bit.10230. PubMed PMID: 12115127.
213. Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1987;113(2):101-22. PubMed PMID: 3549738.
214. Carlsson J, Yuhas JM. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 1984;95:1-23. PubMed PMID: 6396753.
215. Tong JZ, De Lagausie P, Furlan V, Cresteil T, Bernard O, Alvarez F. Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids. *Exp Cell Res.* 1992;200(2):326-32. PubMed PMID: 1572400.
216. Hoewel T, Macek R, Swisshelm K, Kubbies M. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *Int J Cancer.* 2004;108(3):374-83. doi: 10.1002/ijc.11571. PubMed PMID: 14648703.
217. Korff T, Augustin HG. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol.* 1998;143(5):1341-52. PubMed PMID: 9832561; PubMed Central PMCID: PMCPMC2133072.
218. Timmins NE, Nielsen LK. Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol Med.* 2007;140:141-51. PubMed PMID: 18085207.
219. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng.* 2003;83(2):173-80. doi: 10.1002/bit.10655. PubMed PMID: 12768623.
220. Del Duca D, Werbowetski T, Del Maestro RF. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *J Neurooncol.* 2004;67(3):295-303. PubMed PMID: 15164985.
221. Mueller-Klieser W. Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;36(2-3):123-39. PubMed PMID: 11033302.
222. Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland RM. Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *Br J Cancer.* 1987;56(3):325-7. PubMed PMID: 3311111; PubMed Central PMCID: PMCPMC2002210.
223. Carlsson J, Acker H. Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *Int J Cancer.* 1988;42(5):715-20. PubMed PMID: 3182108.
224. Bredel-Geissler A, Karbach U, Walenta S, Vollrath L, Mueller-Klieser W. Proliferation-associated oxygen consumption and morphology of tumor cells in monolayer and spheroid culture. *J Cell Physiol.* 1992;153(1):44-52. doi: 10.1002/jcp.1041530108. PubMed PMID: 1522135.
225. Walenta S, Dötsch J, Mueller-Klieser W. ATP concentrations in multicellular tumor spheroids assessed by single photon imaging and quantitative bioluminescence. *Eur J Cell Biol.* 1990;52(2):389-93. PubMed PMID: 2081538.
226. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol.* 2010;148(1):3-15. doi: S0168-1656(10)00039-8 [pii] 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012. PubMed PMID: 20097238.
227. De Witt Hamer PC, Van Tilborg AA, Eijk PP, Sminia P, Troost D, Van Noorden CJ, et al. The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture

- and preserved in spheroids. *Oncogene*. 2008;27(14):2091-6. doi: 10.1038/sj.onc.1210850. PubMed PMID: 17934519.
228. Zietarska M, Maugard CM, Filali-Mouhim A, Alam-Fahmy M, Tonin PN, Provencher DM, et al. Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Mol Carcinog*. 2007;46(10):872-85. doi: 10.1002/mc.20315. PubMed PMID: 17455221.
229. Cody NA, Zietarska M, Filali-Mouhim A, Provencher DM, Mes-Masson AM, Tonin PN. Influence of monolayer, spheroid, and tumor growth conditions on chromosome 3 gene expression in tumorigenic epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Med Genomics*. 2008;1:34. doi: 10.1186/1755-8794-1-34. PubMed PMID: 18687136; PubMed Central PMCID: PMCPMC2519080.
230. Chang TT, Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(3):559-67. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0434. PubMed PMID: 18724832.
231. Shimada M, Yamashita Y, Tanaka S, Shirabe K, Nakazawa K, Ijima H, et al. Characteristic gene expression induced by polyurethane foam/spheroid culture of hepatoma cell line, Hep G2 as a promising cell source for bioartificial liver. *Hepatogastroenterology*. 2007;54(75):814-20. PubMed PMID: 17591070.
232. Oloumi A, Lam W, Banáth JP, Olive PL. Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *Int J Radiat Biol*. 2002;78(6):483-92. doi: 10.1080/09553000210122299. PubMed PMID: 12065053.
233. Timmins NE, Maguire TL, Grimmond SM, Nielsen LK. Identification of three gene candidates for multicellular resistance in colon carcinoma. *Cytotechnology*. 2004;46(1):9-18. doi: 10.1007/s10616-005-1476-5. PubMed PMID: 19003254; PubMed Central PMCID: PMCPMC3449472.
234. Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M, et al. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *J Cell Physiol*. 2005;204(2):522-31. doi: 10.1002/jcp.20320. PubMed PMID: 15744745.
235. Orlandi P, Barbara C, Bocci G, Fioravanti A, Di Paolo A, Del Tacca M, et al. Idarubicin and idarubicinol effects on breast cancer multicellular spheroids. *J Chemother*. 2005;17(6):663-7. PubMed PMID: 16433198.
236. Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R, et al. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen*. 2007;12(7):925-37. doi: 10.1177/1087057107306839. PubMed PMID: 17942785.
237. Sutherland RM, Durand RE. Cell contact as a possible contribution to radiation resistance of some tumours. *Br J Radiol*. 1972;45(538):788-9. PubMed PMID: 4672981.
238. Weigelt B, Lo AT, Park CC, Gray JW, Bissell MJ. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122(1):35-43. doi: 10.1007/s10549-009-0502-2. PubMed PMID: 19701706; PubMed Central PMCID: PMCPMC2935800.
239. Weaver VM, Lelièvre S, Lakins JN, Chrenek MA, Jones JC, Giancotti F, et al. beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*. 2002;2(3):205-16. PubMed PMID: 12242153; PubMed Central PMCID: PMCPMC2788997.
240. Thurber GM, Wittrup KD. Quantitative spatiotemporal analysis of antibody fragment diffusion and endocytic consumption in tumor spheroids. *Cancer Res*. 2008;68(9):3334-41.

- doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3018. PubMed PMID: 18451160; PubMed Central PMCID: PMC2831542.
241. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(8):583-92. doi: 10.1038/nrc1893. PubMed PMID: 16862189.
242. Overgaard J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol*. 2007;25(26):4066-74. doi: 10.1200/JCO.2007.12.7878. PubMed PMID: 17827455.
243. Wang JH, Wu QD, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Hypoxia upregulates Bcl-2 expression and suppresses interferon-gamma induced antiangiogenic activity in human tumor derived endothelial cells. *Cancer*. 2002;94(10):2745-55. PubMed PMID: 12173346.
244. Yang TM, Barbone D, Fennell DA, Broaddus VC. Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(1):14-23. doi: 10.1165/rcmb.2008-0320OC. PubMed PMID: 19097992; PubMed Central PMCID: PMC2701959.
245. Mellor HR, Ferguson DJ, Callaghan R. A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs. *Br J Cancer*. 2005;93(3):302-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6602710. PubMed PMID: 16052217; PubMed Central PMCID: PMC2361565.
246. Wartenberg M, Frey C, Diedershagen H, Ritgen J, Hescheler J, Sauer H. Development of an intrinsic P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in quiescent cell layers of large, multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer*. 1998;75(6):855-63. PubMed PMID: 9506530.
247. Konur A, Kreutz M, Knüchel R, Krause SW, Andreesen R. Cytokine repertoire during maturation of monocytes to macrophages within spheroids of malignant and non-malignant urothelial cell lines. *Int J Cancer*. 1998;78(5):648-53. PubMed PMID: 9808537.
248. Silzle T, Kreutz M, Dobler MA, Brockhoff G, Knuechel R, Kunz-Schughart LA. Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Eur J Immunol*. 2003;33(5):1311-20. doi: 10.1002/eji.200323057. PubMed PMID: 12731056.
249. Bingle L, Lewis CE, Corke KP, Reed MW, Brown NJ. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *Br J Cancer*. 2006;94(1):101-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6602901. PubMed PMID: 16404363; PubMed Central PMCID: PMC2361081.
250. Dangles-Marie V, Richon S, El-Behi M, Echchakir H, Dorothée G, Thiery J, et al. A three-dimensional tumor cell defect in activating autologous CTLs is associated with inefficient antigen presentation correlated with heat shock protein-70 down-regulation. *Cancer Res*. 2003;63(13):3682-7. PubMed PMID: 12839959.
251. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9):3812-9. doi: 10.1182/blood-2006-07-035972. PubMed PMID: 17255361.
252. Feder-Mengus C, Ghosh S, Weber WP, Wyler S, Zajac P, Terracciano L, et al. Multiple mechanisms underlie defective recognition of melanoma cells cultured in three-dimensional architectures by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Br J Cancer*. 2007;96(7):1072-82. doi: 10.1038/sj.bjc.6603664. PubMed PMID: 17342088; PubMed Central PMCID: PMC2360115.
253. Ghosh S, Rosenthal R, Zajac P, Weber WP, Oertli D, Heberer M, et al. Culture of melanoma cells in 3-dimensional architectures results in impaired immunorecognition by cytotoxic T lymphocytes specific for Melan-A/MART-1 tumor-associated antigen. *Ann Surg*. 2005;242(6):851-7, discussion 8. PubMed PMID: 16327495; PubMed Central PMCID: PMC2361409875.

254. Dangles V, Validire P, Wertheimer M, Richon S, Bovin C, Zeliszewski D, et al. Impact of human bladder cancer cell architecture on autologous T-lymphocyte activation. *Int J Cancer*. 2002;98(1):51-6. PubMed PMID: 11857385.
255. Chouaib S, Messai Y, Couve S, Escudier B, Hasmim M, Noman MZ. Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape. *Front Immunol*. 2012;3:21. doi: 10.3389/fimmu.2012.00021. PubMed PMID: 22566905; PubMed Central PMCID: PMC3341970.
256. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-50. doi: 10.1073/pnas.0506580102. PubMed PMID: 16199517; PubMed Central PMCID: PMC1239896.
257. Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*. 2002;18(1):207-8. PubMed PMID: 11836235.
258. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(4):285-96. doi: 10.1038/nrm2354. PubMed PMID: 18285802; PubMed Central PMCID: PMC2876333.
259. Fries RB, Wallace WA, Roy S, Kuppusamy P, Bergdall V, Gordillo GM, et al. Dermal excisional wound healing in pigs following treatment with topically applied pure oxygen. *Mutat Res*. 2005;579(1-2):172-81. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.02.023. PubMed PMID: 16105672.
260. Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, Giaccia AJ. Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res*. 2001;61(6):2429-33. PubMed PMID: 11289110.
261. Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Viñals F, Gothié E, et al. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(8):1171-8. PubMed PMID: 11007955.
262. Guitart AV, Hammoud M, Dello Sbarba P, Ivanovic Z, Praloran V. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp Hematol*. 2010;38(10):847-51. doi: S0301-472X(10)00237-7 [pii] 10.1016/j.exphem.2010.06.002. PubMed PMID: 20547202.
263. Eliasson P, Rehn M, Hammar P, Larsson P, Sirenko O, Flippin LA, et al. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp Hematol*. 2010;38(4):301-10.e2. doi: S0301-472X(10)00013-5 [pii] 10.1016/j.exphem.2010.01.005. PubMed PMID: 20138114.
264. Arteel GE, Thurman RG, Raleigh JA. Reductive metabolism of the hypoxia marker pimonidazole is regulated by oxygen tension independent of the pyridine nucleotide redox state. *Eur J Biochem*. 1998;253(3):743-50. PubMed PMID: 9654074.
265. Jordan CT, Yamasaki G, Minamoto D. High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations. *Exp Hematol*. 1996;24(11):1347-55. PubMed PMID: 8862447.
266. Jääskeläinen J, Mäenpää A, Patarroyo M, Gahmberg CG, Somersalo K, Tarkkanen J, et al. Migration of recombinant IL-2-activated T and natural killer cells in the intercellular space of human H-2 glioma spheroids in vitro. A study on adhesion molecules involved. *J Immunol*. 1992;149(1):260-8. PubMed PMID: 1351501.

267. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cells*. 1994;12(5):456-65. doi: 10.1002/stem.5530120502. PubMed PMID: 7804122.
268. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294(1-2):15-22. doi: 10.1016/j.jim.2004.08.008. PubMed PMID: 15604012.
269. Durand-Panteix S, Farhat M, Youlyouz-Marfak I, Rouaud P, Ouk-Martin C, David A, et al. B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J Immunol*. 2012;189(1):181-90. doi: 10.4049/jimmunol.1102277. PubMed PMID: 22661084.
270. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):713-25. doi: 10.1038/nri2381. PubMed PMID: 19172692; PubMed Central PMCID: PMCPMC2772177.
271. Joly E, Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol*. 2003;4(9):815. doi: 10.1038/ni0903-815. PubMed PMID: 12942076.
272. Tabiasco J, Vercellone A, Meggetto F, Hudrisier D, Brousset P, Fournié JJ. Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J Immunol*. 2003;170(12):5993-8. PubMed PMID: 12794126.
273. Caumartin J, Favier B, Daouya M, Guillard C, Moreau P, Carosella ED, et al. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J*. 2007;26(5):1423-33. doi: 10.1038/sj.emboj.7601570. PubMed PMID: 17318190; PubMed Central PMCID: PMCPMC1817622.
274. Huang Y, Wang Y, Li Y, Guo K, He Y. Role of sorafenib and sunitinib in the induction of expressions of NKG2D ligands in nasopharyngeal carcinoma with high expression of ABCG2. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(5):829-37. doi: 10.1007/s00432-010-0944-2. PubMed PMID: 20809412.
275. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood*. 2012;120(7):1412-21. doi: 10.1182/blood-2012-02-411678. PubMed PMID: 22547582; PubMed Central PMCID: PMCPMC3423779.
276. Braza MS, Klein B, Fiol G, Rossi JF. $\gamma\delta$ T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody. *Haematologica*. 2011;96(3):400-7. doi: 10.3324/haematol.2010.029520. PubMed PMID: 21109686; PubMed Central PMCID: PMCPMC3046271.
277. Reilly JT, Nash JR, Mackie MJ, McVerry BA. Distribution of fibronectin and laminin in normal and pathological lymphoid tissue. *J Clin Pathol*. 1985;38(8):849-54. PubMed PMID: 3928700; PubMed Central PMCID: PMCPMC499363.
278. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-23. doi: 10.1056/NEJMoa0802885. PubMed PMID: 19038878.
279. Roberts AB, Thompson NL, Heine U, Flanders C, Sporn MB. Transforming growth factor-beta: possible roles in carcinogenesis. *Br J Cancer*. 1988;57(6):594-600. PubMed PMID: 3044431; PubMed Central PMCID: PMCPMC2246450.
280. Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat Biotechnol*. 1997;15(8):778-83. doi: 10.1038/nbt0897-778. PubMed PMID: 9255794.
281. Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion

- mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene*. 2000;19(38):4319-27. doi: 10.1038/sj.onc.1203782. PubMed PMID: 10980607.
282. Assoian RK, Klein EA. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol*. 2008;18(7):347-52. doi: 10.1016/j.tcb.2008.05.002. PubMed PMID: 18514521; PubMed Central PMCID: PMCPMC2888483.
283. Horning JL, Sahoo SK, Vijayaraghavalu S, Dimitrijevic S, Vasir JK, Jain TK, et al. 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs. *Mol Pharm*. 2008;5(5):849-62. doi: 10.1021/mp800047v. PubMed PMID: 18680382.
284. Netti PA, Berk DA, Swartz MA, Grodzinsky AJ, Jain RK. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res*. 2000;60(9):2497-503. PubMed PMID: 10811131.
285. Salmon H, Donnadiou E. [The extracellular matrix: an obstacle to T cell-tumor cell interaction]. *Med Sci (Paris)*. 2012;28(10):824-6. doi: 10.1051/medsci/20122810009. PubMed PMID: 23067412.
286. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest*. 2012;122(3):899-910. doi: 10.1172/JCI45817. PubMed PMID: 22293174; PubMed Central PMCID: PMCPMC3287213.
287. Guadall A, Orriols M, Rodríguez-Calvo R, Calvayrac O, Crespo J, Aledo R, et al. Fibulin-5 is up-regulated by hypoxia in endothelial cells through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 α)-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2011;286(9):7093-103. doi: 10.1074/jbc.M110.162917. PubMed PMID: 21193390; PubMed Central PMCID: PMCPMC3044966.
288. Hoogsteen IJ, Lok J, Marres HA, Takes RP, Rijken PF, van der Kogel AJ, et al. Hypoxia in larynx carcinomas assessed by pimonidazole binding and the value of CA-IX and vascularity as surrogate markers of hypoxia. *Eur J Cancer*. 2009;45(16):2906-14. doi: 10.1016/j.ejca.2009.07.012. PubMed PMID: 19699082.
289. Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shiota T, Hatori M, Shintani S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol*. 2009;45(2):109-15. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.04.002. PubMed PMID: 18710819.
290. Gerweck LE, Kozin SV, Stocks SJ. The pH partition theory predicts the accumulation and toxicity of doxorubicin in normal and low-pH-adapted cells. *Br J Cancer*. 1999;79(5-6):838-42. doi: 10.1038/sj.bjc.6690134. PubMed PMID: 10070878; PubMed Central PMCID: PMCPMC2362684.
291. Noman MZ, Buart S, Van Pelt J, Richon C, Hasmim M, Leleu N, et al. The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. *J Immunol*. 2009;182(6):3510-21. doi: 10.4049/jimmunol.0800854. PubMed PMID: 19265129.
292. Noman MZ, Buart S, Romero P, Ketari S, Janji B, Mari B, et al. Hypoxia-inducible miR-210 regulates the susceptibility of tumor cells to lysis by cytotoxic T cells. *Cancer Res*. 2012;72(18):4629-41. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1383. PubMed PMID: 22962263.

ANNEXES

ANNEXE 1:

Anti-tumor activity of obinutuzumab and rituximab in a follicular lymphoma 3D model.

Emilie Decaup, Christine Jean, Camille Laurent, Pauline Gravelle, Séverine Fruchon, Florence Capilla, Alain Marrot, Talal Al Saati, François-Xavier Frenois, Guy Laurent, Christian Klein, Nathalie Varoqueaux, Ariel Savina, Jean-Jacques Fournié & Christine Bezombes.

En soumission à BLOOD CANCER JOURNAL, 2013

1 **Anti-tumor activity of obinutuzumab and rituximab in a follicular lymphoma 3D model**

2

3

4 Emilie Decaup,¹⁻⁵ Christine Jean,⁶ Camille Laurent,^{7,8} Pauline Gravelle,¹⁻⁵ Séverine Fruchon,⁷

5 Florence Capilla,⁹ Alain Marrot,⁹ Talal Al Saati,⁹ François-Xavier Frenois,⁸ Guy Laurent,^{1-5, 10}

6 Christian Klein,¹¹ Nathalie Varoqueaux,¹² Ariel Savina,¹² Jean-Jacques Fournié,¹⁻⁵ Christine

7 Bezombes^{1-5,*}

8

9

10 ¹ INSERM UMR1037-Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, 31024, Toulouse,

11 France

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

13 ³ ERL 5294 CNRS, BP3028, Hôpital Purpan, 31300, Toulouse, France

14 ⁴ Institut Carnot Lymphome-CALYM, 31024, Toulouse, France

15 ⁵ Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer-TOUCAN, 31024, Toulouse, France

16 ⁶ Moores UCSD Cancer Center, Department of Reproductive Medicine, La Jolla, USA

17 ⁷ INSERM UMR1043-Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan, 31024, Toulouse, France

18 ⁸ Service Anatomie Pathologique CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France

19 ⁹ INSERM, US006, ANEXPLO/CREFRE, Service d'Histopathologie, CHU Purpan, 31024,

20 Toulouse, France

21 ¹⁰ Service d'Hématologie, CHU Purpan, 31059, Toulouse, France

22 ¹¹ Roche Glycart AG, Pharma Research and Early Development (pRED), CH-8906 Schlieren,

23 Switzerland

24 ¹² Roche S.A.S, Boulogne-Billancourt, France

25

26 *Corresponding author: christine.bezombes-cagnac@inserm.fr

27

28 **Running title:** Spatial organization influences response to therapy

29 **ABSTRACT**

30

31 Follicular lymphomas (FL) account for 35-40% of all adult lymphomas. Treatment typically
32 involves chemotherapy combined with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab (RTX).
33 The development of the type II anti-CD20 monoclonal antibody obinutuzumab (GA101) aims
34 to further improve treatment. Here, using FL cells we show that RTX and GA101 display a
35 similar activity on RL cells cultured in 2D. However, 2D culture cannot mimic tumor spatial
36 organization and conventional 2D models may not reflect the effects of antibodies as they
37 occur *in vivo*. Thus, we created a non-Hodgkin's lymphoma (NHL) 3D culture system, termed
38 multicellular aggregates of lymphoma cells (MALC), and used it to compare RTX and
39 GA101 activity. Our results show that both antibodies display greater activity towards FL
40 cells in 3D culture compared to 2D culture. Moreover, we observed that in the MALC model
41 GA101 was more effective than RTX both in inhibiting tumor growth through induction of
42 (lysosomal) cell death and senescence and in inhibiting intracellular signaling pathways such
43 as mTOR, Akt, PLCgamma and Syk. Altogether, our study demonstrates that spatial
44 organization strongly influences the response to antibody treatment, supporting the use of 3D
45 models for the testing of therapeutic agents in NHL.

46

47 **INTRODUCTION**

48

49 Follicular lymphoma (FL) is the second most common type of B non-Hodgkin's lymphomas
50 (NHL) and makes up 40% of all adult lymphomas. Although the prognosis of FL is variable,
51 most patients with aggressive forms of FL (with a high FLIPI score) ultimately die from their
52 disease and median survival is 5 to 8 years.² In recent years impressive progress has been
53 made in the treatment of NHL, mainly due to combining chemotherapy with rituximab
54 (RTX), a monoclonal antibody directed against the membrane-associated CD20 antigen.

55 Considerable efforts to characterize the mechanisms underlying the de-regulation of B-cell
56 functions in NHL have identified the involvement of B-cell receptor components, various
57 kinases such as Btk, Syk and PKC, as well as canonical pathways including PI3K/Akt or NF-
58 kappaB modules.³⁻⁷ Signaling induced by RTX treatment involves raft microdomains and
59 causes activation or inhibition of several pathways responsible for apoptosis or
60 proliferation/survival (for reviews see ^{3,4}). Moreover, the efficacy of RTX is believed to
61 involve antibody-mediated mechanisms of action such as complement-dependent cytotoxicity
62 (CDC) and antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) through Fcγ receptor-expressing
63 cells such as NK cells, γδ T lymphocytes and macrophages.^{8,9} While significant advances
64 have been achieved using RTX in both progression-free and overall survival, a significant
65 number of cases remain incurable and patients develop RTX-refractory disease. Thus, novel
66 anti-CD20 antibodies have been developed such as obinutuzumab (GA101), a
67 glycoengineered type II CD20 antibody that induces enhanced ADCC and direct cell death
68 compared to RTX. Unlike type-I antibodies, type II antibodies do not translocate CD20 into
69 raft microdomains and display less CDC than type I antibodies.¹⁰⁻¹² GA101 also induces a
70 non-apoptotic cell death involving homotypic adhesion, lysosomal permeabilization,
71 cathepsin release and production of radical oxygen species (ROS).^{13,14} Phase I/II trials of

72 GA101 have shown promising activity and it is currently being studied in several pivotal
73 trials in indolent NHL, DLBCL and B-CLL.^{15,16}

74 Like most carcinomas, NHL grow as spherical tumors. Based on carcinoma 3D models (often
75 described as spheroids) it is acknowledged that spatial organization may profoundly affect
76 tumor cell behavior since important functions are dictated by the collective properties of a cell
77 population rather than those of a single cell. These include growth, metastasis, cell-to-matrix
78 and cell-to-cell interaction, as well as intracellular signaling and resistance to anti-tumor
79 agents or even immune escape.¹⁷⁻²⁰ Spatial organization can exert these effects in cancer cells
80 by affecting gene expression profiles^{19,20} or influencing major signaling pathways such as
81 those driven by MAPK, Akt and oncogenic products such as HER-2.²¹ More importantly,
82 spatial organization is known to influence the response to antibodies such as Trastuzumab or
83 Pertuzumab.^{21,22}

84 Conventional 2D NHL cell culture models do not reflect the true effects of antibodies as they
85 occur *in vivo* and may be of limited use. Thus, we recently created a NHL 3D culture system,
86 the so-called multicellular aggregates of lymphoma cells (MALC) model, using a
87 modification of the “hanging drop” method.²³ This model is useful for evaluating tumor
88 sensitivity to antibodies since diffusion/distribution is different within a solid 3D tumor.²⁴

89 Here, we sought to examine and compare the effects of GA101 and RTX in our 3D MALC
90 model to gain a better understanding of the differences between these antibodies and to assess
91 our model as a tool for effective *in vitro* studies into MAb efficacy.

92

93

94 **MATERIALS AND METHODS**

95

96 Cell lines and monoclonal antibodies

97

98 RL were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, Raji
99 from the ATCC and DEAU were kindly provided by Pr Delsol (CRCT, INSERM U1037,
100 Toulouse). These cell lines were cultured at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere in a
101 complete RPMI medium.

102

103 MALC preparation

104

105 MALC were obtained by the hanging drop method.²³ Briefly, drops (20µl) of 10⁴ RL, DEAU
106 or Raji cells (day 0) in complete medium enriched with 1% methylcellulose (MethoCult®
107 H4230, StemCell Technologies) were placed onto the lid of a 24-well plate which was then
108 inverted over a plate containing 1ml of medium. Hanging drop cultures were incubated for
109 24hrs at 37°C in 5% CO₂. In parallel, a layer of 1% agarose (Gibco, Invitrogen) in classical
110 medium was added to another 24-well plate and stored for 24hrs at 4°C. After 24hrs, the
111 resulting cellular aggregates were transferred to the agarose plate and cultured at 37°C in 5%
112 CO₂. MAbs were applied to the initial drop and every 5 days thereafter.

113 MALC volume was calculated using the formula $V=4/3 \times \pi \times L \times l^2$ (L=longest diameter and
114 l=shortest diameter).

115 Morphology was visualized after Hoechst33342 (Invitrogen) staining. MALC were incubated
116 with Hoechst33342 (10µg/ml) for 10min at 37°C in a CO₂ incubator.

117 Pictures were taken with a fluorescent inverted microscope Nikon Eclipse TE200 at
118 magnification x40.

119 *Viable cell number* was determined by counting cells on a Malassez hemocytometer using the
120 trypan blue exclusion method.

121

122 *RL Lymphoma xenograft*

123

124 10×10^6 RL cells were subcutaneously injected into the right flank of SCID-Beige mice,
125 according to the INSERM Animal Care and Use Committee-approved protocol. When tumor
126 volumes reached 100mm^3 mice were divided into three groups of 8 to 10 animals. PBS-,
127 RTX- or GA101-treated groups were injected intra-peritoneally twice a week with 25mg/kg
128 MAb. Tumor burden was measured 3 times per week with a caliper, and tumor volume (TV)
129 calculated using the formula ($TV = [\text{length} \times \text{width}^2]/2$). Animals were killed when the TV
130 reached $2000\text{-}2500 \text{mm}^3$; tumor weight was measured at this time point. Tumors were
131 embedded in paraffin and processed for immunohistochemistry labeling as described below.

132

133 *Immunohistochemistry labeling*

134

135 Immunostaining was performed using an automated stainer (Benchmark XT; Ventana
136 Medical Systems, Tucson, AZ). Antibodies directed against active anti-caspase 3 (R&D
137 Systems) laminin and fibronectin (Sigma Aldrich) were used. After overnight incubation
138 sections were incubated with the avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit,
139 Vector Laboratories) followed by the DAB chromogen solution and were then counter-stained
140 with hematoxylin. Negative controls were incubated in buffered solution without primary
141 antibody.

142

143 *In vivo caspase 3-positive cell quantification*

144 Immunohistochemical-stained slides were digitized using a Panoramic 250 Flash digital
145 microscope (P250 Flash, 3DHisTech, Hungary). Whole slides were scanned using brightfield
146 scan mode with a 20X/NA0.80 Zeiss Plan-Apochromat dry objective, and images were
147 acquired with a 2 megapixel 3CCD color camera (CIS Cam Ref#VCC-F52U25CL, CIS
148 Americas Inc., USA), achieving a 0.22 μ m/pixel resolution, corresponding to 56.09X
149 magnification at the highest optical resolution in conventional microscopy. Panoramic Viewer
150 and HistoQuant software were used for viewing and analyzing the digital slides, respectively
151 (RTM 1.15.0.53, 3DHisTech, Hungary). A minimum of 12 annotations per slide covering
152 more than 80% of the entire tissue were analyzed using the same profile file with the
153 following characteristics: noise reduction (median filter strength= 3), object definition (HSV:
154 44<Hue<115, 36<Saturation<196, 5<Value<250; filtering by size: valid objects>15 μ m²) and
155 object separation according to a 10 pixel distance between the center points of two objects.
156 These settings allowed the automatic segmentation of the detected objects and the
157 measurement of the number of detected objects per mm².
158 Statistical analyses were performed on individual raw data using unpaired t-tests to compare
159 the MAb-treated group to the PBS-treated group. Values are expressed as mean \pm SEM. P
160 values <0.05 were considered statistically significant.

161

162 Collagen I detection by second harmonic generation

163

164 FL lymph nodes or cells were embedded in tissue-freezing media and frozen at -80°C. Then
165 5 μ m sections were cut on a cryostat at -20°C. The slides were mounted in Fluorescence
166 Mounting Medium® (DAKO). Collagen detection was performed using a two-photon
167 microscope 7 MP upright microscope (Zeiss). Excitation light was provided by a Chameleon
168 Ultra II Ti:Sapphire laser (Chameleon Ultra, Coherent Inc., Palo Alto, CA, USA (Coherent)
169 tuned to 830nm. The average laser irradiation after the microscope objective was measured

170 with an Ultracompact Laser Power Meter (New Focus Corp., CA, USA), which ranged from
171 0.5 to 2mW. The second harmonic generation images were detected through a bandpass filter
172 SP 485 (collagen emission). Images were acquired using a x40 oil immersion objective
173 (NA=1.4, Plan-Apochromat; Zeiss). All images were acquired with standardized conditions
174 for gain and offset (brightness and contrast). Unprocessed images were analyzed using the
175 Region Measurements function of the Metamorph software (Universal Imaging,
176 Downingtown, PA) which calculates the integrated fluorescence Intensity for the entire
177 image.

178 For FL patient studies, institutional ethical approval from Inserm U1037 and informed
179 consent were obtained in compliance with the Helsinki protocol.

180

181 Western-blot analysis

182

183 MALC were dissociated with mechanical force in PBS. Cells were then washed with cold
184 PBS and lysed in cytobuster protein extraction reagent (Novagen, Merk) containing a protease
185 inhibitor cocktail (Sigma Aldrich). Western-blot analyses were performed as previously
186 described²⁵ using antibodies against laminin, fibronectin, vitronectin (Sigma Aldrich), cleaved
187 caspase-3 (Ozyme), cleaved PARP (BD Pharmingen), β -actin (Millipore). Peroxidase-
188 conjugated secondary antibodies were from Jackson Immunoresearch Laboratories
189 (Interchim).

190

191 Apoptosis detection

192

193 MALC were dissociated as described above and 10^5 cells were washed with cold PBS and
194 resuspended in Binding Buffer 1X (BD Biosciences) at 1M/ml. 5 μ l Annexin V-PE and 5 μ l

195 7AAD (BD Biosciences) were added for 15min at room temperature in the dark then
196 apoptotic cells (annexin V⁺/7ADD⁻) were detected on a LSRII flow cytometer (BD
197 Biosciences).

198

199 Lysosomal permeability detection

200

201 10⁵ cells from dissociated MALC were incubated with 5μM acridine orange (AO, Molecular
202 Probes, Invitrogen) for 15min at room temperature in the dark. Cells were then washed twice
203 with PBS and analyzed with LSR II flow cytometer.

204

205 Senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity detection

206

207 To measure SA-βgal activity, we used the fluorogenic substrate C₁₂FDG (Invitrogen).²⁶ 4x10⁵
208 cells from dissociated MALC were pretreated with 100nM bafilomycin A for 1 hr at 37°C,
209 5% CO₂, to induce lysosomal alkalization and increase the internal pH of lysosomes to pH
210 6. C₁₂FDG (33μM) was then incubated for 2 hrs, after which the medium was removed.
211 MALC were dissociated, cells were washed twice with PBS and analyzed with a LSR II flow
212 cytometer.

213

214 Intracellular phosphospecific flow cytometry

215

216 Intracellular phosphospecific flow cytometry was performed as previously described.^{27,28} 10⁶
217 cells from dissociated MALC were fixed with BD Cytofix fixation buffer (BD Biosciences)
218 for 10min at room temperature. Cells were washed with wash buffer (BD Biosciences) and
219 permeabilized with Perm Buffer III (BD Biosciences) for 30min at 4°C. Cells were washed,

220 resuspended in cold 50% perm buffer III and mixed. Then either Cell Barcoding Dye 450 (BD
221 Biosciences) at various concentrations (prepared according to the manufacturer's instructions)
222 or DMSO were added and incubated for 30min at 4°C. Cells were then washed and
223 resuspended in a residual volume. Encoded samples were split equally into FACS tubes for
224 parallel stainings. Conjugated phosphospecific antibodies were added to each tube of cells for
225 30min at room temperature. Antibodies against Akt-Alexa488, P-Akt(T308)-PE, P-
226 Akt(S473)-Alexa647, Syk-FITC, P-ZAP70/Syk(Y319/Y352)-Alexa647, PLC γ 2-PE and P-
227 PLC γ 2(Y759)-Alexa647 were all obtained from BD Biosciences . At least 50,000 events from
228 each gated condition were collected and analyzed using a LSRII cytometer.

229

230 Mitochondrial depolarization assay

231

232 To evaluate the status of $\Delta\psi$, we used a lipophilic fluorochrome JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-
233 1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) with the mitochondrial membrane
234 potential detection kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. To
235 assess mitochondrial depolarization, untreated or treated MALC were dissociated then stained
236 with JC-1 for 15min at 37°C in a CO₂ incubator. Once washed and re-suspended in PBS, the
237 loss of red fluorescence was monitored using flow cytometry.

238

239 Cytochrome C release assays

240

241 To evaluate cytochrome C release we used anti-cytochrome C-Alexa 488 antibodies (BD
242 Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Treated or untreated MALC were
243 dissociated then fixed and permeabilized with, respectively, BD Cytotfix fixation buffer and
244 BD Perm Buffer III before staining with an anti-cytochrome C antibody for 1 hr at room

245 temperature. Cytochrome C release was monitored by analyzing green fluorescence in the FL-
246 1 channel with flow cytometry.

247

248 Mitochondrial ROS

249

250 Mitochondrial ROS were detected using a method previously published.²⁹ Briefly, 2×10^5 cells
251 from untreated or treated MALC were stained with Mitotracker deep red and Mitotracker
252 green (Invitrogen) at 50nM for 30min at 37°C. Cells were then washed with PBS and re-
253 suspended in cold PBS for FACS analysis.

254

255 Sub-G1 cell determination after DAPI staining

256

257 Untreated or treated MALC were dissociated and transferred to 96 well-plates. Cells were
258 then incubated in 70% EtOH for 30min at 4°C, washed twice and incubated with RNase A at
259 100µg/ml (Sigma-Aldrich) for 15min at room temperature, then washed and incubated with
260 DAPI (Sigma-Aldrich) at 10µg/ml for 45min at room temperature. Cells were analyzed using
261 flow cytometry and cell death was estimated by the percentage of sub-G1 cells.

262

263 Statistics

264

265 Data shown represent mean \pm SD. Means were compared using unpaired, 2-tailed Student's *t*
266 tests and P values <0.05 were considered statistically significant.

267

268 **RESULTS**

269

270 **GA101 and RTX display comparable efficacy in a 2D RL culture model**

271

272 RL are FL cells carrying the t(14; 18) translocation leading to Bcl-2 overexpression. In 2D
273 RL cultures we previously showed that RTX induces a moderate accumulation of cells in G1
274 phase, growth inhibition, and significant loss in clonogenic potential.³⁰ Here, we determined
275 the effect of GA101 compared to RTX and showed that both antibodies decrease RL cell
276 viability to a similar degree (Fig. 1A). By analyzing cell death using Annexin V/7AAD
277 labeling, we observed only a slight increase in cells in early (Annexin V⁺/7AAD⁻) and late
278 (Annexin V⁺/7AAD⁺) apoptosis after RTX and GA101 treatment. No significant differences
279 were observed between the two antibodies (Fig. 1B).

280

281 **GA101 displays enhanced MALC growth inhibition**

282

283 In order to investigate the role of spatial organization we created the 3D MALC model using
284 RL cells.²³ MALC grew as oblate and relatively stiff spheroids (Fig. 2A). MALC volume
285 increased linearly with time (Fig. 2B) whereas the number of cells increased exponentially
286 throughout the culture (Fig. 2C). MALC stiffness could be due to an accumulation of
287 extracellular matrix since immunohistochemistry and western-blotting showed the presence of
288 fibronectin, vitronectin and laminin, similar to that observed in RL xenografts or patient
289 biopsies (Fig. 2D₁ & 2D₂). Collagen I was also found in MALC and FL tissues (Fig. 2D₃).

290 We then sought to determine the effects of RTX and GA101 in 3D RL culture. To obtain the
291 optimal dose of each antibody we compared doses ranging from 0.1 to 100µg/ml. Both
292 antibodies showed a maximal effect on MALC volume, viable cell number and cell death at

293 10µg/ml. The same results were obtained with MALC made up of diffuse large B-cell
294 lymphoma (DEAU) and Burkitt lymphoma (Raji) cell lines (data not shown). However, after
295 10 days of 3D culture more than 50% of Raji and DEAU cells were apoptotic under untreated
296 conditions, therefore we focused this study on MALC obtained with RL cells.

297 We first sought to assess tumor volume over time following treatment with RTX, GA101 or
298 Trastuzumab (TTZ, used as negative control; data not shown). In untreated (UT) and TTZ-
299 treated cells MALC volume increased from day 1 to day 20, maintaining the spherical
300 structure (Fig. 2A) and reaching 25mm³ (Fig. 2B) with 1.5 million viable cells/MALC (Fig.
301 2C). RTX and GA101 treatment induced potent morphological changes with a disintegration
302 of the peripheral layer (Fig. 2A), reduced MALC growth (Fig. 2B) and significantly decreased
303 the number of viable cells/MALC (Fig. 2C) without modifying cell size (determined by flow
304 cytometry, data not shown). These effects appeared more pronounced in MALC treated with
305 GA101 compared to RTX.

306 We further evaluated the *in vivo* effects of the two antibodies in a RL xenograft mouse model.
307 As shown in Figure 2E, GA101 inhibited tumor growth more strongly in terms of tumor
308 volume and weight compared to RTX-treated animals. No such differences in antibody
309 activity were seen in 2D RL cultured with GA101 when compared to RTX, supporting the
310 conclusion that the spatial organization existing in 3D culture and *in vivo* affects the
311 sensitivity to antibody treatment.

312

313 **GA101 induces cell death more robustly than RTX in MALC**

314

315 The decrease in viable cell number in RTX or GA101-treated MALC observed in Figure 2C
316 might reflect either a cell cycle blockade or induction of cell death. Thus, we analyzed cell
317 cycle distribution and cyclin A, B and D₁ expression as key regulators of the S, G2/M and

318 G0/G1 phase check points, respectively. Both cell cycle distribution and expression of cyclins
319 were not affected by RTX or GA101 treatment. Moreover, the proliferation rate did not differ
320 between untreated and MAb-treated conditions (data not shown). We therefore examined
321 whether RTX and GA101 would induce non-apoptotic (lysosomal) cell death or senescence,
322 as reported elsewhere.^{3,4,13,14,31} We observed that both RTX and GA101 increased cell death,
323 with GA101 eliciting its effects earlier than RTX (Fig. 3A). To avoid possible
324 misinterpretation due to flow cytometry as previously described,³⁹ the induction of cell death
325 by both RTX and GA101 was confirmed by western-blot analysis revealing cleavage of
326 caspase 3 and PARP (Fig. 3B). In addition, RTX and GA101 caused cytochrome c release
327 from mitochondria (Fig. 3C), loss of $\Delta\psi_m$ (Fig. 3D) and production of ROS (Fig. 3E). Cell
328 death induction was also confirmed *in vivo* with tumors isolated from GA101 and RTX-
329 treated animals (Fig. 3F). Interestingly, *in vitro* only GA101-treated MALC exhibited an
330 increase in lysosomal cell death and cathepsin D release (Fig. 4A). Furthermore, a senescence
331 phenotype was found for GA101-treated cells, as shown by an increase in C₁₂FDG cleavage
332 (Fig. 4B). A similar effect was also observed following treatment with Cisplatin and
333 Etoposide, both classical inducers of senescence (Fig. 4B). Together these results demonstrate
334 that GA101 is more active than RTX in inducing senescence and lysosome-mediated cell
335 death.

336

337 **GA101 induces a stronger signaling inhibition than RTX in MALC**

338

339 We have previously shown that RTX reduced FL survival in 2D RL culture through inhibition
340 of the PKC ζ -mTOR module without affecting PI3K/Akt.³² Here, we observed that, unlike
341 RTX, GA101 does decrease Akt phosphorylation, as evaluated by fluorescent cell barcoding
342 (Fig 5A, left panel) and mTOR activation (Fig. 5A, right panel). In 3D culture GA101

343 inhibited phosphorylation of Akt at both T308 and S473, Syk at Y352 and PLC γ 2 at Y759 as
344 well as mTOR-dependant p70S6K phosphorylation at T389 (Fig. 5B). RTX reduced mTOR
345 phosphorylation (Fig. 5C) but had no effect on the other kinases (Fig. 5B).
346 Together, these results demonstrate that GA101 directly inhibits cell signaling in 3D FL
347 culture and does so more efficiently than RTX.

348

349 **Both GA101 and RTX antibodies induce chemosensitization**

350

351 Previous studies have shown that when combined with chemotherapy both RTX and GA101
352 enhance efficacy or sensitize cells to cytotoxic drugs.^{33,34} Thus, we asked whether in 3D
353 models antibodies could improve sensitivity to antitumoral drugs such as doxorubicin
354 (anthracyclin), bendamustine (an alkylating agent) and rapamycin (an mTOR inhibitor). We
355 treated MALC *via* two distinct protocols. Protocol 1 (Fig. 6A) involved adding the antibody
356 to the drop at the beginning of MALC formation followed by treatment with the cytotoxic
357 drugs 24 hrs later. In protocol 2 (Fig. 6B) established MALC were treated with antibodies
358 (after 5 days of 3D culture), followed by addition of cytotoxic drugs 24 hrs later. In both
359 protocols we did not observe sensitization to doxorubicin or to bendamustine (data not
360 shown). However, both antibodies sensitized the 3D cultured cells to treatment with
361 rapamycin (Fig. 6). These results show that both RTX and GA101 sensitize 3D FL cultures to
362 rapamycin.

363

364 **DISCUSSION**

365

366 To develop new therapeutic strategies (i.e., new anti-CD20 antibodies) we need a better
367 understanding of the *in vitro* mechanisms of action of these therapies. For classical 2D NHL
368 cell cultures we and others have described the mechanisms which account for the direct effect
369 of the CD20 antibodies RTX and GA101.^{3,4,13,14} RTX and GA101 display similar efficiencies
370 in the follicular NHL cell line RL, however GA101 has been reported to mediate superior
371 effects on 2D lymphoma cell lines such as large B-cell lymphomas, mantle cell lymphoma
372 and chronic lymphocytic leukaemia^{10,35}

373 The importance of tumor spatial organization is becoming increasingly apparent and can
374 significantly affect major cellular functions such as cell proliferation, survival and
375 intracellular signaling pathways, as described for carcinoma cell spheroids. Based on these
376 models we used NHL cell lines to create MALC with a technique derived from the hanging
377 drop method. MALC mimic lymphoma spatial organization including extracellular matrix
378 accumulation. This model is simple, feasible, reproducible, inexpensive, and offers an
379 alternative to xenografts for testing new drugs. We observed that both RTX and GA101
380 displayed higher efficacy in MALC compared to 2D culture. This result was unexpected since
381 one could have hypothesized that the increased cellular density, higher degree of compaction
382 and ECM accumulation would have interfered with the diffusion of the antibodies into the
383 spheroid and their subsequent effects. It is possible that 3D FL cells are in a more sensitive
384 state because of changes to intracellular signaling pathways as a result of mechanical stress,
385 hypoxia or modified integrin signaling networks. Clinical observations have underlined tumor
386 burden as potentially one of the most important factors mediating resistance to RTX.^{36,37} This
387 was recently confirmed in a study showing that mice presenting with a low tumor burden had
388 a significantly higher complete response rate and a significant longer survival than mice with

389 intermediate or high tumor burden.³⁸ One of the reasons for this may be differences in
390 antibody diffusion and penetration into the center of small lymph nodes versus a less efficient
391 diffusion in case of high tumor burden. Our model provides a powerful approach to study
392 this phenomenon.

393 Here, we show that, unlike in 2D culture, RTX and GA101 induce death in FL cells when
394 organized in 3D. To avoid possible misinterpretation due to flow cytometry as previously
395 described³⁹ we confirmed cell death induction by Western-blot analysis of PARP and caspase
396 3 cleavage, determination of cytochrome c release, $\Delta\psi_m$ modification and ROS production.

397 Recent reports have demonstrated that, in 2D-cultured NHL cell lines, GA101 induces
398 homotypic adhesion followed by actin reorganization, lysosomal permeabilization, cathepsin
399 release and ROS production. Altogether, these events suggest a so-called non-apoptotic
400 lysosomal-mediated cell death.^{13,14} In our 3D model, we detected lysosomal cell death and
401 cathepsin D release after 20 days of GA101 treatment. This was also accompanied by
402 senescence, a phenomenon described by Däbritz and colleagues for RTX.³¹ Although this has
403 never been described for GA101, it should not be surprising as senescence is an aging process
404 involving ROS.⁴⁰ Autophagy has also been described after RTX treatment in Burkitt
405 lymphoma cell lines.⁴¹ However, we found no significant change to the expression of the
406 autophagic proteins LC3II and Atg proteins following RTX or GA101 treatment using both
407 protein micro-arrays and western-blot analysis (data not shown). In terms of RTX treatment
408 we showed that 3D conditions enhanced RTX-induced cytotoxic effects, reflecting clinical
409 observations. For GA101, we also observed an enhancement of cytotoxic effects in 3D-
410 compared to 2D-cultured FL cells, perhaps a result of the combination of the three different
411 cell death mechanisms (apoptosis, lysosomal cell death and senescence). The fact that GA101
412 displayed a higher efficacy than RTX is in accordance with observations from *in vitro* and
413 preclinical studies (^{10,13,33}, Fig. 2D) and may be related to its type-II related mechanism of

414 action resulting in e.g. homotypic adhesion and cell death.⁴² GA101 could also affect cell-cell
415 contacts supporting the 3D structure. Indeed, we used Hoechst labeling (Fig. 2A) to observe
416 that GA101 strongly modifies the spherical organization of NHL cultured in 3D. Moreover,
417 we cannot exclude the possibility that GA101 and RTX diffuse differently into MALC. The
418 mechanisms of diffusion are not yet known and are currently under investigation in our
419 laboratory.

420

421 Previous studies show that RTX and GA101 induce chemosensitization in 2D NHL cultures
422 and xenograft FL models.^{33,34} Consistent with this we showed that both anti-CD20 antibodies
423 induce sensitization to rapamycin (a classical mTOR inhibitor) in 3D culture.
424 Chemosensitization can be explained by several hypotheses. First, it may be a consequence of
425 decreased Bcl2 expression after 10 days of antibody treatment (Supplementary Fig. 1) since
426 Bcl2 expression has been associated with resistance to mTOR inhibitors in a preclinical
427 model.⁴³ Second, antibodies could affect the 3D structure (cell-cell contacts), leading to better
428 drug penetration. This is currently under investigation in our laboratory. Third,
429 chemotherapeutic agents and antibodies may use the same signaling pathways (i.e., ROS
430 production, inhibition of mTOR, etc), converging on enhanced cytotoxic effects compared to
431 those induced by each drug as a single agent.

432

433 Altogether, this study presents strong evidence that GA101 displays enhanced efficacy
434 compared to RTX in a 3D NHL model that mimics lymphoma cell growth in an aggregated
435 architecture. These findings support preclinical and *in vivo* studies and provide a useful model
436 for further investigation of the molecular mechanisms involved in the anti-lymphoma action
437 of antibodies.

438

439

440 **ACKNOWLEDGMENTS**

441

442 This study was supported by an institutional grant from the INSERM, Cancéropôle Grand
443 Sud-Ouest, INCA Pair Lymphome and Roche. The authors thank Raphael Duran, Marie-
444 Noelle Paludetto (CRCT, INSERM UMR1037) for performing preliminary experiments,
445 Amandine Blanc (CRCT, INSERM UMR1037) for technical assistance and Maryline Calyse
446 (ANEXPLO/CREFRE, Service de Zootechnie, Toulouse, France). We thank Scientific Scripts
447 (<http://www.scientificscripts.com/>) for English proofreading.

448

449 Trastuzumab (TTZ, Herceptin), Rituximab (RTX, Mabthera) and Obinutuzumab (GA101)
450 were provided by Genentech (San Francisco, USA), Roche (Boulogne-Billancourt, France)
451 and Roche Glycart (Schlieren, Switzerland), respectively.

452

453

454 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

455

456 ED designed and performed experiments, analyzed data and drafted the manuscript. CJ
457 developed MALC technology and performed *in vitro* experiments. FC and AM performed
458 immunohistochemical staining. CL and TAS interpreted results. SF performed murine model
459 and 2D RL cell culture experiments. FXF realized *in vivo* caspase 3 quantifications. GL, CK,
460 JJF, NV, AS helped plan experiments and interpret data. CB designed the research plan,
461 supervised experiments, interpreted results and wrote the manuscript.

462

463 **DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST**

464

465 Emilie Decaup, Nathalie Varoqueaux and Ariel Savina are employees of Roche (Boulogne-
466 Billancourt).
467 Christian Klein is an employee of Roche Glycart AG (Schlieren).
468 Séverine Fruchon received a grant from Roche.
469 Christine Bezombes received research funding from Roche.
470

471 **REFERENCES**

472

- 473 1. Rao AV, Akabani G, Rizzieri DA. Radioimmunotherapy for Non-Hodgkin's lymphoma.
474 *Clin Med Res.* 2005; **3**: 157-165.
- 475 2. Maloney DG. Treatment of follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Hematol Rep.* 2005;
476 **4**: 39-45.
- 477 3- Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways:
478 implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel
479 therapeutic interventions. *Oncogene* 2007; **26**: 3629-36.
- 480 4- Bezombes C, Fournié JJ, Laurent G. Direct effect of rituximab in B-cell-derived lymphoid
481 neoplasias: mechanism, regulation, and perspectives. *Mol Cancer Res.* 2011; **9**: 1435-42.
- 482 5- Witzig TE, Gupta M. Signal transduction inhibitor therapy for lymphoma. *Hematology Am*
483 *Soc Hematol Educ Program.* 2010; **2010**: 265-70.
- 484 6- Mahadevan D, Fisher RI. Novel therapeutics for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J*
485 *Clin Oncol.* 2011; **29**: 1876-84.
- 486 7- Sawas A, Diefenbach C, O'Connor OA. New therapeutic targets and drugs in non-
487 Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Hematol.* 2011; **18**: 280-7.
- 488 8- Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and
489 resistance. *Oncogene* 2003; **22**: 7359-7368.
- 490 9- Taylor RP, Lindorfer MA. Immunotherapeutic mechanisms of anti-CD20 monoclonal
491 antibodies. *Curr Opin Immunol.* 2008; **20**: 444-449.
- 492 10- Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, *et al.* Increasing the
493 efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20
494 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*
495 2010; **115**: 4393-4402.

496 11- Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, Honeychurch J, Alduaij W, Cox KL, *et al.* Monoclonal
497 antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by
498 lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest.* 2009;
499 **119**: 2143-2159.

500 12- Beers SA, Chan CH, James S, French RR, Attfield KE, Brennan CM, *et al.* Type II
501 (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody out performs type I (rituximab-like) reagents
502 in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood* 2008; **112**: 4170-4177.

503 13- Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, *et al.* Novel type II
504 anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent,
505 lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* 2011; **117**: 4519-29.

506 14- Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, Cheadle EJ, Pelicano H, Ivanov A, *et al.*
507 Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is
508 mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood* 2012; **119**:
509 3523-3533.

510 15- Sehn LH, Assouline SE, Stewart DA, Mangel J, Gascoyne RD, Fine G, *et al.* A phase I
511 study of obinutuzumab induction followed by 2 years of maintenance in patients with
512 relapsed CD20-positive B-cell malignancies. *Blood* 2012; **119**: 5118-25.

513 16- Salles G, Morschhauser F, Lamy T, Milpied N, Thieblemont C, Tilly H, *et al.* Phase I
514 study results of the type II glycoengineered humanized anti-CD20 monoclonal antibody
515 obinutuzumab (GA101) in B-cell lymphoma patients. *Blood* 2012 ; **119**: 5126-32.

516 17- Klement G, Huang P, Mayer B, Green SK, Man S, Bohlen P, *et al.* Multicellular gastric
517 cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric
518 carcinomas. *Gastroenterology.* 2001; **121**: 839-852.

519 18- Dangles-Marie V, Richon S, El-Behi M, Echchakir H, Dorothée G, Thierry J, *et al.* A
520 three-dimensional tumor cell defect in activating autologous CTLs is associated with

521 inefficient antigen presentation correlated with heat shock protein-70 down-regulation.
522 *Cancer Res.* 2003; **63**: 3682-3687.

523 19- Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M, *et al.* Three-
524 dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high
525 density oligonucleotide array study. *J Cell Physiol.* 2005; **204**: 522-531.

526 20- Zietarska M, Maugard CM, Filali-Mouhim A, Alam-Fahmy M, Tonin PN, Provencher
527 DM, *et al.* Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian
528 cancer (EOC). *Mol Carcinog.* 2007; **46**: 872-885.

529 21- Weigelt B, Lo AT, Park CC, Gray JW, Bissell MJ. HER2 signaling pathway activation
530 and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D
531 microenvironment. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; **122**: 35-43.

532 22- Pickl M, Ries CH. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2
533 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene* 2009; **28**:
534 461-8.

535 23- Gravelle P, Jean C, Valleron W, Laurent G, Fournié JJ. Innate predisposition to immune
536 escape in follicular lymphoma cells. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 555-556.

537 24- Sutherland R, Buchegger F, Schreyer M, Vacca A, Mach JP. Penetration and binding of
538 radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their antigen binding
539 fragments in human colon multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1987; **47**: 1627-1633.

540 25- Leseux L, Hamdi SM, Al Saati T, Capilla F, Recher C, Laurent G, *et al.* Syk-dependent
541 mTOR activation in follicular lymphoma cells. *Blood* 2006; **108**: 4156-62.

542 26- Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect
543 senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells
544 in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009; **4**: 1798-1806.

545 27- Irish JM, Czerwinski DK, Nolan GP, Levy R. Kinetics of B cell receptor signaling in

546 human B cell subsets mapped by phosphospecific flow cytometry. *J Immunol.* 2006; **177**:
547 1581-1589.

548 28- Irish JM, Myklebust JH, Alizadeh AA, Houot R, Sharman JP, Czerwinski DK, *et al.* B-
549 cell signaling networks reveal a negative prognostic human lymphoma cell subset that
550 emerges during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; **107**:12747-12754.

551 29- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3
552 inflammasome activation. *Nature* 2011; **469**: 221-225. Erratum in: *Nature* 2011; **475**: 122.

553 30- Bezombes C, Grazide S, Garret C, Fabre C, Quillet-Mary A, Müller S, *et al.* Rituximab
554 antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase
555 activation in raft microdomains. *Blood* 2004; **104**: 1166-73.

556 31- Däbritz JHM, Yu Y, Rosenfeldt MT, Dörken B, Schmitt CA. Anti-CD20 Immunotherapy
557 Augments the Chemotherapy-Induced Senescence Response In Human Lymphoma Cells.
558 *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2010; **182** (abstract 1827).

559 32- Leseux L, Laurent G, Laurent C, Rigo M, Blanc A, Olive D, *et al.* PKC zeta mTOR
560 pathway: a new target for rituximab therapy in follicular lymphoma. *Blood* 2008; **111**:285-
561 291.

562 33- Dalle S, Reslan L, Besseyre de Horts T, Herveau S, Herting F, Plesa A, *et al.* Preclinical
563 studies on the mechanism of action and the anti-lymphoma activity of the novel anti-CD20
564 antibody GA101. *Mol Cancer Ther.* 2011; **10**: 178-185.

565 34- Jazirehi AR, Bonavida B. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated
566 by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in
567 chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene* 2005; **24**: 2121-2143.

568 35- Patz M, Isaeva P, Forcob N, Müller B, Frenzel LP, Wendtner CM, *et al.* Comparison of
569 the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic
570 leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2011; **152**: 295-306.

571 36- Berinstein NL, Grillo-López AJ, White CA, Bence-Bruckler I, Maloney D, Czuczman M,
572 *et al.* Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response
573 in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.*
574 1998; **9**: 995-1001.

575 37- Maloney DG. Follicular NHL: from antibodies and vaccines to graft-versus-lymphoma
576 effects. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007: 226-232.

577 38- Daydé D, Ternant D, Ohresser M, Lerondel S, Pesnel S, Watier H, *et al.* Tumor burden
578 influences exposure and response to rituximab: pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling
579 using a syngeneic bioluminescent murine model expressing human CD20. *Blood* 2009; **113**:
580 3765-3772.

581 39- Golay J, Bologna L, André PA, Buchegger F, Mach JP, Boumsell L, *et al.* Possible
582 misinterpretation of the mode of action of therapeutic antibodies in vitro: homotypic adhesion
583 and flow cytometry result in artefactual direct cell death. *Blood* 2010; **116**: 3372-3373.

584 40- Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process.
585 *Trends Cell Biol.* 2011; **21**: 569-576.

586 41- Turzanski J, Daniels I, Haynes AP. Involvement of macroautophagy in the caspase-
587 independent killing of Burkitt lymphoma cell lines by rituximab. *Br J Haematol.* 2009;
588 **145**:137-140.

589 42- Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M O, *et*
590 *al.* Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the
591 molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 2011; **118**: 358-367.

592 43- Delbaldo C, Albert S, Dreyer C, Sablin MP, Serova M, Raymond E, *et al.* Predictive
593 biomarkers for the activity of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors. *Target*
594 *Oncol.* 2011; **6**: 119-124.

595

596 **FIGURE LEGENDS**

597

598 **Figure 1: Effect of RTX and GA101 on 2D-cultured RL cells**

599 A) Cell viability of RL cells treated or not with 10µg/ml of RTX or GA101 was analyzed by
600 exclusion of Trypan blue, (d=day). (B) Percentage of cells in early and late apoptosis
601 (annexin V⁺/7AAD⁻ and annexin V⁺/7AAD⁺) were determined by flow cytometry after 24, 48
602 and 72 hrs of treatment.

603 Results are mean ±SD of at least three independent experiments. *p<0.05 compared to
604 untreated cells.

605

606 **Figure 2: Effect of RTX and GA101 on MALC**

607 A) Pictures of treated or untreated (UT) MALC were taken with an inverted Nikon Eclipse
608 TE200 microscope at magnification x40 at different times of culture with or without Hoeschst
609 33342 staining. These pictures are representative of several experiments (d=day).

610 B) MALC were treated or not (■) with 10µg/ml RTX (▲) or GA101 (●). MALC volume was
611 measured at different times of culture. Results are expressed in mm³ and represent the mean
612 ±SD of 9 independent experiments. *p<0.05, (d=day).

613 C) Number of viable cells per treated or untreated MALC over time. Histograms represent
614 mean ±SD of 9 independent experiments. *p<0.05.

615 D) D₁: Fibronectin, laminin and vitronectin expression analyzed by western-blotting in
616 MALC compared to 2D RL cells. β-actin expression was used as a control of protein
617 expression. D₂: Fibronectin and laminin labelling on paraffin sections of RL xenografts or
618 lymph nodes isolated from FL patients. D₃: Collagen I (yellow arrows) was visualized by
619 second harmonic generation in a lymph node from FL patients (left) and MALC (right).

620 Results are representative of 3 independent experiments.

621 E) Tumor volume and weight were measured after RL engraftment onto SCID-Beige mice.
622 Histograms represent the mean \pm SD of 9 animals for PBS, 9 animals for RTX and 10 animals
623 for the GA101 treated group. * p <0.05.

624

625 **Figure 3: Induction of MALC apoptosis by RTX and GA101**

626 A) MALC were treated or not with 10 μ g/ml of TTZ, RTX or GA101 for 5 to 20 days (d).
627 Early apoptotic cells (Annexin V⁺/7AAD⁻) were detected by flow cytometry. Dot plots are
628 representative of one experiment and histograms represent the mean \pm SD of 5 independent
629 experiments. * p <0.05.

630 B) Detection of PARP and caspase 3 by western-blot analysis in MALC treated or not with
631 10 μ g/ml of TTZ, RTX or GA101 for 5 to 20 days (d). Results are representative of 3
632 independent experiments. β -actin expression was used as a control of protein expression.

633 C) Detection of cytochrome C release from mitochondria using flow cytometry in MALC
634 treated or not with 10 μ g/ml of TTZ, RTX or GA101 for 20 days. Histograms were analyzed
635 with Cytobank[®] and are representative of three independent experiments.

636 D) Mitochondrial depolarization was analyzed by flow cytometry in MALC treated (10 μ g/ml
637 antibody) or not for 20 days. Histograms represent the mean percentage of red-JC-1 negative
638 cells for 4 independent experiments \pm SD. * p <0.05.

639 E) ROS production was measured in MALC treated or not for 20 days with 10 μ g/ml TTZ,
640 RTX or GA101 by flow cytometry. Cells producing ROS were analyzed by double staining
641 with Mitotracker green⁺/Mitotracker deep red⁻ and results represent the mean percentage of 4
642 independent experiments \pm SD. * p <0.05.

643 F) Active caspase 3 quantification was performed on tumors derived from FL xenograft
644 SCID-Beige mice injected intraperitoneally with PBS or with antibodies at 25mg/kg twice a
645 week.

646

647 **Figure 4: GA101 induces lysosomal cell death (A) and senescence (B) in MALC**

648 A) Left panel: Detection of lysosomal membrane permeabilization after acridine orange (AO)
649 staining of MALC treated or not with 10 μ g/ml antibodies for 20 days. Box shows overlay of
650 fold changes compared to untreated MALC for one representative experiment. Histograms
651 represent the mean fold change \pm SD of 5 independent experiments. * p <0.05. Analysis and
652 representation were performed with Cytobank[®]. Insert: 2D RL culture cells treated with
653 50 μ M chloroquine or 50nM bafilomycin for 3 or 24 hours were used as positive controls for
654 lysosomal cell death. Right panel: MALC were treated (10 μ g/ml antibodies) or not for 20
655 days and cathepsin D expression was determined by western-blot analysis. Results are
656 representative of 3 independent experiments. β -actin expression was used as a control of
657 protein expression.

658 B) Detection of cleavage of C₁₂FDG by SA- β Gal was measured by an increase in green
659 fluorescence in treated and untreated MALC after 20 days of culture. 2D RL culture cells
660 treated with 2.2 μ M cisplatin or 0.9 μ M etoposide for 3 days were used as a positive control of
661 senescence. Left: Overlays of fold changes comparing treated to untreated cells in one
662 representative experiment. Right: Histograms represent the mean fold change \pm SD of 5
663 independent experiments. * p <0.05. Analysis and representation were performed with
664 Cytobank[®].

665

666 **Figure 5: GA101 affects MALC signaling pathways**

667 Cell signaling was analyzed as described in Materials and Methods. Dot plots represent all
668 encoded conditions discriminated according to the CDC450 fluorescence of either 2D RL
669 cells treated for 72 hrs with 10 μ g/ml antibody (A) or MALC after 20 days of antibody
670 treatment (B).

671 Phosphospecific stainings were analyzed for each gated condition and heatmaps represent
672 relative levels of phospho-Akt/Akt, phospho-Syk/Syk and phospho-PLC γ 2/PLC γ 2 for one
673 representative experiment in RL treated or not for 72 hrs or in MALC treated or not at day 20.
674 Analysis and representation were performed with Cytobank[®].
675 Histograms represent the relative percentage of phosphorylated proteins in treated 2D (A) or
676 3D (B) cells compared to untreated cells. Results represent mean \pm SD of 3 independent
677 experiments. *p<0.05.
678 Western-blot analysis of p70S6K phosphorylation was performed in 2D RL cells treated or
679 not with 10 μ g/ml antibody for 72 hrs.

680

681 **Figure 6: Antibodies sensitize MALC to rapamycin**

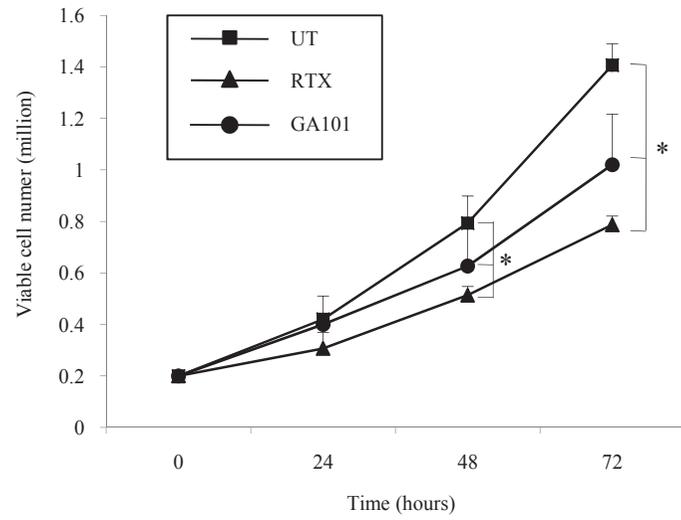
682 MALC were treated in the drop (A) or after 5 days of culture (B) with 10 μ g/ml antibodies. 24
683 hrs later MALC were treated with 50nM of rapamycin. Every 5 days cells were submitted to
684 the same treatment. Results represent the percentage of cells in sub-G1 phase as determined
685 by flow cytometry after DAPI staining at day 20 and are the mean of 6 independent
686 experiments \pm SD. *p<0.05.

687

688

Figure 1

A



B

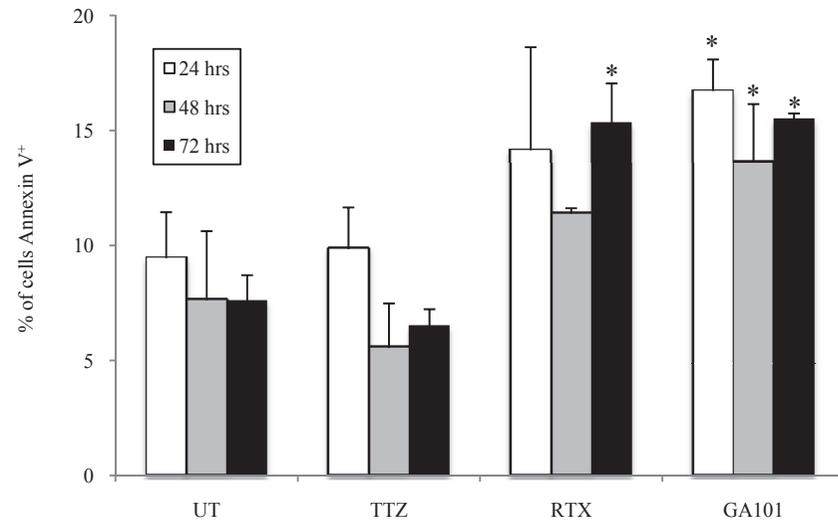
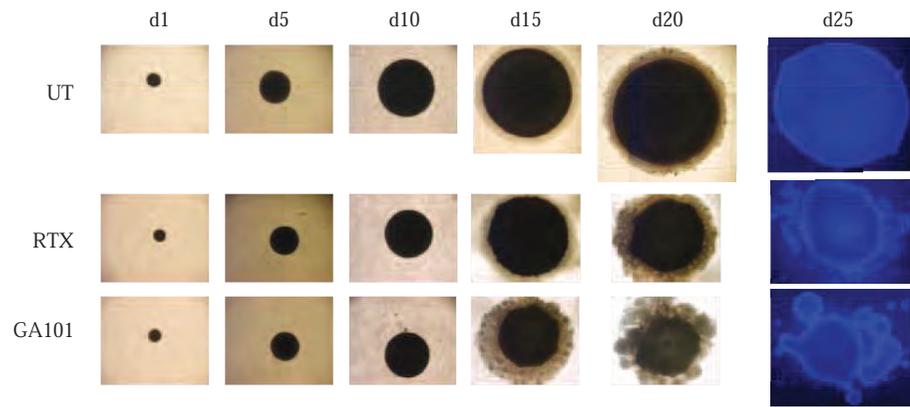
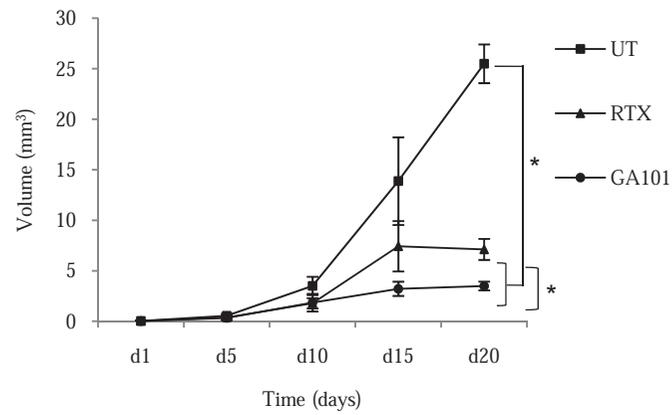


Figure 2

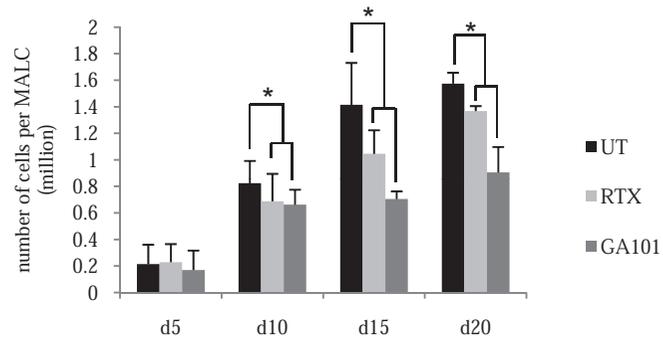
A



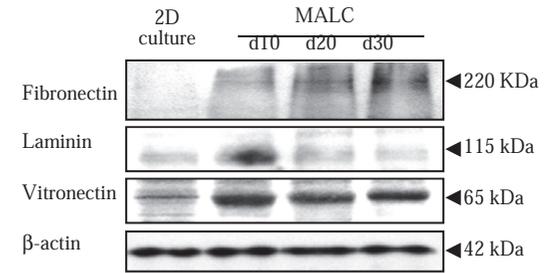
B



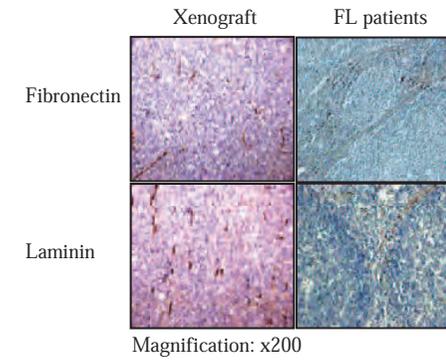
C



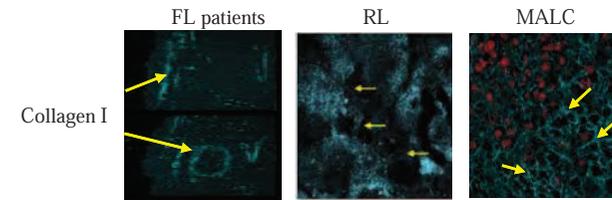
D₁



D₂



D₃



E

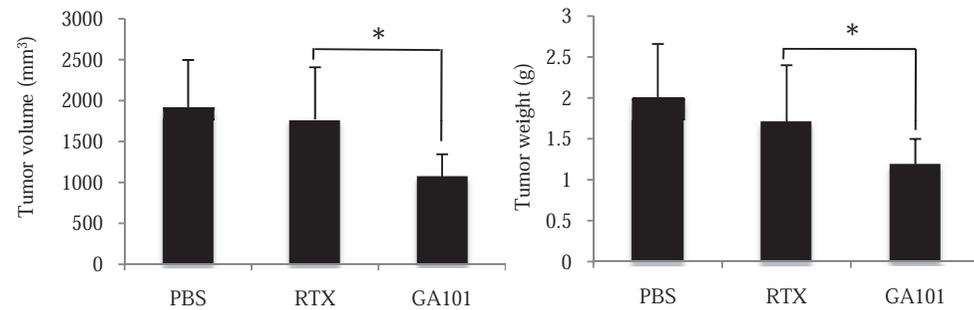
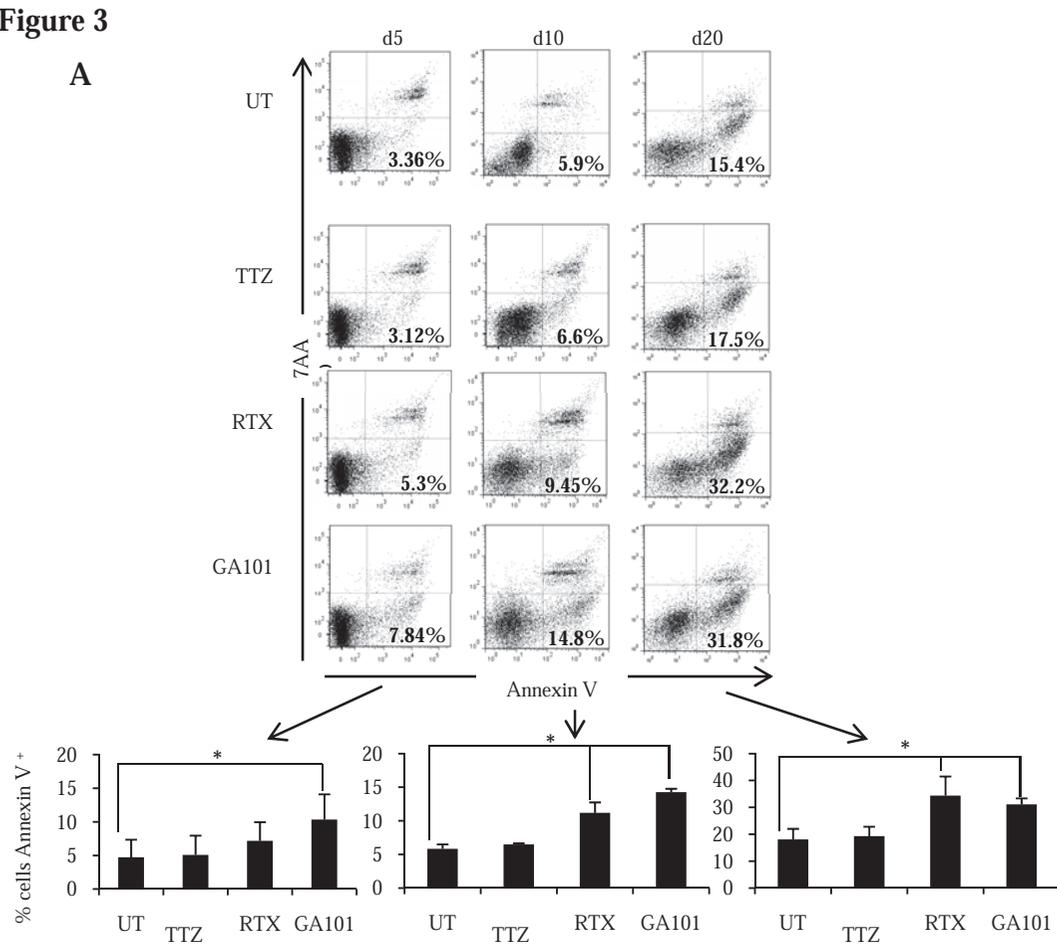
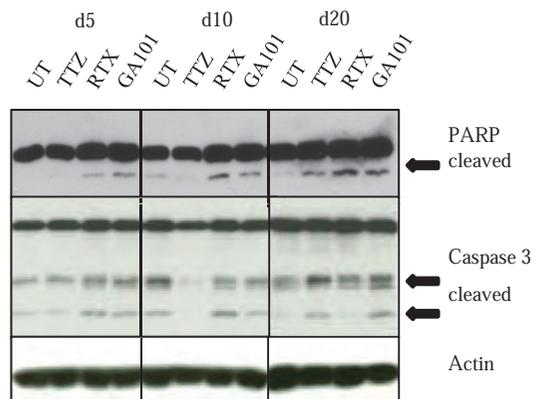


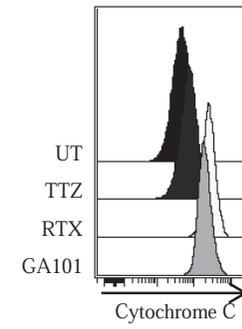
Figure 3



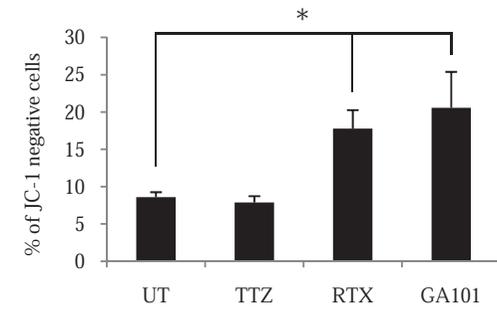
B



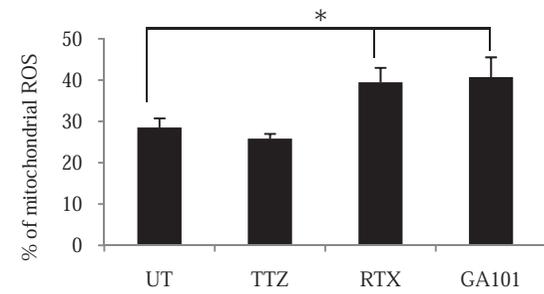
C



D



E



F

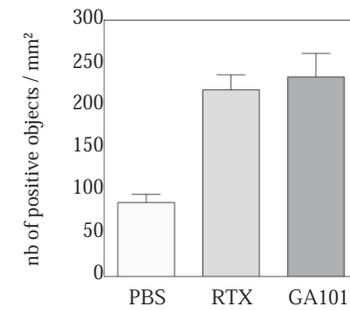
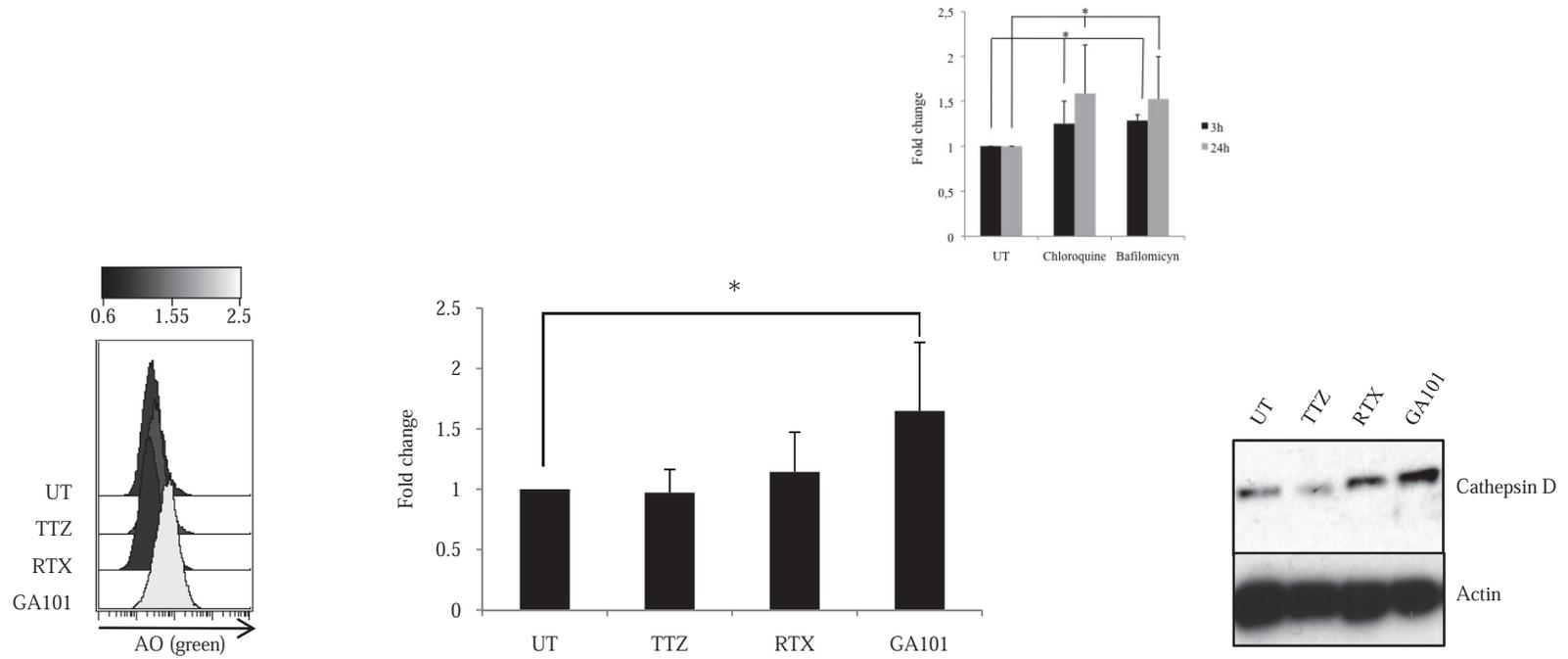


Figure 4

A



B

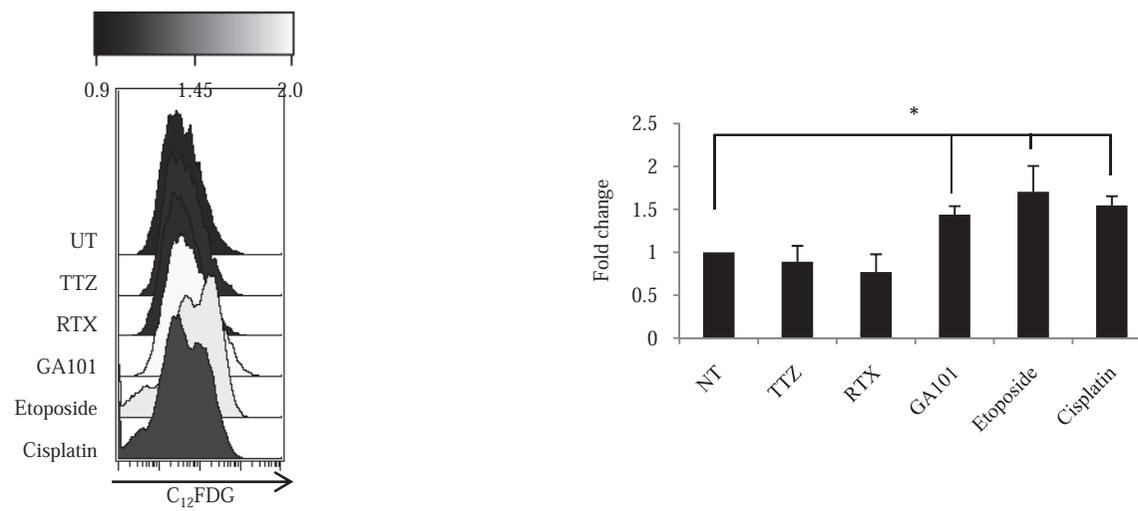


Figure 5

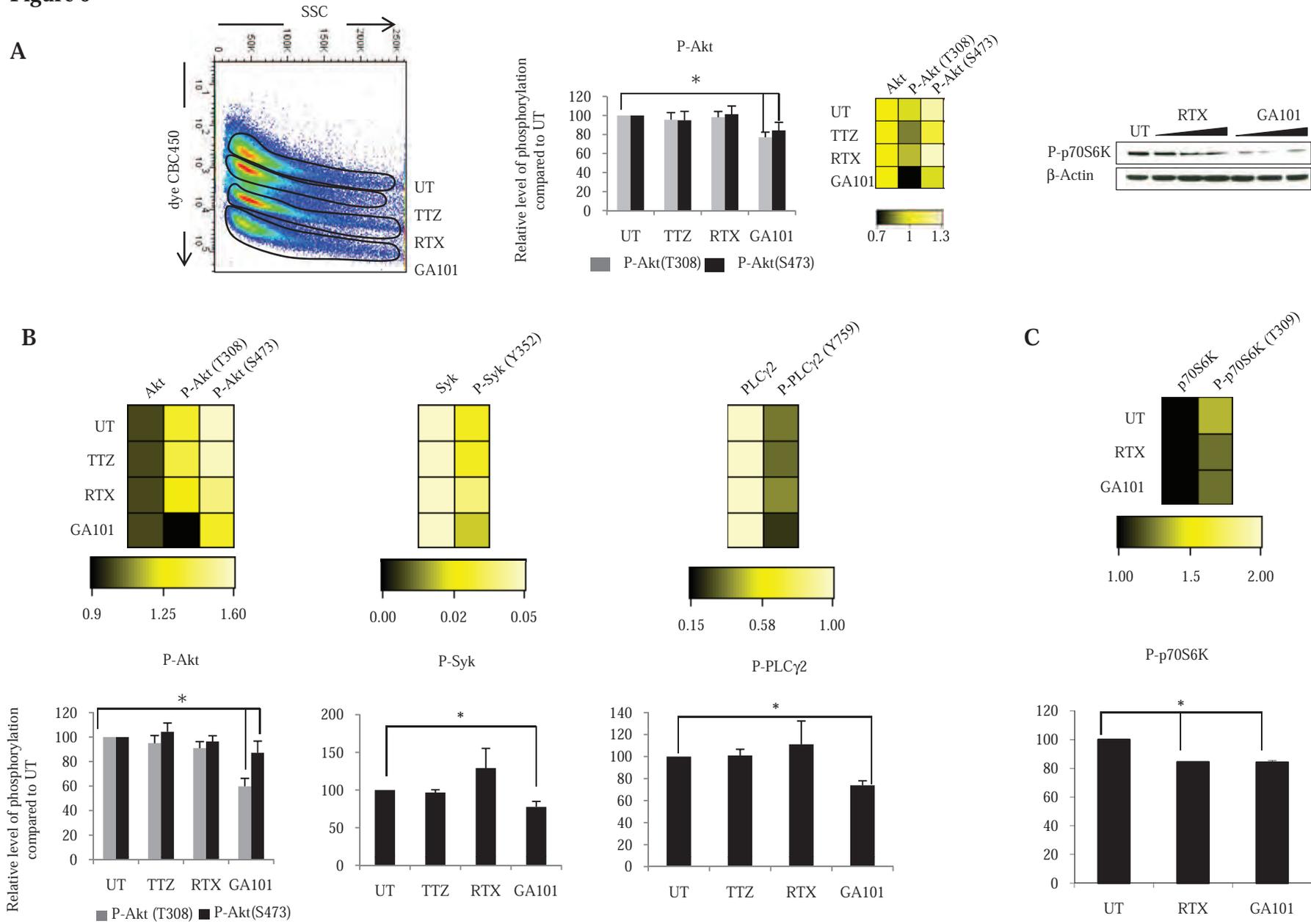
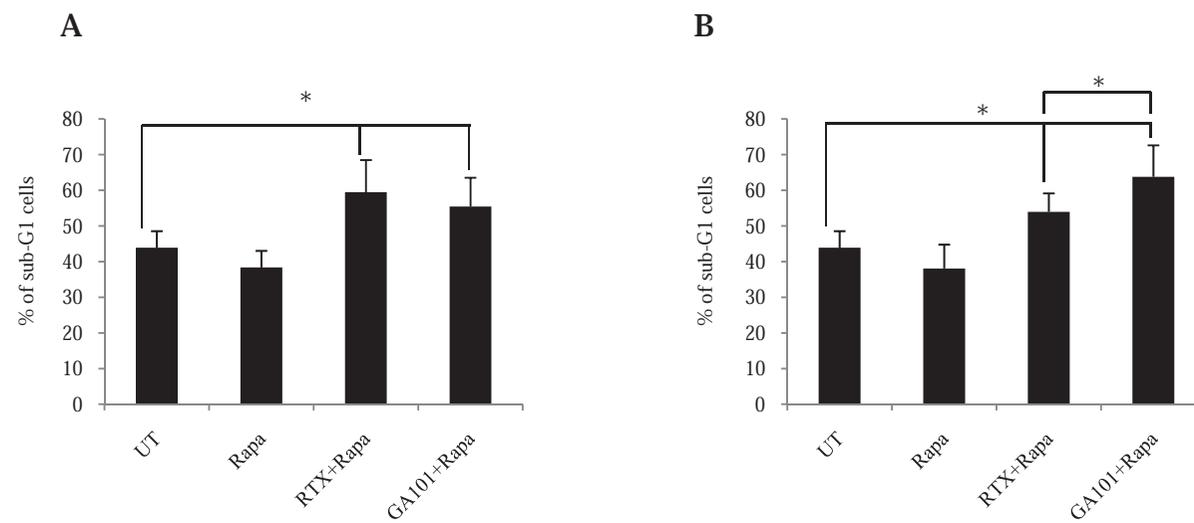


Figure 6



Supplementary Figure legend:

Bcl2 expression in MALC treated with antibodies

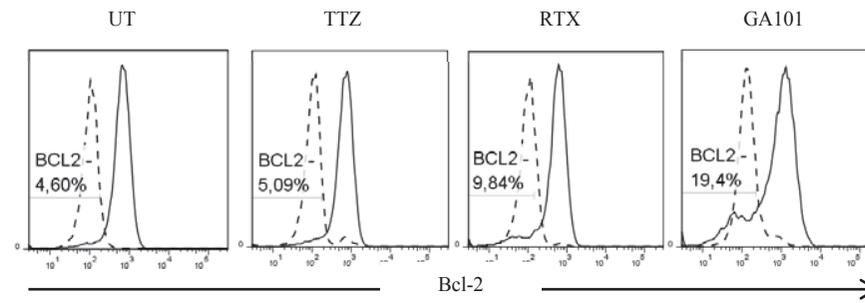
MALC were treated or not for 10 days with 10 µg/ml antibodies and Bcl2 expression was analyzed by flow cytometry (A) and Western-blot analysis (B).

A) Histograms were realized with Flowjo[®] software and are representative of three independent experiments.

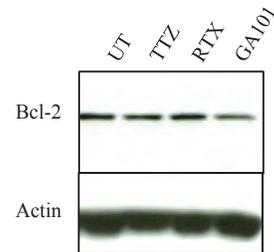
B) Representative of two independent experiments, β-actin expression was used as a control of protein expression.

Supplementary figure 1

A



B



ANNEXE 2:

Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology.

Jean C., Gravelle P., Fournié J.J. & Laurent G.

ONCOGENE, 2011

REVIEW

Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology

C Jean^{1,2,3}, P Gravelle^{1,2,3}, J-J Fournie^{1,2,3} and G Laurent^{1,2,3,4}

¹INSERM UMR1037-Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France; ²Université de Toulouse, Toulouse, France;
³CNRS ERL, Toulouse, France and ⁴Service d'Hématologie, CHU Purpan, Toulouse, France

Dynamic interactions between cells and extracellular matrix (ECM) through integrins influence most cellular functions. Normal cells, but even more, tumor cells are subjected to different forms of stress, including ischemia, radical oxygen species production, starvation, mechanical stress or genotoxic insults due to anti-cancer drugs or irradiation. In these situations, an adaptative cellular response occurs, integrating a complex network of intracellular signaling modules, which, depending on stress intensity, may result to either damage repair followed by complete restitution of cellular functions, or programmed cell death. Because of its implication in oncogenesis and anti-cancer therapy, cellular stress response has been thoroughly investigated. However, most of these studies have been performed in the context of isolated cells without taking into consideration that most cells are part of the tissue within which they interact with ECM through integrin. Few studies have described the influence of stress on cell-to-ECM interaction. However, one can speculate that, in these conditions, cells could functionally interact with protein microenvironment either to create positive interactions to survive (for example by facilitating protective pathways) or negative interaction to die (for example by facilitating detachment). In this review, we summarize the knowledge relative to the influence of different stress modalities on ECM remodeling, integrin expression and/or function modifications, and possible functional consequences, independently from the cellular model as these findings came from a large variety of cells (mesenchymal, endothelial, muscular, epithelial and glandular) and fields of application (cancer, vascular biology and tissue engineering). Most studies support the general notion that non-lethal stress favors ECM stiffness, integrin activation and enhanced survival. This field opens large perspectives not only in tumor biology but also in anti-cancer therapy by targeting one or several steps of the integrin-mediated signaling pathway, including integrin ligation, or activation of integrin-linked enzymes or integrin adaptors.

Oncogene (2011) 30, 2697–2706; doi:10.1038/onc.2011.27; published online 21 February 2011

Keywords: stress; ECM; integrin biology; remodeling; cellular response

Introduction

Tissues are made of cells and a protein support, termed extracellular matrix (ECM). ECM contains a variable proportion of a large variety of matrix and non-matrix proteins. The latter consists of growth factors, inflammatory molecules, or immune soluble mediators. These proteins can be retained by ECM, thus acting as a reservoir for these important regulators. In this review, the term of ECM is restricted to intrinsic matrix proteins such as collagens (27 members), glycoproteins (fibronectin, laminin, vitronectin, tenascin, thrombospondin, SPARC for secreted protein acidic and rich in cysteine), proteoglycans (aggrecan, decorin, perlecan, syndecan and versican) and elastin. ECM composition notably influences its mechanical properties such as compliance, which, at least in part, regulates integrin biology. For example, collagen, especially when polymerized, increases the stiffness of the matrix support, compared with fibronectin.

ECM composition is regulated through synthesis and degradation. It is generally believed that, in tumors, the main cellular source of ECM is resident fibroblasts, even if virtually all types of cells may synthesize ECM proteins. Degradation is under control of many proteases among which metalloproteases (MMPs) have one of the most important role. MMP family consists in 23 members of Zn-dependent endopeptidases with variable spectrum of specificity, collagen and fibronectin being the main substrates. Synthesis and degradation often appear as two coordinated processes for ECM remodeling, resulting in precise mechanical properties (from stiff to soft) depending on the tissue function and organization.

Cells interact physically and functionally with ECM through transmembrane proteins termed integrins, which connect ECM to cell cytoskeleton (for review, see Desgrosellier and Cheresch, 2010). Integrin proteins are heterodimers composed of an α -chain (18 types) and a β -chain (8 types) for a total of 24 combinations. Although α -chain is involved in ligand specificity, β -chain binds to cytoskeleton and transduces the signal from ECM to the cell (see below). Integrins can also be classified according to ligand specificity region. Thus, GFOGER, an amino peptide sequence contained in most collagen fraction, reacts with $\alpha 2\beta 1$ integrin. RGD,

Correspondence: Dr C Jean, CPTP, INSERM UMR1037, Pavillon Lefebvre Bat. B, Place du Dr. Baylac, CHU PURPAN, BP 3028, Toulouse 31024, France.

E-mail: christine.jean@inserm.fr

Received 16 December 2010; revised and accepted 16 January 2011; published online 21 February 2011

a consensus sequence present in fibronectin and vitronectin, binds to $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$. Laminin receptors and leukocytes-specific receptors bind to $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$, respectively, the latter being widely expressed in hematopoietic cells.

Upon binding, integrins gather together in membrane-specific region and recruits through their intracellular domains several coupling proteins, which form the focal adhesion complex. Among these proteins, focal adhesion kinase (FAK), a non-receptor tyrosine kinase, has a central role in transducing integrin-mediated signal through focal adhesion contact (for review, see Berrier and Yamada, 2007). FAK and Src, another non-receptor tyrosine kinase, control the recruitment of adaptor proteins that behave as molecular hubs for transducing integrin signals. Among them, the most important are p130Cas (BCAR1) and NEDD9 (neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 9). Through these proteins, integrin engagement results in the activation of a vast spectrum of signaling pathways involving protein tyrosine kinase, small GTPase of the Rho family, as well as the activation of JNK, ERK and PI3K/Akt modules (for review, see Guo and Giancotti, 2004). Strong evidences support the notion that not only FAK, but also integrin adaptors, have a role in cell transformation, tumor progression and chemoresistance (Cabodi *et al.*, 2010).

ECM-cell interaction acts in two ways. From ECM to the cell, in so far as it has been shown that integrin-mediated signal is strongly influenced by spatial organization (2D *versus* 3D) and mechanical properties (stiff *versus* soft) of ECM support. In this context, integrins act as sensors of mechanical constraints generated by the microenvironment and which convey these informations to the cell. This 'outside-in' signaling may influence through FAK and other key regulators, important cellular functions such as proliferation, survival or motility. From the cell to ECM, in so far as it has been also shown that forces exerted on the cytoskeleton regulate, in turn, integrin-binding activity. This 'inside-out' signal reciprocally operates on ECM tension or 'tensigrity' as pioneered by DE Ingber (Ingber, 2003a,b). According to this model, ECM-cell interaction is a dynamic process, which concerns not only cell machinery but also ECM biological properties (for review, see (Moore *et al.* 2010)). Such mechanotransduction-based mechanisms are involved in tissue homeostasis, embryogenesis, wound healing and carcinogenesis. It has been shown that proliferation of cells cultured in 2D on matrix depends not only on support compliance (stiffness being generally associated with proliferation), but also depends on the type of integrin engaged. Thus, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ or $\alpha v\beta 3$ trigger cell proliferation through a Shc/Ras/ERK module, whereas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, or $\alpha 6\beta 1$ activation results in cell growth inhibition, eventually associated with cell differentiation or even programmed cell death (Kubota *et al.*, 1988; Varner *et al.*, 1995; Sastry *et al.*, 1996; Wary *et al.*, 1996).

However, cellular functions mostly affected by ECM-cell interaction are adhesion, migration and

invasiveness. The decrease in integrin function results in reduced adhesion and ultimately to cell detachment. In non-transformed cells, cell detachment results, in turn, in a type of programmed-cell death termed *anoikis*. This has been described in normal epithelial and endothelial cells, whereas tumor cells are most often resistant to *anoikis* (for review, see Frisch and Ruoslahti, 1997). *Anoikis* may also be facilitated by the loss of cell-to-cell contacts following dissociation of the cadherin-catenin complexes (Fouquet *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2007; Lugo-Martinez *et al.*, 2009). This observation strengthens the notion that *anoikis* activation is a more general process for preventing inappropriate cell detachment, and, for this reason, considered as a tumor suppressor mechanism. However, some cells are resistant to *anoikis*, and thus may detach while remaining alive. Resistance to *anoikis* can be related to intrinsic cellular defects or external signals. Among the former, FAK overexpression or constitutive activation, and ERK deregulation, may indeed contribute to protection against *anoikis* (Frisch *et al.*, 1996; Howe *et al.*, 2002). Alternatively, external signals may also regulate *anoikis*. For example, it has been shown that some specific laminin domains, laminin-proteoglycan complexes or collagen IV are highly efficient to block *anoikis* (Weber *et al.*, 2008; Salo *et al.*, 2009; Munoz *et al.* 2010). Resistance to *anoikis* is a prerequisite for epithelial-mesenchymal transition, and acquisition of invasion capacity.

Normal cells, but even more, tumor cells are subjected to different forms of stress, including radical oxygen species production, ischemia, starvation, mechanical stress, genotoxic insults or irradiation. It has recently emerged that cellular stress may affect ECM remodeling and integrin biology, and subsequently may deregulate virtually all the processes described above. The influence of the redox balance on ECM-cell interaction has been recently reviewed (Chiarugi, 2008). We review below the influence of other forms of stress on ECM composition, integrin expression and activity, cellular signaling and possible modifications of cellular functions.

Hypoxia

The role of hypoxia on ECM remodeling was mainly investigated in the biology of vessels and vascular diseases. One should also consider the effect of hypoxia in tumors as far as hypoxemia is one of the major parameter influencing tumor formation. Moreover, neoangiogenesis implies intense production of matrix framework, which is required for vessel formation and expansion.

Impact of hypoxia on ECM remodeling

Thus, hypoxia activates collagen synthesis (notably collagen I) in periarterial smooth muscle cells. Abnormal collagen metabolism has been involved in arterial stiffness (Ishikawa *et al.*, 2005), a risk factor for

arteriosclerosis, arterial and pulmonary hypertension (Gong *et al.*, 2004). Similar observations have been reported for fibroblasts through a post-transcriptional mechanism (Horino *et al.*, 2002). Hypoxia also facilitates the accumulation of syndecan-4 in lung cancer cells (Koike *et al.*, 2004). Hypoxia stimulates the production of galectin-1, a lactose-binding lectin, which enhances cell-to-ECM adhesion and contributes through this mechanism to hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice (Case *et al.*, 2007). Hypoxia facilitates the production of fibronectin in brain capillaries, in parallel with overexpression of integrin $\alpha 5\beta 1$ (Milner *et al.*, 2008). In this context, hypoxemia operates through HIF (Hypoxia Inducible Factor) transcription factor (Myllyharju and Schipani, 2010). However, hypoxia may also influence ECM degradation through production of MMPs, such as described in breast cancer cells (Munoz-Najar *et al.*, 2006) or in hepatoma cells through HIF α (Miyoshi *et al.*, 2006). The influence of hypoxia on MMP production has been also suggested *in vivo* in human carcinoma xenografts (Miyazaki *et al.*, 2008).

Impact of hypoxia on integrin expression and function

Hypoxia may also affect integrin biology. For example, hypoxia enhances $\beta 1$ expression through a HIF α -mediates transcriptional mechanism in fibroblasts (Keely *et al.*, 2009), $\alpha 5\beta 1$ in endothelial cells (Milner *et al.*, 2008), $\alpha v\beta 3$ in placenta (Cowden Dahl *et al.*, 2005), $\beta 2$ in leukocytes (Kong *et al.*, 2004), or $\alpha v\beta 5$ in endothelial cells (Walton *et al.*, 2000). HIF was also found to control the expression of NEDD9 in colorectal carcinoma cells (Kim *et al.* 2010). HIF might not be the unique factor by which hypoxia regulates integrin expression. The other oxygen sensor VHL was also shown to regulate $\alpha 5$ (Wykoff *et al.*, 2004). Hypoxia also influences integrin function either by increasing $\beta 1$ activity (Blaschke *et al.*, 2002) or by facilitating the recruitment of $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ integrins (Skuli *et al.*, 2009). Another study showed that hypoxia induced FAK activation by increasing $\beta 1$ expression (Lee *et al.* 2011). Finally, hypoxia may also modulate cell adhesion through integrin-independent mechanisms. For example, it augments expression of some selectin ligands (such as Lewis), thereby facilitating endothelial cell adhesion to E-selectin (Koike *et al.*, 2004).

Functional consequences

Based on these considerations, it is not surprising that hypoxia favors ECM-cell or cell-to-cell contacts as shown between tumor cells and endothelial cells (Koike *et al.*, 2004). The impact of hypoxia on integrin biology could explain why it could protect cells against *anoikis* (Rohwer *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009) and contribute to cancer invasion and metastasis (Sullivan and Graham, 2007).

Mechanical stress

Many cells, particularly vascular system cells, are submitted to intense mechanical stress of different mechanisms such as shear, stretch, or hydrostatic pressure. In cancer, mechanical stress has an important role in tumor spatial organization and expansion, but may also affect intrinsic tumor cell function. Indeed, tumor cells are subjected to high hydrostatic pressure due to high cellular density, intense stroma reaction and limited space to expand. These mechanical forces are sensed by integrins and informations are transmitted to the cell with important consequences for ECM and integrin biology (for review, see Schwartz and DeSimone, 2008). For example a pressure variation of 15 Torr is enough to increase cellular adhesiveness through a $\alpha 5\beta 1$ /FAK/Src module Schwartz and DeSimone, 2008. Moreover, it has been reported that stretching fibroblasts cells caused the binding of focal contact proteins containing paxillin, FAK and p130Cas (Sawada and Sheetz, 2002). In spite of its evident interest, this field of tumor cell biology has not received great attention. It is possible that investigators have been discouraged by the fact that the scientific community remains suspicious about the pertinence of the models used (2D cell culture on support with variable compliance, cell culture in 3D milieu or 3D-spheroid culture). These approaches have still demonstrated that 3D cell-to-matrix interaction implicates different integrin-mediated protein recruitment in focal adhesion zone, and different signaling pathways, as compared with 2D culture (Cukierman *et al.*, 2001). This suggests that spatial organization may greatly influence cell-to-ECM functional interaction (for review, see Zamir and Geiger, 2001).

Impact of mechanical stress on ECM remodeling

Previous studies have reported that the magnitude of collagen or fibronectin synthesis in fibroblasts cultured on a 2D collagenic support depends on its degree of relaxation (Lambert *et al.*, 1992). Similar observations were made with tenascin (Chiquet, 1999). In the latter study, the investigators identified a common 5'-GA GACC-3' sequence, target of mechanotransduction, whatever the support used (Chiquet, 1999). More recently, it has been described that 3D culture of fibroblasts in fibrillar collagen results in increased ECM synthesis (Kessler *et al.*, 2001) and that $\alpha 2\beta 1$ regulates this mechanism (Eckes *et al.*, 2006). In fact, most integrins can also activate such 'secretory' profile in fibroblasts cultured on rigid support, including those binding to the RGD sequence (Kock *et al.*, 2009). This phenomenon is not restricted to fibroblasts and may also occur for example in chondrocytes (Lahiji *et al.*, 2004). In tumor cells, Tannock and co-workers have shown that multilayer culture of carcinomatous cells resulted in ECM accumulation, collagen being the most representative (for review, see Minchinton and Tannock, 2006). Horning *et al.* have reported increased

collagen production in spheroids, compared with 2D culture (Horning *et al.*, 2008). It is important to note that spatial organization of the cell culture may result in the deregulation of other proteins than ECM, such as growth factors, angiogenic mediators, chemokines, immune regulators (Ghosh *et al.*, 2005; Oswald *et al.*, 2006), or ECM-degrading enzymes such as MMP-9 (Cha and Purslow, 2010) and MMP-13 (De Croos *et al.*, 2010).

Impact of mechanical stress on integrin expression and function

Mechanical stress may increase integrin expression. Thus, compared with 2D culture, 3D culture resulted in increased expression of $\alpha 5\beta 1$ in fibroblasts and chondrocytes (Takahashi *et al.*, 2003; Hannafin *et al.*, 2006), $\beta 1$ subunit in gliomas and breast cancer cells, or $\alpha 6$ in chondrosarcoma (Demou, 2010).

Mechanical stress may also influence integrin activity. Thus, Schwartz's group has described that $\alpha v\beta 3$ engagement on fibronectin resulted in increased binding activity, supporting the concept of 'inside-out' transduction of mechanical forces (Katsumi *et al.*, 2005). The modulation of integrin activity is specific for the substrate (for example, $\alpha 5\beta 1$ for fibronectin or $\alpha 2\beta 1$ for collagen) (Orr *et al.*, 2006). Mechanical stress may also affect $\beta 1$ subunit activity, at least in fibroblasts (Wen *et al.*, 2009).

Functional consequences

Thus, it is not surprising that mechanical stress may greatly influence many cellular functions. For example, 2D culture of glioma cells on matrix support of variable compliance showed that low compliance (stiffness) favors migration and proliferation (Ulrich *et al.*, 2009). Similarly, Provenzano *et al.*, using a 3D culture model of non-transformed mammary epithelial cells, showed that matrix compliance greatly influences cellular phenotype, for example, facilitated proliferation and migration. This suggests that mechanical stress may positively act on normal cells, an important finding in the perspective of carcinogenesis (Provenzano *et al.*, 2009). In vessels, $\alpha v\beta 3$ or $\alpha v\beta 5$ activation by vitronectin results in smooth muscle cell proliferation, this mechanism contributes to arteriosclerosis (for review, see Shyy and Chien, 1997).

Genotoxic stress

Impact of anti-cancer agents on ECM remodeling

The influence of drugs on ECM composition is not unique. On one hand, anti-cancer agents reduce the synthesis of some ECM components, including collagen, fibronectin or proteoglycan (Sasaki *et al.*, 1987; Jikko *et al.*, 1996; Muszynska *et al.*, 2001). However, these agents stimulate lysyl oxidase and subsequent collagen

polymerization (Di Donato *et al.*, 1997). Moreover, drugs as well as ionizing radiations also induce the secretion of TGF β , a cytokine with potent pro-fibrotic action (Ise *et al.*, 2004). This could contribute to the mechanism of complications of anti-cancer therapy such as clinically documented anthracycline-induced nephrotoxicity or retroperitoneal fibrosis induced by ionizing radiation. Moreover, some drugs, such as anthracyclines, may favor ECM remodeling by stimulating MMP production, such as documented for MMP-2 or MMP-9 in cardiac myocytes (Kizaki *et al.*, 2006). This could explain the loss of heart collagen mass in doxorubicin-treated animals, one of the features of anthracycline-induced cardiotoxicity. In agreement with this observation, MMP overproduction has been also described in multidrug-resistant (MDR1) tumor cells (Song *et al.*, 2009).

Ionizing radiation may also stimulate MMP production in tumor cells, as described for MMP-9 in a hepatoma model, resulting in the stimulation of invasive capacity (Cheng *et al.*, 2006).

Impact of anti-cancer agents on integrin expression and function

Very little is known about the impact of anti-tumor agents on integrin biology. However, some observations suggest that, these agents might influence focal adhesion zone formation (Repeh *et al.*, 1993) as well as phosphorylation of FAK (Repeh *et al.*, 1993; van Nimwegen *et al.*, 2006), p130Cas and paxillin (Beinke *et al.*, 2003). This could explain the anti-metastasis properties of some anti-cancer drugs such as anthracyclines (Repeh *et al.*, 1993). Conversely, as it is suggested by the MDR cell profile, chronic exposure to drugs may result in reduced integrin expression and function with significant consequences on cell adhesion and migration (Duensing *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 2001; Kozlova *et al.*, 2004). However, Damiano *et al.* have described increased expression of $\alpha 4\beta 1$ in a model of multiple myeloma cells selected for their resistance to melphalan (Damiano *et al.*, 1999).

Role of ECM to stress cellular response: the concept of cellular adhesion-mediated drug resistance

The interaction between ECM and cells in the context of genotoxic stress is reciprocal. Indeed, several works, including the pioneering studies coming from W. Dalton and his group, have provided robust evidences that ECM may seriously interfere with cell proliferation and survival control and subsequently, with drug-induced cytotoxic effect, thus defining so-called 'cellular adhesion-mediated drug resistance' or CAM-DR (Damiano *et al.*, 1999). It should be noted that CAM-DR has been mainly studied in myeloma cells cultured on a 2D fibronectin support and treated with chemotherapy. Later, the concept has been extended to ionizing radiation (Cordes *et al.*, 2006; Monferran *et al.*, 2008) and to other cell types, including leukemia, lymphoma or lung carcinoma (Bendall *et al.*, 1998; Sethi *et al.*, 1999; Estrugo *et al.*, 2007). However, CAM-DR has

been also demonstrated *in vivo* in a mouse model of human leukemia (Matsunaga *et al.*, 2003).

The mechanism by which CAM-DR acts is not unique. First, cellular adhesion results in cellular protection by deregulating Bcl2 expression, stimulating PI3K/AKT and NF κ B pathways, or by inactivating p53 (Hazlehurst *et al.*, 2000; Landowski *et al.*, 2003). It also implies drug transport abnormalities (Schuetz and Schuetz, 1993) or decreased drug-induced DNA damage (Hoyt *et al.*, 1996). However, the main mechanism, which indeed deals with most drugs, is the negative regulation of proliferation control due to the induction of p27/Kip1, one of the main regulators of G1/S transit (Hazlehurst *et al.*, 2000). CAM-DR and its role in the function of tumor microenvironment have been recently reviewed (Meads *et al.*, 2008). It is interesting to note that a role of p27 has been also attributed in drug resistance in a 3D model of mouse mammary tumor cells (St Croix *et al.*, 1996).

Integrins involved in CAM-DR have also been examined. VLA4 (α 4 β 1) appears to mediate p27 regulation and CAM-DR in myeloma cells cultured on fibronectin, suggesting that other domains than RGD are involved (Hazlehurst *et al.*, 2000). However, De Toni-Costes *et al.* have shown that, in leukemic cells, CAM-DR could be mediated by a α 5 β 1/GSK3/NF κ B module (De Toni *et al.*, 2006; De Toni-Costes *et al.*, 2010).

CAM-DR represents a promising approach for pharmacological interventions based on the inhibition of integrin-dependent signaling by statin (Schmidmaier *et al.*, 2004), integrin expression by Bortezomib (Noborio-Hatano *et al.*, 2009) or integrin-ECM binding by small molecules such as FNIII14 interfering with attachment to fibronectin (Matsunaga *et al.*, 2008). Finally, it is important to note that, not only cell-to-matrix, but also cell-to-cell interaction may protect cells against drugs, and that gap-junction poisons, such as carbenoxolone may act as chemosensitizers (Westhoff *et al.*, 2008).

Whatever the place of CAM-DR in molecular pharmacology, several important questions remain unsolved. For example, it is unclear whether supports less compliant than fibronectin could have a similar role. It is also uncertain whether CAM-DR takes place in a 3D milieu. Finally, CAM-DR might depend on the integrin equipment, and therefore, on cell type.

Role of ECM on anti-tumor drug distribution

Another interface between ECM and genotoxic agents is the impact of ECM composition on drug diffusion and distribution. Indeed, 3D culture models (multilayer cultures, spheroids and xenograft) have shown that not only these models favor ECM synthesis, but also that ECM thus accumulated in the intercellular spaces, alters the biodiffusion of drugs (Horning *et al.*, 2008) or immunoglobulins (Netti *et al.*, 2000). Based on the latter observation and others coming from the group of R Jain, one can speculate that ECM density and composition (with a special mention for collagen distribution) should greatly influence the efficacy of monoclonal

antibodies, such as trastuzumab or Rituximab. Surprisingly, this important question has received for the moment very little attention.

Ultraviolet (UV) stress

Impact of UV on ECM remodeling

Solar irradiation is an important source of stress for keratinocytes, and represents the main contributor for photocarcinogenesis and photoageing. The effect of UV on ECM has been largely documented a long time ago, as the loss of collagen I mass, considered as one of the striking features of photoageing. However, the mechanism of UV action is complex. Thus, UV inhibits collagen I synthesis in dermal fibroblasts by interfering with the TGF β /smad module, a critical component of collagen I regulation in these cells (Quan *et al.*, 2004). However, UV influence the proportion of collagen III, a fraction, which is more rigid and more resistant to degradation, compared with collagen I (Kligman *et al.*, 1989). UV also increase fibronectin biosynthesis (Boyer *et al.*, 1992, personal results). UV stimulate the synthesis of fibromodulin, a protein involved in collagen I assembly (Iovine *et al.*, 2009) and that of clusterin, a protein, which is involved in elastin assembly (Janig *et al.*, 2007). In parallel UV activate a wide spectrum of ECM-degrading enzymes, including MMP-1, MMP-3 and MMP-9. All these UV effects might contribute to collagen I diminution and its replacement by other more rigid ECM components, which confer to the skin decreased elasticity and strength, two major characteristics of photoageing (Hazane *et al.*, 2005). Moreover, our results showed that, in non-transformed keratinocytes, UV or oxidative stress activates synthesis and secretion of granzyme B (GrB), a serine-protease normally concentrated in cytotoxic granules contained in immune effector cells such as activated T or NK cells (Hernandez-Pigeon *et al.*, 2006, 2007). In the context of UV irradiation, GrB acts as an exoenzyme cleaving fibronectin at the RGD site (Buzza *et al.*, 2005). Based on GrB activity spectrum, it is also likely that UV-produced GrB cleaves other ECM components such as vitronectin, laminin, and proteoglycans (Buzza *et al.*, 2005).

Impact of UV on integrin expression and function

Previous studies indicate that UV may also interfere with integrin biology. Thus, UV activate gene expression of α 2, α 1 and α 5 in skin mice (Kligman *et al.*, 1999), as well as they stimulate the activity of β 1 subunit in fibroblasts and of α 2 β 3 dimer in platelets (Verhaar *et al.*, 2008).

Functional consequences

Few studies have addressed the functional consequences of UV stress. However, it has been described that UV increases adhesion of melanocytes to fibronectin through α 5 β 1 and α v β 3, this mechanism limits migration (Neitmann *et al.*, 1999). Conversely, UVB favor

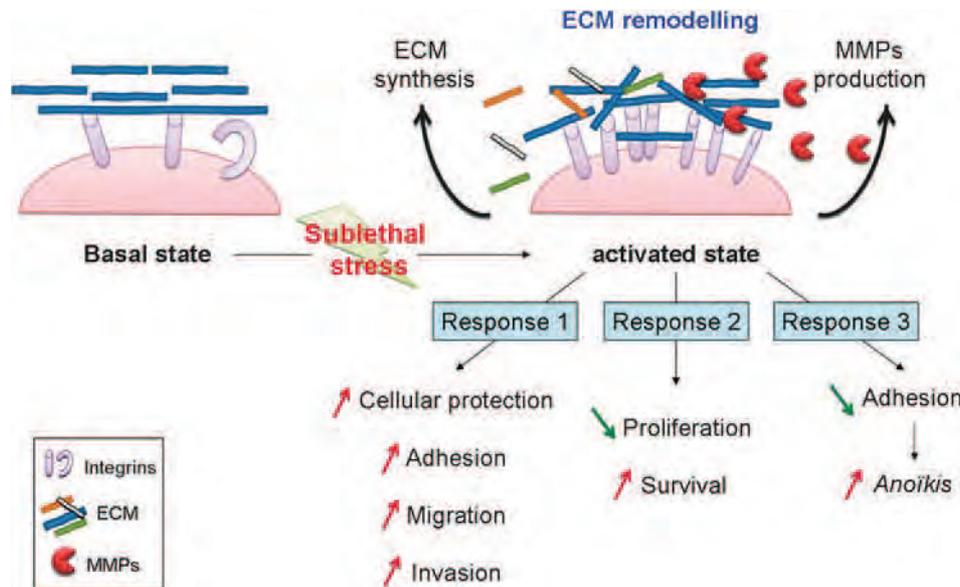


Figure 1 Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology: three patterns of cellular response.

retina cell migration through deregulation of MMP-2 and MMP-9 (Yao *et al.*, 2009).

Surprisingly, very few studies have addressed the role of ECM remodeling in cell detachment to the matrix and subsequent cell death in the context of UV stress. This question is still important in the perspective of photocarcinogenesis as one can speculate that irradiated cell clearing-off should prevent accumulation of cells containing damaged DNA and subsequent risk of malignant transformation. Previously, we have described that, upon UVA activation, GrB-induced cleavage of fibronectin resulted not only in the detachment of normal keratinocytes from a 2D fibronectin support, but also in cell death (*anoikis*) (Hernandez-Pigeon *et al.*, 2007). However, when these cells were cultured in a 2D collagen support, then irradiated, not only they remained alive, but they also accelerated their invasion as single cells through the collagen milieu (Jean *et al.*, 2009). In a recently published study, these intriguing observations were, at least partially, elucidated. First, UV induces the loss of cell-to-cell contacts through the dissociation of catenin/E-cadherin complexes, thus facilitating single cell invasion. Second, UV stimulates the production of MMP-1, a potent collagenase, thus facilitating invasion through the collagenic milieu (Jean *et al.*, 2009). Furthermore, these two mechanisms appeared finely coordinated by a common molecular mechanism consisting of the phosphorylation of β -catenin on tyrosine 654 site (Jean *et al.*, 2009). The differences of behavior between cells cultured on fibronectin and collagenic support (detachment *versus* migration) illustrate the functional importance of ECM composition and integrin equipment.

Stress, ECM and integrin biology: towards a model

Most conditions of stress induce intense ECM remodeling and changes in integrin expression and/or functions.

Striking similarities exist between different sources of stress. With few exceptions, stress favors accumulation of less compliant ECM components and concomitant increase in integrin function, all events converging to more rigidity and adhesion. Functional consequences of these modifications are neither unique, nor largely documented and most often complex. However, based on above findings and considerations, it appears that three modalities of response have been described (see Figure 1). In the first modality of response, modification of cell-to-matrix interactions confers cellular protection or even higher proliferation. This 'positive' response can be associated with increased migration and invasiveness. As a second modality of response, it could also happen that cell-to-ECM interaction results in transitory cell growth arrest, as it has been documented in the context of CAM-DR. This modality of response may also represent an advantage for survival in the context of genotoxic stress or starvation. As a third modality of response, stress stimulates ECM-degrading enzyme production, resulting in ECM dislocation or 'excision' of integrin site (such as RGD for GrB) and subsequent detachment of cells from their supports. In turn, detached cells may die from *anoikis* or migrate if they are rendered resistant to *anoikis*. Whatever the complexity of these processes, the orientation of the cellular response depends on stress intensity, matrix composition and mechanotransduction.

Future directions in tumor biology and anti-cancer therapy

In this review, we have not considered other forms of stress, which potentially may interfere with ECM remodeling and integrin biology in tumor cells. Thus, Sood *et al.* have described a fascinating model of mice submitted to a chronic behavioral stress consisting of physical restraint. In these studies, the authors showed

that this form of stress resulted in deregulated MMP production through catecholamines synthesis in an orthotopic human ovarian carcinoma xenograft (Thaker *et al.*, 2006). More recently, this group has described that, in the same model, catecholamines accumulation resulted in FAK activation responsible for tumor progression (Sood *et al.*, 2010). These observations raise the possibility that hormonal deregulation as commonly observed in many pathological situations or ageing, may create favorable conditions for tumor initiation and progression by modifying integrin biology.

As cancer therapy is concerned, the connections between stress, integrin biology and chemoresistance are not limited to CAM-DR. Indeed, as described above, many forms of stress may directly stimulate the function of FAK and integrin adaptors, which thus represent potential targets for chemosensitization (Ta *et al.*, 2008; Thao le *et al.*, 2009). This question is of special interest since the introduction of FAK inhibitors, specific (Tanjoni *et al.*, 2010; Walsh *et al.*,

2010) or not, such as some cyclooxygenase-2 inhibitors (Casanova *et al.*, 2008).

To conclude, it appears that sublethal stress may greatly influence major cellular function by modifying the spatial interaction between tumor cells and ECM. Although this field raises fascinating perspectives, it is still limited by experimental models (not only animal models but 3D *in vitro* system) and the difficulty to visualize the dynamic of mechanotransduction in a 3D organization.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Dr Claire RACAUD-SULTAN for the advised comments.

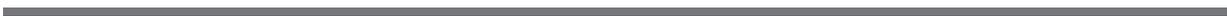
References

- Beinke C, Van Beuningen D, Cordes N. (2003). Ionizing radiation modules of the expression and tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated proteins focal adhesion kinase (FAK) and its substrates p130cas and paxillin in A549 human lung carcinoma cells *in vitro*. *Int J Radiat Biol* **79**: 721–731.
- Bendall LJ, Makrynika V, Hutchinson A, Bianchi AC, Bradstock KF, Gottlieb DJ. (1998). Stem cell factor enhances the adhesion of AML cells to fibronectin and augments fibronectin-mediated anti-apoptotic and proliferative signals. *Leukemia* **12**: 1375–1382.
- Berrier AL, Yamada KM. (2007). Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* **213**: 565–573.
- Blaschke F, Stawowy P, Goetze S, Hintz O, Grafe M, Kintscher U *et al.* (2002). Hypoxia activates beta(1)-integrin via ERK 1/2 and p38 MAP kinase in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **296**: 890–896.
- Boyer B, Fourtanier A, Kern P, Labat-Robert J. (1992). UVA- and UVB-induced changes in collagen and fibronectin biosynthesis in the skin of hairless mice. *J Photochem Photobiol B* **14**: 247–259.
- Buzza MS, Zamurs L, Sun J, Bird CH, Smith AI, Trapani JA *et al.* (2005). Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem* **280**: 23549–23558.
- Cabodi S, del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P. (2010). Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer* **10**: 858–870.
- Casanova I, Bosch R, Lasa A, Parreno M, Cespedes MV, Brunet S *et al.* (2008). A celecoxib derivative inhibits focal adhesion signaling and induces caspase-8-dependent apoptosis in human acute myeloid leukemia cells. *Int J Cancer* **123**: 217–226.
- Case D, Irwin D, Ivester C, Harral J, Morris K, Imamura M *et al.* (2007). Mice deficient in galectin-1 exhibit attenuated physiological responses to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**: L154–L164.
- Cha MC, Purslow PP. (2010). The activities of MMP-9 and total gelatinase respond differently to substrate coating and cyclic mechanical stretching in fibroblasts and myoblasts. *Cell Biol Int* **34**: 587–591.
- Cheng JC, Chou CH, Kuo ML, Hsieh CY. (2006). Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene* **25**: 7009–7018.
- Chiarugi P. (2008). From anchorage dependent proliferation to survival: lessons from redox signalling. *IUBMB Life* **60**: 301–307.
- Chiquet M. (1999). Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol* **18**: 417–426.
- Cordes N, Seidler J, Durzok R, Geinitz H, Brakebusch C. (2006). beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. *Oncogene* **25**: 1378–1390.
- Cowden Dahl KD, Robertson SE, Weaver VM, Simon MC. (2005). Hypoxia-inducible factor regulates alphavbeta3 integrin cell surface expression. *Mol Biol Cell* **16**: 1901–1912.
- Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **294**: 1708–1712.
- Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* **93**: 1658–1667.
- De Croos JN, Roughley PJ, Kandel RA. (2010). Improved bioengineered cartilage tissue formation following cyclic compression is dependent on upregulation of MT1-MMP. *J Orthop Res* **28**: 921–927.
- De Toni-Costes F, Despeaux M, Bertrand J, Bouroogaa E, Ysebaert L, Payrastre B *et al.* (2010). A New alpha5beta1 integrin-dependent survival pathway through GSK3beta activation in leukemic cells. *PLoS One* **5**: e9807.
- De Toni F, Racaud-Sultan C, Chicanne G, Mas VM, Cariven C, Mesange F *et al.* (2006). A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukemia. *Oncogene* **25**: 3113–3122.
- Demou ZN. (2010). Gene expression profiles in 3D tumor analogs indicate compressive strain differentially enhances metastatic potential. *Ann Biomed Eng* **38**: 3509–3520.
- Desgrosellier JS, Chersesh DA. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **10**: 9–22.
- Di Donato A, Ghiggeri GM, Di Duca M, Jivotenko E, Acinni R, Campolo J *et al.* (1997). Lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during chronic adriamycin nephropathy. *Nephron* **73**: 192–200.
- Duensing S, Brevis Nunez F, Meyer N, Anastassiou G, Nasarek A, Grosse J *et al.* (1996). Exposure to vinblastine modulates beta 1 integrin expression and *in vitro* binding to extracellular matrix molecules in a human renal carcinoma cell line. *Invasion Metastasis* **16**: 65–72.

- Eckes B, Zweers MC, Zhang ZG, Hallinger R, Mauch C, Aumailley M *et al.* (2006). Mechanical tension and integrin alpha 2 beta 1 regulate fibroblast functions. *J Invest Dermatol Symp Proc* **11**: 66–72.
- Estrugo D, Fischer A, Hess F, Scherthan H, Belka C, Cordes N. (2007). Ligand bound beta1 integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion-mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells. *PLoS One* **2**: e269.
- Fouquet S, Lugo-Martinez VH, Faussat AM, Renaud F, Cardot P, Chambaz J *et al.* (2004). Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes. *J Biol Chem* **279**: 43061–43069.
- Frisch SM, Ruoslahti E. (1997). Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 701–706.
- Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY. (1996). Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* **134**: 793–799.
- Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M *et al.* (2005). Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *J Cell Physiol* **204**: 522–531.
- Gong LM, Du JB, Shi L, Shi Y, Tang CS. (2004). Effects of endogenous carbon monoxide on collagen synthesis in pulmonary artery in rats under hypoxia. *Life Sci* **74**: 1225–1241.
- Guo W, Giancotti FG. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 816–826.
- Hannafin JA, Attia EA, Henshaw R, Warren RF, Bhargava MM. (2006). Effect of cyclic strain and plating matrix on cell proliferation and integrin expression by ligament fibroblasts. *J Orthop Res* **24**: 149–158.
- Hazane F, Valenti K, Sauvaigo S, Peinnequin A, Mouret C, Favier A *et al.* (2005). Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays. *J Photochem Photobiol B* **79**: 171–190.
- Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. (2000). Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene* **19**: 4319–4327.
- Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, Haure MJ, Baudouin C, Charveron M *et al.* (2007). UVA induces granzyme B in human keratinocytes through MIF: implication in extracellular matrix remodeling. *J Biol Chem* **282**: 8157–8164.
- Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, Haure MJ, Titeux M, Tonasso L *et al.* (2006). Human keratinocytes acquire cellular cytotoxicity under UV-B irradiation. Implication of granzyme B and perforin. *J Biol Chem* **281**: 13525–13532.
- Hofmann C, Obermeier F, Artinger M, Hausmann M, Falk W, Schoelmerich J *et al.* (2007). Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **132**: 587–600.
- Horino Y, Takahashi S, Miura T, Takahashi Y. (2002). Prolonged hypoxia accelerates the posttranscriptional process of collagen synthesis in cultured fibroblasts. *Life Sci* **71**: 3031–3045.
- Horning JL, Sahoo SK, Vijayaraghavalu S, Dimitrijevic S, Vasir JK, Jain TK *et al.* (2008). 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs. *Mol Pharm* **5**: 849–862.
- Howe AK, Aplin AE, Juliano RL. (2002). Anchorage-dependent ERK signaling—mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 30–35.
- Hoyt DG, Rusnak JM, Mannix RJ, Modzelewski RA, Johnson CS, Lazo JS. (1996). Integrin activation suppresses etoposide-induced DNA strand breakage in cultured murine tumor-derived endothelial cells. *Cancer Res* **56**: 4146–4149.
- Ingber DE. (2003a). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* **116**: 1157–1173.
- Ingber DE. (2003b). Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci* **116**: 1397–1408.
- Iovine B, Nino M, Irace C, Bevilacqua MA, Monfrecola G. (2009). Ultraviolet B and A irradiation induces fibromodulin expression in human fibroblasts *in vitro*. *Biochimie* **91**: 364–372.
- Ise K, Sato Y, Matsuyama S, Gunji T, Ishii S, Yamashita M *et al.* (2004). Transforming growth factor-beta signaling is enhanced following mitomycin-C treatment of islet xenograft. *Transplant Proc* **36**: 1183–1185.
- Ishikawa J, Kario K, Matsui Y, Shibasaki S, Morinari M, Kaneda R *et al.* (2005). Collagen metabolism in extracellular matrix may be involved in arterial stiffness in older hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Hypertens Res* **28**: 995–1001.
- Janig E, Haslbeck M, Aigelsreiter A, Braun N, Unterthor D, Wolf P *et al.* (2007). Clusterin associates with altered elastic fibers in human photoaged skin and prevents elastin from ultraviolet-induced aggregation *in vitro*. *Am J Pathol* **171**: 1474–1482.
- Jean C, Blanc A, Prade-Houdellier N, Ysebaert L, Hernandez-Pigeon H, Al Saati T *et al.* (2009). Epidermal growth factor receptor/beta-catenin/T-cell factor 4/matrix metalloproteinase 1: a new pathway for regulating keratinocyte invasiveness after UVA irradiation. *Cancer Res* **69**: 3291–3299.
- Jikko A, Hiranuma H, Iwamoto M, Kato Y, Okada Y, Fuchihata H. (1996). Effects of X irradiation on metabolism of proteoglycans. *Radiat Res* **146**: 93–99.
- Katsumi A, Naoe T, Matsushita T, Kaibuchi K, Schwartz MA. (2005). Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch. *J Biol Chem* **280**: 16546–16549.
- Keely S, Glover LE, MacManus CF, Campbell EL, Scully MM, Furuta GT *et al.* (2009). Selective induction of integrin beta1 by hypoxia-inducible factor: implications for wound healing. *FASEB J* **23**: 1338–1346.
- Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, Plomann M, Hirche F, Krieg T *et al.* (2001). Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a 'synthetic' phenotype. *J Biol Chem* **276**: 36575–36585.
- Kim SH, Xia D, Kim SW, Holla V, Menter DG, Dubois RN. (2010). Human enhancer of filamentation 1 Is a mediator of hypoxia-inducible factor-1alpha-mediated migration in colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* **70**: 4054–4063.
- Kizaki K, Ito R, Okada M, Yoshioka K, Uchida T, Temma K *et al.* (2006). Enhanced gene expression of myocardial matrix metalloproteinases 2 and 9 after acute treatment with doxorubicin in mice. *Pharmacol Res* **53**: 341–346.
- Kligman LH, Gebre M, Alper R, Kefalides NA. (1989). Collagen metabolism in ultraviolet irradiated hairless mouse skin and its correlation to histochemical observations. *J Invest Dermatol* **93**: 210–214.
- Kligman LH, Yang S, Schwartz E. (1999). Steady-state mRNA levels of interleukin-1, integrins, cJun, and cFos in hairless mouse skin during short-term chronic UV exposure and the effect of topical tretinoin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **15**: 198–204.
- Kock LM, Schulz RM, van Donkelaar CC, Thummler CB, Bader A, Ito K. (2009). RGD-dependent integrins are mechanotransducers in dynamically compressed tissue-engineered cartilage constructs. *J Biomech* **42**: 2177–2182.
- Koike T, Kimura N, Miyazaki K, Yabuta T, Kumamoto K, Takenoshita S *et al.* (2004). Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: a missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8132–8137.
- Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS. (2004). Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 10440–10445.
- Kozlova NI, Morozovich GE, Shtil AA, Berman AE. (2004). Multi-drug-resistant tumor cells with decreased malignancy: a role for integrin alphavbeta3. *Biochem Biophys Res Commun* **316**: 1173–1177.
- Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* **107**: 1589–1598.
- Lahiji K, Polotsky A, Hungerford DS, Frondoza CG. (2004). Cyclic strain stimulates proliferative capacity, alpha2 and alpha5 integrin, gene marker expression by human articular chondrocytes propagated on flexible silicone membranes. *In vitro Cell Dev Biol Anim* **40**: 138–142.

- Lambert CA, Soudant EP, Nusgens BV, Lapiere CM. (1992). Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces. *Lab Invest* **66**: 444–451.
- Landowski TH, Olashaw NE, Agrawal D, Dalton WS. (2003). Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene* **22**: 2417–2421.
- Lee SH, Koo KH, Park JW, Kim HJ, Ye SK, Park JB *et al.* (2009). HIF-1 is induced via EGFR activation and mediates resistance to anoikis-like cell death under lipid rafts/caveolae-disrupting stress. *Carcinogenesis* **30**: 1997–2004.
- Lee SH, Lee YJ, Han HJ. (2011). Role of hypoxia-induced fibronectin-integrin beta1 expression in embryonic stem cell proliferation and migration: Involvement of PI3K/Akt and FAK. *J Cell Physiol* **226**: 484–493.
- Liang Y, Meleady P, Cleary I, McDonnell S, Connolly L, Clynes M. (2001). Selection with melphalan or paclitaxel (Taxol) yields variants with different patterns of multidrug resistance, integrin expression and in vitro invasiveness. *Eur J Cancer* **37**: 1041–1052.
- Lugo-Martinez VH, Petit CS, Fouquet S, Le Beyec J, Chambaz J, Pincon-Raymond M *et al.* (2009). Epidermal growth factor receptor is involved in enterocyte anoikis through the dismantling of E-cadherin-mediated junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**: G235–G244.
- Matsunaga T, Fukai F, Miura S, Nakane Y, Owaki T, Kodama H *et al.* (2008). Combination therapy of an anticancer drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* **22**: 353–360.
- Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A *et al.* (2003). Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med* **9**: 1158–1165.
- Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. (2008). The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* **14**: 2519–2526.
- Milner R, Hung S, Erokwu B, Dore-Duffy P, LaManna JC, del Zoppo GJ. (2008). Increased expression of fibronectin and the alpha 5 beta 1 integrin in angiogenic cerebral blood vessels of mice subject to hypobaric hypoxia. *Mol Cell Neurosci* **38**: 43–52.
- Minchinton AI, Tannock IF. (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* **6**: 583–592.
- Miyazaki Y, Hara A, Kato K, Oyama T, Yamada Y, Mori H *et al.* (2008). The effect of hypoxic microenvironment on matrix metalloproteinase expression in xenografts of human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* **32**: 145–151.
- Miyoshi A, Kitajima Y, Ide T, Ohtaka K, Nagasawa H, Uto Y *et al.* (2006). Hypoxia accelerates cancer invasion of hepatoma cells by upregulating MMP expression in an HIF-1alpha-independent manner. *Int J Oncol* **29**: 1533–1539.
- Monferran S, Skuli N, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Cohen-Jonathan-Moyal E *et al.* (2008). Alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer* **123**: 357–364.
- Moore SW, Roca-Cusachs P, Sheetz MP. (2010). Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing. *Dev Cell* **19**: 194–206.
- Munoz-Najar UM, Neurath KM, Vumbaca F, Claffey KP. (2006). Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation. *Oncogene* **25**: 2379–2392.
- Munoz J, Zhou Y, Jarrett HW. (2010). LG4-5 domains of laminin-211 binds alpha-dystroglycan to allow myotube attachment and prevent anoikis. *J Cell Physiol* **222**: 111–119.
- Muszynska A, Wolczynski S, Palka J. (2001). The mechanism for anthracycline-induced inhibition of collagen biosynthesis. *Eur J Pharmacol* **411**: 17–25.
- Myllyharju J, Schipani E. (2010). Extracellular matrix genes as hypoxia-inducible targets. *Cell Tissue Res* **339**: 19–29.
- Neitmann M, Alexander M, Brinckmann J, Schlenke P, Tronnier M. (1999). Attachment and chemotaxis of melanocytes after ultraviolet irradiation *in vitro*. *Br J Dermatol* **141**: 794–801.
- Netti PA, Berk DA, Swartz MA, Grodzinsky AJ, Jain RK. (2000). Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res* **60**: 2497–2503.
- Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M *et al.* (2009). Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene* **28**: 231–242.
- Orr AW, Ginsberg MH, Shattil SJ, Deckmyn H, Schwartz MA. (2006). Matrix-specific suppression of integrin activation in shear stress signaling. *Mol Biol Cell* **17**: 4686–4697.
- Oswald J, Steudel C, Salchert K, Joergensen B, Thiede C, Ehninger G *et al.* (2006). Gene-expression profiling of CD34+ hematopoietic cells expanded in a collagen I matrix. *Stem Cells* **24**: 494–500.
- Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Keely PJ. (2009). Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene* **28**: 4326–4343.
- Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. (2004). Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. *Am J Pathol* **165**: 741–751.
- Repech LA, Drake SR, Warner MC, Downing SW, Jyring R, Seftor EA *et al.* (1993). Adriamycin-induced inhibition of melanoma cell invasion is correlated with decreases in tumor cell motility and increases in focal contact formation. *Clin Exp Metastasis* **11**: 91–102.
- Rohwer N, Welzel M, Daskalow K, Pfander D, Wiedenmann B, Detjen K *et al.* (2008). Hypoxia-inducible factor 1alpha mediates anoikis resistance via suppression of alpha5 integrin. *Cancer Res* **68**: 10113–10120.
- Salo S, Boutaud A, Hansen AJ, He L, Sun Y, Morales S *et al.* (2009). Antibodies blocking adhesion and matrix binding domains of laminin-332 inhibit tumor growth and metastasis *in vivo*. *Int J Cancer* **125**: 1814–1825.
- Sasaki T, Holeyfield KC, Uitto J. (1987). Doxorubicin-induced inhibition of prolyl hydroxylation during collagen biosynthesis in human skin fibroblast cultures. Relevance to impaired wound healing. *J Clin Invest* **80**: 1735–1741.
- Sastry SK, Lakonishok M, Thomas DA, Muschler J, Horwitz AF. (1996). Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation. *J Cell Biol* **133**: 169–184.
- Sawada Y, Sheetz MP. (2002). Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol* **156**: 609–615.
- Schmidmaier R, Baumann P, Simsek M, Dayyani F, Emmerich B, Meinhardt G. (2004). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood* **104**: 1825–1832.
- Schuetz JD, Schuetz EG. (1993). Extracellular matrix regulation of multidrug resistance in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Cell Growth Differ* **4**: 31–40.
- Schwartz MA, DeSimone DW. (2008). Cell adhesion receptors in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 551–556.
- Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C *et al.* (1999). Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance *in vivo*. *Nat Med* **5**: 662–668.
- Shyy JY, Chien S. (1997). Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 707–713.
- Skuli N, Monferran S, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Toulas C *et al.* (2009). Alphavbeta3/alphavbeta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res* **69**: 3308–3316.
- Song JH, Kim SH, Cho D, Lee IK, Kim HJ, Kim TS. (2009). Enhanced invasiveness of drug-resistant acute myeloid leukemia cells through increased expression of matrix metalloproteinase-2. *Int J Cancer* **125**: 1074–1081.

- Sood AK, Armaiz-Pena GN, Halder J, Nick AM, Stone RL, Hu W *et al.* (2010). Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis. *J Clin Invest* **120**: 1515–1523.
- St Croix B, Florenes VA, Rak JW, Flanagan M, Bhattacharya N, Slingerland JM *et al.* (1996). Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med* **2**: 1204–1210.
- Sullivan R, Graham CH. (2007). Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 319–331.
- Ta HQ, Thomas KS, Schrecengost RS, Bouton AH. (2008). A novel association between p130Cas and resistance to the chemotherapeutic drug adriamycin in human breast cancer cells. *Cancer Res* **68**: 8796–8804.
- Takahashi I, Onodera K, Sasano Y, Mizoguchi I, Bae JW, Mitani H *et al.* (2003). Effect of stretching on gene expression of beta1 integrin and focal adhesion kinase and on chondrogenesis through cell-extracellular matrix interactions. *Eur J Cell Biol* **82**: 182–192.
- Tanjoni I, Walsh C, Uryu S, Tomar A, Nam JO, Mielgo A *et al.* (2010). PND-1186 FAK inhibitor selectively promotes tumor cell apoptosis in three-dimensional environments. *Cancer Biol Ther* **9**: 764–777.
- Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C *et al.* (2006). Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med* **12**: 939–944.
- Thao le B, Vu HA, Yasuda K, Taniguchi S, Yagasaki F, Taguchi T *et al.* (2009). Cas-L was overexpressed in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor cells. *Cancer Biol Ther* **8**: 683–688.
- Ulrich TA, de Juan Pardo EM, Kumar S. (2009). The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res* **69**: 4167–4174.
- van Nimwegen MJ, Huigsloot M, Camier A, Tijdens IB, van de Water B. (2006). Focal adhesion kinase and protein kinase B cooperate to suppress doxorubicin-induced apoptosis of breast tumor cells. *Mol Pharmacol* **70**: 1330–1339.
- Varner JA, Emerson DA, Juliano RL. (1995). Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* **6**: 725–740.
- Verhaar R, Dekkers DW, De Cuyper IM, Ginsberg MH, de Korte D, Verhoeven AJ. (2008). UV-C irradiation disrupts platelet surface disulfide bonds and activates the platelet integrin alphaIIb beta3. *Blood* **112**: 4935–4939.
- Walsh C, Tanjoni I, Uryu S, Tomar A, Nam JO, Luo H *et al.* (2010). Oral delivery of PND-1186 FAK inhibitor decreases tumor growth and spontaneous breast to lung metastasis in pre-clinical models. *Cancer Biol Ther* **9**: 778–790.
- Walton HL, Corjay MH, Mohamed SN, Mousa SA, Santomena LD, Reilly TM. (2000). Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors alpha(vbeta3) and alpha(vbeta5) in cultured human endothelial cells. *J Cell Biochem* **78**: 674–680.
- Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* **87**: 733–743.
- Weber LM, Hayda KN, Anseth KS. (2008). Cell-matrix interactions improve beta-cell survival and insulin secretion in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part A* **14**: 1959–1968.
- Wen H, Blume PA, Sumpio BE. (2009). Role of integrins and focal adhesion kinase in the orientation of dermal fibroblasts exposed to cyclic strain. *Int Wound J* **6**: 149–158.
- Westhoff MA, Zhou S, Bachem MG, Debatin KM, Fulda S. (2008). Identification of a novel switch in the dominant forms of cell adhesion-mediated drug resistance in glioblastoma cells. *Oncogene* **27**: 5169–5181.
- Wykoff CC, Sotiropoulos C, Cockman ME, Ratcliffe PJ, Maxwell P, Liu E *et al.* (2004). Gene array of VHL mutation and hypoxia shows novel hypoxia-induced genes and that cyclin D1 is a VHL target gene. *Br J Cancer* **90**: 1235–1243.
- Yao J, Liu Y, Wang X, Shen Y, Yuan S, Wan Y *et al.* (2009). UVB radiation induces human lens epithelial cell migration via NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species and up-regulation of matrix metalloproteinases. *Int J Mol Med* **24**: 153–159.
- Zamir E, Geiger B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**: 3583–3590.



ABSTRACT

Spatial organization determines gene expression profile of follicular lymphoma cells: *Contribution to immune escape and chemoresistance mechanisms.*

Non-Hodgkin lymphomas (NHL) are the most frequent malignant hematological diseases. Among these, follicular lymphomas (FL) are the second most common subtype of indolent NHL in frequency. FL cells arise from germinal center and are characterized by the constitutive over-expression of *BCL2* proto-oncogene, due to t(14,18) chromosomal translocation.

In carcinomas, spatial organization is described as modulating major cell functions such as tumor growth, intracellular signaling, but also cell survival, sensitivity to drugs, or metastatic potential. But although FL develops in 3D in patients, the contribution of spatial organization on FL cells biology was never investigated until now.

To this aim, we developed the first three-dimensional culture model of LF cells (MALC for *Multicellular Aggregates of Lymphoma Cell*). We studied, in this system, by comparison with conventional suspension cultures, gene expression profile, proliferation, stress responses as well as sensitivity to genotoxics, targeted therapies, and immune cellular effectors.

The present study shows that spatial organization profoundly affects gene expression profile (more than 600 genes are modulated). The gene signatures found in MALC cells are specific of negative regulation of cell cycle, hypoxic stress, and NF- κ B pathway activation. These 3 signatures are closer to those identified in patient samples. Phenotypic analysis further supports decreased cell proliferation, and for the half of MALC cells, quiescence entry through a HIF1 α -dependent mechanism. Cells cultured in 3D are more resistant to anthracyclines and alkylating agents, as to NK cells. However, these cells remain equally sensitive to targeted therapies (Rituximab[®] and mTOR kinase inhibitors).

To conclude, this study shows that FL cells biology is considerably determined by 3D organization. This also suggests that the MALC model offers a unique opportunity for pre-clinical screening of new bio-active molecules, MALC being more representative than conventional 2D culture.

Keywords: lymphoma, aggregates, transcriptomes, hypoxia, chemoresistance, immune escape

Auteur: Pauline Gravelle

Directeur de thèse: Pr Guy LAURENT

Titre: Influence de l'organisation tridimensionnelle des cellules de lymphome folliculaire sur l'expression génique: *Contribution à la caractérisation des mécanismes d'échappement immunitaire et de chimiorésistance.*

Résumé:

Les lymphomes malins non-Hodgkiniens (LMNH) représentent la pathologie la plus fréquente en hémato-oncologie. Parmi eux, le lymphome folliculaire (LF) est le second type de LMNH en fréquence. Les cellules de LF dérivent du centre germinatif et sont caractérisées par la surexpression du proto-oncogène BCL2, induite par la translocation chromosomique t(14;18).

Dans les carcinomes, il est largement démontré que l'organisation tridimensionnelle joue un rôle essentiel dans la modulation de paramètres biologiques tels que la croissance tumorale, la signalisation intracellulaire, mais également la survie cellulaire, la réponse aux drogues, ou encore le potentiel métastatique. Paradoxalement, alors que le LF se développe chez le malade en 3D, la contribution de l'organisation spatiale sur la biologie des cellules de LF n'a pas été étudiée.

Pour cette raison, nous avons développé le premier modèle de culture de cellules lymphomateuses en 3 dimensions (MALC pour *Multicellular Aggregates of Lymphoma Cell*) et nous avons étudié dans ce modèle, en comparaison avec la culture conventionnelle en suspension, l'expression génique, la prolifération, la réponse au stress, et la sensibilité aux agents génotoxiques, aux thérapeutiques ciblées et aux effecteurs de l'immunité naturelle.

Nous montrons que l'organisation spatiale modifie considérablement le transcriptome (plus de 600 gènes sont ainsi modifiés), avec des signatures caractérisant la régulation négative de la prolifération, le stress hypoxique et l'activation de la voie NFkB. Ces trois signatures se rapprochent de celles observées dans les échantillons tumoraux de patients. Les analyses phénotypiques confirment le ralentissement global de la prolifération et pour la moitié des cellules, l'entrée en quiescence. Ce phénomène est régulé par HIF α . Les cellules cultivées en 3D sont plus résistantes aux anthracyclines et aux agents alkylants ainsi qu'aux cellules NK. Ces mêmes cellules restent par contre sensibles aux thérapies ciblées (rituximab et inhibiteur de la voie mTOR). Au total, ce travail montre que la structuration 3D des cellules de LF modifie considérablement la biologie de ces cellules, suggérant ainsi que le modèle MALC offre des opportunités uniques pour le criblage pré-clinique de nouvelles molécules.

Mots clés: lymphome, sphéroïdes, transcriptomes, hypoxie, chimiorésistance, immuno-évasion

Discipline: Cancérologie

Laboratoire d'accueil: Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse - INSERM UMR1037, Equipe 9