



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Déjà délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Cancérologie*

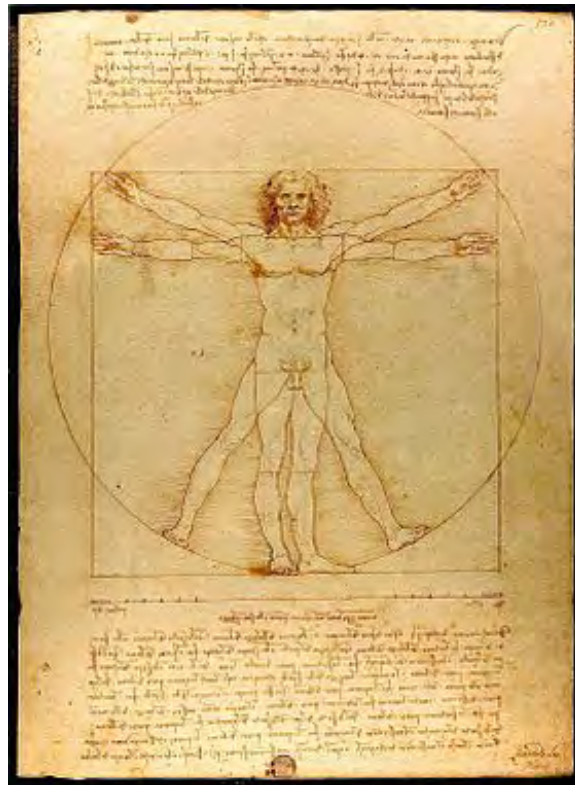
Présentée et soutenue par *Emilie DECAUP*
Le 11 Octobre 2013

Titre : *Caractérisation des signaux intracellulaires activés par les anticorps monoclonaux anti-CD20 dans un modèle de culture 3D de lymphome folliculaire*

JURY

Pr Jean-Pierre DELORD (Président)
Dr. Emmanuel Donnadieu (Rapporteur)
Pr. Charles DUMONTET (Rapporteur)
Pr. Gilles THIBAUT (Examinateur)
Dr. Valérie LOBJOIS (Invitée)
Dr. Jean-Jacques FOURNIE (Invité)
Dr. Christine BEZOMBES & Dr. Ariel SAVINA (Directeurs de thèse)

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies de Toulouse*
Unité de recherche : *CRCT U1037*
Directeur(s) de Thèse : *Dr. Christine BEZOMBES & Dr. Ariel SAVINA*
Rapporteurs : *Dr. Emmanuel DONNADIEU & Pr. Charles DUMONTET*



Je dédie cette thèse à mon papi...

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Le président du jury, le Professeur *Jean-Pierre Delord*.

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Merci pour les « jokers » que vous m'avez accordé et qui ont permis d'approfondir au maximum chaque réflexion.

Les rapporteurs, le Professeur *Charles Dumontet* et le Docteur *Emmanuel Donnadiou*.

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteurs pour ma thèse et d'avoir consacré autant de temps au manuscrit. Merci pour vos questions qui ont fait avancer la réflexion autour de mon sujet de thèse.

L'examineur, le Professeur *Gilles Thibault*. Le docteur *Valérie Lobjois*, membre invité.

Merci d'avoir consacré du temps à mon manuscrit et pour vos questions et observations durant la discussion.

Mon directeur de thèse, le Docteur *Ariel Savina*.

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez toujours accordée. Merci pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eu et qui ont permis des avancées constructives dans le projet. Merci pour votre gentillesse et votre soutien.

Je remercie en même temps les Laboratoires Roche pour le financement de cette thèse et leur soutien pendant ces 3 années.

Le directeur d'équipe et membre du jury, le Docteur *Jean-Jacques Fournié*.

Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre équipe il y a maintenant 5 ans. Je vous remercie pour tous vos précieux conseils et de m'avoir toujours soutenue. Je vous remercie également pour toutes les discussions que l'on a pu avoir et de votre ouverture d'esprit qui ont donné un aspect convivial et chaleureux à ces années passées dans votre équipe.

Ma directrice de thèse, le Docteur *Christine Bezombes*.

Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée pendant ces 3 ans et pour toutes les opportunités que tu m'as données. On a eu des hauts et des bas, c'est vrai mais malgré tout je pense qu'on a formé une super équipe. J'ai beaucoup appris pendant ces années, j'ai gagné en maturité et en autonomie. Merci pour ta bonne humeur et ton énergie débordante. Et vive la cytométrie !!!

Je remercie également tous les membres de l'équipe passés ou présents. Les statutaires Guy Laurent, Loïc Ysebaert ou encore Anne Quillet-Mary pour les discussions que l'on a pu avoir. Merci Mary de m'avoir accueillie en M1, merci pour toutes nos discussions et ta bonne humeur c'est extrêmement agréable de travailler à tes côtés. Les étudiants que j'ai plus ou moins bien connus Nicolas, Chris, Aude-Hélène, François et Srdjana : merci pour votre bonne humeur et votre convivialité, je vous souhaite beaucoup de réussite pour la suite !

Je remercie mes collègues de bureau ou d'ailleurs: Marie, Caro, Fred, Delphine, Don Marc, Sonia, Fabienne et Pauline. Merci à tous pour votre bonne humeur et votre soutien. On a partagé de très bon moments ensemble, on s'est toujours serré les coudes et j'ai vraiment beaucoup apprécié travailler à vos côtés. Même s'il est vrai que parfois c'est difficile de travailler dans le bureau de la société protectrice des animaux laids, il est sûr qu'il y règne entraide et solidarité. Merci de m'avoir supporté les jours (semaines peut être ?) avant ma thèse. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite pour la suite!

Je remercie mes amis pour leur soutien et leur présence tout au long de ma thèse. Merci ma cacahuète : ca y'est nous voila Docteur, la classe! Après toutes ces années de galère (si si faut le dire), les caput à 7h du matin, les impressions de rapport à la chaîne, ca y'est c'est fini mais on s'en est bien tirées. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite que ce soit sur le plan personnel ou pour médecine tu le mérites. Je remercie mes amis Cha, Béa et Philippe de m'avoir toujours soutenue et pour tous les bons moments que l'on passe ensemble. Je suis très heureuse de vous avoir à mes côtés et je souhaite longue vie à notre amitié.

Je remercie Eddy de m'avoir toujours soutenue et épaulée. Je te félicite aussi pour ta réussite, tu n'as jamais baissé les bras et tu peux être fier de tout le chemin que tu as parcouru. Depuis bientôt 8 ans l'union fait la force, . Je remercie mes beaux parents d'être venus me soutenir en ce jour. J'ai trouvé une 2^{ème} famille et pour tout ca je vous remercie.

Je remercie mes parents et ma sœur pour leur soutien sans faille, sans vous je n'en serais pas là. Vous avez toujours accepté mes choix et m'avez aidé à les mener à bien. Aujourd'hui je suis arrivée au bout et c'est aussi grâce à vous. Je remercie également ma mamie d'être venue partager ce moment avec moi.

RESUME

Caractérisation des signaux intracellulaires activés par les anticorps monoclonaux anti-CD20 dans un modèle de culture en 3 dimensions du lymphome folliculaire

Le lymphome folliculaire (LF) est le 2^{ème} type de lymphome non-Hodgkinien le plus fréquent. Les cellules de LF sont caractérisées par la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, conséquence de la translocation t(14;18). Le LF est une pathologie incurable malgré les nombreuses stratégies thérapeutiques. L'apparition des anticorps monoclonaux (AcMo) anti-CD20 a révolutionné les traitements, notamment avec le développement du Rituximab (RTX). Pour pallier les phénomènes de résistance et grâce aux progrès de l'ingénierie, des AcMo anti-CD20 de nouvelle génération ont été développés, tels que l'Obinutuzumab (GA101).

Les objectifs de mes travaux de thèse sont de comparer les mécanismes du RTX et du GA101. Pour cela, il est important de disposer d'un modèle d'étude relevant de la pathologie. Le rôle de la masse tumorale dans l'efficacité thérapeutique a été de longue date étudié dans les tumeurs solides mais très peu dans les hémopathies malignes. Pourtant, il a été récemment montré que celle-ci influence la réponse aux traitements dans les LF. C'est pourquoi, nous avons utilisé un modèle de culture 3D développé dans notre laboratoire. Ce modèle, appelé MALC (Multicellular Aggregates of Lymphoma Cells), est adapté de la technique de la goutte inversée. Il nous permet d'obtenir des structures 3D sur lesquelles nous étudions les effets de deux AcMo: RTX et GA101.

Les AcMo peuvent agir selon différents mécanismes directs ou indirects en fonction de la liaison au CD20 et/ou au récepteur au fragment constant des immunoglobulines. Ainsi, concernant les effets directs, nous montrons que le RTX et le GA101 inhibent la croissance des MALC et induisent de l'apoptose. Le GA101, quant à lui, induit également de la sénescence et de la mort lysosomale. Grâce à la technique du *fluorescent cellbarcoding*, nous montrons que le GA101 inhibe les voies de signalisation classiquement activées dans les cellules de LF. Concernant les effets indirects, nous avons étudié l'ADCC (*Antibody Dependent Cell Cytotoxicity*) et montré que le RTX et le GA101 augmentent l'activité cytotoxique des cellules NK et des lymphocytes T $\gamma\delta$ vis-à-vis des MALC. L'action du GA101 est plus forte que celle du RTX tant dans l'activation des cellules effectrices que dans la lyse des cellules cibles. Des analyses en microscopie confocale ont permis d'étudier l'infiltration des cellules immunitaires en présence des AcMo au sein des MALC.

Au total, mes travaux montrent d'une part, l'intérêt du modèle 3D pour l'étude des mécanismes d'action des AcMo, et d'autre part la meilleure efficacité du GA101. Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives dans l'exploration des mécanismes d'action des AcMo mais également dans le développement de modèle 3D à partir de cellules de patients. Le LF étant une pathologie qui reste à l'heure actuelle incurable, l'amélioration de l'efficacité thérapeutique représente un enjeu majeur.

SOMMAIRE

RESUME.....	5
SOMMAIRE	7
LISTE DES ABREVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLES	14
INTRODUCTION GENERALE.....	15
I- LE LYMPHOCYTE B: SA VIE, SON ŒUVRE.....	17
1- Naissance des lymphocytes B dans la moelle osseuse.....	17
a) De la cellule souche hématopoïétique aux cellules précurseurs B	17
b) La recombinaison V(D)J.....	19
2- Maturation du lymphocyte B immature	21
a) Structure du centre germinatif	22
b) La mutation hypersomatique.....	24
c) La commutation de classe.....	25
3- Obtention des cellules professionnelles	25
II- LE LYMPHOME FOLLICULAIRE: UN CANCER MECONNU DU GRAND PUBLIC28	
1- Généralités sur les cancers du système lymphatique	28
a) La maladie de Hodgkin.....	29
b) Les lymphomes non-Hodgkiniens	30
2- Diagnostic et pronostic.....	32
3- Origines des cellules lymphomateuses: le moment où tout bascula... ..	32
4- La t(14;18), oui mais pas seulement: aperçu d'un terrain génétique accidenté	35
5- Le BCR, acteur de la lymphomagénèse	38
6- Le micro-environnement tumoral, berceau des cellules lymphomateuses.....	39
a) Composition du micro-environnement et progression tumorale	40
b) Cellules immunitaires du micro-environnement et immunosurveillance	44
c) Echappement immunitaire	46
d) Micro-environnement et transformation du LF	50
7- Traitements.....	51
a) Standards thérapeutiques: des décennies d'énigme	52

b) Nouvelles approches	53
III- LES ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-CD20 : DES NOUVELLES ARMES DANS LA GUERRE CONTRE LE CANCER.....	58
1- Utilisation des anticorps monoclonaux: de la sérothérapie du XIX ^{ème} siècle au « Mab business » du XXI ^{ème} siècle	58
2- Le CD20: une cible de choix pour l'immunothérapie.....	61
a) Structure et fonctions du CD20.....	62
b) Régulation de l'expression du CD20	64
3- Rituximab	65
a) Etat des lieux.....	65
b) Le Rituximab en clinique.....	67
4- L'Obinutuzumab	68
a) Généralités	68
b) L'Obinutuzumab en clinique	70
5- Mécanismes de déplétion des cellules B par les anticorps monoclonaux.....	71
a) Mécanismes directs: une attaque de front.....	72
i. Action directe.....	72
ii. Mort lysosomale.....	74
iii. Senescence	76
b) Mécanismes indirects: la manière détournée	78
i. Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps.....	79
ii. Cytotoxicité dépendante du complément.....	80
iii. Phagocytose médiée par l'anticorps	82
c) L'effet « vaccinal » du Rituximab	83
6- Mécanismes de résistance	85
IV- LES CULTURES CELLULAIRES EN TROIS DIMENSIONS	89
1- Généralités.....	89
2- Les sphéroïdes, des copies de microrégions tumorales.....	91
a) Caractéristiques physiques.....	92
b) Un modèle idéal pour des études précliniques.....	95
3- Multicellular Aggregates of Lymphoma Cells.....	97
RESULTATS	103
I- EFFETS DIRECTS.....	104

1- Principe du <i>fluorescent cell barcoding</i>	104
2- Déplétion directe des cellules B par le RTX et le GA101	122
II- EFFETS INDIRECTS MEDIÉS PAR LE RITUXIMAB ET LE GA101	142
1- Introduction	142
2- Méthodologie et résultats	143
3- Conclusion.....	148
DISCUSSION	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXES	175

LISTE DES ABREVIATIONS

2D: 2 dimensions
3D: 3 dimensions
aa: Acide Aminé
AcMo: AntiCorps MOnoclonal
ADCC: Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity
ADCP: Antibody Dependent Cell Phagocytosis
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
ARN: Acide RiboNucléique
BCR: B Cell Receptor
CAM: Complexe d'Attaque Membranaire
CC: Commutation de Classe
CD: Custer de Différenciation
CDC: Complement Dependent Cytotoxicity
CDF: Cellule Dendritique Folliculaire
CG: Centre Germinatif
CLP: Common Lymphoid Progenitor
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène
CSH: Cellule Souche Hématopoiétique
CTL: Lymphocyte T Cytotoxique
DC: Cellule Dendritique
DLBCL: Lymphome B Diffus à Grande Cellule
FCB: Fluorescent Cell Barcoding
FcR: Récepteur au Fragment Constant des immunoglobulines
FLIPI: Follicular Lymphoma International Pronostic Index
GZB: GranZyme B
Id: IDiotype
IFN: InterFéroN
Ig: ImmunoGlobuline
IL-: InterLeukine
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
LAL: Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LAM: Lymphoma Associated-Macrophage
LB: Lymphocyte B
LF: Lymphome Folliculaire
LLC: Leucémie Lymphoïde Chronique
LMPP: Lymphoid-Primed Multipotent Progenitors
LNH: Lymphome Non Hodgkinien
MALC: Multicellular Aggregates of Lymphoma Cell
MCL: MultiCellular Layer
MC(T)S: MultiCellular (Tumor) Spheroid
MEC: Matrice ExtraCellulaire
MHS: Mutation HyperSomatique
MO: Moelle Osseuse

NK: Cellule natural killer
OL II^R: Organe Lymphoïde secondaire
Pag: PhosphoAntiGène
PFN: PerForiNe
RTX: RiTuXimab
TCR:T Cell Receptor
T $\gamma\delta$: Lymphocytes T gd
TIS: Treatment Induced Senescence
TSCA: Transplantation de Cellules Souches Autologues
Treg: Lymphocytes T régulateur
VDJ: Variable Diversity Joining

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1:</u> Développement des lymphocytes B.....	17
<u>Figure 2:</u> Différents stades cellulaires du développement des lymphocytes B.	18
<u>Figure 3:</u> Développement des cellules B dans la moelle osseuse.	19
<u>Figure 4:</u> Recombinaison V(D)J dans les cellules précurseurs B.	20
<u>Figure 5:</u> Trajet des cellules B dans les OL II ^R : le chemin vers la cellule B mature.	22
<u>Figure 6:</u> Structure et composants cellulaires du centre germinatif.	23
<u>Figure 7:</u> Différenciation terminale post-CG.	26
<u>Figure 8:</u> Ontogénie des cellules B.	27
<u>Figure 9:</u> Origines cellulaires des différents LNHs.....	31
<u>Figure 10:</u> La t(14;18) conduit à la surexpression constitutive de Bcl-2.	33
<u>Figure 11:</u> Le centre germinatif, une véritable niche pour la lymphomagenèse.	34
<u>Figure 12:</u> Modèle impliquant les altérations génétiques dans la transformation du LF	37
<u>Figure 13:</u> Prédiction de la survie dans le lymphome folliculaire en fonction des signatures géniques du micro-environnement cellulaire.	40
<u>Figure 14:</u> Micro-environnement du lymphome folliculaire.....	42
<u>Figure 15:</u> Reconnaissance de la tumeur par les cellules du système immunitaire.....	44
<u>Figure 16:</u> Balance entre le système immunitaire et la tumeur.	47
<u>Figure 17:</u> Inhibition de la phagocytose <i>via</i> l'expression de CD47 par les cellules tumorales.	49
<u>Figure 18:</u> Modèle impliquant le micro-environnement dans la transformation du LF.....	50
<u>Figure 19:</u> Fresque regroupant les progrès conduisant aux AcMo.....	58
<u>Figure 20:</u> Générations successives d'AcMo thérapeutiques.....	60
<u>Figure 21:</u> Evolution de la mortalité des patients atteints de LNHs et des nouveaux agents thérapeutiques disponibles aux Etats-Unis pour les LNHs.	61
<u>Figure 22:</u> Antigènes de surface sur la cellule B.....	62
<u>Figure 23:</u> Schéma de la structure du CD20.	63
<u>Figure 24:</u> Expression du CD20 au cours de l'ontogénie des cellules B.	64
<u>Figure 25:</u> Structure du Rituximab.....	66
<u>Figure 26:</u> Superposition des domaines VH du GA101 et du RTX.	68
<u>Figure 27:</u> Epitopes reconnus par le RTX et le GA101.	69
<u>Figure 28:</u> Différences entre les AcMo de type I et de type II.....	72
<u>Figure 29:</u> Inhibition des voies de survie, chimio-sensibilisation et immuno-sensibilisation par le RTX.	74
<u>Figure 30:</u> Mécanisme de mort lysosomale induite pas le GA101.	75
<u>Figure 31:</u> Conséquences de la sénescence au sein d'une tumeur.	77
<u>Figure 32:</u> Mécanismes de déplétion des cellules B par les AcMo.....	79
<u>Figure 33:</u> Mécanismes moléculaires de la voie classique du complément.	81
<u>Figure 34:</u> Mécanisme de la CDCC.	82
<u>Figure 35:</u> Effet « vaccinal » du RTX.	84
<u>Figure 36:</u> Entre action du RTX et réaction de la cellule tumorale.....	86

<u>Figure 37</u> : Analogies entre sphéroïde et microrégion tumorale.....	92
<u>Figure 38</u> : Gradients observés dans une microrégion tumorale avec l'éloignement des vaisseaux sanguins.	93
<u>Figure 39</u> : Gradients physiques au sein d'un sphéroïde.....	94
<u>Figure 40</u> : Raisons potentielles expliquant la résistance des cellules distantes des vaisseaux sanguins.	95
<u>Figure 41</u> : Méthodologie d'obtention des MALC.....	98
<u>Figure 42</u> : Etapes de la technique du <i>fluorescent cell barcoding</i>	105
<u>Figure 43</u> : Signalisation en aval du FcγRIIIa ou CD16.	143
<u>Figure 44</u> : RTX et GA101 induisent l'ADCC des cellules de LF par les cellules NK.....	144
<u>Figure 45</u> : RTX et GA101 induisent l'ADCC des cellules de LF par les lymphocytes T γδ TCRVγ9 ⁺	145
<u>Figure 46</u> : Le RTX et le GA101 favorisent la mort des MALC en présence de cellules NK.	146
<u>Figure 47</u> : Le RTX et le GA101 activent la cascade de signalisation en aval du FcγRIIIa... ..	147
<u>Figure 48</u> : Expression du CD47 sur les cellules RL cultivées en 2D ou en 3D.....	151
<u>Figure 49</u> : Expression du CD47 selon les traitements dans les MALC au cours du temps... ..	151
<u>Figure 50</u> : Inhibition de l'expression d'ICAM-1 par le GA101 dans les MALC.....	153

LISTE DES TABLES

Table 1: Altérations génétiques connues du LF au diagnostic.....	36
Table 2: Tableau regroupant des nouvelles molécules en cours d'étude clinique dans le LF.	55
Table 3: AcMo existants ciblant les cellules du micro-environnement.	56
Table 4: Expression des FcRs selon le type de cellule immunitaire.	78
Table 5: Différents types de culture en 3D utilisés en recherche.	90

INTRODUCTION GENERALE

Le lymphocyte B (LB) est une cellule immunitaire dont la réputation n'est plus à faire. Cependant, si l'on revient quelques temps en arrière il n'en était pas de même. A la fin du XIX^{ème} siècle, Emil von Behring, médecin allemand, fit une découverte qui révolutionna le monde de l'immunologie. En effet, il observa chez des cobayes immunisés contre la toxine diphtérique ou le tétanos la présence d'un facteur humoral. Peu de temps après, il découvrit que le sérum de ces animaux, porteur de ce facteur humoral, pouvait transférer l'immunité. Cela lui valut en 1901 le prix Nobel pour « son travail sur la thérapie par le sérum, particulièrement son application contre la diphtérie, grâce à laquelle il a ouvert une nouvelle voie dans le domaine de la science médicale et par conséquent placé dans les mains du médecin une arme victorieuse contre la maladie et la mort ». Ce facteur humoral prit alors le nom d'antitoxine et prendra plusieurs années plus tard le nom d'anticorps ou d'immunoglobuline (Ig). Ces travaux ont été accompagnés à la même époque de ceux d'un autre scientifique allemand: Paul Ehrlich. Ce dernier fut également lauréat du prix Nobel en 1908 en reconnaissance de ses travaux sur l'immunité. Ce prix Nobel récompense une théorie de la réponse immunitaire centrée sur l'interaction entre les antigènes et les anticorps.

L'immunité adaptative était née.

Ce n'est que près d'un siècle plus tard, grâce aux travaux de Miller et Mitchell, que l'on découvrit que la production de ces anticorps étaient spécifiquement l'apanage des LB ou cellules B (1, 2). Ces cellules ont été ainsi nommées par Roitt et ses collaborateurs du fait de leur provenance de la bourse de Fabricé chez les oiseaux (B pour *Bursa-equivalent*) par opposition aux cellules T, dérivant du thymus (3).

Dans une revue originale à la fin du XX^{ème} siècle, Miller fit le bilan d'un siècle de découvertes et d'avancées dans le monde de l'immunologie (4). Il conclut en reprenant une phrase de Winston Churchill qui ne vieillit pas : « **So much accomplished, so much still be done** ».

I- LE LYMPHOCYTE B: SA VIE, SON ŒUVRE

Les LB sont des cellules immunitaires responsables de la réponse immunitaire humorale spécifique grâce aux anticorps qu'ils produisent. Ils jouent également le rôle de cellule présentatrice d'antigène (CPA).

L'ontogénie des LB débute dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les LB vont ensuite migrer vers le sang pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires (OL II^R). La seule destinée du LB, en dehors des cellules mémoires, est de devenir un plasmocyte qui reviendra coloniser la moelle osseuse. Pour cela, la maturation du LB doit faire face aux réarrangements des gènes des différentes classes de BCR (*B-Cell Receptor*) (Figure 1).

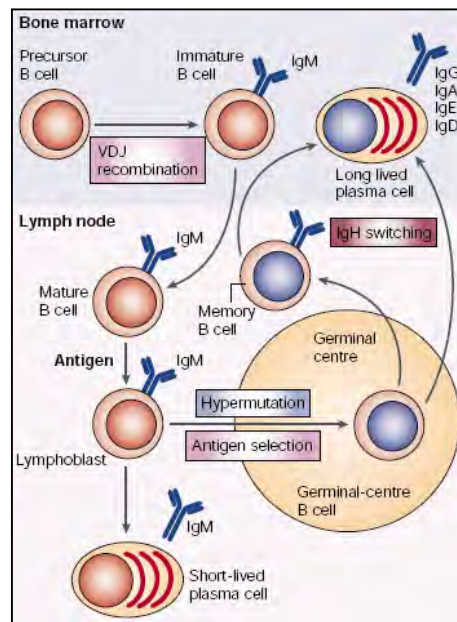


Figure 1: Développement des lymphocytes B.

Résumé des différentes étapes de la vie d'un lymphocyte B et son parcours du précurseur au plasmocyte (ou à la cellule B mémoire) (5).

1- Naissance des lymphocytes B dans la moelle osseuse

a) De la cellule souche hématopoïétique aux cellules précurseurs B

La moelle osseuse (MO) se trouve dans la cavité médullaire centrale des os. Elle forme un micro-environnement complexe qui sera le berceau de l'hématopoïèse précoce. C'est au sein

de cette niche que vont se trouver les CSH. Des études menées en 1997 chez la souris ont permis de connaître les premiers progéniteurs. Ainsi, les CSH permettent la formation des LMPPs (*Lymphoid-Primed Multipotent Progenitors*) donnant naissance au lignage lymphoïde. Ces LMPPs peuvent se différencier en CLPs (*Common Lymphoid Progenitors*) qui eux, sont capables de donner des cellules B et T (6).

C'est à partir de ces CLPs que vont naître les cellules précurseurs B. On peut distinguer 4 catégories de précurseurs qui ont été identifiés dans les années 1990 sous le nom de fractions A, B, C et D. Ces fractions correspondent aux cellules pré-pro-B, pro-B et pré-B (7). Ces précurseurs ont été caractérisés par l'expression différentielle de certaines molécules de surface (Figure 2).

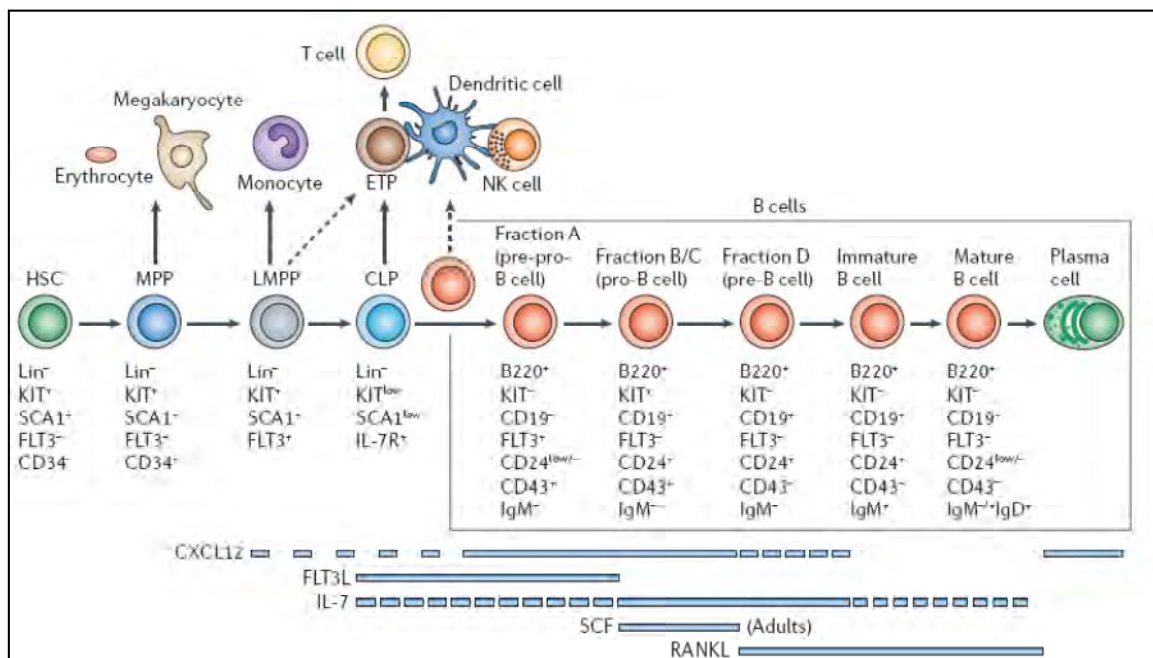


Figure 2: Différents stades cellulaires du développement des lymphocytes B.

La cellule B va passer par différents stades avant de devenir un plasmocyte. Toutes ces étapes sont marquées par des expressions différentielles de marqueurs protéiques qui permettront de distinguer les différents intermédiaires cellulaires (8).

Le développement de ces cellules précurseurs est dépendant du micro-environnement médullaire et de l'activation séquentielle de facteurs de transcription. Il nécessite la présence de plusieurs facteurs solubles tels que CXCL12 ou l'interleukine 7 (IL-7). Ces facteurs sont sécrétés par les cellules stromales qui forment la niche médullaire et principalement par les cellules réticulaires (Figure 3) (8).

Les mécanismes exacts régulant le développement des cellules précurseurs B ne sont pas encore bien connus mais on sait que cette niche médullaire est indispensable pour l'ontogénie des LB.

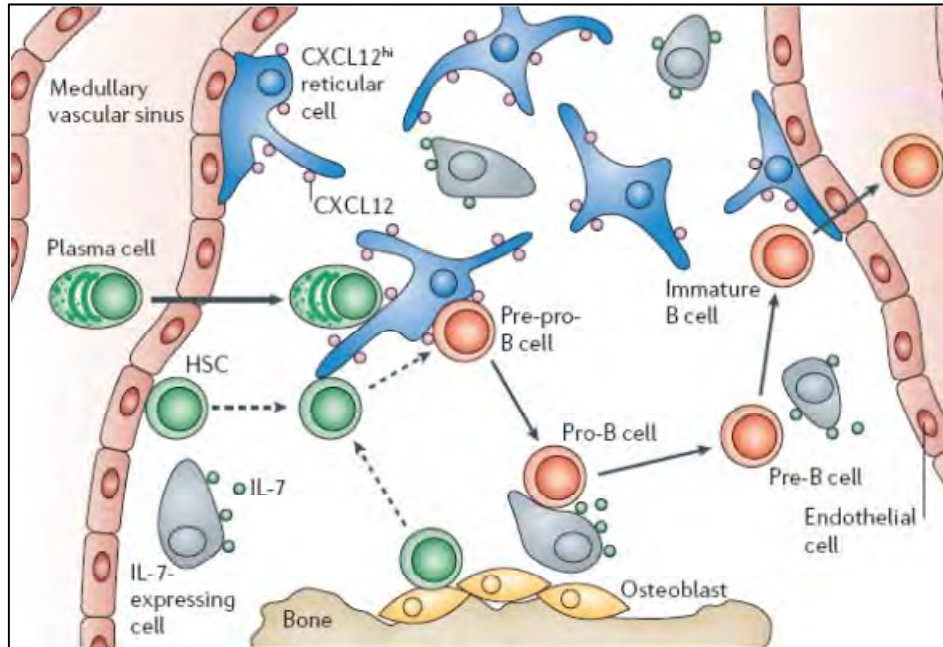


Figure 3: Développement des cellules B dans la moelle osseuse.

Le parcours des cellules précurseurs B dans la niche médullaire est dirigé par les cellules stromales (cellules réticulaires, ostéoblastes...) qui vont leur délivrer les facteurs solubles essentiels à leur développement (8).

Le développement des cellules précurseurs B est caractérisé par l'expression de marqueurs protéiques mais surtout par l'expression de l'Ig de surface qui servira de récepteur à l'antigène.

b) La recombinaison V(D)J

Dans les cellules B progénitrices, va s'initier l'assemblage des gènes pour les régions variables des chaînes lourdes et légères des Igs. Il a été montré, dans les années 80, par Tonegawa et ses collaborateurs que cet assemblage subissait des recombinaisons sur des sites spécifiques de l'ADN (9). Cette découverte lui a valu le prix Nobel en 1987 car elle est à l'origine d'un processus fondamental en immunologie : la génération de la diversité des anticorps.

Ce phénomène est aujourd'hui connu sous le nom de recombinaison V(D)J (*Variable (Diversity) Joining*) et a été longuement étudié afin de connaître son mécanisme.

Ce processus consiste en l'assemblage des segments géniques V, D et J (Figure 4). Les sites de recombinaison sont définis grâce à des séquences essentielles et hautement conservées : les RSS (*Recombination Signal Sequences*). Ces séquences vont être reconnues par une machinerie protéique qui effectuera la réaction de recombinaison. L'initiation de la recombinaison se fera grâce à des protéines codées par deux gènes spécifiques aux lymphocytes: RAG1 et RAG2 (*Recombination-Activating Gene*) qui ont été découverts à la suite des études de Tonegawa (10, 11). Ces protéines vont générer des cassures double-brin dans l'ADN entre les segments géniques et les séquences RSS (12). Ces cassures seront ensuite réparées par les protéines du système de réparation NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*).

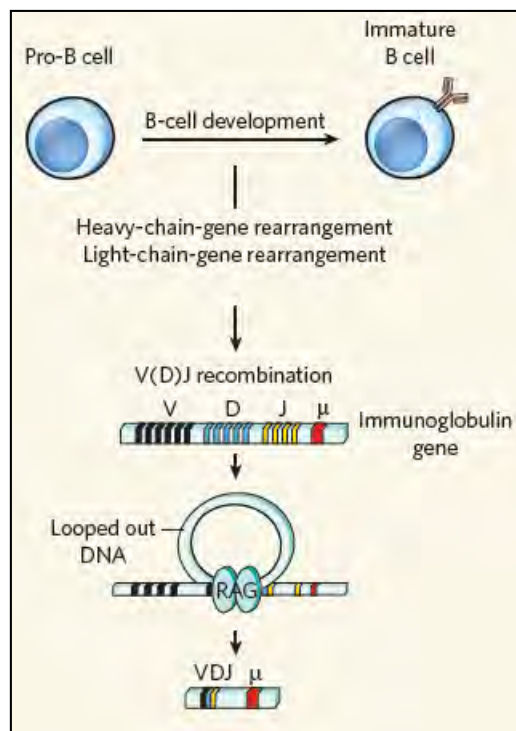


Figure 4: Recombinaison V(D)J dans les cellules précurseurs B.

Recombinaison des segments V (*Variable*), D (*Diversity*) et J (*Joining*) des gènes des Igs adapté de (13).

Le réarrangement est tout d'abord initié sur le locus de la chaîne lourde IgH (Heavy Chain Immunoglobulin) du CLP ou de la cellule pro-B nouvellement formée. Ce réarrangement concerne les segments D_H et J_H . Le réarrangement entre les segments V_H et DJ_H se produira plus tard au stade pro-B tardif (13).

La recombinaison V(D)J permet d'obtenir la chaîne $Ig\mu$ qui fait partie du complexe pré-BCR, exprimé sur les cellules pré-B. Le pré-BCR est nécessaire pour initier divers processus dans les cellules pré-B comme la prolifération ou encore l'exclusion allélique. L'exclusion allélique est une étape intégrale de la différenciation B qui assure l'expression à la surface d'un BCR à spécificité unique (14). Le signal du pré-BCR va également participer à la recombinaison du gène de la chaîne légère.

A l'issue de ces événements, la cellule B exprime un BCR avec les chaînes lourdes et légères qui ont subies le réarrangement. On passe donc au stade B immature exprimant le BCR à sa surface.

2- Maturation du lymphocyte B immature

Avant de quitter la MO, les cellules B immatures vont subir le processus de sélection négative visant à éliminer les cellules ayant un BCR autoréactif. En effet, les cellules B ayant un BCR réactif pour les antigènes du soi seront éliminées par apoptose. Les autres pourront quitter la MO et se diriger vers les OL II^R, principalement la rate et les ganglions lymphatiques, avec à leur surface, un BCR d'isotype IgM.

Les cellules immatures vont subir la maturation dans les OL II^R, elles vont les traverser et ressortiront quand elles auront atteint leur maturité (Figure 5). Cette phase de maturation dans les OL II^R est, contrairement à celle se déroulant dans la moelle osseuse, dépendante des antigènes.

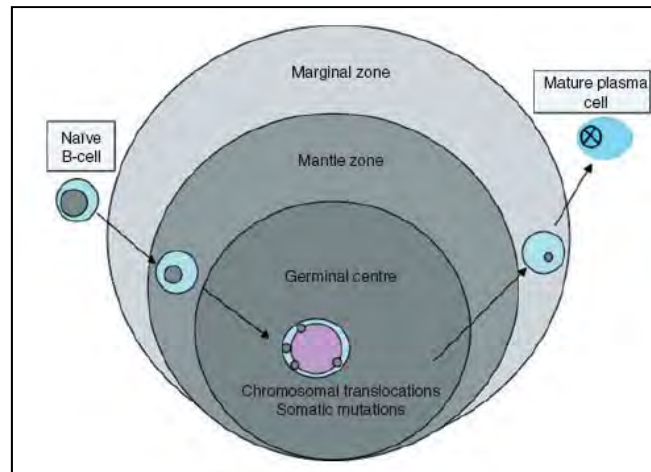


Figure 5: Trajet des cellules B dans les OL II^R: le chemin vers la cellule B mature.

Les cellules B immatures vont entrer dans les OL II^R au niveau de la zone marginale puis vont traverser la zone du manteau. Elles parviennent ainsi au centre germinatif qui est la zone clé de la différenciation des cellules B. Elles ressortiront ensuite quand la différenciation sera achevée et les plasmocytes retourneront au niveau de la MO (15).

On retrouve dans la circulation des lymphocytes B immatures qui transitent de la MO vers les OL II^R. Ces cellules dites « transitionnelles » vont acquérir l'expression des IgD en surface en plus des IgM grâce à un processus d'épissage alternatif (16). On obtient ainsi des cellules B matures naïves qui vont rejoindre les OL II^R.

Pour la suite, nous prendrons l'exemple du ganglion lymphatique comme OL II^R dans la mesure où la pathologie étudiée se développe dans cet organe.

a) Structure du centre germinatif

Les cellules B naïves, *via* des récepteurs aux cytokines et à l'expression de CD40, vont être attirées vers une zone riche en cellules T (*T cell zone*, paracortex). L'interaction avec les cellules T va activer les cellules B entraînant ainsi leur prolifération. Cela initie la formation du centre germinatif (CG) (17). Les cellules B proliférantes, les centroblastes, vont former la zone sombre du CG. Par opposition, la zone claire va contenir les centrocytes (cellules non proliférantes), les cellules dendritiques folliculaires (CDF), des cellules T et des macrophages (Figure 6).

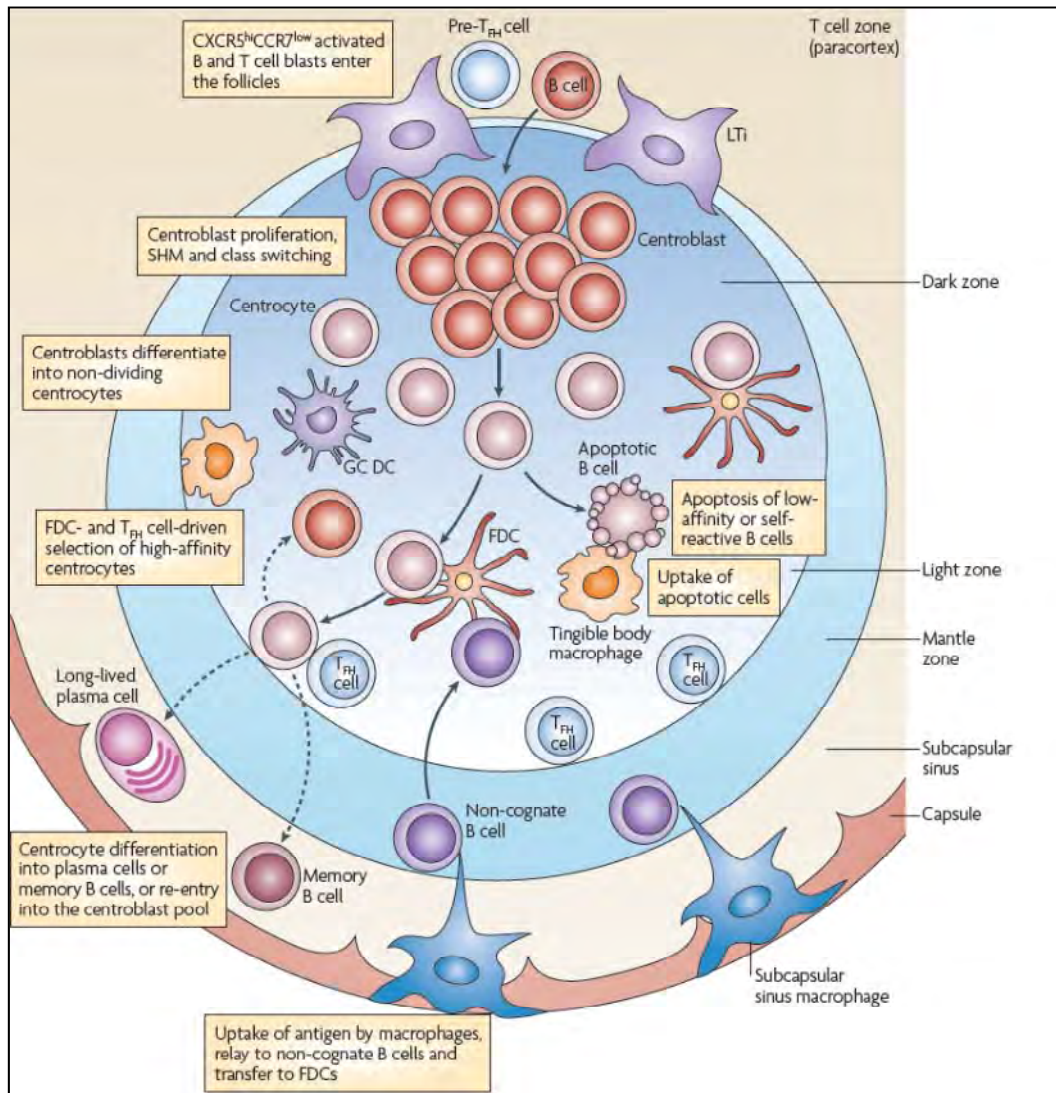


Figure 6: Structure et composants cellulaires du centre germinatif.

Les cellules B naïves entrent dans le ganglion lymphatique par la zone T. Un phénomène d'intense prolifération fait suite aux interactions cellules B-cellules T et entraîne la formation de deux zones dans le centre germinatif : la zone sombre et la zone claire. Le CG contient de nombreux acteurs cellulaires tels que les cellules T, les CDFs ou encore les macrophages. Ce micro-environnement est crucial pour la différenciation des cellules B (18).

Les CDFs présentent à leur surface des antigènes qu'elles ont acquis *via* un relai entre les macrophages et des cellules apparentées B. Grâce à cette expression antigénique sous forme de complexe immun, les CDFs peuvent jouer leur rôle de CPAs vis-à-vis des cellules B. Ces CDFs vont être essentielles dans la sélection des cellules B: seules les cellules B présentant un BCR à haute affinité reçoivent un signal de survie. Les autres seront éliminées par apoptose. Les macrophages présents dans cette zone claire permettront l'élimination des cellules B apoptotiques afin d'éviter des réactions auto-immunes (18, 19).

Les cellules B du CG sont connues pour être très sensibles à l'apoptose. Cela s'explique par le fait que ces cellules sont déficientes en protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*). Cela permet l'élimination rapide de cellules présentant un BCR non fonctionnel ou muté (20).

A la suite de l'activation du BCR par liaison à un antigène, un signal activera des mécanismes conduisant à des modifications responsables d'une augmentation de la diversité des Igs. Ces mécanismes sont indispensables à l'augmentation de la spécificité de la réponse immunitaire ainsi qu'à celle vis-à-vis de l'antigène. Ces mécanismes majeurs sont: la mutation hypersomatique et la commutation de classe.

b) La mutation hypersomatique

La mutation hypersomatique (MHS) est un processus par lequel des mutations ponctuelles sont introduites dans les régions variables des chaînes lourdes et légères du BCR. Ce processus permet la génération d'un répertoire diversifié d'anticorps et induit une maturation de l'affinité du BCR.

La MHS se produit dans les centroblastes au sein de la zone sombre du CG et va générer substitutions, délétions ou insertions dans la région V(D)J réarrangée. Ce phénomène est associé à des cassures double-brin de l'ADN dues à l'activité d'une enzyme exprimée par les centroblastes: l'AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*) (21, 22). Cette enzyme catalyse l'initiation du processus en déaminant les cytidines directement sur l'ADN, générant les cassures. Suite à cela, le système de réparation non fidèle « error-prone » répare ces cassures en induisant des mutations ponctuelles (20).

Le but de la MHS est de permettre la sélection de cellules B exprimant un BCR de meilleure affinité pour l'antigène. Les cellules présentant un BCR de faible affinité pour l'antigène seront éliminées par apoptose.

c) La commutation de classe

La commutation de classe (CC), aussi connue sous le nom de commutation isotypique, est un processus qui permet le remplacement des Igs d'isotypes IgM et IgD par d'autres isotypes IgG, IgA ou encore IgE. Chaque isotype présente une fonction bien distincte, mais il est important de préciser que la CC permet de modifier la fonction des Igs tout en conservant leur spécificité.

Ce mécanisme correspond à un réarrangement irréversible de l'ADN et implique l'enzyme AID. Il va se produire une excision des séquences d'ADN situées entre le gène J et le gène codant pour la chaîne lourde voulue. Cela est permis grâce à la présence de séquences caractéristiques (séquences Switch) en amont de chaque gène qui vont entraîner le rapprochement des séquences codant pour l'IgM et l'Ig voulue. C'est la nature des cytokines et des signaux co-stimulateurs qui va déterminer l'isotype de l'Ig. Les signaux mis en jeu peuvent faire intervenir des récepteurs tels qu'ICOS (*Inducible T-cell CO - Simulator*) ou les récepteurs BAFF. De plus, il semble que le facteur de transcription IRF4 soit capable de réguler indirectement l'expression de AID (20).

3- Obtention des cellules professionnelles

L'étape finale de la différenciation des cellules B se caractérise par l'obtention de deux types cellulaires : les cellules B mémoires et les plasmocytes (Figure 7). Les événements (MHS et CC) qui viennent de se produire dans le CG ne semblent pas orienter la différenciation terminale en plasmocytes ou cellules mémoires. Les signaux requis sont encore mal connus mais plusieurs gènes ont été identifiés, notamment pour orienter la différenciation en plasmocytes.

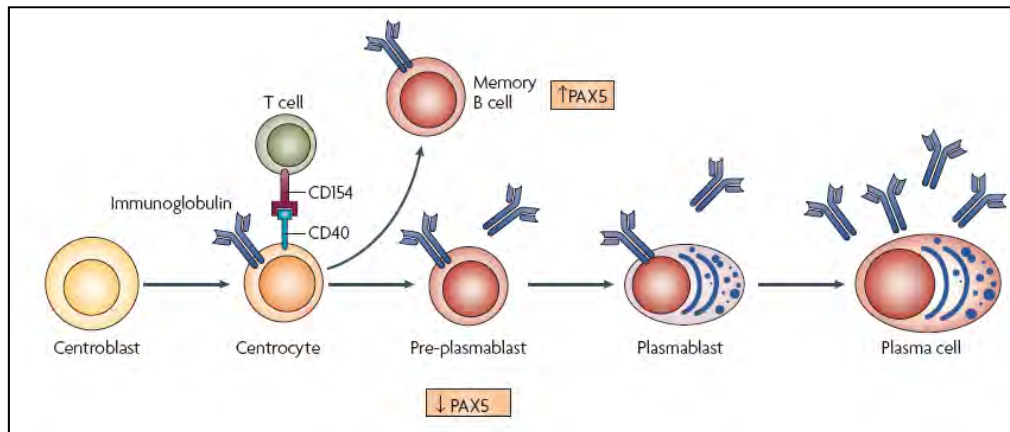


Figure 7: Différenciation terminale post-CG.

Les centrocytes vont pouvoir donner deux types de cellules: les cellules B mémoires et les plasmocytes. L'orientation vers l'un ou l'autre des types cellulaires va être conditionnée par la modulation de différents facteurs nucléaires mais les mécanismes exacts sont encore aujourd'hui peu connus *adapté de (20)*.

La différenciation terminale en plasmocytes nécessite l'inactivation du gène PAX5 (*Paired BoX 5*), gardien de l'identité B. L'inhibition de PAX5 est la première étape vers la différenciation en plasmocytes avec l'établissement des pré-plasmablastes qui sécrètent un faible taux d'anticorps. Ensuite, l'inhibition de BCL-6 (*B-Cell Lymphoma 6*) va enclencher la formation des plasmablastes et s'en suivra l'obtention des plasmocytes qui eux sont capables de sécréter des anticorps spécifiques de haute affinité (20). On distingue deux types de plasmocytes : les plasmocytes à longue durée de vie et ceux à faible durée de vie. Cette durée de vie est conditionnée par leur localisation. Les plasmocytes à courte durée de vie vont rester dans le ganglion lymphatique où ils produiront la première vague d'anticorps spécifiques. Les autres plasmocytes, qui retourneront dans la MO, verront leur durée de vie s'allonger de plusieurs années.

Les cellules B mémoires se définissent comme étant des cellules spécifiques à l'antigène et à longue durée de vie. Une fois générées, ces cellules rejoignent la population B circulante et migrent vers les différents tissus où elles assureront la veille immunologique. Elles persistent dans l'organisme en l'absence d'antigène et constituent la population cellulaire qui répondra par une différenciation massive en plasmocytes si l'antigène ayant déclenché leur production réapparaît (23).

L'ontogénie des lymphocytes B (Figure 8) est un phénomène extrêmement régulé. Le bon déroulement de la différenciation conditionnera l'immunité humorale et ainsi la protection de l'organisme contre les pathogènes. Cependant, il peut exister des dysfonctionnements générant des cellules B anormales et pouvant ainsi engendrer des situations pathologiques. C'est dans ce contexte que va se poursuivre cette introduction pour le cas d'une hémopathie maligne particulière : le lymphome folliculaire.

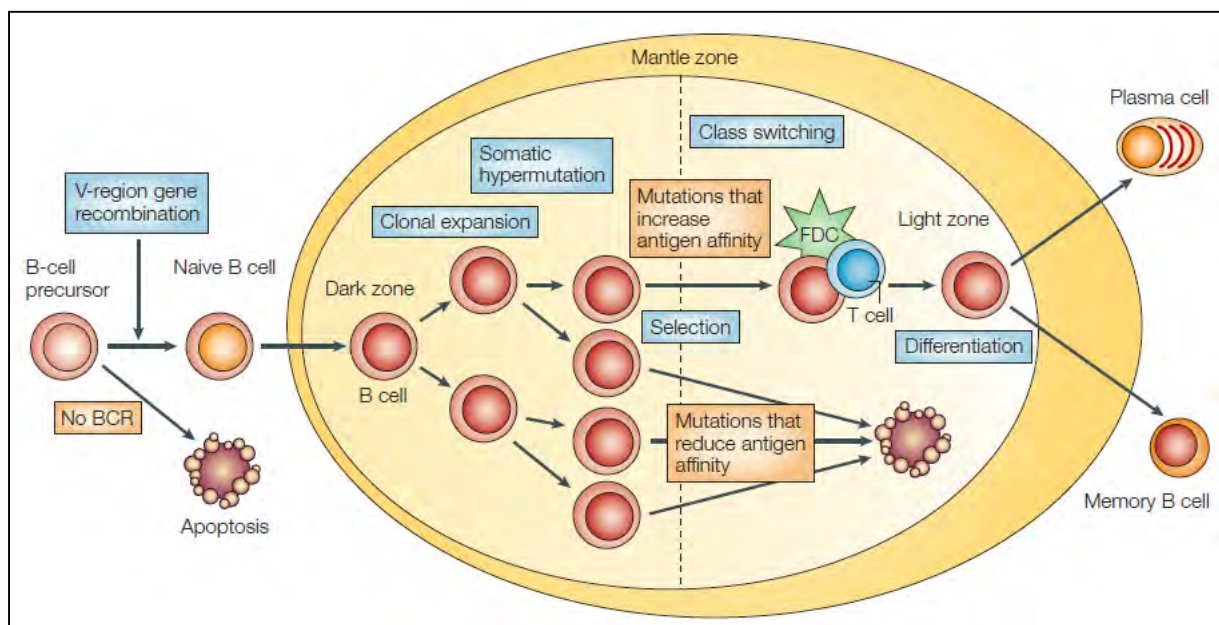


Figure 8: Ontogénie des cellules B.

Schéma récapitulant les étapes et les évènements du développement des lymphocytes B (24).

II- LE LYMPHOME FOLLICULAIRE: UN CANCER MECONNU DU GRAND PUBLIC

1- Généralités sur les cancers du système lymphatique

Un lymphome est un cancer du système lymphatique caractérisé par la prolifération de lymphocytes T ou B malins (parfois de cellules Natural Killer (NK) mais ceci est très rare), prenant naissance dans les ganglions lymphatiques et pouvant s'étendre aux autres OL II^R. Les lymphomes sont souvent révélés par la présence d'une adénopathie.

Il existe deux grands types de lymphomes B:

- La maladie de Hodgkin: caractérisée par la présence de grosses cellules atypiques appelées les cellules de Reed-Sternberg. Elle représente 10% des lymphomes.

- Les lymphomes non-Hodgkiniens (LNHs), 90% des lymphomes, que l'on distingue selon leur degré de malignité: les indolents (faible malignité) et les agressifs (malignité élevée).

La classification d'Ann-Arbor est utilisée en médecine pour faire le bilan d'extension des lymphomes malins. Elle repose sur des critères communs aux lymphomes et est très utile pour le pronostic (25).

Cette classification distingue 4 stades:

- ❖ Stade I: atteinte d'un seul groupe ganglionnaire ou d'un seul organe
- ❖ Stade II: atteinte de plus d'une aire ganglionnaire d'un même côté du diaphragme
- ❖ Stade III: adénopathies multiples des deux côtés du diaphragme
- ❖ Stade IV: atteinte viscérale diffuse avec au moins une atteinte ganglionnaire ou atteinte médullaire.

A cela on ajoute:

- ❖ E aux stades I, II et III s'il y a présence d'une atteinte viscérale contiguë
- ❖ B si le patient présente un amaigrissement inexplicé de plus de 10 % du poids du corps en moins de 6 mois, une fièvre inexplicée (>38°C) de plus de 8 jours ou encore des sueurs nocturnes profuses

- ❖ A si aucun signe de B
- ❖ X si la masse tumorale est volumineuse (>10cm de diamètre)

a) La maladie de Hodgkin

En France, la maladie de Hodgkin se situe au 20^{ème} rang des cancers chez l'homme et au 21^{ème} chez la femme avec une incidence en France de 2,2/100 000 habitants et 2,5/100 000 habitants chez l'homme et la femme respectivement. La survie relative à 5 ans est de 85% chez l'homme et de 92% chez la femme.

Les patients présentent typiquement une lymphadénopathie cervicale ou supra-cervicale avec des symptômes systémiques dans 25% des cas. Les atteintes sont presque exclusivement ganglionnaires mais peuvent envahir la MO (5 à 8% des cas). Concernant l'étiologie de cette pathologie, elle peut être variable mais la cause la plus fréquente reste une infection virale due au virus Epstein-Barr (26).

Les perspectives sont très bonnes pour les patients à des stades précoces (I à IIA) avec une survie globale de 90% et pour les patients présentant un stade avancé, la survie globale est de 75 à 90%. Pour les stades avancés, un score est calculé et permet d'évaluer le pronostic. Ce score, appelé score de Hasenclever, est calculé selon la présence, ou non, de sept facteurs cliniques; la présence de chaque facteur réduit de cinq ans la survie globale (25).

Facteurs pris en compte pour le calcul du score de Hasenclever (27):

- ✓ Age >45ans
- ✓ Sexe masculin
- ✓ Concentration en albumine dans le sérum <40g/L
- ✓ Concentration en hémoglobine <105g/L
- ✓ Maladie à un stade IV
- ✓ Leucocytose (concentration en globules blancs >15×10⁹ ϕ /L)
- ✓ Lymphopénie (moins de 0,6×10⁹ lymphocytes / L ou <8% des globules blancs totaux).

Le traitement de cette pathologie va dépendre du stade auquel le patient est diagnostiqué. Selon le stade, le traitement est composé soit de l'association chimiothérapie (ABVD=

Doxorubicine + Bléomycine + Vinblastine + Dacarbazine) + radiothérapie soit chimiothérapie seule (MOPP6ABV= ABVD + Méchloréthamine + Procarbazine + Prednisone) (28) (29).

Aujourd'hui, la plupart des patients atteints de la maladie de Hodgkin sont guéris mais la recherche continue afin de réduire les effets secondaires et de parvenir à une éradication tumorale totale.

b) Les lymphomes non-Hodgkiniens

L'incidence des LNHs est marquée par une augmentation importante durant ces deux dernières décennies et on dénombre en France 10 400 nouveaux cas par an. Les raisons de cette augmentation ne sont pas bien connues encore aujourd'hui bien que l'émergence du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a représenté un facteur d'augmentation de l'incidence de ces maladies (30). De plus, de nombreuses études ont montré que l'usage des pesticides était un facteur de risque important pour les LNHs (31). Ils représentent à l'heure actuelle le 6^{ème} cancer le plus fréquent en France avec pour les hommes de 8,9 à 13 cas pour 100 000 habitants/an et pour les femmes de 2,4 à 14,3 cas pour 100 000 habitants/an. Ces lymphomes sont des pathologies de l'adulte avec un âge moyen de survenue de 63-64 ans pour les hommes et de 66-70 ans pour les femmes.

Les LNHs représentent un groupe hétérogène de cancer dont 85 à 90% sont à cellules B, les autres provenant des lymphocytes T voire rarement des cellules NK. On les classifie selon leur degré de malignité. On distingue ainsi les LNHs indolents (faible malignité) et les LNHs agressifs (malignité élevée). De plus, qu'ils soient de phénotype T ou B, les différents LNHs vont être caractérisés par le stade de différenciation des cellules malignes (Figure 9) (32).

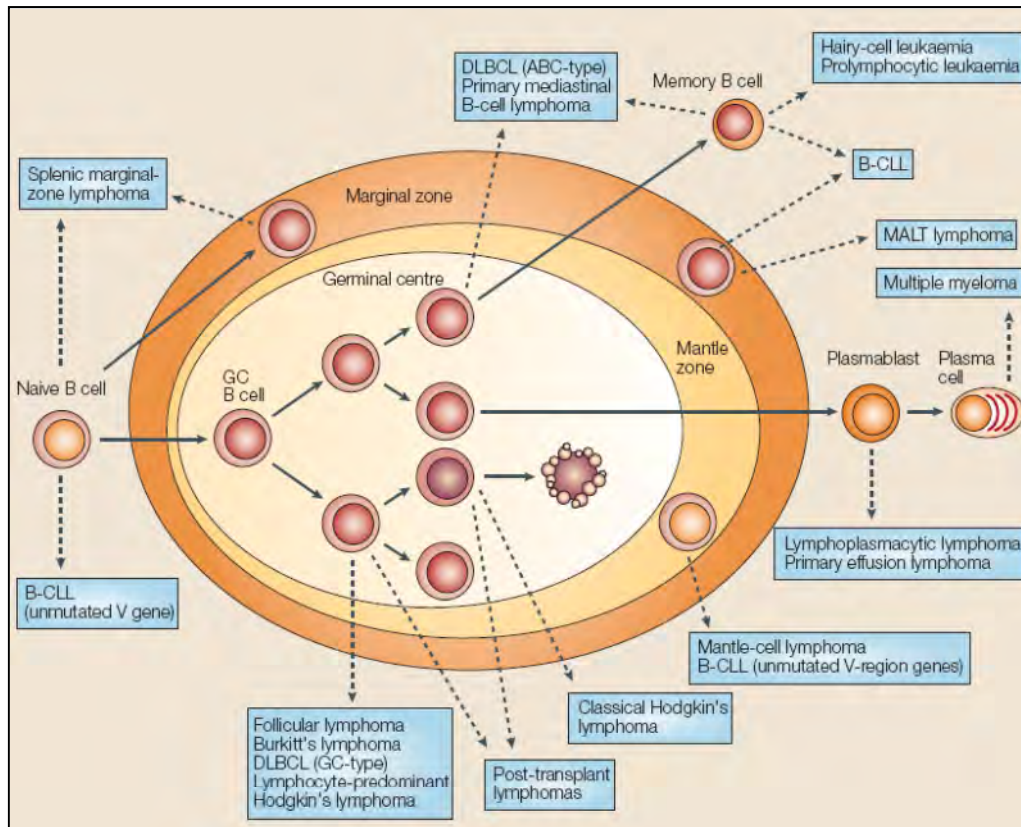


Figure 9: Origines cellulaires des différents LNHS.

B-CLL = Leucémie Lymphoïde Chronique B, DLBCL = Lymphome B Diffus à Grandes Cellules, MALT = Lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (24).

Les signes cliniques vont dépendre des sites atteints, du sous-type de LNH et de symptômes cités dans la classification de Ann-Arbor (le patient présente un amaigrissement inexpliqué de plus de 10 % du poids du corps en moins de 6 mois, une fièvre inexpliquée (>38°C) de plus de 8 jours ou encore des sueurs nocturnes profuses). 2/3 des patients présentent une lymphadénopathie non douloureuse qui est plus généralisée que dans la maladie de Hodgkin (33).

Un index international de pronostic (IPI) a été mis en place au début des années 1990 pour évaluer le pronostic des patients atteints d'une forme agressive de LNH et celui-ci a été étendu comme modèle de pronostic pour les patients atteints de LNH. Cet IPI prend en compte l'âge du patient (> ou < à 60 ans), la concentration en lactate déshydrogénase (LDH), le stade selon la classification d'Ann-Arbor (I/II vs III/IV), le nombre de sites extra-ganglionnaires atteints et le statut de performance du Eastern Cooperative Oncology Group (34). Cet index permet ainsi de distinguer quatre groupes de risque et d'établir un pronostic pour chaque patient.

2- Diagnostic et pronostic

Le lymphome folliculaire (LF) est le second type de LNH le plus fréquent avec environ 30% des cas (31). Il s'agit d'un lymphome indolent à progression lente dont la survie globale moyenne est de 10 ans (35) et l'âge moyen au diagnostic est de 60 ans.

Au diagnostic, les patients présentent une lymphadénopathie asymptomatique avec dans 70% des cas une infiltration de la MO. Moins de 20% des patients présentent les symptômes décrits dans la classification d'Ann-Arbor et également moins de 20% des patients ont une concentration élevée en LDH dans le sérum (36).

Le pronostic du LF est variable et de nombreux traitements peuvent être proposés. C'est pourquoi un index pronostic adapté à cette pathologie a été mis en place. Il s'agit du score FLIPI (*Follicular Lymphoma International Prognostic Index*). Pour calculer ce score, cinq facteurs de risques principaux sont pris en compte: l'âge (> ou < à 60 ans), le stade Ann-Arbor (I/II vs III/IV), le taux d'hémoglobine (< ou > 120g/L), le nombre d'aires ganglionnaires atteintes (> ou < à 4) et le taux de LDH. Ainsi, trois groupes à risque ont été définis: le groupe à faible risque (score 0-1, 36% des patients), celui à risque intermédiaire (score de 2, 37% des patients) et celui à risque élevée (score >3, 27% des patients). Ce score FLIPI apparaît plus discriminant pour le LF que le score IPI et peut notamment être très utile pour le choix des traitements (37).

La transformation du LF en lymphome agressif est cliniquement marquée par une rapide atteinte des sites extra-ganglionnaires, le développement de symptômes B (classification Ann-Arbor) et une forte augmentation du taux de LDH. Cette transformation de LF est la principale cause de décès chez les patients. Le plus souvent, le LF va se transformer en DLBCL et plus rarement en lymphome de Burkitt. Selon le stade du LF ces transformations auront lieu dans 10 à 70% ces cas avec un risque de 3% par an (38).

3- Origines des cellules lymphomateuses: le moment où tout bascula...

Chez l'Homme, le développement des lymphocytes B débute dans la MO et est initié par la recombinaison V(D)J. Ce processus est fondamental dans la vie du lymphocyte B et est donc

extrêmement régulé. Mais parfois, il peut survenir des accidents génétiques. Certains seront corrigés par la machinerie cellulaire mais ceux qui ne le seront pas pourront être la cause de nombreuses pathologies telles que le LF (39).

C'est à cette étape là de la vie d'un lymphocyte B que va survenir l'accident génétique qui va initier la cascade oncogénique conduisant au LF: la translocation t(14;18). Cette translocation survient après la cassure double-brin sur le locus IgH du chromosome 14 suite à une recombinaison V(D)J médiée par la protéine RAG défectueuse et à une autre cassure au niveau du locus BCL-2 sur le chromosome 18 à cause de sites CpG fragiles (40). Cette translocation va conduire à la surexpression constitutive de la protéine Bcl-2, protéine anti-apoptotique (Figure 10).

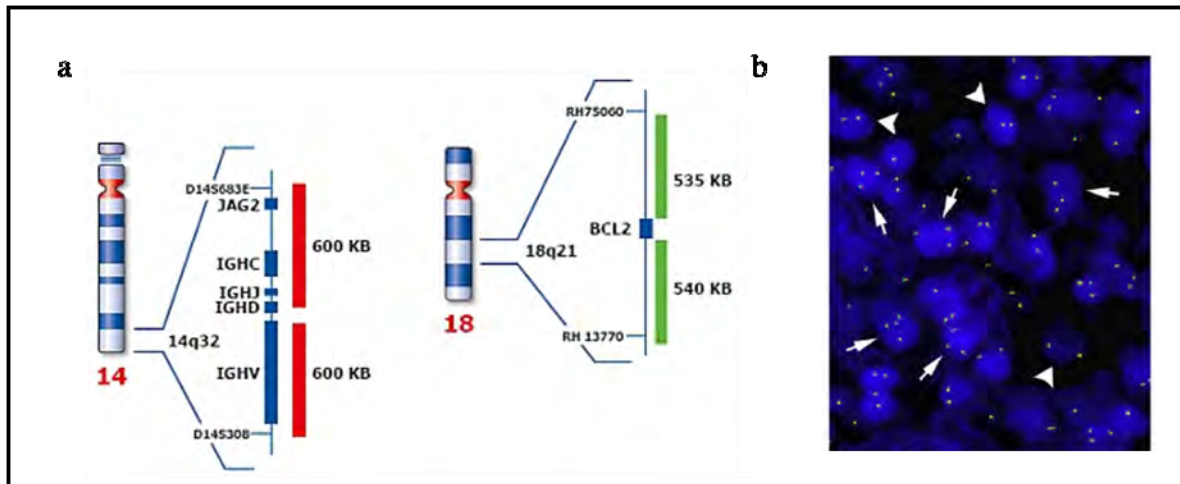


Figure 10: La t(14;18) conduit à la surexpression constitutive de Bcl-2.

a. Le chromosome 14 contient le locus IgH et le chromosome 18 le locus BCL2. (www.kreatech.com/uploads/RTEmagicC_d7f9c4b392.jpg) b. La technique du FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) permet de visualiser la fusion IGH/BCL2. En rouge le locus intact BCL2, en vert le locus intact IGH. Les flèches indiquent la fusion IGH/BCL2, et donc les cellules porteuses de la t(14;18) (41).

Cette translocation n'empêche pas la différenciation des lymphocytes B. Ainsi, les cellules B naïves porteuses de la translocation t(14;18) vont quitter la MO pour se rendre dans les OL II^R (42).

Les cellules normales du CG présentent une capacité accrue à répondre aux signaux apoptotiques, notamment due à l'absence de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, ce qui permet l'élimination rapide des cellules B ayant un BCR non fonctionnel (17). C'est au sein de ce CG que la transformation maligne du LF va se produire (Figure 11).

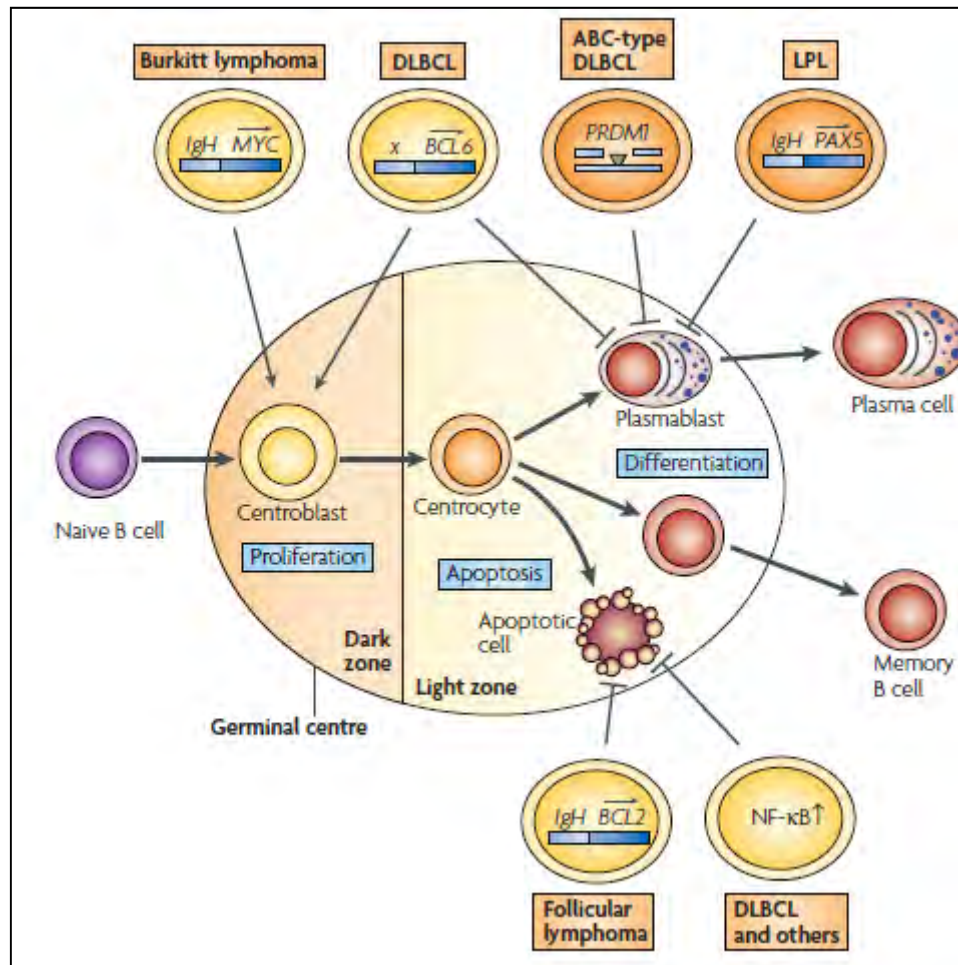


Figure 11: Le centre germinatif, une véritable niche pour la lymphomagenèse.

Les altérations génétiques survenues au cours de la maturation des lymphocytes B vont constituer des obstacles au bon déroulement de la différenciation dans le CG entraînant l'apparition des différents lymphomes. Dans le cas du LF, la t(14;18) conduisant à l'expression constitutive de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 va induire un défaut d'apoptose des centrocytes (20).

Les cellules B porteuses de la t(14;18) ont, quant à elles, un avantage de survie dû à l'expression constitutive de Bcl-2 et celles-ci seront protégées de l'apoptose même si elles portent un BCR non fonctionnel.

La t(14;18) est le premier élément à l'origine de la lymphomagenèse mais il est important de noter qu'au diagnostic, 10% des patients atteints de LF ne présentent pas cette translocation (43). De plus, la t(14;18) peut être retrouvée chez des individus sains (44, 45). Cette translocation ne peut donc pas, à elle seule, être responsable de l'apparition d'un LF et il existe ainsi d'autres altérations génétiques impliquées dans le développement d'un LF.

4- La t(14;18), oui mais pas seulement: aperçu d'un terrain génétique accidenté

Plus de 50% des individus sains portent cette t(14;18), élément définissant initialement le LF, et seulement 1 personne sur 24 000 par an développera un LF. La transformation en cellules B lymphomateuses est donc un événement rare (46). La t(14;18) ne suffit pas pour une complète transformation en LF. L'analyse plus précise de ces cellules t(14;18)⁺ a montré qu'elles ont subi la CC, et ne sont donc pas des cellules naïves. En effet, ces cellules sont capables de répondre à la stimulation antigénique et même à un stimulus exogène viral (47).

Ces cellules t(14;18)⁺ vont, dans le CG, subir la MHS et la CC. Ces deux réactions, bien que complètement différentes, dépendent de la même enzyme: AID. C'est suite à l'activation induite par cette enzyme que les cellules B t(14;18)⁺ vont acquérir des altérations génétiques secondaires qui conduiront à la transformation en cellules B malignes et donc par suite à l'apparition d'un LF. En effet, l'implication de cette enzyme dans l'apparition du FL a été montrée par Pasqualucci et ses collaborateurs grâce à un modèle murin déficient pour cette enzyme. Ainsi, les souris déficientes pour AID ne développeront pas de lymphome médié par Bcl-6 (48). Cette étude montre tout d'abord que l'enzyme AID est requise pour la lymphomagenèse et que des erreurs dans les processus de MHS et de CC vont contribuer à la pathogénèse. Ensuite, cette étude nous rappelle le rôle de Bcl-6 dans le LF.

Son implication dans la lymphomagenèse était bien connue dans le développement du DLBCL mais était plus rarement retrouvée dans les cas de LF. Cette surexpression avait été décrite pour la première fois en 1992 comme ayant un rôle dans une voie alternative de développement du LF (49). Et ce plus particulièrement chez les patients atteints de LF et non porteurs de la t(14;18) (50).

Mais le paysage génétique du LF montre de bien nombreuses altérations (Table 1).

Gene	Frequency (%)	Effect
<i>BCL2</i>	85	<i>BCL2</i> overexpression by <i>IGH/BCL2</i> translocation
	96	Bystander mutation (SHM)?
<i>MLL2</i>	89	Histone modification
<i>IGHV, IGLV</i>	79–100	N-glycosylation motifs
<i>EPHA7</i>	70	Loss of tumor suppressor (ERK and SRC kinase signaling)
<i>BCL6</i>	47	Bystander mutation (SHM)?
	6–14	<i>BCL6</i> overexpression by <i>BCL6</i> translocation (various partners)
<i>TNFRSF14</i>	18–46	Unknown
<i>CREBBP</i>	33	Histone modification
<i>MEF2B</i>	15	Histone modification
<i>EP300</i>	9	Histone modification
<i>EZH2</i>	7	Oncogenic H3K27me3
<i>TNFAIP3/A20</i>	2–26	Loss of tumor suppressor
<i>FAS</i>	6	Decreased apoptosis
<i>TP53</i>	<5	Loss of tumor suppressor

Table 1: Altérations génétiques connues du LF au diagnostic.

Liste non exhaustive des altérations génétiques que l'on retrouve chez les patients atteints de LF avec leur fréquence ainsi que leur(s) conséquence(s) (51).

Plusieurs études ont montré que chez les patients atteints de LF, des mutations sont retrouvées sur les gènes codant pour des protéines qui régulent les histones. Ainsi, les mutations les plus récurrentes sont celles de *MLL2* (gène codant pour des histone-méthyltransférases) chez 89% des patients. Ces mutations vont entraîner une perte complète (ou quasi complète) du gène *MLL2* dans les cellules tumorales. La mutation consiste en une inactivation, indiquant que *MLL2* est un gène suppresseur de tumeur. Morin et ses collaborateurs ont également montré qu'il y a, chez environ 15% des patients atteints de LF, des mutations sur le gène *MEF2B* (52). Un autre gène de cette catégorie *CREBBP* (codant pour une histone acétylase) est également affecté chez 33% des patients atteints de LF. Cette mutation est analogue à celle retrouvée chez des patients atteints de DLBCL à savoir une délétion. Etant donné les similarités fonctionnelles et structurales entre *CREBBP* et *EP300*, Pasqualucci et ses collaborateurs ont recherché s'il existait des mutations dans ce dernier gène. Ils ont ainsi trouvé des mutations d'*EP300* chez 9% des patients atteints de LF (53). *EZH2* est le gène accidenté dans le LF le mieux caractérisé, et on retrouve cette mutation chez 7% des patients. *EZH2* est un gène suppresseur de tumeur normalement surexprimé dans les cellules B du CG. Engendrer des mutations de ce gène bloque le profil transcriptionnel et favorise la prolifération (54).

De très nombreuses études ont été menées pour caractériser les aberrations génétiques présentes chez les patients atteints de LF. On dénote qu'il y a plusieurs gains chromosomiques affectant plusieurs gènes dont notamment le proto-oncogène *REL* (dans 10% des cas),

MDM2, CDK4, BCL9 ou encore dans 5 à 10% l'oncogène MYC. En parallèle, des pertes sont aussi à dénombrer. Elles vont concerner plusieurs gènes comme par exemple TNFR2, P73, PTEN, TP53 ou encore TNFRSF14 (55).

Le LF est donc une pathologie du génome et de l'épigénome.

La plupart de ces mutations participent également à la transformation du LF en lymphome agressif et principalement en DLBCL (Figure 12).

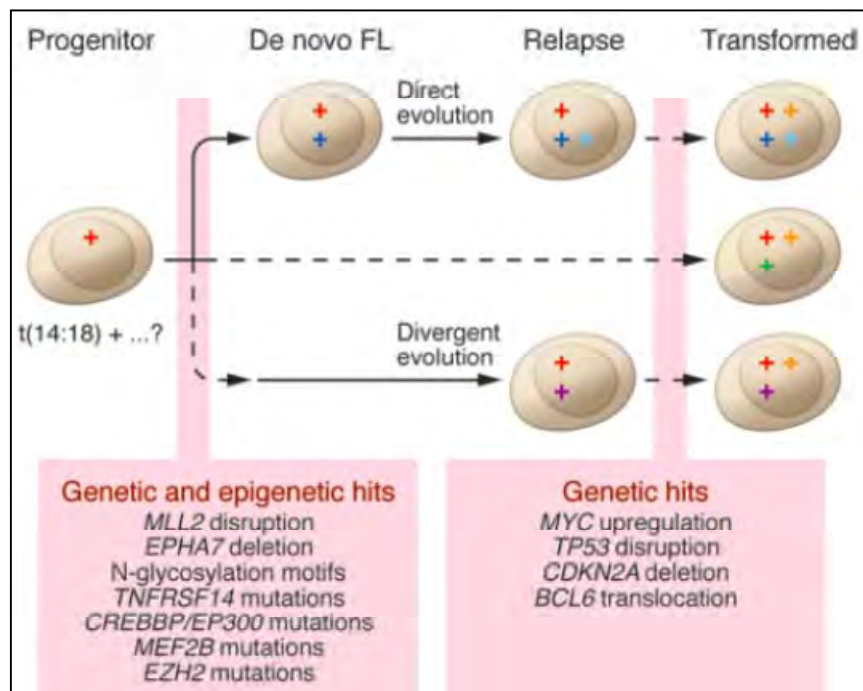


Figure 12: Modèle impliquant les altérations génétiques dans la transformation du LF
Liste non exhaustive des différentes altérations génétiques impliquées dans la transformation du LF (51).

Plusieurs études ont montré des associations entre les aberrations génétiques et le processus de transformation. La plus connue pour être impliquée dans la transformation est la surexpression de l'oncogène MYC ou de ses gènes cibles. De plus, les patients porteurs de la translocation t(14;18) et surexprimant MYC (*double hit lymphoma*) présentent un très mauvais pronostic et une pathologie agressive (56). De nombreuses aberrations génétiques ont été associées avec la transformation. Parmi ces aberrations, on retrouve notamment les dérégulations de p53 mais aussi les conséquences des gains ou pertes chromosomiques (38).

Les mutations concernant le gène TNFRSF14 sont dues à une perte chromosomique et sont associées au processus de transformation du LF. Ce gène est régulièrement muté chez les

patients atteints de LF avec des fréquences allant, selon les études, de 18 à 46% (57). Il est considéré comme un gène suppresseur de tumeur car il favorise l'apoptose médiée par Fas, l'immunité anti-tumorale et est capable d'inhiber la prolifération cellulaire. Dans 57% des cas, la mutation de TNFRSF14 induit la production d'une protéine tronquée dans son domaine transmembranaire, conduisant à une diminution de son expression à la membrane des cellules (58).

Ces mutations font un lien entre la génétique du LF et l'implication du micro-environnement dans lequel les cellules lymphomateuses évoluent.

5- Le BCR, acteur de la lymphomagenèse

Le BCR est le reflet de la spécificité du LB et va permettre à ces cellules de reconnaître directement les antigènes qui leur seront présentés. Le BCR est une forme membranaire des Igs, « contrairement » aux anticorps qui représentent eux une forme soluble. Il est associé à un dimère $Ig\alpha-Ig\beta$ qui transduira le signal dans la cellule B suite à la stimulation du BCR. Toute leur vie, les LB subiront une pression de sélection afin d'exprimer un BCR approprié: par exemple, les cellules pré-B sont sélectionnées selon leur pré-BCR et les cellules B immatures sont sélectionnées pour avoir un BCR fonctionnel et non-autoréactif. La sélection pour l'expression du BCR semble également exister dans le développement des cellules B malignes. En effet, malgré la translocation t(14;18) qui touche également le locus de l'Ig, l'expression du BCR est assurée par le deuxième allèle ce qui montre la « volonté » de la cellule B à exprimer le BCR indispensable à la survie des LB (24).

La MHS peut avoir pour conséquence l'introduction de mutations dans la région IgV_H , générant des sites de N-glycosylation. Ainsi, l'équipe de Stevenson a montré que 79% des patients atteints de LF portent ce type de mutation. Ce taux de mutation est significativement plus élevé dans les LF que dans les DLBCL (41%), les myélomes multiples (8%) ou les LB normaux (9%) (59). Cette accumulation de sites de N-glycosylation pourrait conduire à une suractivation directe du BCR ou induire des interactions spécifiques ou non avec des structures présentes dans le micro-environnement. La N-glycosylation facilite les interactions avec des lectines présentes dans le micro-environnement (60) ce qui influence plusieurs fonctions cellulaires telles que l'adhésion ou encore la migration.

De plus, des études montrent que le BCR est anormalement stimulé dans des cellules de LF. L'équipe de R. Lévy a montré que, dans les cellules de LF, la signalisation du BCR est altérée comparativement aux cellules saines et que cela joue un rôle dans l'ontogénie du LF. Plus précisément, ils ont montré que la signalisation du BCR, *via* les phosphorylations de Btk, Syk, Erk 1/2 et p38, était plus rapide et plus durable dans les cellules malignes de LF que dans les LB normaux issus des mêmes donneurs (61). Une étude menée par notre équipe en 2006 a montré dans les LF une suractivation de la voie mTOR. Celle-ci est régulée en amont par la suractivation de différentes kinases telles que Syk, PI3K, PLC γ 2, PKC ζ et p90RSK. Cette suractivation de la voie mTOR confère un avantage de survie aux cellules lymphomateuses (62-64).

Toutes les études menées sur l'implication du BCR dans le LF convergent pour dire que la stimulation du BCR va contribuer à la survie et la prolifération des cellules lymphomateuses. Et ce, de manière directe ou de manière indirecte *via* des interactions avec le micro-environnement tumoral.

6- Le micro-environnement tumoral, berceau des cellules lymphomateuses

Les avancées majeures sur l'importance du micro-environnement dans la pathologie du LF ont été réalisées grâce à des approches d'analyse d'expression de gènes. De façon intéressante, les gènes qui définissent le mieux la signature pronostique du LF sont ceux exprimés par les cellules T, les macrophages ou encore les cellules dendritiques (DC) mais non ceux exprimés par les cellules tumorales elles-mêmes (65). L'agressivité de la maladie est aussi déterminée par le micro-environnement et non par les caractéristiques génétiques des cellules B tumorales.

L'équipe de Staudt a identifié deux signatures géniques qui permettent de déterminer le pronostic du LF: l'« *Immune-Response 1* » (IR1) et l'« *Immune-Response 2* » (IR2) (Figure 13).

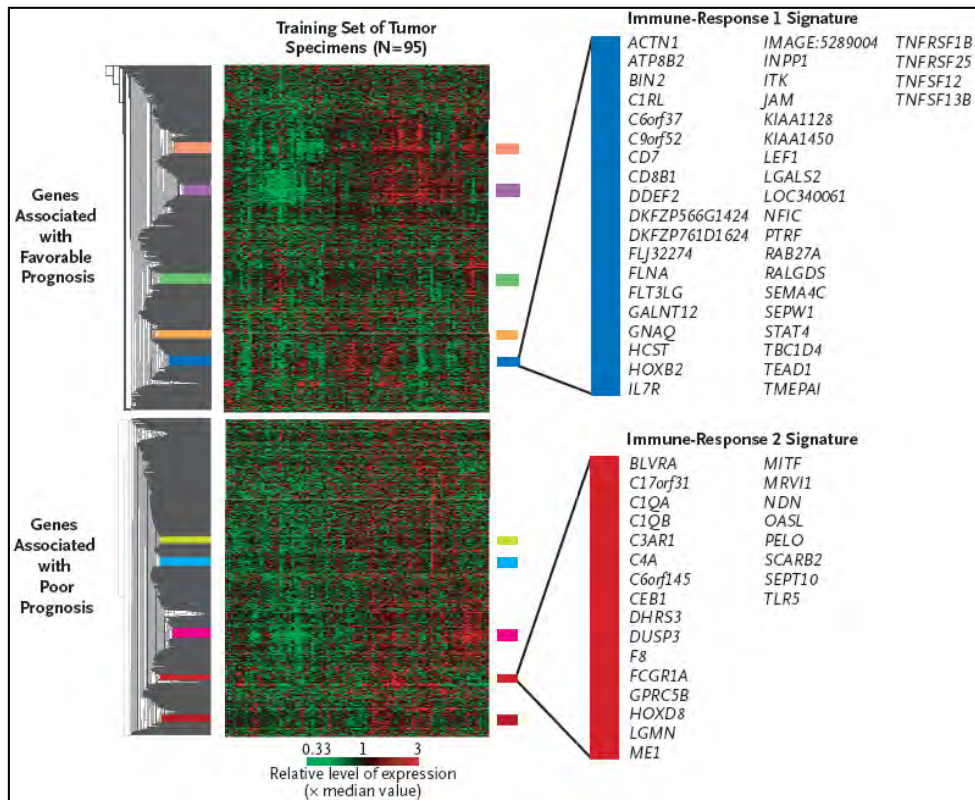


Figure 13: Prédiction de la survie dans le lymphome folliculaire en fonction des signatures géniques du micro-environnement cellulaire.

Deux signatures géniques ont été identifiées: la première « *Immune-Response 1* » est associée à un pronostic favorable. La 2^{ème} « *Immune-Response 2* » est associée à un mauvais pronostic (66).

L'IR1 est une signature de bon pronostic et comporte des gènes exprimés par les cellules T et certains macrophages. L'IR2 est, quant à elle, associée à un mauvais pronostic et comporte des gènes préférentiellement exprimés par des macrophages et les DCs (66).

a) Composition du micro-environnement et progression tumorale

L'importance du micro-environnement dans le LF est confirmée par le fait que les cellules de LF sont très difficiles à cultiver *in vitro* en absence de cellules stromales ou de stimulation du récepteur CD40, voie de signalisation principale entre les cellules B et les cellules T. Dès les années 1990, avec la standardisation de l'immuno-histochimie, les pathologistes ont montré que les cellules T non malignes représentaient une grande partie du volume tumoral. Leur infiltration représente environ 50% de la masse cellulaire (67).

Les interactions entre les cellules tumorales et le micro-environnement sont bidirectionnelles et vont participer activement au développement du LF. Outre l'accumulation d'accidents génétiques dans la cellule B tumorale, la pathogenèse du LF va s'accompagner de modifications progressives du micro-environnement tant dans sa composition que dans son organisation. Il se compose de différents acteurs cellulaires tels que des cellules T *Helper* (CD4), des cellules *Helper* folliculaires (PD-1), des cellules T cytotoxiques (CD8), des cellules T régulatrices (FOXP3), des macrophages (CD68) ou encore des cellules dendritiques folliculaires (CDF) (CD21, CD23, CD35). La nature cellulaire des acteurs du micro-environnement peut aussi avoir un rôle de facteur pronostic. En effet, un nombre élevé de macrophages est associé à un mauvais pronostic alors qu'un grand nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est un facteur de bon pronostic (67).

Ce micro-environnement présente une double compétence. D'un côté, il est capable de promouvoir la croissance tumorale. Et d'autre part, il va inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale (Figure 14).

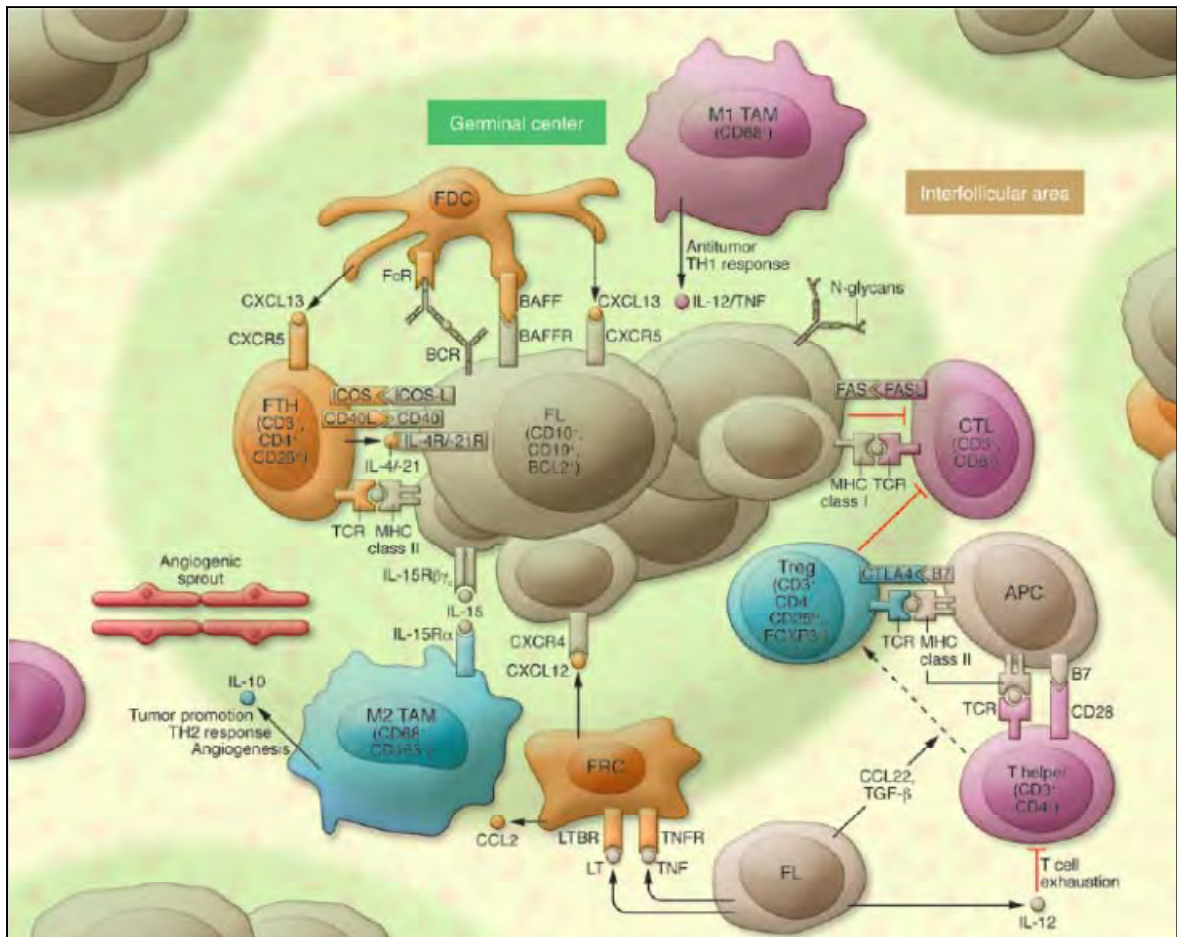


Figure 14: Micro-environnement du lymphome folliculaire.

Les cellules tumorales sont soutenues par plusieurs acteurs cellulaires (en orange) qui vont leur fournir des signaux de survie et de croissance. Elles sont capables de détourner les réactions immunitaires anti-tumorales venant des cellules T *Helper*, des macrophages ou encore des cellules cytotoxiques (en violet). Pour détourner la réponse anti-tumorale, les cellules de LF sont aidées des macrophages M2 et des lymphocytes T régulateurs (en bleu) qui ont un rôle immunosuppresseur. Tous ces acteurs cellulaires vont coopérer afin de promouvoir le développement tumoral (51).

Les deux acteurs cellulaires principaux qui vont participer à la progression tumorale sont les CDFs et les macrophages dits « associés aux tumeurs » (TAM). Mais les autres cellules peuvent également y participer. Par exemple, les lymphocytes T vont interagir avec les cellules B *via* CTLA4 ou CD40L et vont ainsi favoriser la prolifération des cellules de LF (15).

Les CDFs sécrétant de forts taux de CXCL13 vont attirer les cellules de LF, qui elles, expriment CXCR4 et CXCR5, dans les follicules (68). De plus, les CDFs vont également présenter l'antigène aux cellules de LF contribuant ainsi à activer la signalisation du BCR. Cette activation du BCR peut également se faire *via* des interactions entre les motifs de N-glycosylation et les lectines présentes sur les cellules du système immunitaire inné (69).

Les cellules du micro-environnement, grâce à l'expression de nombreuses molécules d'adhésion et à la production de cytokines et de facteurs de croissance vont promouvoir la prolifération des cellules de LF. Les CDFs expriment les molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM1 qui vont interagir avec LFA-1 et VLA-4 qui sont présentes sur les cellules de LF. Ces interactions vont générer des signaux prolifératifs et de survie pour les cellules tumorales. Les CDFs fournissent des molécules stimulatrices telles que l'IL-15, BAFF (*B-cell Activating Factor belonging the TNF family*) ou le HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) qui jouent un rôle dans l'expansion des cellules B dans le CG.

A l'inverse, les cellules B tumorales vont également influencer sur le développement des cellules stromales en sécrétant du TNF et des lymphotoxines α et β . Ces molécules sont cruciales quant au développement des CDFs (15).

Les macrophages ont tout d'abord été décrits comme des cellules détruisant les cellules tumorales (70) mais il s'avère que leurs fonctions sont détournées dans de très nombreux cancers (71). Dans le LF, l'équipe de Gascoyne a montré que les macrophages intra-tumoraux CD68⁺ dits LAMs (*Lymphoma-associated macrophages*) sont associés à un facteur de mauvais pronostic (72).

Les TAMs peuvent être de deux types: classiques M1 ou alternatifs M2. Sur les sites tumoraux, on retrouve principalement des TAMs de type M2. Les TAMs de type M1 ont plutôt un rôle anti-inflammatoire et anti-tumoral contrairement aux TAMs de type M2. En effet, les TAMs de type M2 favorisent la progression tumorale *via* la production de cytokines et de facteurs de croissance. Ils sont également pro-angiogéniques et immunosuppresseurs *via* la production de TGF- β (*Tumor Growth Factor β*) (73) (74).

Dans ce contexte là, les macrophages ont donc un rôle pro-tumoral. Mais il s'avère que leur rôle dans l'élimination ou la protection des tumeurs a longtemps été controversé. La difficulté à leur attribuer un rôle vient de leur grande plasticité et de leurs capacités à présenter des phénotypes variables selon leur type d'activation (75).

Parmi les cellules du micro-environnement, on trouve également deux types de cellules T régulatrices infiltrantes: les cellules FOXP3⁺ et celles PD-1⁺. Dans le cadre du LF, leur présence en grande quantité est associée à un bon pronostic avec une meilleure survie globale (76, 77). Pourtant, des études menées dans les LNHs de type B, ont montré que les cellules T régulatrices FOXP3⁺ étaient plutôt immunosuppressives. En effet, celles-ci sont capables d'inhiber la prolifération et la production de cytokines (IFN- γ et IL-4) des lymphocytes T

CD4⁺ (78). Les cellules FOXP3⁺ ont également la capacité d'inhiber la prolifération des cellules CD8⁺ cytotoxiques (CTL), et d'inhiber leur expression de perforine (PFN) et granzyme B (GZB). L'activité effectrice des CTLs est inhibée par les cellules FOXP3⁺ dans les LNHs (79).

D'autres acteurs cellulaires peuvent s'inviter au sein du micro-environnement pour perturber l'équilibre tumoral et tenter de détruire les cellules du LF.

b) Cellules immunitaires du micro-environnement et immunosurveillance

Depuis le milieu du siècle dernier, il existe de nombreuses évidences montrant que le système immunitaire est capable de reconnaître et de détruire les tumeurs (80). Des études sur les interactions entre le système immunitaire et les tumeurs ont révélé que toutes les cellules du système immunitaire (inné et adaptatif) pouvaient participer à la reconnaissance et au contrôle de la tumeur (Figure 15) (81).

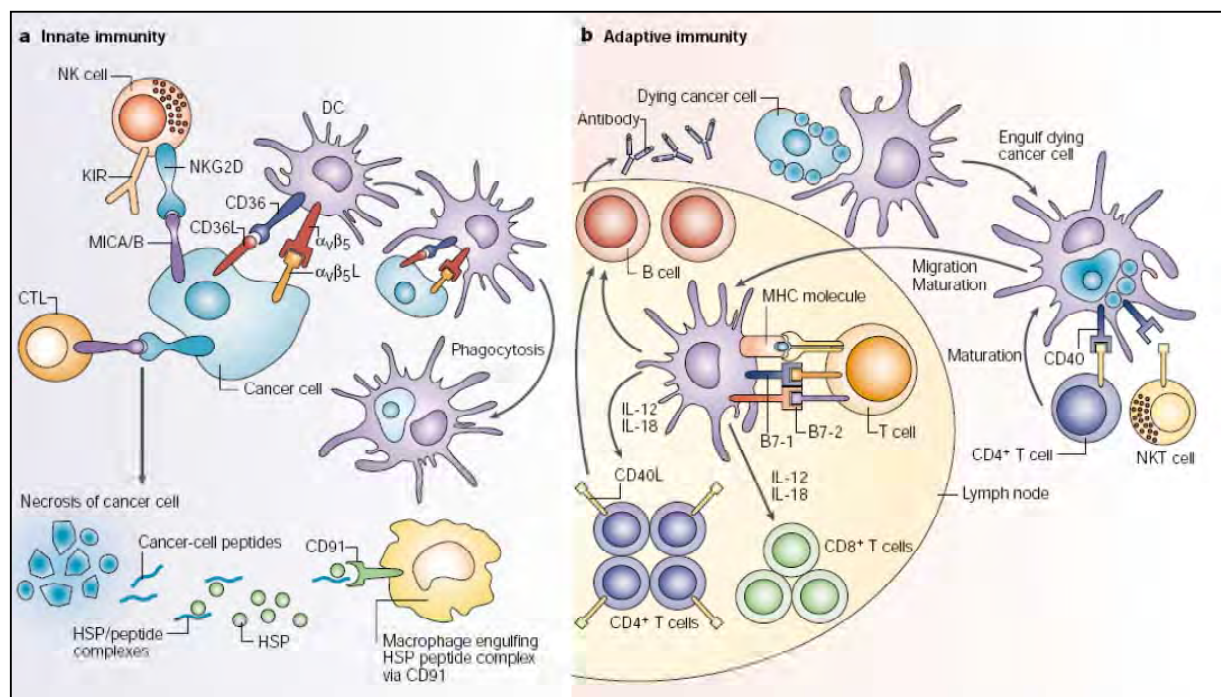


Figure 15: Reconnaissance de la tumeur par les cellules du système immunitaire.

a. Les cellules du système immunitaire inné (cellules NK, DC ou encore macrophages) reconnaissent les cellules tumorales *via* les PRRs (*Pattern-Recognition Receptors*) ou d'autres molécules de surface.
b. Les cellules du système immunitaire adaptatif (cellules NKT, lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ et les lymphocytes B) vont être activées pour reconnaître les cellules tumorales grâce aux DCs (81).

L'immunosurveillance est principalement assurée par les lymphocytes T $\alpha\beta$, les cellules NK et les cellules T $\gamma\delta$.

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ comprennent les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, chacun ayant un rôle bien défini. Les LT $CD8^+$ sont des cellules cytotoxiques alors que les LT $CD4^+$ participent à la régulation des fonctions lymphocytaires. Une étude menée par Whalin et ses collaborateurs a montré que dans le LF, un infiltrat de LT $CD4^+$ était associé à un mauvais pronostic contrairement à celui des LT $CD8^+$ qui est associé à un bon pronostic (82).

Les données concernant les LT $CD4^+$ sont complexes et parfois contradictoires. En effet, une étude plus ancienne a montré que les LT $CD4^+$ étaient associés à un bon pronostic dans le LF (83). Cependant, il est important de noter qu'il y a plusieurs sous-types de LT $CD4^+$: les LT *Helper* 1 et 2 (Th1 & Th2), les LT régulateurs ainsi que les LT folliculaires *Helper*. Comme décrit précédemment, les LT régulateurs ont une action pro-tumorale. En revanche, les lymphocytes Th1 vont sécréter de l'IL-2 et de l'IFN- γ (84). La sécrétion d'IFN- γ va favoriser la reconnaissance des cellules anormales par les CTLs en augmentant l'expression des molécules de CMH de classe I. En parallèle, *via* la sécrétion d'IL-2, ils vont induire le développement de T $CD8^+$ mémoires ce qui permettra une réponse secondaire complète (85).

Les CTLs sont des cellules capables de tuer une cellule contre laquelle elles ont été activées. On leur prête ainsi volontiers un rôle dans l'immunité anti-tumorale. Dès 1994, ces cellules ont été étudiées dans le cadre du LF. En effet, Leger-Ravet et ses collaborateurs ont montré la présence de CTLs activés en bordure des follicules (86). Quelques années plus tard, il s'est avéré que cet infiltrat de LT $CD8^+$ était un facteur de bon pronostic (82). Récemment, l'équipe de Valitutti s'est intéressée à cette population dans le LF. Ils ont ainsi montré que les LT $CD8^+$ situés en bordure de follicules, n'entraient pas dans les nodules et exprimaient le GZB. Ces CTLs forment des structures équivalentes aux synapses lytiques avec les cellules lymphomateuses. De plus, ces cellules semblent associées à une meilleure survie sans progression pour les patients ayant reçu un traitement R-CHOP (87).

Concernant les cellules NK, les données dans le cadre du LF sont peu nombreuses. Cependant, une étude menée par l'équipe de Nadkarni a montré qu'il y avait une infiltration de cellules NK et que ces dernières se positionnaient en bordure des follicules tumoraux (88). Les études concernant le rôle des cellules NK dans le LF doivent se poursuivre. En effet, il est une évidence aujourd'hui que les cellules NK font partie des acteurs cellulaires principaux dans l'immunosurveillance des tumeurs. L'activation des cellules NK est sous le contrôle de

récepteurs inhibiteurs. Ces derniers vont se lier aux molécules de CMH de classe I. Quand ces molécules de CMH de classe I manquent à l'appel, les cellules seront détruites par les cellules NK par un processus appelé « *missing-self recognition* ». Dans ces cas là, il y aura relargage de PFN et GZB entraînant la lyse de la cellule cible (89).

Enfin, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des LT non conventionnels qui ont la capacité de tuer les cellules cancéreuses. On en distingue deux grands types: les TCR V δ 1, que l'on trouve dans les tissus lymphoïdes ou épithéliaux, et les TCR V γ 9V δ 2 que l'on trouve dans le sang périphérique. Ils sont activés de manière CMH-indépendante par des métabolites non peptidiques: les phospho-antigènes. Cela leur confère un avantage par rapport aux LT $\alpha\beta$ car ils peuvent reconnaître des molécules exprimées sur les cellules tumorales sans la transformation des Ags ni leur présentation (90-92). Ils sont capables de migrer comme des lymphocytes infiltrants dans les tumeurs solides et peuvent éliminer *in vitro* des cellules malignes dont celles du LF (93). Une autre étude de l'équipe de Rossi, dans le cadre du LF, a montré la présence des T $\gamma\delta$ en bordure des follicules. Les T $\gamma\delta$ périphériques de ces patients pourraient être amplifiés *in vitro* et être ré-utilisés par transfert adoptif. Cette stratégie est une possibilité d'immunothérapie adoptive, à condition que les T $\gamma\delta$ retournent au follicule tumoral (94). Les données sont encore peu nombreuses concernant l'aspect fonctionnel de l'implication des T $\gamma\delta$ dans l'immunosurveillance du LF mais il semblerait que cette population lymphocytaire ait un rôle important.

c) Echappement immunitaire

Si le système immunitaire ne rencontrait aucun obstacle, il pourrait détruire les tumeurs. Cependant, les cellules tumorales elles-mêmes et l'aide apportée par leur micro-environnement jouent également un rôle immunosuppresseur. Ainsi, la balance entre système immunitaire et tumeur détermine l'équilibre ou l'échappement tumoral (Figure 16) (80).

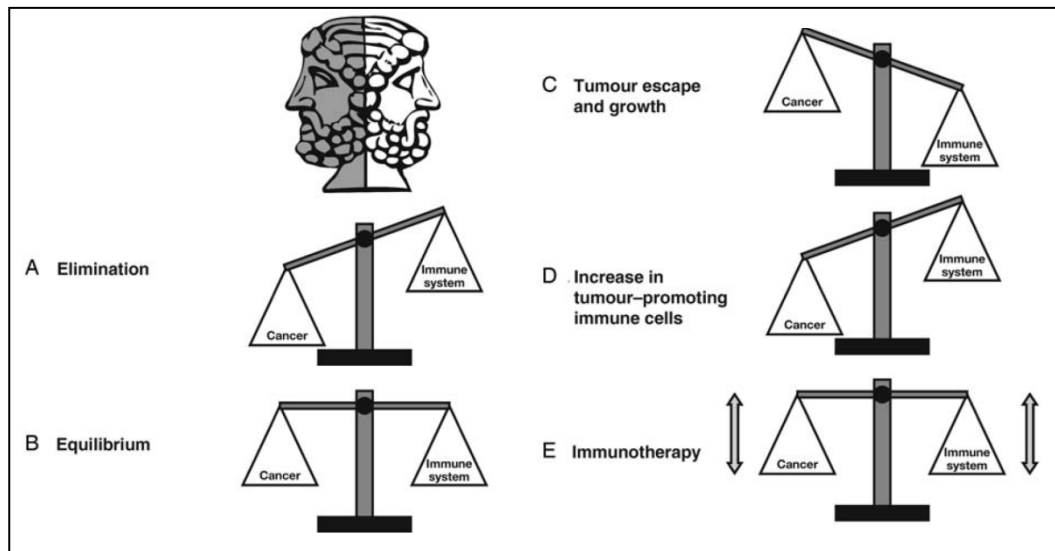


Figure 16: Balance entre le système immunitaire et la tumeur.

A. Le système immunitaire détruit totalement la tumeur, il y a élimination. **B.** Le système immunitaire n'est pas capable d'éliminer entièrement la tumeur, on atteint un état d'équilibre. **C.** L'état d'équilibre est rompu si les cellules tumorales contournent le système immunitaire. **D.** L'infiltration des cellules immunitaires dans la tumeur induit une inflammation chronique. **E.** L'immunothérapie stimule le système immunitaire contre la tumeur pour contrecarrer la balance (80).

Les cellules tumorales sont capables de mettre en place un grand nombre de stratégies visant à détourner le système immunitaire afin d'échapper aux réponses anti-tumorales de l'hôte.

Un des moyens de détourner le système immunitaire est la modulation de l'expression des molécules de CMH de classe I. Ces molécules vont permettre la reconnaissance des cellules cibles par les CTLs. La diminution de l'expression de ces molécules, due à des mutations de la $\beta 2$ -microglobuline, a été décrite dans le mélanome comme favorisant la progression tumorale (95). Concernant cette stratégie d'immuno-échappement dans les LNHs, peu de données existent. L'équipe de Kluin a montré la présence de ce défaut d'expression dans certains sous-types de DLBCL (96). Ces résultats ont été confirmés par une étude récente, suggérant même des expressions aberrantes de ces molécules (97). De manière surprenante, des travaux menés dans notre équipe ont montré un phénomène inverse. En effet, des cellules stromales du cancer ovarien sont capables d'acquérir par trogocytose des molécules de CMH de classe I, se protégeant ainsi de la lyse médiée par les lymphocytes T $\gamma\delta$ (ce qui peut être étendu aux cellules NK) (Annexe 1) (98). Mais ces études doivent être approfondies afin d'en découvrir le mécanisme et de l'étendre à d'autres types de cancer.

Les cellules tumorales disposent d'autres stratégies pour résister à la cytotoxicité des cellules immunitaires. On peut notamment citer une étude menée par Ramsay et ses collaborateurs dans le cadre du LF et du DLBCL. Ils montrent ainsi des dysfonctionnements de la synapse immunologique entre les lymphocytes T et les cellules du lymphome empêchant les interactions nécessaires à la cytotoxicité de ces lymphocytes. Ces dysfonctionnements sont dus à un défaut de recrutement des protéines du cytosquelette (entre autres l'actine, LFA-1 ou la filamine) au niveau du site synaptique (99). Une étude publiée en 2000 montre également un défaut de fixation de la PFN sur les cellules leucémiques (100). Cette stratégie impacte à la fois les CTLs, les cellules NK ou encore les T $\gamma\delta$ qui agissent *via* PFN et GZB.

Les cellules impliquées dans l'immunosurveillance sont la « bête noire » des cellules tumorales qui essaient par tous les moyens de les évincer. En se restreignant aux études portant sur les LNHs et plus précisément sur le LF, il apparaît que les cellules lymphomateuses peuvent détourner le système immunitaire à leur profit. En effet, Ai et ses collaborateurs ont montré que les cellules B issues de patients atteints de LF étaient capables d'induire la conversion de LT CD4⁺ en Treg FOXP3⁺, cellules qui jouent un rôle pro-tumoral. Le mécanisme reste encore peu connu mais la stimulation du TCR par les antigènes associés aux tumeurs semble être associée à cette conversion (101).

Les lymphocytes T ou les cellules NK peuvent aussi induire la mort de la cellule cible par le système Fas/Fas-L. Là encore, les cellules tumorales ont développé des stratégies pour contourner ce processus. On trouve par exemple des mutations de Fas, une diminution de l'expression de Fas ou encore la sécrétion de Fas-L soluble qui induira la mort des cellules cytotoxiques (102). Ce dysfonctionnement du système Fas/Fas-L a également été observé avec des cellules de LF. En effet, ces dernières sont résistantes à l'apoptose médiée par Fas et se protègent donc du contrôle effectué par les LT CD4⁺ et d'une partie de l'action anti-tumorale des cellules cytotoxiques. Le mécanisme conférant cette résistance aux cellules tumorales reste peu connu, mais il semblerait que la surexpression de protéines antiapoptotiques (Bcl-2 ou Bcl-xL) et une activation constitutive du BCR participent à ce phénomène (103).

Les cellules tumorales sont donc capables de se protéger des cellules immunitaires mais elles peuvent aussi agir en offensive. Par exemple, les cellules B de LF en sécrétant de l'interleukine 12 (IL-12), vont anergiser les CTL se trouvant sur le site tumoral. La présence

de cette cytokine en quantité importante dans le sérum des patients est un facteur de mauvais pronostic (104).

Une autre stratégie d'immuno-échappement consiste à inhiber la phagocytose. Pour cela, les cellules tumorales surexpriment la protéine CD47 à leur surface. Le CD47 est une protéine associée aux intégrines qui interagit avec SIRP α (*Signal-Regulatory Protein α*) (105). Cette interaction CD47-SIRP α induit des signaux négatifs *via* des phosphatases aux cellules exprimant SIRP α (106). Les macrophages étant des cellules exprimant SIRP α , cette protéine va conduire à l'inhibition de la phagocytose (107). Les cellules tumorales quant à elles, vont surexprimer la protéine CD47 et ainsi se protéger de la phagocytose par les macrophages (Figure 17).

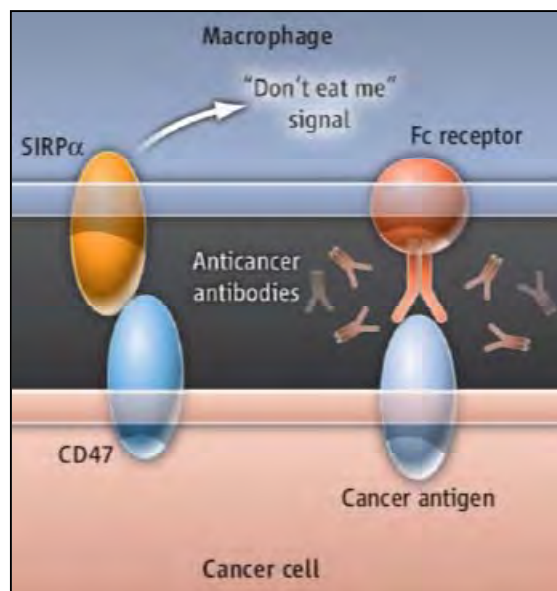


Figure 17: Inhibition de la phagocytose *via* l'expression de CD47 par les cellules tumorales.

La liaison du CD47 à SIRP α envoie un message de « *don't eat me* » aux macrophages (108).

Cette stratégie est appliquée dans les LNHs et des AcMo bloquants anti-CD47 ont été développés et sont aujourd'hui l'objet d'études cliniques (109).

d) *Micro-environnement et transformation du LF*

Le micro-environnement tumoral participe également à la transformation du LF (Figure 18).

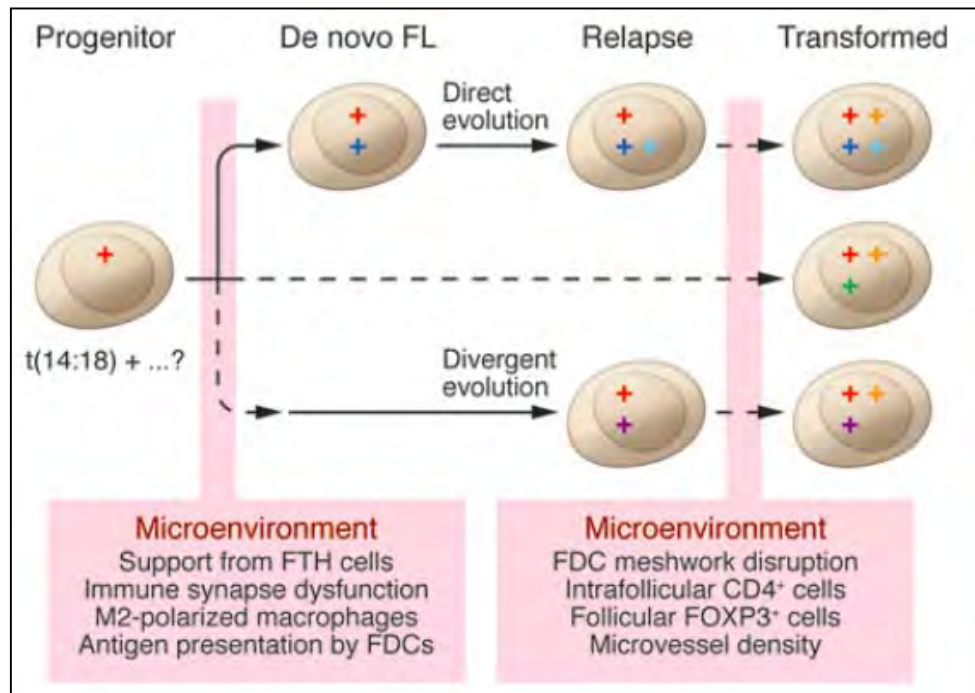


Figure 18: Modèle impliquant le micro-environnement dans la transformation du LF.

Liste non exhaustive des rôles du micro-environnement dans la transformation du LF(51).

La pathogénèse du LF s'accompagne de modifications progressives du micro-environnement tumoral tant dans sa composition que dans son organisation (110). Plus de 60% des gènes qui discriminent le LF et ses formes transformées sont impliqués dans la réponse immunitaire et les processus inflammatoires. Ainsi, Glas et ses collaborateurs ont montré qu'il y avait une augmentation des T CD4⁺ intrafolliculaires ainsi que des perturbations dans l'organisation des CDFs (111). L'équipe de K. Tarte s'est intéressée aux cellules T CD4⁺ et a montré que parmi ces cellules il y avait une grande proportion de LT folliculaires *Helper* (T_{FH}). Les T_{FH} du LF sécrètent des facteurs de croissance pour les cellules B (IL-2, IL-4) qui favorisent la croissance et la survie des cellules B tumorales. Ces T_{FH} vont participer au développement du LF et à sa transformation en lymphome agressif (112).

Parmi les cellules T CD4⁺ on trouve les Treg (CD4⁺/FOXP3⁺). Une étude menée par l'équipe de Gascoyne sur des biopsies de patients atteints de LF a montré une corrélation entre l'organisation et la distribution des Treg et le risque de transformation du LF (113).

D'autres travaux menés par cette même équipe ont mis en évidence l'implication de l'angiogenèse dans la transformation du LF. En effet, une augmentation de la densité vasculaire intra-tumorale, corrélée à l'augmentation des LAMs, est un marqueur de mauvais pronostic et promeut la transformation du LF (114). Une étude menée dans notre équipe a également montré que l'angiogenèse participait à la progression du LF. Ce phénomène serait dû à une augmentation des taux de VEGF (*Vascular endothelial Growth Factor*) et de MMP9 médiée par la protéine Syk (115).

7- Traitements

Comment traiter les patients atteints de LF ? Répondre à cette question fût longtemps un véritable casse-tête. Quel comportement adopter face à un patient asymptomatique ? Quelle stratégie mettre en place pour augmenter la durée de vie des patients traités ? Et bien d'autres questions que chercheurs et médecins se sont posées durant des décennies afin d'améliorer les résultats thérapeutiques. C'est en 1984 que naît l'association GELA (Groupe d'Etude du Lymphome de l'Adulte) regroupant médecins et biologistes dans le but d'optimiser les efforts de la recherche fondamentale et clinique. Après l'association avec le groupe GOELAMS (Groupe Ouest-Est d'Etude des Leucémies Aiguës et autres Maladies du Sang) en 2012, un nouveau groupe recherche est créé: le LYSA (LYmphoma Study Association). En France, cette association, grâce au développement de nombreux essais thérapeutiques, a permis des avancées considérables dans les stratégies de traitements des patients atteints de LF.

Dans cette partie, seront présentées de manière non exhaustive plusieurs stratégies thérapeutiques qui ont été mises en place pour le traitement des patients atteints de LF.

a) Standards thérapeutiques: des décennies d'énigme

Durant les 40 dernières années, les études portant sur les traitements des LF ont été controversées. Les modalités de prise en charge thérapeutique du LF dépendent notamment du stade d'évolution et des facteurs de risque de progression qui ont été évalués lors du bilan. De nombreux patients peuvent vivre en bonne santé plusieurs années après le diagnostic même s'ils ne reçoivent pas de traitement immédiatement. Une étude rétrospective d'Advani et ses collaborateurs a montré que pour des patients atteints de LF de stade I ou II sans traitement initial, la survie était comparable à celle des patients traités (116). Pour les patients asymptomatiques avec une progression lente, la stratégie « *wait and watch* » est recommandée (117). Dès l'apparition des symptômes, une radiothérapie localisée dite « *involved field* » est préconisée. Elle permet une rémission de 50% pour les LF de stade I et de 25% pour les stades II (118). Pour les patients diagnostiqués à des stades précoces (I ou II), cette radiothérapie représente un traitement de référence. Celle-ci a prouvé son efficacité en terme de survie sans récurrence avec une médiane de survie atteignant 19 ans (119).

Malheureusement, seulement une minorité des patients est diagnostiquée à un stade précoce de la maladie. En effet, dans la plupart des cas, les patients présentent un stade avancé. Dans ces cas là, la prise en charge est variable et dépend de l'état général du patient et du stade de la pathologie. Par le passé, seules la chimiothérapie et la radiothérapie étaient disponibles pour les patients symptomatiques. L'agent chimio-thérapeutique le plus utilisé était la prednisone, un corticostéroïde. Mais les résultats obtenus n'étaient pas ceux attendus. Des combinaisons de chimiothérapie ont donc fait leur apparition: CVP (Cyclophosphamide + Vincristine + Prednisone), MCP (Mitotranxone + Chlorambucil + Prednisone), pour obtenir, en 1976, une polychimiothérapie qui restera le traitement de référence. Cette polychimiothérapie aujourd'hui bien connue est l'association de quatre agents : Cyclophosphamide + Hydroxydaunomycine + Oncovine + Prednisone = CHOP (120). Cette chimiothérapie CHOP a fortement augmenté le taux de réponse des patients mais n'a pas réellement amélioré leur survie. C'est pourquoi de nombreux essais thérapeutiques, menés notamment par l'association GELA, ont comparé différentes associations ou agents pour trouver une stratégie de traitement alliant efficacité anti-tumorale et amélioration de la survie. L'administration combinée ou seule d'interféron alpha (IFN α) (121) ou encore des comparaisons avec des molécules telles que la fludarabine (122) ont été étudiées chez des patients présentant un stade avancé du LF. Mais ces différentes options n'ont pas permis

d'augmenter la survie des patients. L'apparition de nouvelles stratégies telle que la transplantation de cellules souches autologues (TCSA) ou l'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcMo) a révolutionné le traitement des LF.

C'est en 1987 que la première étude impliquant la TCSA est apparue. Cette étude a montré un avenir prometteur de la TCSA associée à la chimiothérapie chez des patients atteints de LHN en rechute (123). Aujourd'hui encore, la TCSA couplée à de hautes doses de chimiothérapie fait ses preuves en terme de survie et de réponse durable avec 79% de survie globale à 10 ans et 57% de survie sans progression (124). Malgré tout, elle reste controversée quant aux complications qu'elle peut engendrer, notamment le développement de tumeurs solides (125).

L'immunothérapie par utilisation d'AcMo a réellement été une approche révolutionnaire dans le traitement du LF. L'arrivée du Rituximab (Mabthera[®], anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le CD20, RTX) a apporté des résultats plus qu'encourageants chez les patients atteints de LF. D'abord utilisé seul, les premiers résultats n'étaient pas spectaculaires: pas de rémission complète et seulement 27% de réponse partielle (126). Par contre, une fois associé à la polychimiothérapie CHOP, les résultats ont été plus probants: chez des patients atteints de LF de bas grade 95% de réponse globale avec 55% de réponse complète. De plus, la conversion de cellules BCL-2⁺ en BCL-2⁻ chez ces patients donne des espoirs quant à l'éradication de la maladie résiduelle (127).

Les anticorps monoclonaux et principalement ceux dirigés contre le CD20 seront étudiés plus en détails dans le chapitre suivant.

b) Nouvelles approches

D'autres champs d'investigation ont été explorés comme par exemple la vaccination idiotypique. L'idiotype (Id) est un épitope de la partie variable de l'Ig qui est spécifique d'un clone. L'Id des Igs retrouvées à la surface des LB est donc clone-spécifique et lors d'une transformation maligne des cellules B, cet antigène deviendra tumeur-spécifique. Le caractère « tumeur-spécifique » de cet antigène en fait ainsi une cible intéressante pour la vaccination thérapeutique (128). La première étude réalisée dans ce domaine a été menée par l'équipe de

Ronald Lévy. Ils ont utilisé des anticorps anti-Id chez des patients atteints de LNH et ont observé des cas de régression tumorale durable (129). Cependant, l'efficacité biologique de cette vaccination (induction d'une réponse immunitaire spécifique) n'aboutit pas nécessairement à une efficacité clinique (induction d'effets anti-tumoraux). L'ensemble des essais thérapeutiques utilisant la vaccination idiotypique n'a montré que très peu d'effets bénéfiques. Cela est sûrement dû au fait que les Ids sont spécifiques de chaque patient (128). Cette approche représente en fait une thérapie personnalisée qui requiert une production sur mesure, ce qui reste très difficile à mettre en place. Mais les études continuent afin d'optimiser cette stratégie thérapeutique comme le prouve la publication récente de résultats encourageants obtenus lors de la phase III d'une étude clinique. Lors de cette étude, l'injection vaccinale associée à une protéine vecteur KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) a permis d'augmenter la survie sans récurrence des patients atteints de LF et de minimiser la maladie résiduelle (130).

D'autres traitements biologiques ont fait ou font l'objet d'études cliniques. La bendamustine, agent alkylant, a donné de très bons résultats en phase II. En effet, elle est assez bien tolérée chez les patients et a démontré des effets très positifs et durables dans les cas de LF résistants avec 77% de réponse globale dont 15% de réponse complète (131). Une autre molécule a fait ses preuves en phase II, il s'agit du bortézomib (Velcade[®]), un inhibiteur du protéasome. Le système ubiquitine-protéasome est un système très conservé permettant la régulation de nombreux processus biologiques (tels que le renouvellement protéique ou encore la réparation de l'ADN). La survie des cellules tumorales est dépendante de la fonctionnalité de ce système et il est maintenant admis que le système ubiquitine-protéasome est impliqué dans la progression tumorale (132). L'inhibition du protéasome représente une nouvelle approche dans le traitement de nombreuses formes de cancers et notamment les hémopathies (133). Les résultats récents publiés par l'association GELA sont très encourageants pour le traitement du LF (134) et confirment ceux observés par O'Connor et ses collaborateurs (135).

Le BCR étant fortement impliqué dans la lymphomagenèse (cf. § II-6), de nombreux inhibiteurs de la signalisation du BCR ont été étudiés et font l'objet d'intenses études pré-cliniques et cliniques dans le cadre du LF. Parmi ces molécules, on trouve l'inhibiteur de Syk (fostanatinib), l'inhibiteur de Btk (ibrutinib ou PCI-32765, actuellement en essai clinique (136) ou encore celui de PKC (*Protein Kinase C*) (enzastaurine). Les lésions génétiques du LF peuvent également être utilisées comme cible thérapeutique. Par exemple, Bcl-2 est une

cible de choix pour le LF et les drogues qui miment le domaine BH3 (*BCL-2 Homology 3*) agissent comme des inhibiteurs de Bcl-2. Parmi ces drogues, on trouve l’obatoxax, le navitolax (ABT263) ou encore l’ABT199. Les deux dernières drogues sont actuellement en développement clinique pour le LF (137). Ces nouvelles molécules sont nombreuses et laissent espérer un avenir thérapeutique positif (Table 2).

Simplified summary of the current and emerging treatment options for follicular lymphoma		
Current treatments	Chemotherapy and antibody combinations (e.g. CHOP + rituximab).	
New therapies	Signaling	Ibrutinib, Cal-101
		EPHA7-hCD20
	Apoptosis	ABT-737, ABT-199
		Obatoxax
	Cell cycle	PD-0332991
	Epigenetics	EZH2 inhibitors (GSK126, EI-1, EPZ005687)
	Immunotherapy	Anti-CTLA4
		Anti-PD-1L
		CAR-anti-CD19

Table 2: Tableau regroupant des nouvelles molécules en cours d’étude clinique dans le LF.

Nouvelles molécules thérapeutiques pour le LF (137).

Les AcMo dirigés contre des antigènes associés aux cellules B sont de plus en plus nombreux à être testés. La plupart sont actuellement en cours d’études cliniques afin d’évaluer leurs efficacités en monothérapie ou en association avec les traitements actuels. On trouve l’anti-CD80 (galiximab), l’anti-CD40 (HCD122) ou encore l’anti-CD22 (épratuzumab) (36). Ce dernier a également été testé en association avec le RTX portant le taux de réponse globale à 84% (138). Ces résultats encourageants ont conduit Gupta et ses collaborateurs à réaliser des AcMo humanisés hexavalents bispécifiques: anti-CD20/anti-CD22. Ces AcMo montrent des effets anti-lymphomateux *in vitro* avec notamment une forte cytotoxicité vis-à-vis des lignées cellulaires de lymphome (139).

Aux vues de l’importance du micro-environnement dans cette pathologie, les acteurs cellulaires qui le composent représentent également une cible thérapeutique intéressante. Ainsi, des AcMo visant à activer la réaction immunitaire anti-tumorale ont été développés (Table 3).

Antibodies targeting molecules expressed by immune cells					
Target	Generic antibody name (trade name; sponsoring companies)	Target expression	Target function	Agonist or antagonist	Effect of antibody treatment in preclinical studies
CD40	Dacetuzumab (SGN-40; Seattle Genetics) and CP-870893 (Pfizer)	DCs, B cells, monocytes and macrophages	Promotes DC maturation, germinal center formation, Ig-isotype switching and affinity maturation	Agonist	Apoptosis in some tumours and increased number of tumour-specific CD8 ⁺ T cells ³³
CTLA4	Tremelimumab (CP-675,206; Pfizer) and ipilimumab (MDX-010; Bristol-Myers Squibb/Medarex)	Activated T cells	Inhibition of T cell proliferation	Antagonist	Tumour rejection, protection from rechallenge ³⁶ ; enhanced tumour-specific T cell responses ³⁷
OX40	OX86	Activated mouse T cells	T cell proliferation and maintenance of memory T cells	Agonist	Increase in antigen-specific CD8 ⁺ T cells at the tumour site; fewer MDSCs and T _{Reg} cells and decreased levels of TGFβ; enhanced tumour rejection ¹¹⁴
PD1	CT-011 (Cure Tech)	Activated lymphocytes	Negative regulator of lymphocyte proliferation and cytokine production	Antagonist	Maintenance and expansion of tumour specific memory T cells populations and NK cell activation ¹¹⁵
CD137	BMS-663513 (Bristol-Myers Squibb) ¹¹⁶	Activated T cells, T _{Reg} cells, NK cells, NKT cells, DCs, neutrophils and monocytes ¹¹⁷	Promotes expansion of T cell populations, CD8 ⁺ T cell survival, NK cells proliferation and IFNγ production	Agonist	Regression of established tumours, expansion and maintenance of CD8 ⁺ T cells ¹¹⁷
CD25	Daclizumab (Zenapax; Roche)	Activated T cells	IL-2Rα chain. Promotes T cell proliferation; highly expressed by T _{Reg} cells	Antagonist	Transient depletion of CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ T _{Reg} cells ⁴⁸ ; enhanced tumour regression and increased number of effector T cells ¹¹⁸

Table 3: AcMo existants ciblant les cellules du micro-environnement.

Tableau récapitulatif de plusieurs AcMo avec leur cible et leurs effets (140).

Prenons tout d'abord l'exemple de l'ipilimumab (MDX-010). Ce dernier est un anticorps antagoniste humain anti-CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*). Précédemment étudié dans les cancers du pancréas, de l'ovaire ou encore dans le mélanome, il est aujourd'hui en étude clinique chez des patients atteints de LNH (LF, DLBCL et lymphome du manteau). Cet AcMo cible la signalisation du CTLA-4 qui a été montrée comme augmentant l'activité des Treg. Bloquer cette voie grâce à l'ipilimumab permet d'augmenter les réponses des cellules T et d'accroître les réponses anti-tumorales (141). La récente approbation par la FDA (*Food and Drug Administration*) de l'ipilimumab pour le traitement du mélanome permet d'envisager des résultats encourageants quant à son utilisation thérapeutique dans le cadre des LNHs (142).

L'anticorps anti-PD1 (CT-011) est également un AcMo agoniste humanisé. Cet AcMo a montré plusieurs bénéfices cliniques chez 33% des patients atteints d'hémopathies (dont le LF) qui faisaient partie de l'étude. Il semble être bien toléré chez les patients et engendrer une réponse durable (143). Cet AcMo permet de cibler les interactions PD1/PDL-1 qui sont connues pour restreindre l'action des CTLs (144). Une étude clinique, actuellement de phase II, teste l'association RTX - CT-011 chez des patients atteints de LF en rechute (NCT00904722) (145).

Un dernier exemple est celui du CD137 ou 4-1BB. Cette protéine appartient à la famille des récepteurs au TNF (*Tumor Necrosis Factor*) exprimés principalement sur les cellules T activées ou encore les cellules NK. Une fois lié à son ligand (4-1BBL), exprimé par les CD8, les LB ou encore les macrophages, le CD137 entraîne la surexpression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 protégeant ainsi les cellules tumorales. Par contre, il a été montré que la liaison d'un Ac agoniste sur 4-1BB engendrait une régression tumorale *via* l'activité des CTLs ou des cellules NK. Il a également été montré que cette liaison empêchait la conversion des T CD4⁺ en Treg. Plusieurs essais cliniques ont étudié le rôle d'Ac anti-4-1BB chez les patients dont un dans le cadre des LNHs (146). Dans cet essai, un AcMo humanisé anti-4-1BB (PF-05082566) est injecté seul ou en combinaison avec le RTX (NCT01307267) (145, 147).

Ainsi, les AcMo sont un outil de thérapie très intéressant dont les cibles possibles sont très nombreuses.

Dans le chapitre suivant, je développerai plus en détails l'utilisation des anticorps monoclonaux. Je porterai une attention particulière aux anticorps monoclonaux anti-CD20 qui ont révolutionné le traitement des LF et qui sont l'objet de mon projet de thèse.

III- LES ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-CD20 : DES NOUVELLES ARMES DANS LA GUERRE CONTRE LE CANCER

Aider le patient à combattre lui-même son cancer: Rêve ou Réalité?

Activer le système immunitaire contre les tumeurs a longtemps été un objectif commun pour la recherche en immunologie et cancérologie. Après des dizaines d'années de déceptions, les succès d'études cliniques ont commencé à apparaître. Dans un contexte où la compréhension des mécanismes de la réponse immunitaire anti-tumorale ne cesse de progresser, l'immunothérapie représente un réel moyen d'obtenir des réponses durables chez les patients atteints de cancer (148).

1- Utilisation des anticorps monoclonaux: de la sérothérapie du XIX^{ème} siècle au « Mab business » du XXI^{ème} siècle

Si les AcMo apparaissent aujourd'hui comme une formidable avancée thérapeutique, ils sont l'aboutissement d'un long processus et sont le résultat de plus d'un siècle de succès en thérapie ciblée (Figure 19) (149).

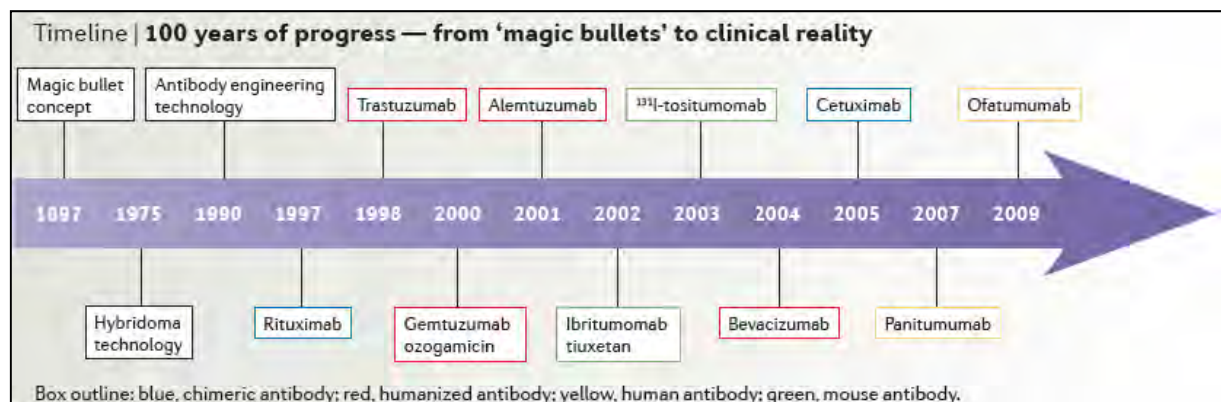


Figure 19: Fresque regroupant les progrès conduisant aux AcMo.

En bleu: Ac chimérique (-ximab), en rouge: Ac humanisé (-zumab), en jaune: Ac humain (-mumab), en vert: Ac murin (-momab) (140).

On doit la naissance de la sérothérapie à Emil von Behring dans les années 1890 avec le sérum antidiphtérique. Mais, pour pouvoir travailler à l'échelle humaine, il est nécessaire de disposer de quantités suffisantes de sérum. Quelques années plus tard, ils décidèrent

d'immuniser des chevaux et d'utiliser ce sérum équin pour réaliser les premières expériences cliniques. Les résultats obtenus sur des enfants atteints de diphtérie traités avec ce sérum furent spectaculaires (150), la sérothérapie était lancée. L'utilisation de la sérothérapie fut rapidement transposée au traitement des envenimations ou intoxications. Ce n'est qu'à la veille de la Seconde Guerre mondiale que la présence des Ac dans le sérum fut démontrée, initiant ainsi les études biochimiques de l'après guerre. Dans les années 1950, les techniques de protéolyse ménagée par la papaïne et la pepsine permirent d'obtenir la première structure de l'IgG. S'en sont suivies des applications cliniques car, sans la partie constante, les fragments d'Ig d'origine animale étaient beaucoup mieux tolérés. A partir des années 1960, il devint possible de disposer d'Ig humaines dont la demi-vie est plus longue que les Ig équines (151). Malgré leur coût plus élevé que les Ig équines, les Ig humaines s'imposèrent largement.

L'avènement des AcMo a été permis grâce à la fabrication d'hybridomes. Ces hybridomes résultent de la fusion de LB normaux murins avec des cellules de myélome multiple. Les cellules obtenues héritent de deux propriétés: l'« immortalité » des cellules de myélome et la capacité à fabriquer des Ac des LB. Ainsi, en 1975, César Milstein et Georges Kohler ont réalisés des hybridomes avec des LB de souris immunisées avec des globules rouges de mouton. Les cellules hybrides obtenues produisaient un AcMo dirigé contre les globules rouges de mouton (152).

Les AcMo étaient nés et de grands espoirs thérapeutiques en découlèrent.

Deux firmes pharmaceutiques, Centocor et Genentech, se lancèrent dans l'aventure des AcMo. Genentech fut particulièrement visionnaire et participa activement au succès de ces biomédicaments. Ce succès fut tout de même entaché de nombreuses déceptions notamment avec les équipes qui ont tenté de développer des AcMo anti-cytokines ou anti-facteurs de croissance.

Aux vues de « l'AcMo boom », le monde de la cancérologie s'y est fortement intéressé. L'utilisation des AcMo permettrait le ciblage spécifique des cellules tumorales *via* la fixation de l'Ac sur l'Ag de la cellule maligne. Outre la question de l'obtention d'Ac de haute affinité, le problème de l'utilisation d'Ac murins chez l'Homme se posa rapidement. En effet, cette utilisation induit l'apparition, chez le patient, d'Ac humains anti-Ac de souris Hama (*Human Anti-Mouse Antibody*) responsables de nombreux effets secondaires indésirables dus à la formation de complexes immuns. D'où la nécessité de générer des anticorps avec le moins de

fragments d'origine murine possible (153). Ainsi, l'ingénierie moléculaire a permis l'obtention d'Ac thérapeutiques chimériques, humanisés puis totalement humains (Figure 20) (154).

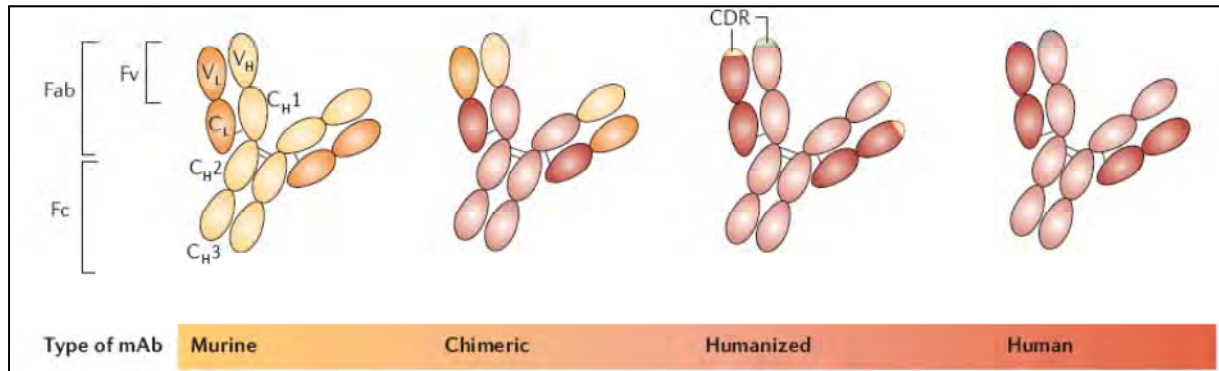


Figure 20: Générations successives d'AcMo thérapeutiques.

V_H & V_L: régions variables respectivement des chaînes lourdes et légères. C_H & C_L: régions constantes respectivement des chaînes lourdes et légères (155, 156).

Un véritable engouement s'est créé au fil des années autour de ces AcMo et les stratégies pour augmenter la puissance anti-tumorale des AcMo se sont multipliées. Des AcMo ayant une meilleure affinité, une immunogénicité réduite et des propriétés effectrices optimales ont été générés (155).

Dans le cadre des LNHS, l'arrivée des AcMo donne de nouveaux espoirs thérapeutiques. Leur utilisation a inversé la tendance de la courbe de mortalité des LNHS (Figure 21). Entre 1991 et 1997, la mortalité augmentait de 1,6% par an. Cependant, de 1997 à 2003, la mortalité s'est mise à décliner de 2,8% par an. Bien que durant ces années les thérapies ont continué à s'améliorer, c'est l'introduction du RTX qui est responsable de l'inversement des tendances (157).

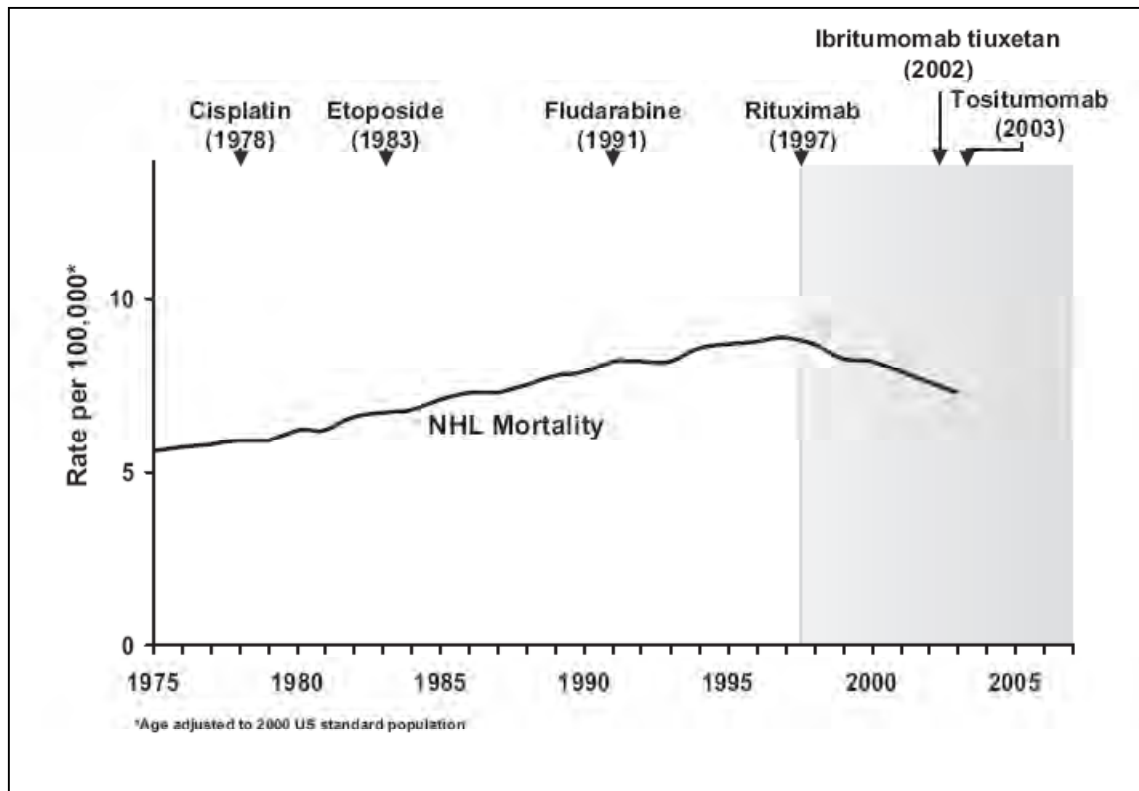


Figure 21: Evolution de la mortalité des patients atteints de LNHs et des nouveaux agents thérapeutiques disponibles aux Etats-Unis pour les LNHs.

Données obtenues grâce au programme américain SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) (157).

2- Le CD20: une cible de choix pour l'immunothérapie

Plusieurs études étaient en quête d'antigènes cibles pour traiter les hémopathies B (Figure 21). Un antigène est apparu comme pouvant représenter une cible de choix: le CD20. En effet, ce dernier n'est pas modulé (internalisation, décapage) et n'est pas internalisé après fixation de l'anticorps. Un premier anticorps dirigé contre le CD20, le 1F5, fut injecté à quatre patients atteints de lymphome. Le patient ayant reçu la plus forte dose a présenté peu d'effets secondaires et a eu une réduction de 90% de sa masse ganglionnaire (158).

Le règne du CD20 débuta.

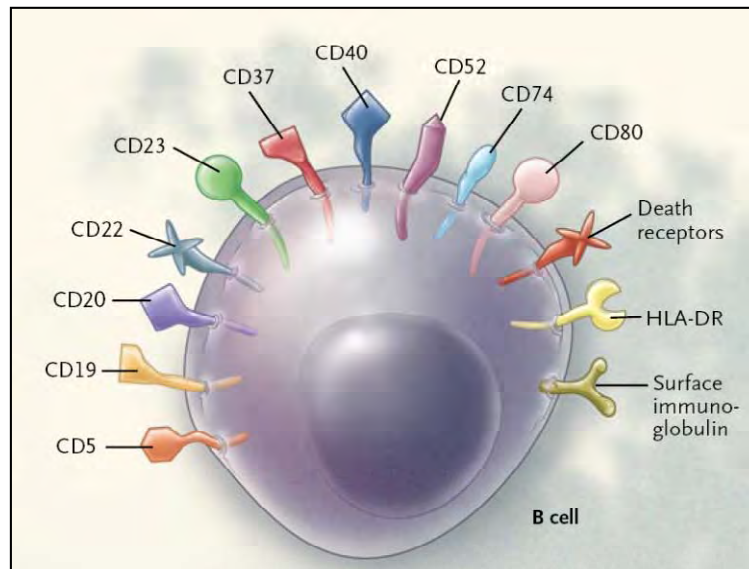


Figure 22: Antigènes de surface sur la cellule B.

La cellule B présente un grand nombre d'antigènes de surface pouvant être la cible d'AcMo. La présence du CD5 dépendra du type histologique (159).

a) *Structure et fonctions du CD20*

Le CD20 a été identifié pour la première fois en 1980 par Stashenko et ses collaborateurs. Ils l'ont défini comme un antigène spécifique des LB humains et l'ont appelé B1. Selon leurs travaux, il est présent sur environ 9% des cellules du sang périphérique. Par contre, il est présent sur plus de 95% des cellules B, qu'elles proviennent du sang ou des organes lymphoïdes (160). Les premières études visant à déterminer la structure de cette protéine suivirent quelques années plus tard. En 1988, Einfeld et ses collaborateurs ont proposé un premier modèle pour la structure du CD20 (Figure 23a). Ils décrivent ainsi une protéine avec 3 domaines transmembranaires: A, B et C. Entre les segments B et C se trouve une grande boucle extracellulaire de 41 acides aminés (161). Au cours des années, la structure a été affinée.

Au final, le CD20 ou MS4A1 (*Membrane-Spanning 4-domain, group A, member 1*) est une protéine non glycosylée transmembranaire. Elle contient quatre domaines transmembranaires séparant deux boucles extracellulaires (dont la petite manquait dans le modèle d'Einfeld) et trois régions intracellulaires (Figure 23b). Les régions intracellulaires contiennent de nombreux sites en sérine et thréonine dont la phosphorylation est régulée par la PKC (162). Selon les sites phosphorylés, on obtient trois isoformes de 33, 35 et 37kDa (163).

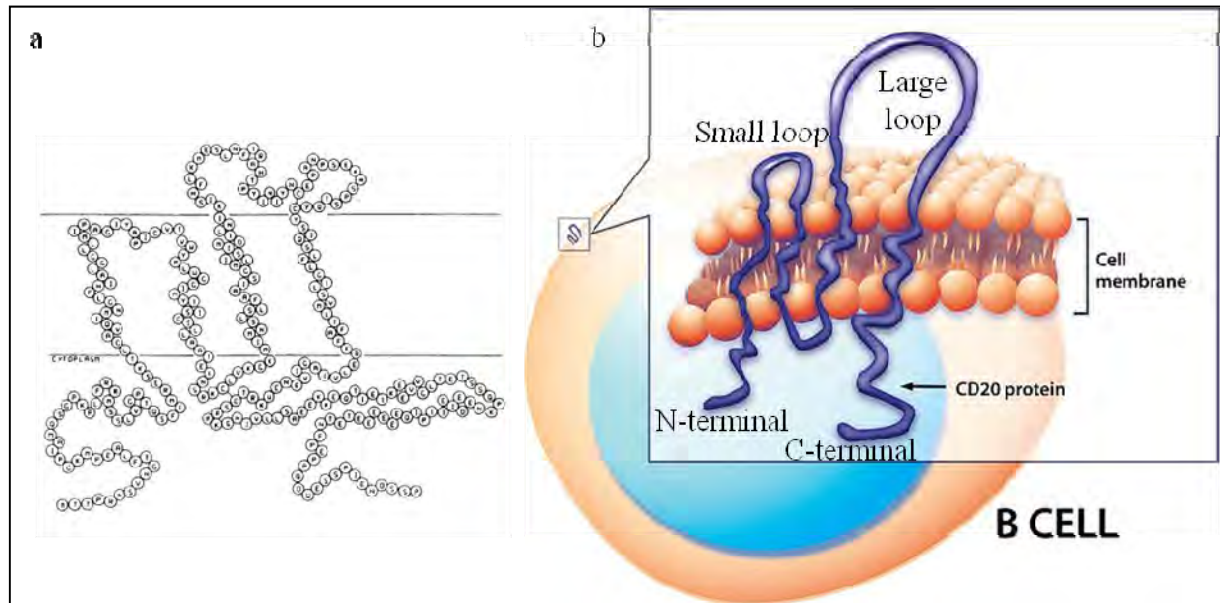


Figure 23: Schéma de la structure du CD20.

a. Premier modèle proposé avec une seule boucle extracellulaire et trois domaines transmembranaires.
b. Structure affinée du CD20 avec quatre segments transmembranaires. Deux boucles extracellulaires (1 petite et 1 grande) et les queues N et C-terminales intracytoplasmiques *adapté de* (164) (161).

Le CD20 est présent à la membrane plasmique sous forme d'oligomère et plus précisément en tétramère. Il va participer à la formation de complexes protéiques à la surface notamment en interagissant avec le BCR (165).

Le ligand de cette protéine n'étant pas connu, il est nécessaire d'utiliser la liaison d'anticorps anti-CD20 pour étudier sa fonction.

Il existe un homologue humain du CD20 chez la souris. Chez les souris déficientes pour cette protéine, il n'y a pas de défaut majeur imputé à cette déficience et les cellules B présentent un développement et des fonctions normales (166). Pour déterminer la fonction de cette protéine, l'équipe de Tedder a réalisé des transfections ectopiques du CD20. Ils ont ainsi montré que l'expression du CD20 induisait un flux calcique transmembranaire, suggérant un rôle de canal calcique (167). Cela est confirmé dix ans plus tard, par l'équipe de JP Deans qui publie une étude prouvant l'implication du CD20 dans la voie calcique. En effet, l'expression ectopique du CD20 associé aux radeaux lipidiques induit un important flux calcique dans les cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*). Cette relocalisation du CD20 dans les radeaux lipidiques, dépendante d'une séquence cytoplasmique de la protéine (168), est essentielle pour la fonction de canal calcique (169).

Plusieurs études évoquent des relations fonctionnelles entre le CD20 et le BCR. En 2000, Mathas et ses collaborateurs ont montré que l'induction d'apoptose et l'inhibition de prolifération par des AcMo anti-CD20 se faisaient *via* l'activation des mêmes signaux que le BCR (170). Trois ans plus tard, l'équipe de Yamada confirme cela en décrivant une synergie des signaux du CD20 et du BCR pour induire l'apoptose dans des cellules de lymphome de Burkitt ou des cellules leucémiques (171). Enfin, une étude plus récente a montré que dans des cellules n'exprimant pas le BCR, l'activation du CD20 est incapable d'induire un flux calcique (172). Dans l'équipe, il a été montré que le RTX pouvait inhiber la signalisation du BCR en modifiant la structure des radeaux lipidiques, et en inhibant l'expression du BCR à la surface (172, 173).

b) Régulation de l'expression du CD20

Le gène MS4A1 qui code pour la protéine CD20 est localisé sur le chromosome 11q12-13 (174). Ce gène est activé au stade pré-B et l'expression du CD20 est maintenue jusqu'au stade B mémoire (Figure 24). Cette expression différentielle à des stades précis de la différenciation des lymphocytes B permet un ciblage thérapeutique (8). Les cellules de LF exprimant le CD20, peuvent quant à elles être facilement la cible d'une immunothérapie ciblée anti-CD20 (175).

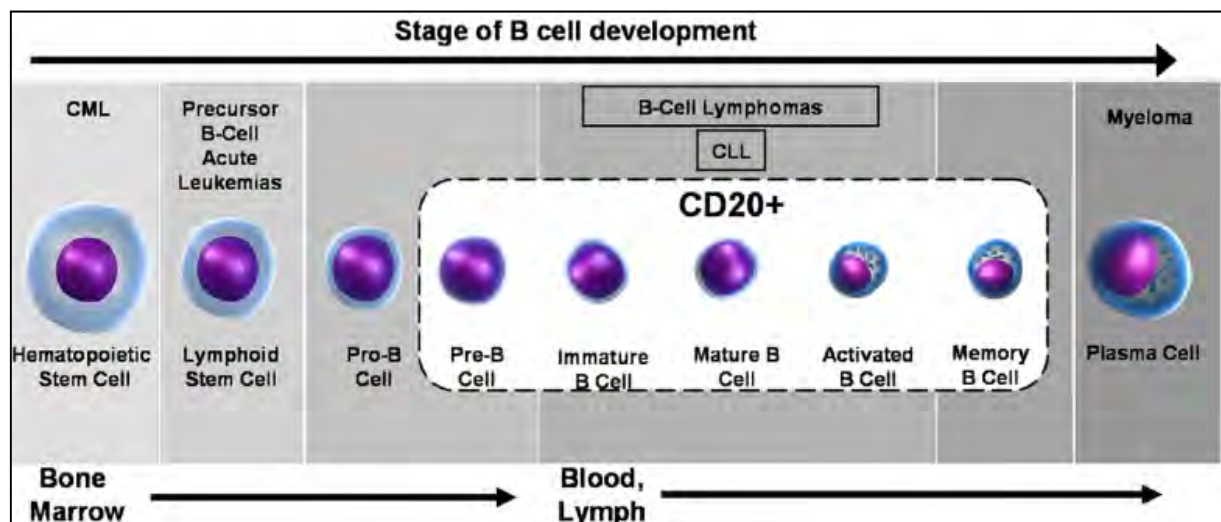


Figure 24: Expression du CD20 au cours de l'ontogénie des cellules B.

Le CD20 est exprimé du stade pré-B au stade cellule B mémoire. Il n'est pas exprimé sur les plasmocytes (176).

L'expression du CD20 au cours du développement des LB est très finement régulée. La régulation peut s'effectuer au niveau transcriptionnel sur le gène MS4A1. On peut citer par exemple une étude montrant que l'utilisation d'inhibiteurs des HDAC (*Histone DeAcetylase*) augmente l'expression du CD20 à la surface des cellules B (177). De la même manière, un traitement avec la 5-azacytidine, qui inhibe la méthyltransférase de l'ADN, augmente l'expression de l'ARNm du CD20 et restaure l'expression en surface du CD20 (178). Ces données suggèrent l'existence de mécanismes épigénétiques dans la régulation du CD20.

Au niveau post-transcriptionnel, l'activation de la phosphorylation du CD20 grâce à des agents tels que la PMA (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*) entraîne une diminution de l'expression du CD20 à la surface (179). Czuczman et ses collaborateurs ont observé, dans des lignées de LF résistantes au RTX, qu'il y avait une corrélation entre la diminution de l'expression du CD20 et l'augmentation des composants du système ubiquitine-protéasome (UPS) (180). Cette implication du protéasome dans la régulation post-transcriptionnelle a été confirmée par l'équipe de Golab qui montre que le traitement avec le Bortézomib (inhibiteur du protéasome) augmente le niveau d'expression du CD20 (181).

Enfin, l'expression du CD20 peut également être régulée par plusieurs cytokines telles que l'IL-4, le TNF- α ou encore le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) (182).

Il existe donc de nombreux niveaux de régulation pour le CD20 mais les mécanismes exacts mis en jeu restent encore relativement méconnus. Ce qui est sûr, c'est que ce marqueur de surface représente un antigène de choix pour cibler les cellules B de LF.

3- Rituximab

Le Rituximab (Mabthera®) est le premier AcMo qui a reçu l'approbation de la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1997 pour son utilisation en oncologie.

a) Etat des lieux

Il s'agit d'un AcMo de type I chimérique: ses parties variables sont d'origine murine et sont associées à la région constante d'une IgG1 humaine (Figure 25). Pour obtenir un tel AcMo,

l'ADN codant pour les domaines V_H et V_L d'un AcMo de souris est fusionné avec l'ADN codant les domaines constants H et L d'une Ig humaine. On obtient ainsi un AcMo hybride, humain à 75%, dont la partie constante n'est pas immunogène (153).

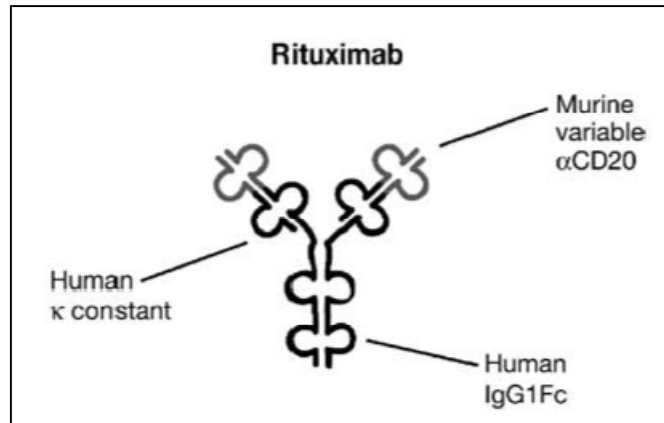


Figure 25: Structure du Rituximab.

Fc: fragment constant (183).

L'épitope du CD20 reconnu par le RTX se situe dans la grande boucle extracellulaire comprise entre les domaines transmembranaires 3 et 4. Le RTX se lie à un épitope discontinu qui se compose des aa 170 à 173 et des aa 182 à 185. Ces deux portions sont structurellement rapprochées par un pont disulfure reliant les cystéines 167 et 183 (184).

Le RTX se fixe sur le CD20 par sa partie variable entraînant la relocalisation de ce dernier dans les radeaux lipidiques (185). 95% des molécules de CD20 seront redirigées dans les radeaux lipidiques, cette redistribution dépend d'un fragment cytoplasmique de la protéine compris entre les résidus 219 et 225 (168). Cette relocalisation du CD20 est indispensable pour l'activité du RTX et la composition lipidique de la membrane est importante pour la fixation et l'effet du RTX (186).

Suite au « clustering » du CD20 dans les radeaux lipidiques, des tyrosines kinases de la famille src vont être recrutées (Lyn, Fyn et Lck) et activer la PLC γ 2 menant, *in fine*, à l'induction d'un flux calcique. Ce dernier est suivi par une activation des caspases et une induction d'apoptose (187).

Les mécanismes d'action du RTX impactant les cellules B seront détaillés dans le paragraphe « mécanismes de déplétion des cellules B par les AcMo ».

b) Le Rituximab en clinique

En 1997, le RTX a donc reçu l'autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis pour son utilisation en cancérologie. Un nouvel agent thérapeutique est ainsi apparu pour des patients atteints d'hémopathies à cellules B. C'est ainsi, qu'un patient atteint à la fois de lymphome B et de polyarthrite rhumatoïde (PR) a reçu des injections de RTX. De manière extrêmement inattendue à cette époque là, le RTX a entraîné une rémission des symptômes de la PR (188). Il s'agit là, de la première évidence clinique de l'efficacité du RTX dans les maladies auto-immunes. Depuis, les maladies auto-immunes dont le traitement comprend le RTX sont nombreuses. On peut citer, outre la PR, le lupus érythémateux, la dermatomyosite, l'anémie hémolytique auto-immune ou encore la granulomatose de Wegener (189).

Dans le domaine de la cancérologie, le RTX a tout d'abord été utilisé en monothérapie chez des patients atteints de LNH en rechute. Les premiers résultats étaient modestes avec environ 50% de réponse partielle et aucune réponse complète (190). Les résultats plus probants ont été ceux obtenus lors de l'association du RTX avec la polychimiothérapie CHOP. Après plusieurs études cliniques, l'administration de RTX s'est standardisée et consiste en une injection par semaine de $375\text{mg}/\text{m}^2$ pendant quatre semaines. Les effets secondaires dus au RTX apparaissent à la première injection et leur intensité est variable selon les patients: fièvre, vertiges, nausées, toux, fatigue, hypotension, prurit ou encore des gonflements de la gorge (191). Cette combinaison R-CHOP, devenue aujourd'hui le traitement standard, a permis d'obtenir 95% de réponse globale.

Le LF reste une pathologie incurable dont le taux de rechute est non négligeable. Les améliorations apportées par le RTX dans le traitement de cette pathologie n'étant plus à démontrer, l'industrie pharmaceutique a développé de nouveaux AcMo anti-CD20 dits de 3^{ème}

génération supposés plus efficaces. Nous nous focaliserons par la suite sur l'obinutuzumab (GA101) qui fait l'objet de mes travaux de thèse.

4- L'Obinutuzumab

a) Généralités

L'Obinutuzumab ou GA101 est un AcMo anti-CD20 humanisé, développé à partir d'un Ac murin d'isotype IgG1 le B.ly1. Il s'agit du premier AcMo modifié par glyco-ingénierie utilisé en essai clinique. Contrairement au RTX, le GA101 est un AcMo de type II: il n'entraîne pas de relocalisation du CD20 dans les radeaux lipidiques et induit une agrégation homotypique (192, 193).

Les modifications apportées visent à augmenter l'affinité pour l'antigène et l'afucosylation sur la partie Fc permet d'augmenter l'affinité pour le FcγRIIIa et d'optimiser l'ADCC. Cette afucosylation va également pallier les problèmes de polymorphisme (que l'on détaillera dans le § III-6). En effet, que la cellule exprime le variant FcγRIIIa-158F ou le FcγRIIIa-158V, l'affinité sera meilleure. Lors de l'humanisation, une autre modification a été apportée. Il s'agit de la substitution d'une valine, présente dans le coude de la région charnière entre la région variable et le premier domaine de la partie constante, par une leucine. Cette substitution entraîne une ouverture de l'angle du coude d'environ 30° comparativement à la structure du RTX (Figure 26). Cette modification impacte certainement l'arrangement spatial des deux molécules de CD20 liées au GA101 ou au RTX (194).

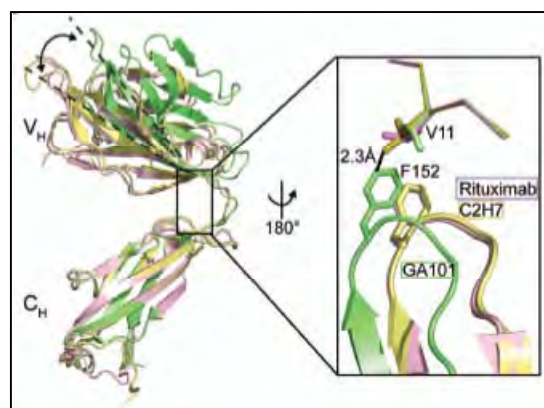


Figure 26: Superposition des domaines VH du GA101 et du RTX.

En vert le GA101, en rose le RTX et en jaune le C2H7 (AcMo chimérique de type I). Le RTX et le C2H7 présente un angle équivalent d'environ 140° alors que celui du GA101 est de 167° (193).

L'épitope reconnu par le GA101 est différent de celui du RTX mais ils se chevauchent sur quelques aa. L'épitope reconnu par le GA101 est décalé vers la partie C-terminale et l'asparagine en position 176 est essentiel pour la reconnaissance (Figure 27) (194).

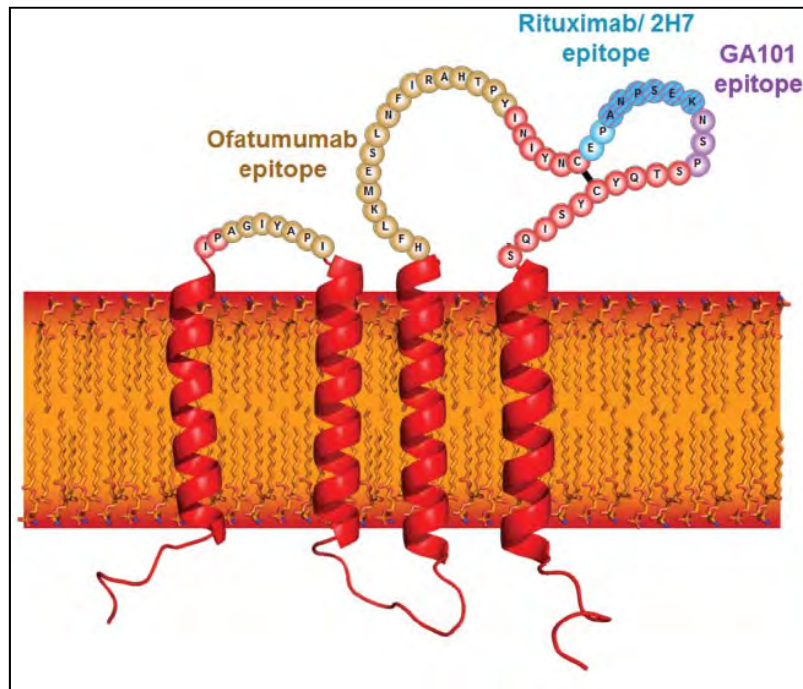


Figure 27: Epitopes reconnus par le RTX et le GA101.

En bleu aa reconnus par le RTX et en violet les aa reconnus par le GA101 (194).

Plusieurs études *in vitro* ont été menées afin de déterminer les mécanismes d'action du GA101 et/ou de le comparer avec le RTX. Une des études pionnières dans ce domaine est celle de Mössner et ses collaborateurs. Ils montrent que le GA101 induit une plus forte ADCC que le RTX et qu'il exerce une activité supérieure dans la déplétion des cellules B tumorales de LNH. Dans les modèles de xéno greffes, le GA101 présente une activité anti-tumorale supérieure au RTX, aboutissant à l'induction d'une rémission tumorale complète et d'une augmentation de la survie globale. Chez les primates non-humains, le GA101 présente encore une activité supérieure notamment concernant la déplétion des cellules B dans les tissus lymphoïdes tels que la rate et les ganglions lymphatiques (195). Une étude préclinique menée par l'équipe de Dumontet a montré la supériorité du GA101, seul ou en combinaison avec une chimiothérapie, par rapport au RTX dans des lignées de LF (196).

Les mécanismes intracellulaires seront détaillés dans le chapitre III-5.

b) L'Obinutuzumab en clinique

Les données de pharmacocinétiques obtenues avec le GA101 sont apparues comme étant similaires à celles du RTX. Pas moins de douze études cliniques sont en cours à l'heure actuelle (197, 198), dont des phases II et III pour les LNHs et la LLC (194).

Les premiers résultats de l'étude clinique de phase III CLL11 (BO21004, clinicaltrial: NCT010110061) ont été présentés à l'ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) en Juin 2013. Cette étude a comparé le traitement au GA101 ou au RTX, tous deux administrés avec le chlorambucil (CLB, un agent alkylant), au CLB seul dans la LLC (199). Ainsi, le GA101 a significativement réduit le risque de progression de la maladie ou de décès. L'association GA101–CLB a plus que doublé la durée de survie sans progression en comparaison avec le CLB seul. Ces résultats ont permis l'obtention du statut de percée thérapeutique des autorités sanitaires américaines pour le GA101 et très récemment, la FDA lui a accordé une procédure d'homologation accélérée dont la décision définitive sera connue en fin d'année 2013.

Deux études de phase II ont analysé l'efficacité du GA101 dans le cadre des LF en rechute ou réfractaires pour la première, et dans les DLBCL et lymphomes du manteau pour la seconde. Dans la première étude, l'étude GAUDI (NCT 00825149), 56 patients ont reçu la combinaison G-CHOP ou l'association GA101 – fludarabine – cyclophosphamide (G-FC). L'effet secondaire le plus courant a été une neutropénie chez 43% des patients ayant reçu le traitement G-CHOP et chez 50% des patients ayant reçu le traitement G-FC. Aucun effet secondaire inattendu n'a été observé, montrant que le GA101 associé à la chimiothérapie est relativement bien toléré. Au final, 93% et 96% de réponse globale ont été observé avec respectivement le traitement G-CHOP et le G-FC. Tous ces résultats sont encourageants et favorables pour la poursuite des études en phase III (200).

Dans la seconde étude, GAUGUIN (NCT00517530), deux doses de GA101 en monothérapie ont été testées. Dans la phase I de cette étude, les résultats concernant l'activité du GA101 étaient encourageants mais il n'y a pas eu de réel effet dose-réponse. 40 patients reçurent huit

cycles de GA101 soit 400mg pour tous les cycles, soit une alternance de 1 600/800mg. A la fin des cycles de traitement, le taux de réponse global était de 37% avec les doses les plus élevées et de 24% pour les patients ayant reçu la dose de 400mg. Dans tous les cas, le GA101 s'est montré globalement bien toléré et les effets secondaires principalement rencontrés sont ceux liés à l'injection. Comme pour la précédente étude de phase II, les résultats semblent encourageants pour la poursuite en phase III (201).

Enfin, trois études de phase III sont en cours dans le traitement des lymphomes. La première, GADOLIN (NCT01059630) compare l'association GA101 – bendamustine à la bendamustine seule chez des patients présentant des LNHS indolents et réfractaires au RTX. La deuxième, GOYA (NCT01287741) compare les associations GA101 – CHOP et RTX – CHOP chez des patients atteints de DLBCL à cellules CD20⁺. Et la troisième, GALLIUM (NCT01332968), compare le RTX et le GA101 tous deux associés à une polychimiothérapie (CHOP, CVP ou bendamustine) suivis d'une maintenance avec le RTX ou la GA101 chez des patients atteints de LNHS indolents de stade avancé (202).

Les effets secondaires sont équivalents à ceux observés avec le RTX à savoir: fièvre, hypo/hyper tension, nausées, vomissements (203). Récemment, un patient traité pour un LF a présenté une éruption lichénoïde répandue en réaction au traitement au GA101. Il s'agit là du seul cas d'effet secondaire cutané du GA101 (204).

5- Mécanismes de déplétion des cellules B par les anticorps monoclonaux

Le RTX et le GA101 sont de deux types distincts d'AcMo anti-CD20: le RTX est un AcMo de type I (*Rituximab-like*) et le GA101 est un AcMo de type II (*Tositumomab-like*). Ces deux types d'AcMo présentent des caractéristiques et des mécanismes d'action différents (Figure 28).

Les AcMo de type II sont plus efficaces dans l'induction d'une mort de manière directe tout comme dans l'induction d'ADCC comparativement aux AcMo de type I. En revanche, les AcMo de type I induisent une plus forte cytotoxicité dépendante du complément (CDC) (163).

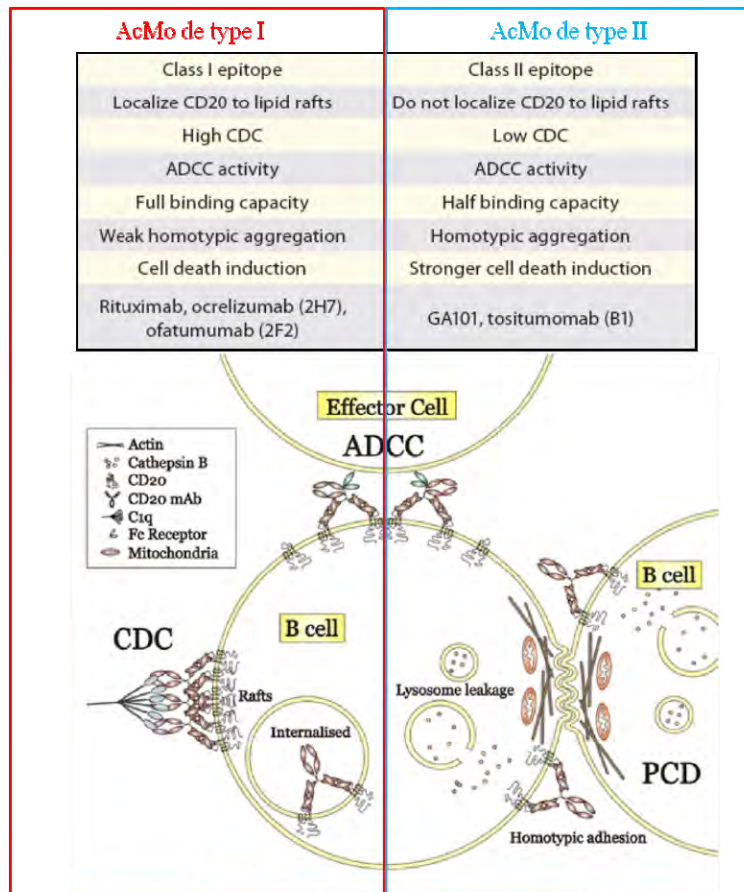


Figure 28: Différences entre les AcMo de type I et de type II.

Dans le panel de gauche, les propriétés des AcMo de type I. Dans celui de droite, les propriétés des AcMo de type II *adapté de* (163, 194).

a) Mécanismes directs: une attaque de front

Les mécanismes d'action directs sont ceux n'impliquant que la liaison de l'AcMo au CD20 par ses parties variables.

i. Action directe

Les données concernant les mécanismes d'action directe du GA101 sont moindres par rapport à celles du RTX, de part son arrivée récente sur le marché des AcMo. Le GA101 induit une agrégation homotypique mais pas de relocalisation du CD20 dans les radeaux lipidiques (195).

Notre équipe a mené plusieurs travaux afin de comprendre les mécanismes d'action du RTX sur les cellules B de LF. Dans un premier temps, il a été montré que le RTX inhibe la prolifération des cellules B. Cela s'explique par le fait que le RTX affecte la structure des radeaux lipidiques en activant la sphingomyélinase acide qui hydrolyse la sphingomyéline et génère du céramide, ceux-ci étant responsables de la fusion des radeaux lipidiques. La signalisation au sein de la cellule B en sera perturbée avec une activation de MAPK, une augmentation de l'expression de p27Kip1 et un arrêt du cycle cellulaire (205). Ensuite, d'autres travaux de notre équipe ont montré que l'inhibition de la prolifération peut également s'expliquer par une inhibition de la PKC ζ inactivant ainsi la voie mTOR (63). Enfin, des travaux plus récents ont montré que le RTX inhibe le signal BCR en inhibant l'activation des protéines, telles que Lyn, Syk, PLC γ 2, Akt et Erk, induite par la stimulation du BCR. Il a également été observé une inhibition du flux calcique, qui est la signature de l'activation du signal BCR. Le RTX agit par deux mécanismes: 1) il modifie le taux de cholestérol au niveau des radeaux lipidiques, empêchant la délocalisation du BCR dans ces micro-domaines ce qui est nécessaire à son activation, et 2) il inhibe l'expression du BCR à la surface par un mécanisme protéasome-dépendant (173).

L'équipe de B. Bonavida a montré que, dans des cellules de LNH, le RTX inhibe les voies de p38/MAPK, NF κ B, de Erk1/2 et de Akt. Cela a pour conséquence une inhibition de la transcription des gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques aboutissant à une chimio-sensibilisation des cellules (Figure 29a). Le RTX, *via* l'inhibition de la voie NF κ B, inhibe l'expression du facteur de transcription YY1 (*Yin Yang 1*) qui lui-même, régule négativement Fas et DR5. *In fine*, l'action du RTX va permettre une augmentation de l'expression de Fas et DR5 induisant ainsi une immuno-sensibilisation (Figure 29b) (206).

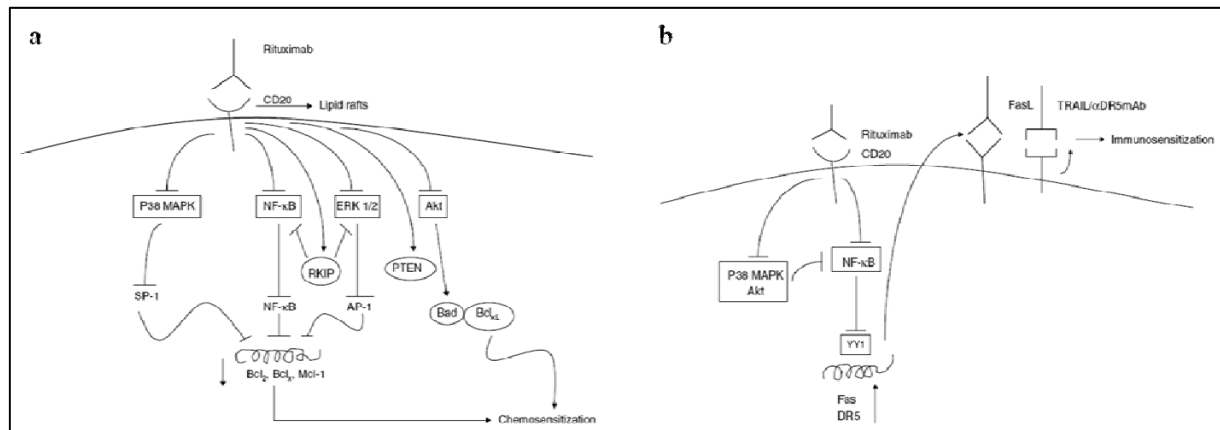


Figure 29: Inhibition des voies de survie, chimio-sensibilisation et immuno-sensibilisation par le RTX.

a. Le RTX inhibe les voies de survie ce qui entraîne l'inhibition de la transcription des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1) aboutissant *in fine* à une chimio-sensibilisation. **b.** L'inhibition de la voie NFκB par le RTX lève l'inhibition de la répression transcriptionnelle de Fas et DR5 ce qui permet une augmentation de l'apoptose induite par Fas et TRAIL (206).

Une étude préclinique menée par Dalle et ses collaborateurs a montré que le GA101 présentait une plus grande efficacité directe que le RTX. Il a également été montré l'implication de deux autres protéines: EGR1 (*Early Growth Response 1*) et ATF3 (*Activating Transcription Factor 3*) dans la signalisation du CD20 médiée par le RTX et le GA101 (196).

Dans le cadre de la LLC, Reslan et ses collaborateurs montrent que le GA101 et le RTX induisent en effet de l'apoptose, mais par des mécanismes différents. Ainsi, le GA101 induit une plus forte implication de la voie mitochondriale avec notamment une inhibition de Bcl-xL. Cette inhibition pourrait, en plus, induire une chimio-sensibilisation et faciliter l'induction d'apoptose par les agents thérapeutiques (207). En ce qui concerne l'induction directe d'apoptose, le GA101 s'avère généralement plus efficace que le RTX dans des cellules de LLC et de LNH (195, 207).

ii. Mort lysosomale

Dans les années 1950, de Duve, lors de ses recherches sur une phosphatase hépatiques fit la découverte des lysosomes (208) et leur potentiel cytotoxique fut mis en évidence. Le développement de stratégies thérapeutiques ciblant les lysosomes a tardé à se mettre en place

par crainte de cibler toutes les cellules contenant des lysosomes (seuls les globules rouges en sont dépourvus) (209).

Connaissant la forte résistance à l'apoptose des cellules B malignes, les travaux de Chan et ses collaborateurs furent d'une grande importance. Ils montrèrent que le tositumomab (AcMo murin anti-CD20 de type II, IgG2a) était capable d'induire une mort des cellules B malignes indépendante de l'activation des caspases et insensible à la surexpression de Bcl-2 (192).

Quelques années plus tard, l'équipe de T. Illidge a montré que le GA101 est capable d'induire une mort programmée des cellules tumorales de manière caspase-indépendante mais impliquant la réorganisation de l'actine. Ce type de mort, spécifique aux anticorps de type II, est un processus mettant en jeu les lysosomes et leur perméabilisation (210). La perméabilisation de la membrane lysosomale va permettre le relargage d'enzymes lysosomes telles que les cathepsines (notamment la cathepsine B). Suite à ce processus, il va se produire une processus de mort cellulaire non apoptotique impliquant la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Figure 30) (211).

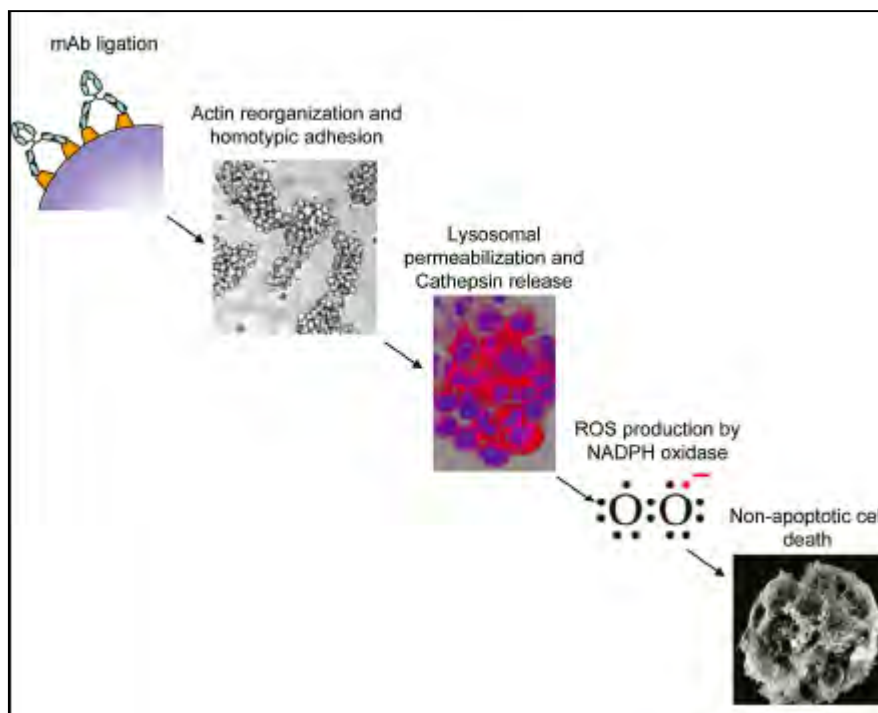


Figure 30: Mécanisme de mort lysosomale induite pas le GA101.

La fixation des AcMo de type II entraîne un remodelage de l'actine et une agrégation homotypique. Suite à cela, il est observé une rupture de la membrane lysosomale avec un relargage des cathepsines. Cela induit la production de ROS et aboutit une mort cellulaire non apoptotique (211).

Le processus de mort lysosomale est caractérisé par une perméabilisation partielle de la membrane lysosomale et le relargage des hydrolases lysosomales dans le cytosol. Une fois dans le cytosol, ces hydrolases vont engendrer une mort cellulaire même dans les cellules résistantes à l'apoptose. Les cathepsines sont les protéases lysosomales les plus abondantes et la majorité d'entre elles sont ubiquitaires. Celles qui sont le plus couramment impliquées dans la mort lysosomale sont l'aspartique-cathepsine D et la cystéine-cathepsine B (212). Il semble que le tositumomab induise l'expression de la cathepsine B (210, 213), dont l'augmentation de l'activité conduit à une déstabilisation de la membrane lysosomale par un mécanisme impliquant la dégradation des protéines de la membrane lysosomale (214).

Ce type de mort n'a pas été décrit pour le RTX mais il n'a pas été étudié pour tous les AcMo de type I. L'induction de mort lysosomale par les AcMo de type II dans les hémopathies malignes (210, 215) paraît importante pour pallier les résistances à l'apoptose développées par les cellules tumorales.

iii. Senescence

Les mécanismes d'action directs des AcMo sont souvent imputés aux fonctions classiques et connues que l'on vient de voir. Mais de manière intéressante, Däbritz et ses collaborateurs ont présenté au congrès de l'*American Society of Haematology* en 2010, des travaux montrant une induction de sénescence dans des cellules de lymphome B humain indolent et agressif suite à des traitements au RTX (216). Le mécanisme reste pour le moment inconnu.

Il existe plusieurs études qui ont montré que la sénescence pouvait être un mécanisme de suppression des tumeurs. Des études *in vivo* dans des modèles murins ont permis de montrer l'implication de la sénescence dans la restriction de la tumorigenèse (217, 218). Carol Greider, dans une étude qui se révélera comme pionnière dans ce domaine, a montré que la sénescence réduit significativement le développement tumoral *in vivo*. Un des mécanismes expliquant ce processus serait une réponse aux télomères courts médiée par p53. La sénescence implique un arrêt irréversible du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule. Elle peut être de deux types: répllicative si elle est induite par le raccourcissement des télomères, ou prématurée induite par le stress (219).

L'arrêt du cycle cellulaire est généralement associé à l'augmentation de l'expression de l'activité β -galactosidase lysosomale (SA- β -Gal) (220).

Aux vues de ces observations, l'idée de faire de la sénescence un intérêt thérapeutique est apparue. Le cisplatine, la doxorubicine ou encore l'étoposide sont des drogues capables d'induire de la sénescence dans des cellules cancéreuses. On parle alors de TIS (*Therapy-Induced Senescence*) (221) et celle-ci est détectable au sein de tumeurs de patients traités avec ce type d'agents génotoxiques. Par exemple, 41% des biopsies de tumeurs de cancer du sein provenant de patientes traitées avec un cocktail thérapeutique comprenant de la doxorubicine présentent de la sénescence (222). Cette recherche ouvre potentiellement de nouvelles perspectives thérapeutiques mais de nouvelles études, tant fondamentales que cliniques, doivent être menées pour pouvoir attribuer le statut de cible thérapeutique aux protéines impliquées dans le processus de sénescence. D'autant plus que, considérer l'induction de la sénescence comme une thérapeutique anticancéreuse est tout de même controversé aux vues des aspects protumoraux qu'elle peut générer (Figure 31).

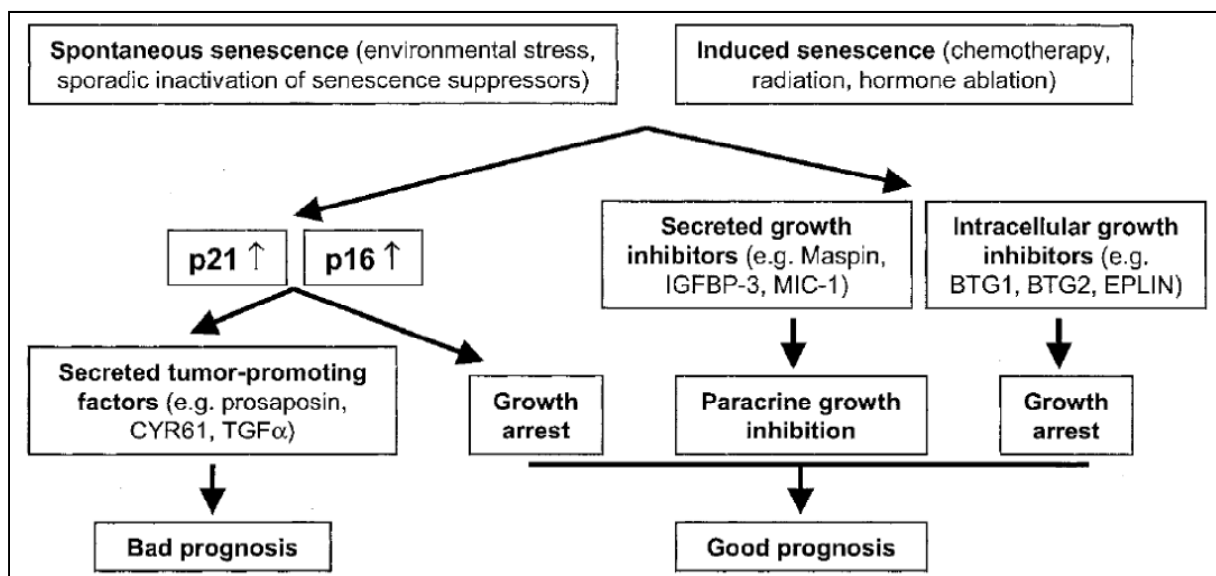


Figure 31: Conséquences de la sénescence au sein d'une tumeur.

La sénescence est un processus biologique qui dans le cadre d'un cancer peut être de bon ou de mauvais pronostic selon le phénotype des cellules sénescence (223).

Des données montrent que le phénotype sécrétoire des cellules sénescence peut générer un environnement protumoral (224). En effet, nous pouvons citer une étude menée par l'équipe

de Campisi sur des fibroblastes sénescents qui montre que ces cellules vont stimuler la prolifération des cellules épithéliales malignes ou pré-malignes et non des cellules saines, ainsi que la formation de tumeurs chez la souris (225). Ces fibroblastes sécrètent des facteurs solubles tels que des cytokines inflammatoires, des facteurs de croissance épithéliaux ou encore des métalloprotéases matricielles. Tous ces facteurs vont créer un environnement propice au développement tumoral (226).

Des études supplémentaires sont nécessaires pour statuer quant au bon ou mauvais pronostic associé à une TIS, et plus précisément dans le cadre des lymphomes pour lesquels les données sur la sénescence sont manquantes.

b) Mécanismes indirects: la manière détournée

Outre une action directe, les AcMo peuvent également « recruter » des cellules immunitaires et les lier à la cellule cible en se fixant d'une part au CD20 et d'autre part aux récepteurs au fragment constant (FcR) des Igs exprimés par les cellules effectrices (Table 4).

	Fc γ RI	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIc	Fc γ RIIIa	Fc γ RIIIb
Monocytes/ macrophages	+	+	+	—	+	—
NK cells	—	—	—	+	+	—
Neutrophils	+/-	+	—	—	—	+
B lymphocytes	—	—	+	—	—	—
Dendritic cells	+	+	+	—	+	—
Mast cells	+/-	+	+	—	—	—
Platelets	—	+	—	—	—	—

Table 4: Expression des FcRs selon le type de cellule immunitaire.

Différents Fc γ R exprimés par les cellules immunitaires (227).

Parmi les FcR, on distingue deux catégories: les activateurs (Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa et Fc γ RIIIb) qui signalent *via* un motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) et les inhibiteurs (Fc γ RIIb) qui signalent *via* un motif ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*). La fixation de l'Ig sur le FcR induit une phosphorylation en tyrosine des motifs ITAM par des protéines kinases des familles src ou Syk. L'engagement du Fc γ RIIb induit la phosphorylation du motif ITIM et l'activation de

phosphatases telle que SHIP (*SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase*) entraînant l'inhibition du signal activateur. C'est la balance entre les signaux provenant des FcR activateurs et inhibiteurs qui détermine le niveau d'activation des cellules effectrices (228).

Les mécanismes majeurs de déplétion indirecte des cellules B par les AcMo sont: l'ADCC, l'ADCP (*Antibody Dependent Cellular Phagocytosis*) et la CDC (*Complement-Dependent Cytotoxicity*) (Figure 32).

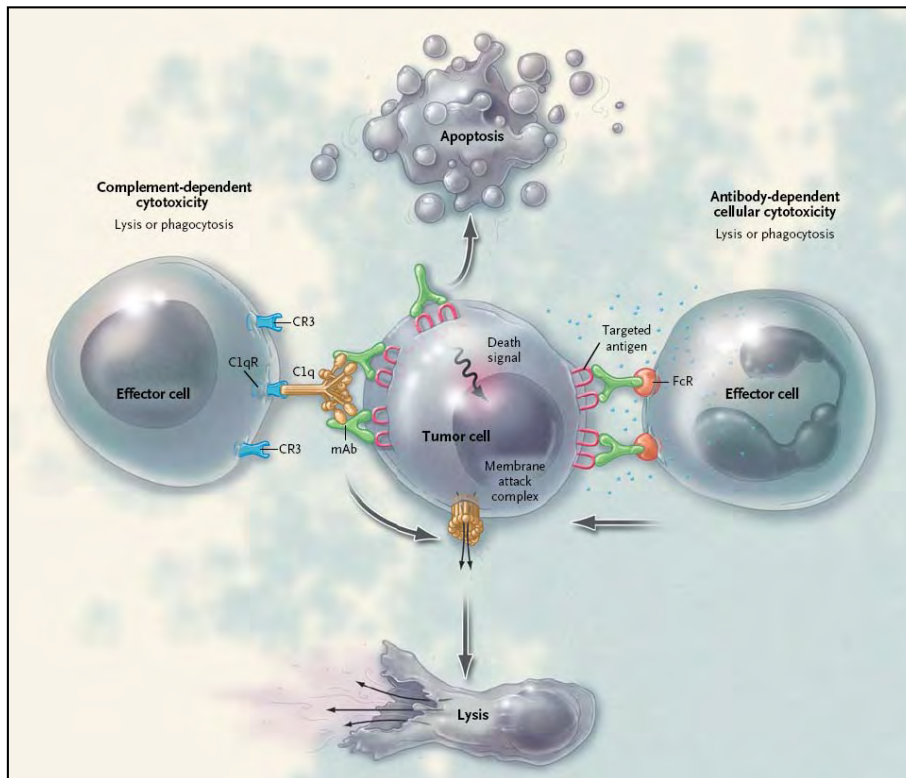


Figure 32: Mécanismes de déplétion des cellules B par les AcMo.
En rose: le CD20, en vert: l'AcMo (159).

i. Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps

Dès 1994, des études *in vitro* ont montré que le RTX induisait une ADCC dans des lignées cellulaires de lymphome (229). L'implication de l'ADCC dans les mécanismes d'action du RTX a été confirmée *in vivo* avec des souris soit déficientes pour la chaîne γ du FcR (230) soit traitées avec un Ac neutralisant les FcR (231).

Aux vues de l'importance de la liaison entre le fragment Fc et le FcR, cela donne un champ d'investigation quant à l'amélioration de l'efficacité du RTX. Des modifications biochimiques de la partie Fc, telles que l'afucosylation, peuvent augmenter les capacités des AcMo à induire l'ADCC (232). Ainsi, l'afucosylation présente sur le GA101 permet d'augmenter l'affinité pour le FcR et d'accroître ses capacités à induire l'ADCC.

Des études *in vitro* ont confirmé la meilleure efficacité du GA101 à induire la dégranulation des cellules NK face à des cellules de LLC (233). De la même façon, Rafiq et ses collaborateurs ont montré que, vis-à-vis de cellules B de LLC, le GA101 induit une plus forte ADCC et également une plus forte activation des cellules NK (234). Enfin, des travaux de l'équipe de JF Rossi ont montré que le GA101 augmente fortement la cytotoxicité des lymphocytes T V γ 9V δ 2 vis-à-vis de cellules primaires ou de lignées cellulaires de lymphome. En effet, ils observent au niveau des LT V γ 9V δ 2 une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ et une augmentation de l'expression de CD107a (marqueur de dégranulation). En parallèle, ils notent également une augmentation de la lyse des cellules de lymphomes en présence de GA101. Pour toutes ces observations, l'effet du GA101 est supérieur à celui du RTX (93).

Des travaux récents menés dans notre équipe ont mis en évidence l'IL-8 comme co-activateur des cellules NK, impliquée dans l'ADCC de cellules de LLC médiée par le RTX et le GA101 (235).

ii. Cytotoxicité dépendante du complément

Le système du complément est un processus important dans l'éradication des cellules néoplasiques. Ce système peut être activé selon trois voies: des lectines, alternative ou classique. La voie classique est celle faisant intervenir les Igs. La première étape de cette voie est la fixation de la protéine C1q sur le fragment Fc des IgG ou IgM. Cette liaison déclenche une cascade protéolytique générant une grande quantité de C3b, protéine effectrice principale de la cascade. La C3b va se lier à la C3 convertase pour former la C5 convertase conduisant à la génération du complexe d'attaque membranaire (CAM) qui sera responsable de la mort de la cellule cible en perturbant sa membrane plasmique (Figure 33) (227).

Il s'agit là du phénomène de cytotoxicité dépendante du complément (CDC).

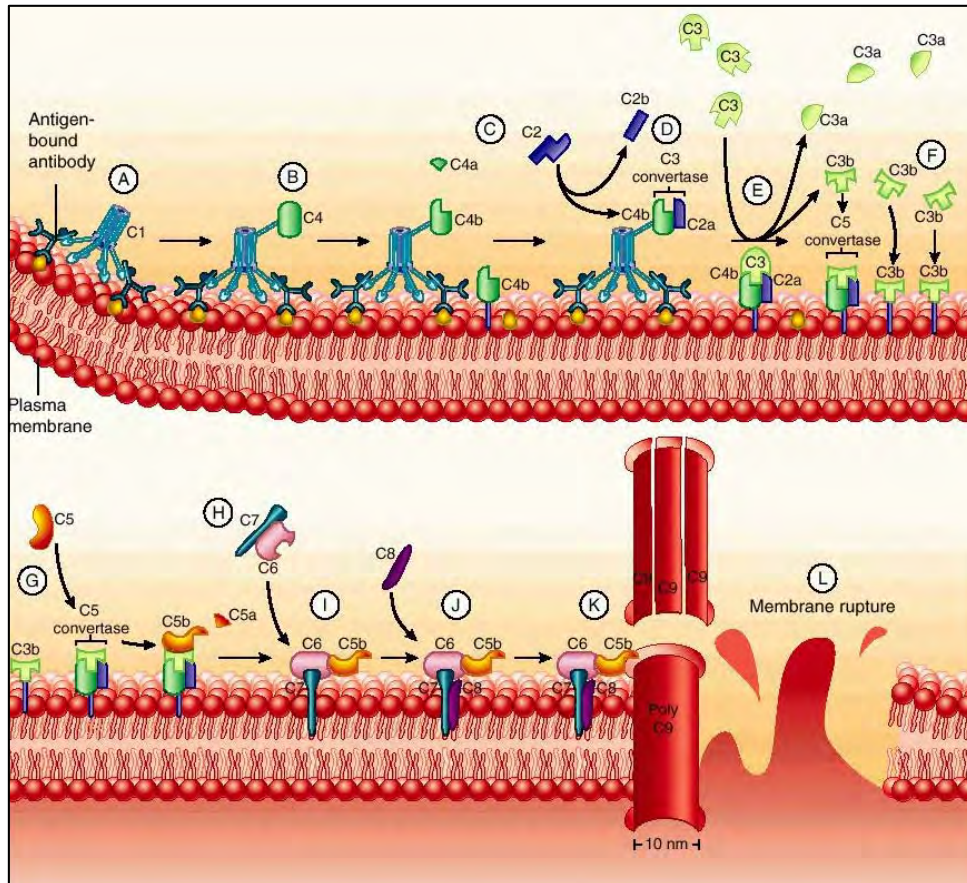


Figure 33: Mécanismes moléculaires de la voie classique du complément.

La fixation de l'Ac sur son Ag entraîne le recrutement de la première protéine de la cascade du complément C1q (A). S'en suit le recrutement des autres protéines de la cascade du complément (B-K) jusqu'à la formation du CAM avec rupture de la membrane plasmique (L) (236).

La C3 est abondante dans le plasma mais les C3b nouvellement produites seront éliminées si elles ne se lient pas à la C5 convertase. En revanche, C3b est capable de se lier à des récepteurs au complément que l'on trouve sur des cellules effectrices telles que les granulocytes, les macrophages ou encore les cellules NK (Figure 34). Cette liaison active les cellules effectrices et entraîne la lyse ou la phagocytose de la cellule cible. Ce phénomène est appelé CDCC (*Complement-Dependent Cellular Cytotoxicity*) (227).

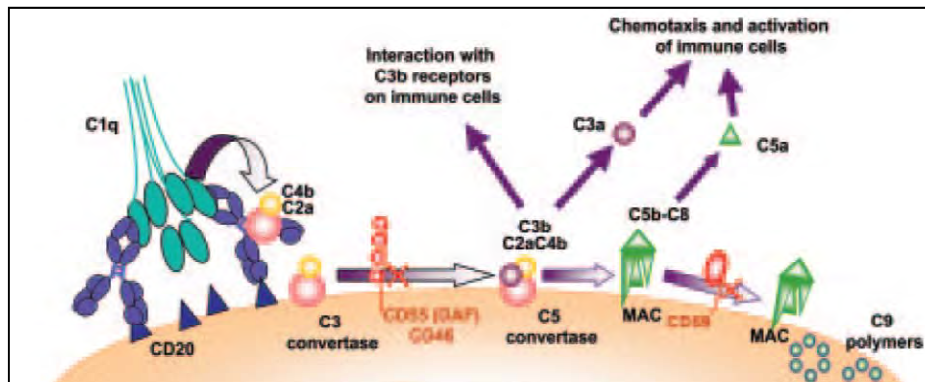


Figure 34: Mécanisme de la CDC.

Protéines impliquées dans la cascade du complément (227).

Des études *in vitro* ont montré que le RTX induit une CDC dans les lignées cellulaires de lymphome B (237) ou dans des cellules fraîchement isolées de patients (238, 239). La CDC semble un des mécanismes d'action majeurs du RTX mais est dépendant du niveau d'expression du CD20. Le niveau d'expression du CD20 détermine dans quelle mesure la cascade du complément va se déclencher et donc l'efficacité du RTX à induire une CDC (238). La capacité à induire une CDC sera variable selon le type cellulaire considéré. Par exemple, un fort taux de CDC est observé dans les LF ou les lymphomes du manteau par rapport à la LLC (239).

L'induction de la CDC fait partie intégrante de l'activité du RTX. Des stratégies visant à amplifier ce phénomène afin d'augmenter l'efficacité du RTX ont été développées. Par exemple, augmenter l'expression du CD20, faciliter l'activation du complément ou diminuer les protéines inhibitrices de la cascade du complément. Ainsi, il semble que l'association du RTX avec ces approches donne de meilleurs résultats que le RTX seul (240).

Les données concernant le GA101 et sa capacité à induire ou non une CDC sont moindres. Mais, une étude menée par l'équipe de C. Dumontet a montré, *in vivo*, que la neutralisation du système du complément n'affectait pas l'activité anti-tumorale du GA101 (196).

iii. Phagocytose médiée par l'anticorps

Comme on peut le voir dans la table 3, les monocytes/macrophages et les DCs sont des cellules exprimant les FcRs. Quand ces cellules seront dirigées contre les cellules cibles grâce

au pontage *via* l'AcMo, elles vont entraîner la phagocytose de la cellule cible. Il s'agit là du phénomène d'ADCP (227). Des travaux *in vitro* ont montré la phagocytose de cellules de lymphome traitées au RTX par des macrophages. L'ADCP semble principalement médiée par les FcγRIIa (241). Les AcMo présentant une afucosylation de la partie Fc sont également capables d'induire une ADCP. En effet, l'équipe de BS Wilson a montré que des AcMo humanisés anti-CD19 avec une afucosylation induisaient la phagocytose des cellules de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL). Ils ont observé, *in vitro*, la formation de synapses entre les cellules de LAL traitées avec l'anti-CD19 (Medi-511) et les macrophages induisant ainsi la phagocytose de toutes les cellules de LAL en 3h (242).

Face à des cellules B de LLC, le RTX et le GA101 induisent de la phagocytose à des niveaux équivalents. Par contre, dans le sang cette induction de phagocytose est inhibée du fait d'une grande quantité d'IgG circulantes. (233). De manière surprenante, des travaux menés par Rafiq et ses collaborateurs ont montré que le GA101, comparé au RTX, induit une plus faible activation des monocytes avec une plus faible phosphorylation de Erk et un moindre relargage de TNF-α (234).

L'ADCP est un mécanisme important dans l'activité anti-tumorale des AcMo et peut être utilisée comme cible thérapeutique. Ainsi, il a été montré que l'utilisation d'un AcMo anti-CD47 fonctionne en synergie avec le RTX pour promouvoir la phagocytose des cellules de LNH (243).

c) *L'effet « vaccinal » du Rituximab*

Tous les mécanismes que nous venons de voir sont des phénomènes se produisant rapidement et à court terme après le traitement aux AcMo. Or, des études ont montré que la réponse clinique au RTX atteignait son maximum quelques mois après l'injection. Les mécanismes évoqués précédemment ne sont donc pas les seuls mis en jeu (227). Selenko et ses collaborateurs ont montré que les DCs pouvaient présenter des peptides provenant de la lyse des cellules tumorales. La présentation de ces peptides tumoraux peut induire la formation de CTLs spécifiques *via* le phénomène de cross-présentation (Figure 35) (244).

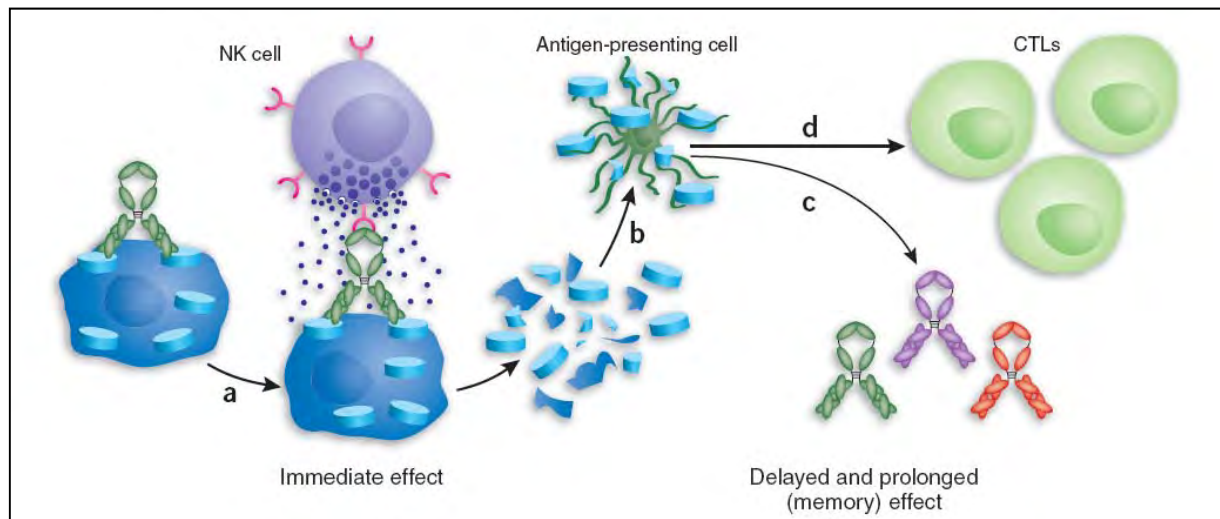


Figure 35: Effet « vaccinal » du RTX.

En se fixant sur l'antigène à la surface des cellules tumorales, les AcMo vont pouvoir être la cible des FcR présents notamment sur les cellules NK. Ces liaisons vont entraîner le relargage de PFN et GZB qui vont lyser les cellules tumorales (a). Les débris cellulaires issus de cette lyse seront captés par des CPA (b) qui les présenteront à des cellules B induisant la production d'Ac dirigés contre les épitopes tumoraux (c). Les CPA activeront également les CTL qui reconnaîtront et tueront les cellules présentant ces antigènes (d) (245).

Des études *in vivo* suggèrent que l'administration d'AcMo à des souris peut induire une immunité anti-tumorale spécifique (246). L'équipe de JL. Teillaud a montré *in vivo*, qu'un traitement initial avec des AcMo anti-CD20 induisait une protection longue durée contre les cellules tumorales exprimant le CD20 humain. Ce traitement rend les souris immunocompétentes vis-à-vis des tumeurs. Ces données démontrent que les AcMo anti-CD20 agissent également en induisant une réaction immunitaire adaptative, plaidant en faveur d'un effet « vaccinal » du RTX (247).

Deux études cliniques dans le cadre des LNHs associant des AcMo anti-CD20 avec des cytokines immunomodulatrices suggèrent également cet effet vaccinal. L'association RTX – GM-CSF chez des patients atteints de LF en rechute ou réfractaires au traitement a montré de grands taux de réponses, tout en étant bien tolérée (248). La 2^{ème} étude montre que la combinaison du RTX et de l'IFN- α chez des patients avec un lymphome indolent semble augmenter la qualité et la durée de la réponse clinique (249).

Enfin, une étude menée par Hilchey et ses collaborateurs a mis en évidence une réponse immunitaire anti-tumorale chez des patients atteints de LF. En effet, ils ont comparé la réponse contre les Igs exprimées par les cellules de LF avant et après le traitement au RTX. Il

ressort de cette étude qu'après le traitement au RTX, 4 patients sur les 5 étudiés, présentent une augmentation des cellules T spécifiques de l'Id tumoral (250). Il s'agit là de la première preuve de l'immunité anti-tumorale induite par le RTX chez les patients.

L'existence de cet effet « vaccinal » semble d'une importance capitale quant à une utilisation plus fréquente du RTX en thérapie de maintenance. Concernant le GA101, il faudra attendre quelques années pour avoir le recul nécessaire par rapport aux études cliniques en cours, afin de pouvoir lui imputer un tel effet.

6- Mécanismes de résistance

Bien que le RTX soit un agent thérapeutique efficace, environ 50% des patients en rechute ou présentant un LF CD20⁺ réfractaire ne répondent pas à une thérapie initiale utilisant le RTX (résistance innée). De plus, quasiment 60% des patients ayant initialement répondu à une thérapie avec du RTX, ne tirent plus de bénéfices d'un retraitement avec cet AcMo (résistance acquise). Il existe de nombreuses manières d'expliquer ces phénomènes de résistance (Figure 36).

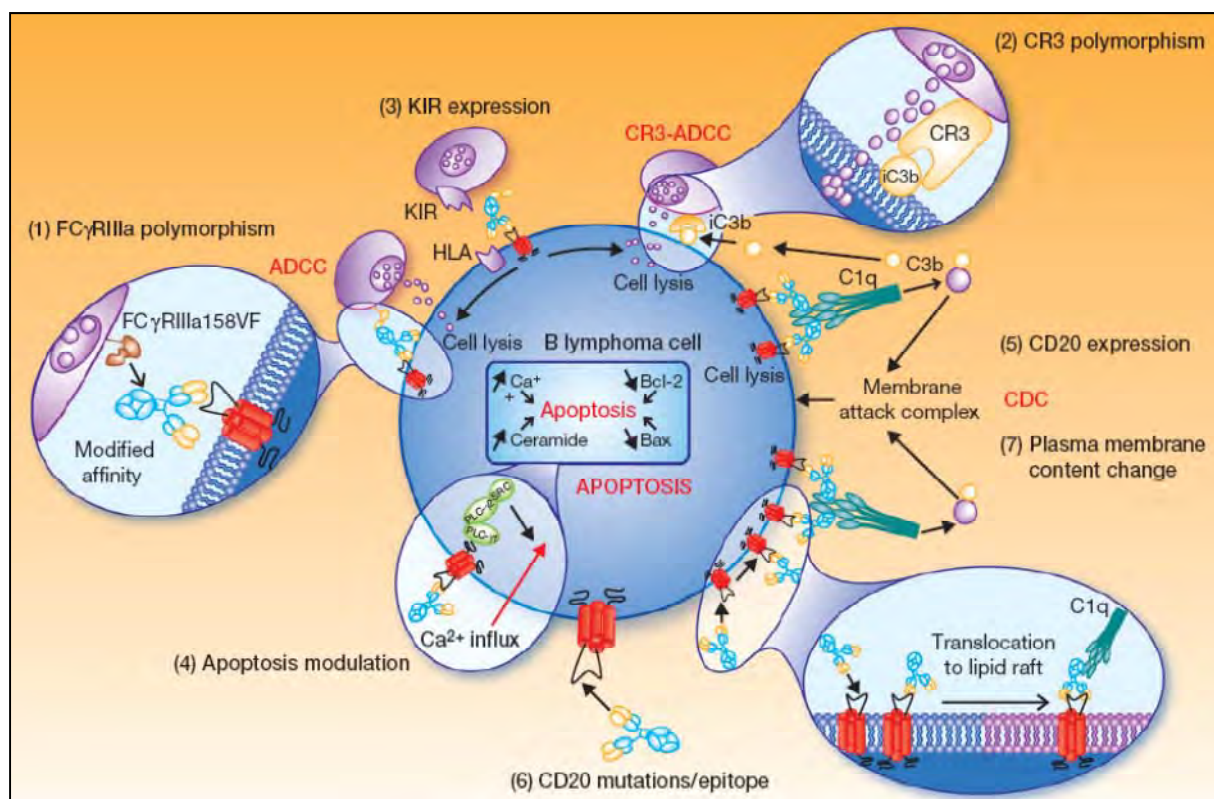


Figure 36: Entre action du RTX et réaction de la cellule tumorale.

(1) Le polymorphisme du FcγRIIIa affecte la liaison du RTX par sa partie constante. (2) Polymorphisme existant dans les protéines de la cascade du complément et affectant la cytotoxicité dépendante du complément médiée par le RTX. (3) L'expression des molécules de CMH de classe I sur les cellules tumorales impacte l'ADCC avec des cellules effectrices exprimant les récepteurs KIRs. (4) L'induction directe d'apoptose par le RTX peut être modulée négativement. (5) (6) Des modifications qualitatives ou quantitatives de l'expression du CD20 à la surface des cellules tumorales influence la fixation du RTX. (7) Des changements de composition de la membrane plasmique affectent l'efficacité du RTX (251, 252).

Si l'on conserve la hiérarchie évoquée dans la figure 36, le premier mécanisme de résistance abordé est le polymorphisme du FcγRIIIa, récepteur pour la partie constante des Ac impliqués dans l'ADCC. Une étude menée par l'équipe de Watier a montré une corrélation entre le polymorphisme du FcγRIIIa et les réponses cliniques et moléculaires du RTX (253). En effet, cette même équipe, avait également montré qu'une mutation sur le gène codant pour le FcγRIIIa, entraînant la substitution d'une valine (V) par une phénylalanine (F) induisait une moins bonne fixation des IgG1. Ainsi, le dimorphisme du gène FCGR3A génère deux allotypes: FcγRIIIa-158V et FcγRIIIa-158F. Les patients homozygotes FcγRIIIa-158V sont ceux répondant le mieux au RTX. La présence de la mutation, qu'elle soit homozygote ou hétérozygote, entraîne une moindre efficacité du RTX. Et cela est notamment dû à une diminution de l'efficacité de l'ADCC médiée par les cellules NK (254).

Dans un deuxième temps, Cartron et ses collaborateurs ont montré qu'un autre polymorphisme influençait la réponse au RTX. Il s'agit du polymorphisme du CD11b, récepteur pour la protéine C3b de la cascade du complément mais les données sur ce mécanisme sont encore peu nombreuses (252).

Comme détaillé précédemment, le RTX module directement les voies de signalisation de la cellule B tumorale. Des dérégulations de ces voies de signalisation pourraient jouer un rôle dans la résistance au RTX. Il a été observé par l'équipe de Bonavida que les cellules résistantes au RTX présentent une suractivation constitutive des voies de signalisation: NFκB (Nuclear Factor κB) et Erk1/2 (255). De plus, des travaux menés dans notre équipe ont montré que l'expression d'un variant constitutivement actif de la PKCζ empêchait l'effet inhibiteur du RTX sur la prolifération des cellules tumorales (63).

Enfin, le CD20, cible du RTX, peut également être au centre de mécanismes de résistance; et ce, tant dans son expression que dans sa localisation. En effet, des études réalisées *in vitro* sur des lignées tumorales résistantes au RTX ont révélé une moindre expression du CD20 tant au niveau génique que protéique (180). Ce phénomène serait plutôt un mécanisme de résistance acquise car Hiraga et ses collaborateurs ont montré que des lymphomes à cellules B CD20⁺ et traités avec du RTX devenaient CD20⁻. En effet, ils observent chez ces patients une diminution des ARNm codants pour la protéine CD20 associée à une diminution de l'expression de ce marqueur à la surface des cellules B tumorales. Cette diminution étant réversée par un traitement à la 5-azacytidine, la résistance semble être la conséquence de phénomènes épigénétiques (178). L'équipe de Peschel a montré que l'altération de la composition des domaines lipidiques, notamment le taux de GM1 (un sphingolipide associé aux radeaux lipidiques), pourrait être associée au phénomène de résistance (256).

L'équipe de RP. Taylor a montré que le traitement au RTX des cellules de lymphome du manteau ou de LLC entraînait une importante perte du CD20 à la surface des LB circulants. Une telle modulation antigénique est compromettante pour l'efficacité thérapeutique. En fait, il se produit un « arrachement » du complexe CD20/RTX par les monocytes par un mécanisme dit de « *shaving* ». Les monocytes vont détecter ces complexes immuns *via* leur récepteur FcγRI qui va fixer le RTX. (257). Ce « *shaving* » induit la perte complète de la majorité du RTX sur les cellules B. Les monocytes sont capables « d'arracher » ces complexes immuns sans détruire la cellule porteuse par un mécanisme actif de type

trogocytose. De plus, il semblerait que ce mécanisme de résistance se produise également avec des AcMo de type II (258).

Les mécanismes généraux d'action des AcMo sont globalement connus mais il reste toutefois de nombreux champs d'investigation. Etudier les AcMo et leurs effets reste un sujet incontournable. Cependant il est important lors des études précliniques de se rapprocher le plus possible du contexte physiopathologique. Ainsi, les modèles d'étude in vitro se doivent d'être pertinents de la tumeur, dont la caractéristique principale est une structuration en 3D.

IV- LES CULTURES CELLULAIRES EN TROIS DIMENSIONS

Les premières cultures cellulaires en trois dimensions (3D) utilisées en recherche préclinique datent des années 70. Des radio-biologistes ont essayé de trouver un modèle *in vitro* mimant le plus possible l'architecture tumorale. Ils ont ainsi utilisé des modèles de culture 3D appelés sphéroïdes pour étudier les réponses cellulaires aux thérapies anti-cancéreuses (259). Les modèles 3D apparaissent comme un bon système d'étude *in vitro*, beaucoup plus relevant que les cultures monocouches ou en suspension.

Cette relevance, notamment par rapport à l'étude des mécanismes d'action des AcMo, est confirmée par des travaux menés par l'équipe de Ries. Cette équipe a étudié les mécanismes d'action du Trastuzumab (ou Herceptine, AcMo humanisé anti-HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*)) dans le cancer du sein. Pour cela, ils ont comparé des cultures en 2D et 3D de cellules de cancer du sein et ont observé que la culture en 3D reflète mieux certains aspects de la signalisation HER2 observés *in vivo*. Le type de culture influence ainsi la réponse au Trastuzumab (260).

Il est important de sélectionner un modèle de culture le plus relevant possible de la pathologie afin d'étudier les mécanismes d'action des AcMo.

1- Généralités

La croissance *in vitro* des cellules tumorales en 3D a permis d'importantes avancées dans la compréhension de la biologie tumorale. Ainsi, de nombreux modèles de culture en 3D ont été développés et sont identifiés par diverses appellations. La plus courante reste le terme « sphéroïde », mais un autre terme est régulièrement utilisé: MC(T)S (*MultiCellular (Tumor) Spheroid*). Il existe plusieurs modèles de culture 3D (Table 5), les MCTS ou sphéroïdes étant les plus utilisés (261).

System	Description	Uses
Multicellular – spheroid	Spherical aggregate of cells in static or stirred suspension culture	Tumor cell biology, therapy resistance, cell-cell interactions, invasion, drug penetration, modeling, tumor markers, nutrient gradients, tumor cell metabolism ¹⁴⁻¹⁶
Cellular – multilayer	Layers of cells cultured on top of a porous membrane	Drug transport and binding, therapy resistance, invasion ^{17,18}
Matrix-embedded – culture	Single cells or aggregates embedded in a porous extracellular matrix	Tumor cell biology, cell-cell interactions, cell migration and invasion, artificial organs ^{19,20}
Hollow-fiber – bioreactor	Cells cultured within a network of perfused artificial capillaries	Tumor cell metabolism, therapy resistance, artificial organs ²¹⁻²³
Ex vivo culture	Piece of tissue or tumor excised and cultured <i>in vitro</i>	Therapy resistance, cell-cell interactions, tumor markers ^{24,25}

The list of uses and literature citations is not intended to be exhaustive but rather to reflect the most common types of studies published.

Table 5: Différents types de culture en 3D utilisés en recherche.

Descriptions des différents types de modèles de culture en 3D (261).

Les MCL (*Multicellular layer* ou *Cellular Multilayer*) sont un système de multicouches cellulaires qui, placé au dessus d'une membrane poreuse permet d'étudier la diffusion des drogues (262). Tannock et ses collaborateurs ont travaillé sur ce modèle dans les années 2000 afin d'étudier la pénétration des drogues à travers un tissu tumoral. Ils ont ainsi montré que la matrice extracellulaire (MEC) gêne la diffusion des drogues telle que la gemcitabine. Ils ont observé la présence de protéines de la MEC, telles que la laminine et le collagène, dans leur modèle. Les niveaux d'expression sont certes différents entre le MCL et les tumeurs relatives, mais cela explique la faible pénétration des drogues dans le modèle de culture. Ces observations confirment la relevance et la pertinence d'un tel modèle notamment dans l'étude de la biodiffusion des agents thérapeutiques (263).

La MEC contribue à la rigidité de la tumeur et cela va influencer, entre autres, la différenciation ou encore la prolifération des cellules (264). Des approches expérimentales utilisant la MEC dans les cultures en 3D ont été développées. On peut citer notamment les travaux de Gudjonsson et ses collaborateurs qui ont inclus des cellules de l'épithélium mammaire dans un milieu riche en MEC (collagène, Matrigel®). Ce modèle de culture 3D leur a permis d'étudier *in vitro* l'activité fonctionnelle des cellules tumorales dans un environnement reflétant celui dans lequel elles se développent *in vivo*. Les expériences réalisées lors de ces travaux leur ont permis de montrer que la production de laminine-1 par les cellules épithéliales mammaires influençait leur capacité à former des structures « *acinus-like* ». Les cellules tumorales correspondantes quant à elles, génèrent des colonies désorganisées avec une moindre production de laminine-1. Ces travaux montrent l'importance

de recréer un environnement mimant au mieux celui établi *in vivo* afin d'étudier la physiologie des cellules d'intérêt (265).

Le modèle de bioréacteur cité dans la table 5 est peu utilisé dans le monde de la cancérologie car il reste très spécifique de l'étude du métabolisme cellulaire. Il permet de modéliser des organes artificiels et de mimer un système de perfusion grâce à un réseau de capillaires artificiels (266, 267).

Enfin, les cultures *ex vivo* sont également un modèle de culture 3D largement décrit dans la littérature. Elles proviennent de la mise en culture de fragments cellulaires issus de biopsies de tissus sains ou tumoraux. L'avantage de ce système est de pouvoir prendre en compte les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales et également les variabilités inter-individuelles. Ce modèle semble idéal pour étudier notamment les phénomènes de résistance aux drogues comme le montre l'étude menée par l'équipe de P. Nyren. Ils ont effectué des tests de chimiosensibilité sur des cultures *ex vivo* provenant de patients atteints de cancers métastatiques. Pour cela, ils ont utilisé l'approche FMCA (*Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay*) basée sur l'incorporation d'une sonde fluorescente qui est clivée dans les cellules vivantes. Cette étude montre le potentiel de ce modèle pour évaluer la sensibilité des patients aux agents chimiothérapeutiques (268). Cette méthodologie a été utilisée dans le cadre d'hémopathies malignes, plus particulièrement pour la LAL, et il a été démontré que les drogues les plus efficaces dans les cultures *ex vivo* sont celles qui, une fois administrées aux patients, confèrent le meilleur avantage de survie (269).

Ce paragraphe nous a permis d'examiner de manière non exhaustive différents systèmes de culture en 3D. Nous allons maintenant nous focaliser sur les sphéroïdes et leurs caractéristiques intrinsèques.

2- Les sphéroïdes, des copies de microrégions tumorales

Les sphéroïdes sont des reproductions *in vitro* en 3D de microrégions tumorales ou de sites métastatiques avascularisés (Figure 37).

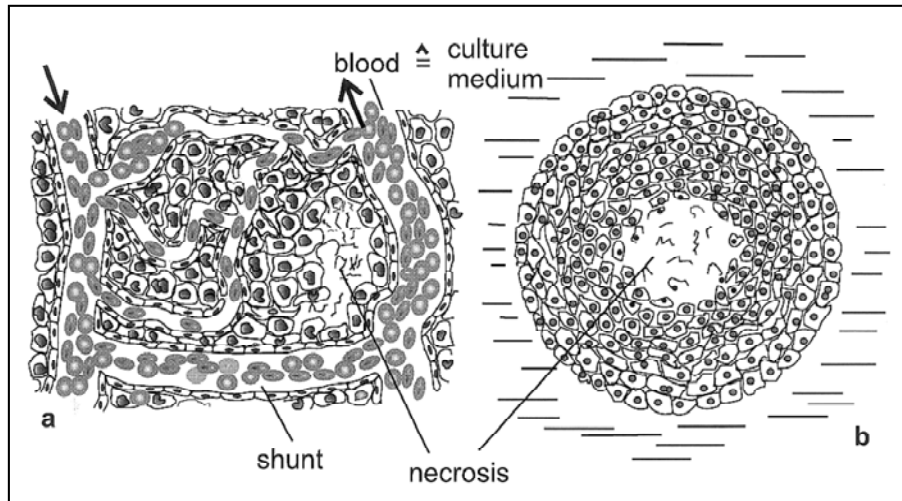


Figure 37: Analogies entre sphéroïde et microrégion tumorale.

a. Microrégion tumorale avec vascularisation anarchique et architecture tissulaire irrégulière. **b.** Sphéroïde avec une géométrie sphérique et plusieurs couches de cellules encourant un cœur nécrotique (270).

L'homéostasie d'un tissu est maintenue par un réseau de communication en 3D qui permet les interactions cellule - cellule ou cellule - MEC. Les sphéroïdes rétablissent ces interactions physiologiques et miment ainsi, contrairement aux cultures classiques en 2D, la réalité tissulaire (271, 272).

a) Caractéristiques physiques

Les sphéroïdes miment les caractéristiques fonctionnelles et histomorphologiques des tissus. Un des avantages majeurs de ces sphéroïdes est la géométrie bien définie avec un arrangement concentrique de cellules aux caractéristiques différentes. Cela montre l'émergence d'une hétérogénéité cellulaire, ce qui est une propriété inhérente de la plupart des tumeurs solides (270).

Plusieurs études ont montré la mise en place, au sein des sphéroïdes, de différents gradients qui reproduisent l'éloignement des vaisseaux sanguins dans les tumeurs.

Quand on analyse une tumeur, on observe des gradients de métabolites fondamentaux (oxygène, glucose, lactate, facteurs de croissance) dus à l'éloignement des vaisseaux sanguins. Un gradient de prolifération cellulaire est également présent. En effet, en périphérie tumorale on trouve des cellules proliférantes puis en allant vers le cœur de la tumeur, les

cellules deviennent quiescentes puis nécrotiques (Figure 38). Ce gradient de prolifération est probablement causé par la carence en métabolites (273).

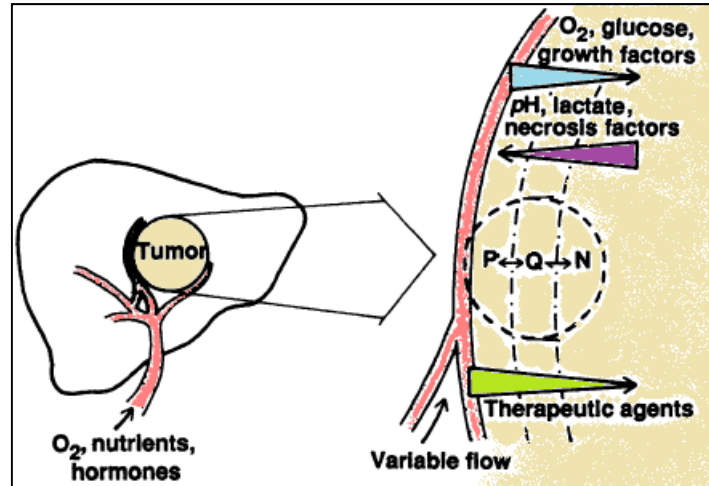


Figure 38: Gradients observés dans une microrégion tumorale avec l'éloignement des vaisseaux sanguins.

Schéma montrant les facteurs qui contribuent au développement de microrégions cellulaires hétérogènes au sein d'une tumeur. P: Prolifération, Q: Quiescence et N: Nécrose *adapté de* (273).

Les sphéroïdes sont des systèmes avascularisés mais qui « baignent » dans du milieu contenant les métabolites fondamentaux. On retrouve également un gradient dans la distribution de l'oxygène avec un phénomène d'hypoxie au centre de la structure (274). De la même manière, au centre du sphéroïde, le glucose est peu disponible et on note une accumulation de déchets métaboliques tels que le lactate. Ces gradients de métabolites vont influencer la prolifération des cellules qui diminue de la périphérie vers le cœur (275). Au final, l'accumulation de tous ces phénomènes peut entraîner, au-delà d'un diamètre de 500 μ m, l'apparition d'un cœur nécrotique (270).

Les gradients existants dans les sphéroïdes (Figure 39) sont semblables à ceux observés dans les tumeurs *in vivo*. Ces données prouvent la pertinence de l'utilisation des sphéroïdes dans la recherche en cancérologie.

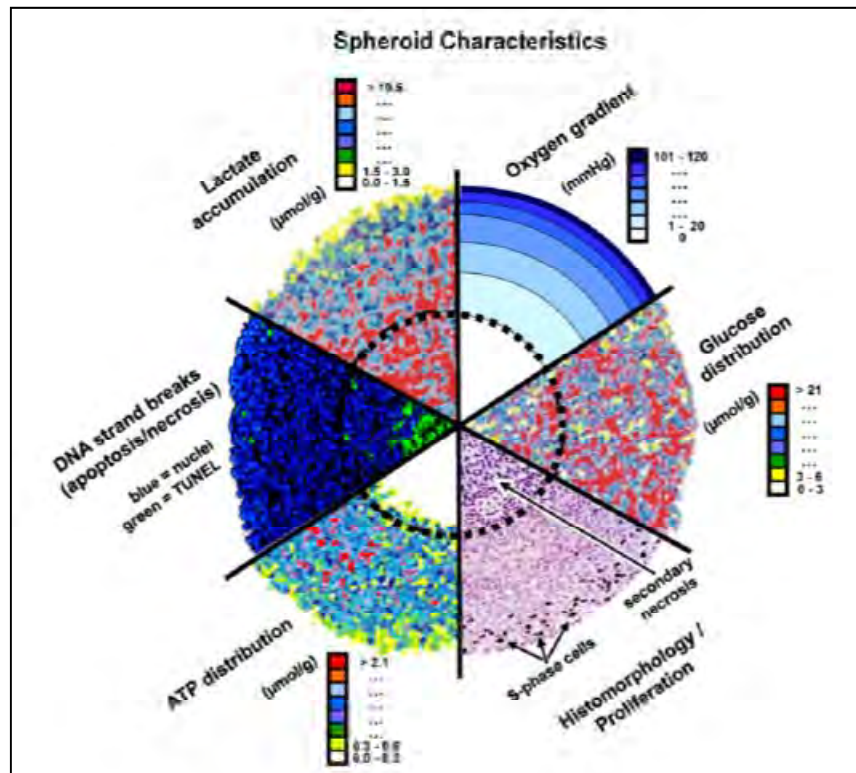


Figure 39: **Gradients physiques au sein d'un sphéroïde.**

Répartition concentrique de divers paramètres tels que la prolifération, la mort cellulaire et la distribution des métabolites (275).

Il est également important de souligner que plusieurs études ont mis en évidence la présence de protéines de la MEC au sein des sphéroïdes. Parmi ces protéines on trouve la fibronectine, la laminine ou encore le collagène (276, 277). Les sphéroïdes miment également le profil d'expression des intégrines que l'on observe *in situ* (278). Les cultures 3D, comparées aux cultures 2D, sont des modèles de culture reproduisant mieux les fonctions et les comportements cellulaires observés *in situ*.

D'autres aspects de la physiopathologie peuvent être reproduits en utilisant les sphéroïdes. En effet, il est possible d'étendre ce modèle à un système cellulaire hétérologue. Prenons l'exemple des travaux de l'équipe de Kreutz dans lesquels des fibroblastes ou des monocytes ont été introduits avec les cellules tumorales. Ils montrent que les monocytes sont capables d'infiltrer le sphéroïde et que ce modèle peut également être utilisé pour étudier les interactions entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires (279).

b) *Un modèle idéal pour des études précliniques*

La chimiorésistance des tumeurs a longtemps été imputée à la présence, voire à la sélection, de cellules résistantes au sein d'une tumeur. Mais ce n'est pas le seul facteur responsable de cette chimiorésistance. En effet, la physiologie tumorale, le micro-environnement mais également la structuration 3D sont des facteurs influençant fortement la sensibilité des cellules aux agents thérapeutiques (280).

Dans les tumeurs solides, la faible organisation du réseau vasculaire a pour conséquence une distribution limitée de l'oxygène et des nutriments. Il existe au moins trois facteurs pouvant expliquer que les cellules distantes des vaisseaux sanguins soient résistantes aux agents conventionnels de chimiothérapie (Figure 40). Tout d'abord, la plupart des agents anti-cancéreux agissent sur des cellules cyclantes, donc les cellules pas ou peu proliférantes seront résistantes à ces agents. Deuxièmement, certaines drogues sont moins efficaces dans des zones hypoxiques, acides ou appauvries en nutriments. Enfin, les cellules éloignées des vaisseaux sont exposées à des concentrations en drogues bien plus faibles (281).

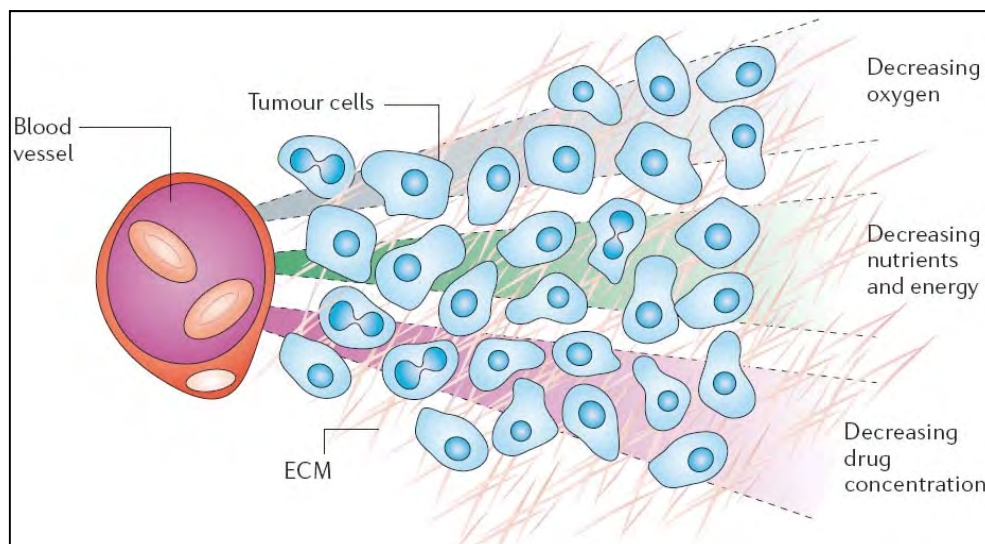


Figure 40: Raisons potentielles expliquant la résistance des cellules distantes des vaisseaux sanguins.

Représentation schématique des gradients expliquant la résistance des cellules en fonction de l'éloignement des vaisseaux (281).

Comme nous l'avons vu précédemment (§ IV-2-a), ce schéma est retrouvé au sein des sphéroïdes. Cela est un premier argument quant à la relevance de ce modèle pour des études précliniques.

Au sein d'un tissu, les cellules interagissent avec les cellules voisines et également avec les protéines de la MEC *via* des signaux biochimiques et mécaniques. Les interactions cellule – cellule et cellule – MEC permettent la mise en place d'un réseau de communication en 3D qui maintient la spécificité et l'homéostasie tissulaire (271). M. Bissel et ses collaborateurs ont montré que ces interactions participent à l'intégrité fonctionnelle en régulant des processus cellulaires clés tels que l'apoptose, la prolifération ou encore la migration. *In situ*, tous ces paramètres vont participer à la résistance des cellules tumorales aux agents thérapeutiques (282). Les cultures en 3D reproduisent ces interactions physiologiques et miment ainsi beaucoup mieux le comportement tissulaire face aux agents thérapeutiques que les cultures cellulaires classiques en 2D. En effet, Weaver et ses collaborateurs ont montré que cette MEC, et plus précisément l'intégrine $\beta 4$, était responsable dans les cultures 3D de la résistance à l'apoptose induite par Fas, TRAIL ou encore l'étoposide (283). Cette même équipe a montré que, dans des cultures 3D de cellules mammaires, la résistance vis-à-vis de deux AcMo (Trastuzumab et Pertuzumab) était dépendante des interactions cellule – MEC. En effet, l'utilisation d'un Ac inhibiteur de l'intégrine $\beta 1$ diminue la résistance observée vis-à-vis de ces AcMo (284).

La MEC, qui semble jouer un rôle fondamental dans la résistance des tumeurs aux agents thérapeutiques, peut aussi être une barrière physique prévenant une infiltration immunitaire. En effet, les propriétés physiques et biochimiques de la MEC peuvent moduler les effets des lymphocytes vis-à-vis de la tumeur. Une forte densité matricielle peut empêcher l'infiltration lymphocytaire au sein de la tumeur (285).

Les sphéroïdes contenant de la MEC pourraient donc être utilisés pour des études précliniques impliquant les cellules immunitaires.

3- Multicellular Aggregates of Lymphoma Cells

Tous les sphéroïdes décrits dans la littérature ont été obtenus à partir de cellules adhérentes, en particulier avec des cellules épithéliales ou carcinomateuses. Il n'existe pas dans la littérature un modèle de culture 3D pour le LF. C'est pourquoi C. Jean et G. Laurent ont développé, dans notre équipe, un tel modèle appelé MALC (*Multicellular Aggregate of Lymphoma Cells*).

Les lignées cellulaires de LF sont des cellules en suspension. Le protocole mis en place pour obtenir les MALC est une adaptation de trois approches déjà existantes dans la littérature. Premièrement, l'adaptation principale est celle de la technique de la goutte inversée. Ensuite, vient l'ajout de matrice exogène pour forcer l'agrégation cellulaire. Enfin, le revêtement du fond des plaques de culture avec des substances empêchant l'adhésion des cellules au support de culture.

Ainsi, une suspension cellulaire est préparée à partir de 10 000 cellules RL (lignée cellulaire de LF) contenant un agent gélifiant (méthylcellulose) qui va promouvoir les interactions intercellulaires. Cette suspension est déposée sous forme de goutte sur le couvercle d'une plaque de culture qui est ensuite retournée sur une plaque contenant du milieu de culture. Le lendemain, les agrégats néoformés sont transférés dans les plaques contenant de l'agarose (4%). Après ce transfert, on obtient des structures 3D, les MALC, comme on peut le voir sur la reconstruction d'une image acquise au biphoton (Figure 41).

Ce système, relativement simple à obtenir, permet de disposer d'un modèle de culture 3D à long terme. Moins onéreux et moins contraignant que les xénogreffes, il permet de se rapprocher *in vitro* de la structuration tumorale.

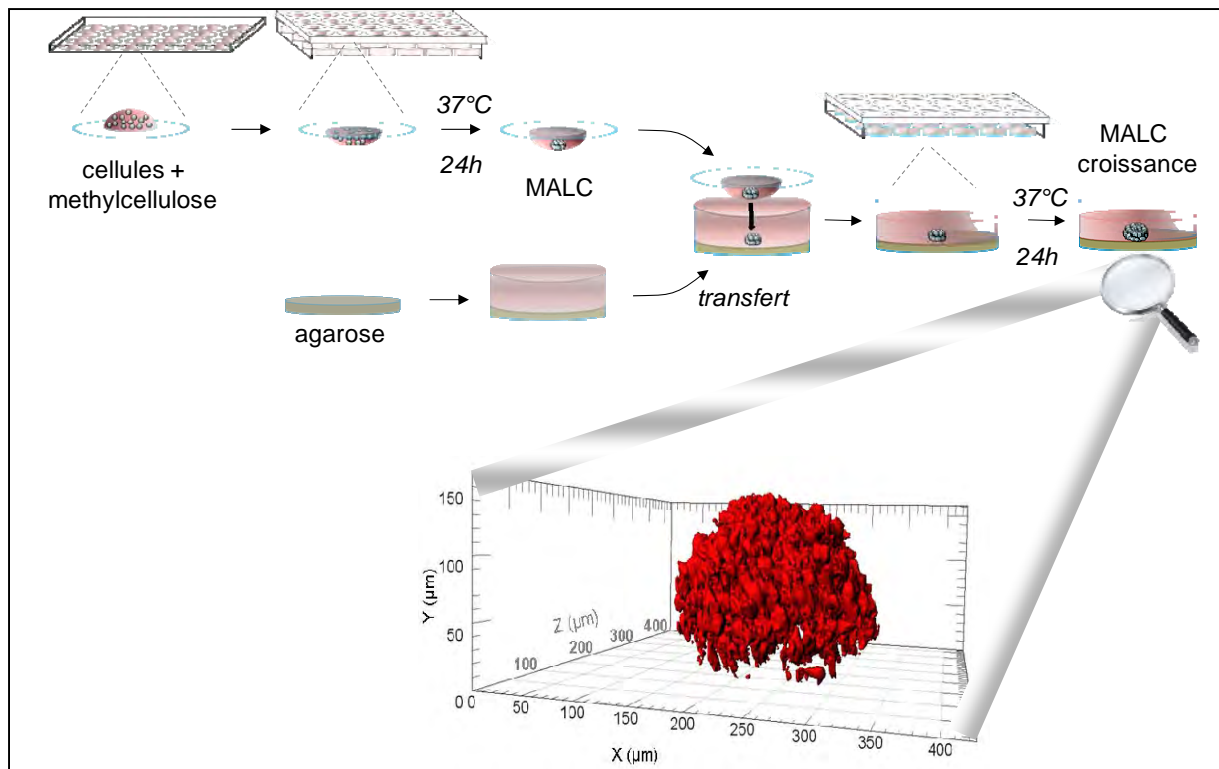


Figure 41: Méthodologie d’obtention des MALC.

Étapes permettant l’obtention des MALC avec reconstruction 3D d’un MALC au premier jour de culture.

Ce modèle offre plusieurs avantages pour étudier la biologie des cellules lymphomateuses ou de nouveaux agents thérapeutiques dans le cadre du LF tout en étant plus relevant de la pathologie que la culture cellulaire classique en 2D.

Ainsi, dans un travail récent réalisé dans le laboratoire, des transcriptomes comparatifs entre les cellules provenant d’une culture 2D, celles provenant des MALC et celles provenant de banques de patients de LF ont permis de mettre en évidence quatre familles fonctionnelles significativement augmentées dans les MALC (en révision à *American Journal of Pathology*). Il s’agit des gènes impliqués dans la réponse à l’hypoxie, la cascade de signalisation de NFκB, la régulation du cycle cellulaire et la régulation négative de l’apoptose. Il est important de souligner que la signature moléculaire des MALC est caractéristique de celle des patients atteints de LF. La culture en 3D induit des phénomènes d’hypoxie se traduisant par une augmentation de l’expression d’HIF1α et de la sécrétion de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). L’expression d’HIF1α est également détectée dans des coupes de ganglions lymphomateux et l’augmentation de VEGF est observée dans le sérum de patients atteints de

LF. La voie pro-survie NFκB est suractivée dans les MALC *via* l'augmentation de la phosphorylation de p53 en S536. Au sein des MALC, il a été observé un fort ralentissement de la prolifération avec une entrée progressive des cellules en quiescence. Le ralentissement de la prolifération est dû à un blocage au niveau de la transition G₁/S du cycle cellulaire. Ce blocage peut être dû à une régulation négative de CDC25A tant au niveau transcriptionnel que protéique. Mais l'entrée en quiescence des cellules semble plus expliquer ce blocage. Cette dernière observation est intéressante puisqu'elle reflète bien le phénotype des cellules observé dans les échantillons de patients. Cette sortie de cycle de ces cellules est corrélée à une augmentation de l'expression de deux protéines connues pour favoriser l'entrée des cellules en quiescence: p27-Kip1 et p21-Cip1. De façon intéressante, il a été montré après tri au sein des MALC, que les cellules quiescentes sont plus résistantes aux anthracyclines et aux agents alkylants que les cellules cyclantes. Une fois remises en culture, ces cellules retrouvent leurs capacités de prolifération tout en conservant leur capacité de résistance vis-à-vis des agents thérapeutiques ciblant les cellules en prolifération (Article annexe 2).

Enfin, le transcriptome des cellules quiescentes, comparativement aux cellules cyclantes, a été caractérisé. Il est intéressant de noter que plusieurs gènes appartenant à la famille « réponse à l'hypoxie » (tel que VEGF) sont régulés positivement dans les cellules quiescentes. Ces données sont favorables quant à l'hypothèse que l'hypoxie contribue au caractère quiescent des cellules de LF. Cependant, afin d'approfondir l'étude de cette sous-population quiescente et de la comparer aux échantillons provenant de biopsies de LF.

L'étude réalisée sur les modèles 3D a permis donc de montrer l'importance de la structuration spatiale dans la biologie des cellules de LF. De nombreuses caractéristiques physiques décrites dans la littérature pour les sphéroïdes sont retrouvées ici dans les MALC. De plus, les nombreuses homologies entre les cellules de MALC et celles obtenues à partir des patients atteints de lymphome montrent la relevance de ce nouveau modèle dans les études précliniques dans le LF.

Une autre étude menée dans notre équipe a discuté du potentiel des cellules de MALC à résister aux cellules NK. Ainsi, les capacités intrinsèques des cellules liées à leur organisation 3D rendraient les cellules plus résistantes à la lyse par les cellules NK (286).

Les modèles de culture 3D semblent être les modèles in vitro les plus pertinents des tumeurs, et donc les plus adéquats pour les études précliniques, notamment celles analysant les effets des AcMo. C'est dans ce contexte que se sont déroulés mes travaux de thèse dont les résultats seront présentés dans la suite de ce manuscrit.

Objectifs du travail

Le LF est le 2^{ème} type de LNH le plus fréquent. Cette pathologie est due à l'accumulation de cellules B dans le CG des ganglions lymphatiques. Ces cellules sont caractérisées par la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 engendrée par la translocation t(14;18). Le LF est une pathologie incurable malgré les nombreuses stratégies thérapeutiques existantes. L'apparition des AcMo anti-CD20 a révolutionné les traitements, notamment avec le développement du RTX. Pour pallier les phénomènes de résistance et grâce aux progrès de l'ingénierie, des AcMo anti-CD20 de nouvelle génération ont été développés, tels que l'Obinutuzumab (GA101).

L'objectif principal de mon projet de thèse est de comparer les mécanismes d'action de ces deux AcMo. Pour cela, il est important de disposer d'un modèle d'étude relevant de la pathologie. Ce modèle, appelé MALC est adapté de la technique de la goutte renversée. Il nous permet d'obtenir des structures 3D sur lesquelles nous étudions les effets du RTX et du GA101.

Le premier objectif est d'étudier les effets directs des deux AcMo sur les MALC. Pour cela, nous avons étudié les différents mécanismes mis en jeu dans la déplétion des cellules B tumorales et comparé leurs efficacités.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets indirects du RTX et du GA101. On dénote trois mécanismes impliqués dans les effets indirects des AcMo. Parmi ces trois là, nous avons principalement analysé le phénomène d'ADCC. En système décomplémenté, des cellules NK ont été mises en contact avec des MALC et nous avons ensuite analysé les deux partenaires cellulaires afin de déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu.

RESULTATS

I- EFFETS DIRECTS

Comme détaillé dans la partie introductive de ce manuscrit, les AcMo agissent, entre autres, de manière directe sur les cellules tumorales en induisant principalement de l'apoptose et/ou de l'inhibition de prolifération ou de survie. Les études qui ont permis de caractériser les mécanismes d'action directs ont été réalisées à partir de cultures cellulaires en 2D. Or, nous avons vu que la structuration 3D influençait la réponse aux agents thérapeutiques et notamment aux AcMo (260, 287). De plus, les données concernant les mécanismes d'action du GA101 sont encore peu nombreuses et les expériences n'ont encore jamais été menées dans un contexte de culture en 3D.

Ainsi, nous avons déterminé la nature des effets directs du RTX et du GA101 dans le modèle de culture en 3D de LF, les MALC. Pour cela, nous avons traité les MALC dès la goutte puis tous les cinq jours jusqu'à 20 jours de culture (dans le but de se rapprocher le plus possible des protocoles cliniques). Les MALC ont été prélevés et analysés aux jours 5, 10 et 20.

Afin de prouver la pertinence de ce modèle, certaines expériences ont également été réalisées en parallèle sur des xénogreffes et sur des cellules RL cultivées de manière classique en 2D.

Avant de détailler les résultats obtenus sur l'effet des AcMo dans des modèles en 3D, il est important de s'attarder ici sur une technique innovante de cytométrie en flux: le *fluorescent cell barcoding*.

1- Principe du *fluorescent cell barcoding*

Le *Fluorescent cell barcoding* (FCB) est une technique innovante développée par Krutzik et ses collaborateurs pour laquelle j'ai été formée en 2011 au sein de l'équipe de Gary Nolan à Stanford. Cette technique permet de réaliser des études multiparamétriques en cytométrie en flux même pour des populations rares. Le FCB consiste à attribuer un « code-barre » fluorescent à chacune des conditions expérimentales (traitements, types cellulaires, cinétique) puis de les combiner en un seul tube pour réaliser un seul marquage et une seule acquisition au cytomètre (Figure 42) (288).

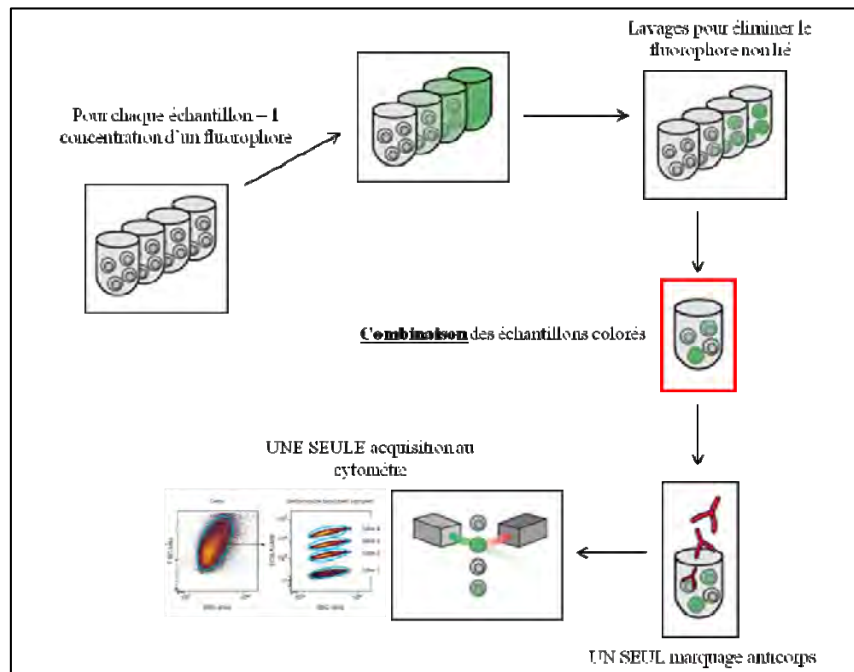


Figure 42: Étapes de la technique du fluorescent cell barcoding.
Exemple pour une expérience avec 4 échantillons.

Un des principaux avantages du FCB est d'atténuer les variations inter-échantillons. En effet, tous les échantillons sont manipulés en même temps ce qui annihile par exemple les variations de volume ou encore les différences temporelles. De plus, cela permet de minimiser la consommation de réactifs et d'optimiser le temps d'acquisition tout en augmentant la précision des résultats.

En 2006, Krutzik et Nolan publient le FCB comme une technique permettant d'allier haut débit et analyses fiables (289). Cette technique est très utilisée pour l'analyse de marquages membranaires, de cytokines intracellulaires mais également de phospho-protéines. Pour illustrer cette technique, on peut citer une étude menée par J. Irish et ses collaborateurs en 2010 dans laquelle ils mettent en évidence une sous-population dite LNP (*Lymphoma Negative Prognostic*) caractérisée par une insensibilité du BCR (290). Mettre en évidence cette sous-population a impliqué de travailler sur de faibles quantités de matériel biologique. En même temps, il leur a fallu tester de nombreuses voies de signalisation sur cette sous-population afin de déterminer une signature moléculaire caractéristique.

Les analyses de ce type d'expériences sont réalisées grâce au logiciel Cytobank développé au sein de cette même équipe par Nikesh Kotesha. Facile et rapide, ce logiciel permet, outre

l'analyse, le stockage et/ou le partage de données depuis n'importe quel ordinateur grâce à une simple connexion internet et ce, de façon gratuite.

Ainsi, à titre d'exemple d'utilisation du FCB, nous avons comparé les signaux induits après activation du TCR des lymphocytes T V γ 9V δ 2.

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont des lymphocytes T exprimant un TCR $\gamma\delta$. Ils peuvent réagir rapidement et localement sans passer par un organe lymphoïde secondaire pour s'activer. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont un rôle très important dans l'immunité anti-tumorale notamment grâce à leurs fonctions cytotoxiques et de sécrétion de cytokines. Ils sont dits « non conventionnels » et reconnaissent des antigènes très conservés (291), non peptidiques (naturels ou de synthèse) de faible masse moléculaire appelés phosphoantigènes (PAg) (292). Le PAg synthétique le plus puissant dont on dispose actuellement est le Bromohydrine pyrophosphate ou BrHPP (293).

Par ailleurs, une étude récente a identifié la protéine CD277/ butyrophiline-3A (BTN3A) comme un nouveau stimulus spécifique des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (294, 295). BTN3A est une protéine membranaire qui, suite aux interactions cellule – cellule, peut contribuer à l'activation des lymphocytes T. De plus, BTN3A a été montré comme entraînant une réponse des lymphocytes T V γ 9V δ 2, hautement spécifiques des PAg. En revanche, il n'a pas encore été déterminé si BTN3A est un ligand direct du TCR, une molécule présentant des PAg ou encore un co-récepteur spécifique.

Ainsi, nous avons analysé, par la technique du FCB, les signaux intracellulaires induits par ces deux types de stimulation spécifique (BrHPP ou BTN3A) des lymphocytes T V γ 9V δ 2 afin d'apporter de nouvelles données quant à l'identification des mécanismes d'action de ces deux agents.

Ces travaux font l'objet d'un article soumis à *Journal of Immunology* (article 1).

Similar signaling to phosphoantigens and butyrophilin A3 in human TCRV γ 9⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes

Authors: Emilie Decaup*¹⁻⁶, Caroline Duault*¹⁻⁵, Christine Bezombes^{1-5#}, Mary Poupot¹⁻⁵, Ariel Savina⁷, Daniel Olive⁸, Jean-Jacques Fournie¹⁻⁵

Adresses:

¹ INSERM /Unité Mixte de Recherche 1037-Centre Recherche en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France

² Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France

³ ERL 5294 CNRS, Hôpital Purpan, Toulouse, France

⁴ Laboratoire d'Excellence 'TOUCAN'

⁵ Institut Carnot 'CALYM'

⁶ Institut de Recherche Roche, Boulogne Billancourt, France

⁷ Roche SAS, Boulogne Billancourt, France

⁸ INSERM/Unité Mixte de Recherche 1068, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France

* these authors equally contributed to this work

correspondence: christine.bezombes-cagnac@inserm.fr, **phone:** +335 6274 8368

Running title: Phosphoantigen and CD277 signaling pathway

Keywords: activation, cell barcoding, gamma-delta, phosphoflow cytometry, T-lymphocyte, signal transduction

Abbreviations: BTN3A: butyrophilin 3A, BrHPP: bromohydrin pyrophosphate, mAb: monoclonal antibody, PAg: phosphoantigen

Grant support: This work was supported in part by institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Toulouse III: Paul Sabatier, the Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN) and the Institut Carnot Lymphome (CALYM).

Abstract

Human $\gamma\delta$ cells expressing TCRV γ 9 are T lymphocytes with great potential for cancer immunotherapy and unconventional pattern of antigen specificity. These HLA-unrestricted lymphocytes are specifically reactive to non-peptide metabolites (phosphoantigens) and to the butyrophilin 3A (BTN3A/CD277) protein. Whether recognition of such highly different structures trigger the same activation signaling pathway remains unclear, however. Here we combined fluorescent cell barcoding and phosphoflow analysis of TCRV γ 9⁺ T lymphocytes to compare simultaneously the level of several signaling phosphoproteins after activation by phosphoantigen (BrHPP) or by anti-BTN3A (monoclonal antibody 20.1). This approach shows that the same pathways involving ZAP70, PLC γ 2, Akt, NF κ B p65, MAPK p38 and Erk1, were induced by either of these stimuli. These data strongly suggest the TCRV γ 9⁺ T lymphocytes detect phosphoantigens and butyrophilin A3 by the same recognition process.

Introduction

The antigenic specificity of $\gamma\delta$ T cells remains largely unknown, except in a few cases. Most circulating human $\gamma\delta$ T lymphocytes in adults express a V γ 9V δ 2 T cell receptor (TCR) specific for non-peptide phosphoantigens (PAgs), a small group of phosphorylated metabolites from isoprenoid pathway (1-3). Natural PAgs include hydroxy-methyl-butenyl pyrophosphate, isopentenyl pyrophosphate, and dimethylallyl pyrophosphate that are produced by microbes and cancer cells, respectively. BrHPP is a synthetic PAg developed as TCRV γ 9V δ 2⁺ T lymphocyte-selective immunostimulating drug for cancer immunotherapies; its bioactivity is similar as those of natural phosphoantigens (4). In addition, aminobisphosphonates or alkylamines inducing accumulation of endogenous PAgs also activate yet indirectly the same subset of TCRV γ 9V δ 2 T cells (5-7).

A recent work identified the CD277/ butyrophilin-3A (BTN3A) protein as another specific stimulus for the same subset of PAg-reactive $\gamma\delta$ T lymphocytes (8, 9). BTN3A is a type 1 membrane protein member of the B7 superfamily, including butyrophilin and Skint receptors. Upon cell-cell interactions, these molecules generally contribute to tune activation of antigen-stimulated T lymphocytes, and BTN3A was shown to determine a highly specific PAg-response of TCRV γ 9V δ 2⁺ T lymphocytes. How V γ 9V δ 2 TCR⁺ cells recognize PAgs or butyrophilins remains unclear however (10). Whether BTN3A is a TCR ligand, a PAg-presenting molecule or a TCRV γ 9V δ 2⁺-specific co-receptor interacting in parallel yet on the same cells is unknown. We reasoned that identifying the respective intracellular signaling cascade triggered by either soluble BrHPP or BTN3A-specific antibody 20.1 (11) could help to address this question.

Simultaneous analysis at the single cell level of different phosphoproteins mediating the intracellular transduction of activation signaling in V γ 9V δ 2 TCR⁺ cells is not easy task, however.

Although flow cytometry allows study at the single cell level, its relatively low throughput has led to the recent development of a cell-based multiplexing technique called fluorescent cell barcoding (FCB). In FCB, individual cell samples are "barcoded" by staining with fluorescent dyes such as to harbour a specific fluorescent signature of the sample or the experimental condition. With this new method, different experimental conditions can be mixed together, stained and analyzed as a single sample without hampering the final recovery of each barcoded condition (12).

Here, we combined fluorescent cell barcoding with intracellular phosphoflow cytometry (13) to compare simultaneously several signaling phosphoproteins in TCRV γ 9⁺ cells stimulated by BrHPP or BTN3A-specific antibody. This new approach demonstrates that both stimuli induce the same signaling phosphoproteins and kinetics.

Materials and Methods

Cell assays

Production and culture of primary TCRV γ 9⁺ cell lines (purity > 95% of the viable cells) were as described (14). Prior to experiments, these cell lines were washed twice and re-suspended (1.5×10^6 /ml) in complete RPMI 1640 culture medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Hy1, ThermoScientific, USA), 2 mM L-glutamine, 100 μ g/ml streptomycine, 100 IU/ml penicillin and 1 mM sodium-pyruvate (Cambrex Biosciences, Rockland, ME, USA). Cells were then stimulated by BrHPP (200 nM) (Innate Pharma, Marseille, France) or by the anti-BTN3A activating antibody (clone 20.1, 10 μ g/ml) (9, 11). At the specified time points after stimulation, cells were processed for fluorescent cell barcoding and phosphoflow analysis.

Fluorescent cell barcoding and phosphoflow analysis

Cells were washed, fixed and permeabilized with 2% paraformaldehyde and 1% saponine plus 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) prior to washing. For fluorescent cell barcoding, cells were re-suspended in ice-cold PBS containing 0.5% saponin, mixed, and stained with either Cell Barcoding dye 450, Cell Barcoding dye 500 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) or DMSO for 30 minutes at 4°C. According to manufacturer's instructions, each experimental condition was encoded by a specific concentration of cell barcoding dye. Cells were washed and re-suspended in a residual volume prior to splitting equally into 5 FACS tubes for parallel stainings of intracellular phosphoproteins. Both anti-CD3-PE-Cy7 (Beckman Coulter, Villepinte, France), anti-TCRV γ 9-PE or anti-TCRV γ 9-FITC (BD Biosciences) and conjugated phosphoprotein-specific antibodies were added to each tube for 30 minutes at room temperature. The conjugated phosphoprotein-specific antibodies were all from BD Biosciences: phospho-ZAP70(Y319)/Syk(Y352)-Alexa Fluor 647, phospho-Akt(T308)-PE, phospho-Akt(S473)-Alexa Fluor 647, phospho-Erk(T202/Y204)-FITC, phospho-Stat6(Y641)-Alexa Fluor 647, phospho-PLC γ 2(Y759)-Alexa Fluor 647, phospho-NF κ B p65(S529)-PE, phospho-p38 MAPK(T180/Y182)-Alexa Fluor 488. Cells were then washed and analysed by flow cytometry on LSRII (BD Biosciences) by acquiring at least 50,000 events from each gated condition. Final comparative analysis including deconvolution of experimental settings and data processing of were done with Cytobank (www.cytobank.org). The mean of fluorescence intensity (mfi) for each stimulated sample was divided by the mfi of its respective control sample (prior to stimulation) to determine a fold change. Using Cytobank, fold changes were represented by colored histograms, with color scales indicated in each figure.

Statistics

Results shown are representative from ($n=6$) independent experiments with different primary $\gamma\delta$ cell lines. One-tailed, paired Student's t tests were used whenever appropriate using $\alpha = 5\%$ for significant difference.

Results & Discussion

Monitoring $\gamma\delta$ T cell activation by fluorescent cell barcoding and phosphoflow cytometry

Several TCRV γ 9⁺ T cell lines were stimulated with either BrHPP or the anti-CD277 20.1 mAb and their respective expression of several intracellular signaling phosphoproteins at various time points could be compared simultaneously thanks to a single staining experiment. For each cell line to be tested, the matrix of experimental conditions comprised one unstimulated control and 5 post-activation time points which were respectively encoded by different concentrations of the fluorescent cell barcoding dyes CBC450 and CBC500. In each tube of the experiments, the staining was done with reagents for several different intracellular phosphoproteins and mAbs for the cell surface phenotyping. Further deconvolution of the dot plots from gated CD3⁺ TCRV γ 9⁺ cells for CBC450 *versus* CBC500 allowed identification of each experimental condition (Fig. 1). For example, the level of phospho-p38 in TCRV γ 9⁺ cells was significantly increased 30 minutes after stimulation with BrHPP ($p=4.10^{-5}$) compared to the untreated cells, since the ratio ($\text{mfi}_{\text{treated cells}}/\text{mfi}_{\text{untreated cells}}$) was of 2.74 (Fig. 1), indicating that BrHPP triggered the intracellular signaling by the MAPK/p38 pathway.

BrHPP and anti-CD277 induce the same signaling events in V γ 9V δ 2 T lymphocytes

Phosphorylation of ZAP70 is an upstream signalling event induced by TCR-driven T cell activation (15). Likewise, the TCRV γ 9⁺ $\gamma\delta$ cells activated by either BrHPP or by the anti-CD277 mAb 20.1 increased their intracellular level of phospho-ZAP70(Y319)/Syk(Y352) when compared to the unstimulated counterparts (mean of 1.1 fold increase of mfi, $p=10^{-2}$) (Fig.2A).

Activation of the phosphoinositide-specific phospholipase PLC γ 2 takes part to the TCR signalling cascade by triggering the phosphoinositide pathway. Here, both BrHPP and anti-

CD277 mAb induced the phosphorylation of the PLC γ 2 residue Y759 in the TCRV γ 9⁺ $\gamma\delta$ cells, reflecting activation of this signaling enzyme. (on average 1.1 fold increase of mfi, $p < 10^{-3}$) (Fig.2B).

Along the activation cascade, the phosphatidylinositol (4,5)-diphosphate down-product of PLC γ 2 activation is phosphorylated into phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. This latter allows activation of the downstream protein kinase Akt upon phosphorylation of its T308 and S473 residues by PDK1 and mTORC2, respectively. We thus tested whether Akt was phosphorylated accordingly, and found that the $\gamma\delta$ cells significantly increased their level of both phospho-Akt (T308) and phospho-Akt (S473) upon stimulation by either BrHPP or anti-CD277 mAb 20.1 (on average: 1.2 fold increase of mfi for phospho-Akt (T308), $p < 10^{-3}$, same values for phospho-Akt (S473)) (Fig.2C).

As a consequence of activation, Akt regulates cell survival and metabolism, *inter alia* by activating the p65 component of NF κ B through phosphorylation of the S529 residue, such as to relocate in the nucleus. We tested whether the NF κ B p65 component of the $\gamma\delta$ cells was phosphorylated upon stimulation, and found that NF κ B phospho-p65 was significantly increased by either stimulus (average range: 1.2-1.6 fold increase of mfi, $p < 10^{-3}$) (Fig. 2D).

In addition to the phosphoinositide/NF κ B transducing pathway, TCR-driven extracellular activation also triggers the MAPK pathway, yielding phosphorylation of Erk1 on its T202/Y204 residues and phosphorylation of p38 on its T180/Y182 residues. Analysis of these two MAPK components showed that BrHPP or the anti-CD277 mAb 20.1 strongly increased their levels in the $\gamma\delta$ cells (mean range: 1.1-2.3 fold increase of mfi, $p < 10^{-3}$) (Fig. 2E).

Distinct from TCR-driven signaling pathways, signalling cascade of cytokines such as IL4 involves the phosphorylation of Stat6 at residue Y641. Nevertheless in the $\gamma\delta$ cells, neither BrHPP nor anti-CD277 mAb 20.1 induced this phosphorylation target (Fig. 2F).

This study illustrates how the combined use of fluorescent cell barcoding and phospho-flow cytometry is a straightforward method to delineate several signalling pathways simultaneously and at the single cell level. When applied to human $\gamma\delta$ T lymphocytes stimulated by two different yet TCRV γ 9-specific stimuli, this approach unveiled the similarity of their respective intracellular signal transduction pathways. Namely in these cells, either the soluble phosphoantigen BrHPP or the anti-butyrophilin A3 antibody do induce the same activation signalling cascades through ZAP70, PLC γ 2, Akt, NF κ B p65, MAPK p38 and Erk1, but not by Stat6.

The only difference found between these stimuli were their respective kinetics. The signalling events induced by BrHPP and anti-BTN3A showed similar starts, but a trend to stop earlier with the anti-BTN3A. The earliest transduction steps at ZAP70 and PLC γ 2 showed a significantly shorter lifespan ($p < 10^{-4}$) when induced by anti-BTN3A than by BrHPP (e.g. phospho-ZAP70 by 60 and 120 minutes after stimulation, Fig. 2A). By contrast, the most downstream transduction steps, namely phosphorylation of Akt, p38, Erk1, or NF κ B p65 showed almost identical long lasting kinetics within both conditions. Although this difference is currently unexplained, it might simply reflect the structural difference between a small molecular weight hydrosoluble ligand and a cell-binding monoclonal antibody.

By contrast with butyrophilin 2A2 which negatively interferes with T cell activation (16), butyrophilin A3 is mandatory to TCR-driven activation of human TCRV γ 9⁺ T lymphocytes, and

notably for their response to phosphoantigens (9). Although presently, much remains to be done to establish a unifying structural model for TCR-mediated antigen recognition by human TCRV γ 9⁺ T lymphocytes (10), these data document their quite conventional pathways of activatory signal transduction.

Beyond, this report strongly supports a model which posits phosphoantigens and BTN3A in the same molecular recognition process leading to TCR-driven signal transduction in human TCRV γ 9⁺ T lymphocytes (8, 9).

Acknowledgements

We are grateful to all members of our laboratory for critical discussions and technical advices on this work, Innate Pharma for providing us with BrHPP, BD Biosciences for reagents, G. Nolan, J. Irish, N. Kotesha, P. Krutzik early for technical advice and access to Cytobank facility.

Authorship and conflict of interest

E.D and C.D. performed experiments and analyzed data, M.P. and C.B. designed experiments and D.O. and J.J.F. supervised the study and wrote the manuscript. Authors declare no relevant conflict of interest.

References

1. Constant, P., F. Davodeau, M. A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville, and J. J. Fournie. 1994. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264:267-270.
2. Poupot, M., and J. J. Fournie. 2004. Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunol Lett* 95:129-138.
3. Belmant, C., D. Decise, and J. J. Fournie. 2006. Phosphoantigens and aminobisphosphonates: New leads targeting gamma delta T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 3:17-23.
4. Espinosa, E., C. Belmant, F. Pont, B. Luciani, R. Poupot, F. Romagne, H. Brailly, M. Bonneville, and J. J. Fournie. 2001. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J Biol Chem* 276:18337-18344.
5. Kunzmann, V., E. Bauer, and M. Wilhelm. 1999. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* 340:737-738.
6. Gober, H. J., M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori, and G. De Libero. 2003. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 197:163-168.
7. Thompson, K., and M. J. Rogers. 2004. Statins prevent bisphosphonate-induced gamma,delta-T-cell proliferation and activation in vitro. *J Bone Miner Res* 19:278-288.
8. Palakodeti, A., A. Sandstrom, L. Sundaresan, C. Harly, S. Nedellec, D. Olive, E. Scotet, M. Bonneville, and E. J. Adams. 2012. The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *J Biol Chem* 287:32780-32790.
9. Harly, C., Y. Guillaume, S. Nedellec, C. M. Peigne, H. Monkkonen, J. Monkkonen, J. Li, J. Kuball, E. J. Adams, S. Netzer, J. Dechanet-Merville, A. Leger, T. Herrmann, R. Breathnach, D. Olive, M. Bonneville, and E. Scotet. 2012. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood* 120:2269-2279.
10. Kabelitz, D. 2012. CD277 takes the lead in human gammadelta T-cell activation. *Blood* 120:2159-2161.
11. Compte, E., P. Pontarotti, Y. Collette, M. Lopez, and D. Olive. 2004. Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur J Immunol* 34:2089-2099.
12. Krutzik, P. O., M. R. Clutter, A. Trejo, and G. P. Nolan. 2011. Fluorescent cell barcoding for multiplex flow cytometry. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.]* Chapter 6:Unit 6 31.
13. Krutzik, P. O., J. M. Crane, M. R. Clutter, and G. P. Nolan. 2008. High-content single-cell drug screening with phosphospecific flow cytometry. *Nature chemical biology* 4:132-142.
14. Capietto, A. H., L. Martinet, and J. J. Fournie. 2011. Stimulated gammadelta T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer. *J Immunol* 187:1031-1038.
15. Straus, D. B., and A. Weiss. 1993. The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J Exp Med* 178:1523-1530.

16. Ammann, J. U., A. Cooke, and J. Trowsdale. 2013. Butyrophilin Btn2a2 inhibits TCR activation and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway signaling and induces Foxp3 expression in T lymphocytes. *J Immunol* 190:5030-5036.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1: Deconvolution of the fluorescent barcoded TCRV γ 9⁺ γ δ cells identifies each of the the different experimental settings in the same test tube. The specified phosphoprotein staining of each stimulated population is compared to its respective unstimulated control as shown by overlaid histograms with the fold change (mfi_{test} *versus* mfi_{control}) represented by the indicated color scale.

Figure 2: BrHPP or anti-CD277 mAb 20.1 activate similar signaling pathways in TCRV γ 9⁺ cells. A to F. Representative histogram overlays of TCRV γ 9⁺ γ δ primary cell lines stained for P-ZAP70(Y319) (A), P-PLC γ 2(Y759) (B), P-Akt(T308) and (S473) (C), P-NF- κ Bp65(S529) (D), P-Erk(T202/Y204) and P-p38 MAPK(T180/Y182) (E) and P-Stat6(Y641) (F). Cells were analysed at the specified time points after activation by BrHPP or by anti-CD277 mAb.

Figure 1:

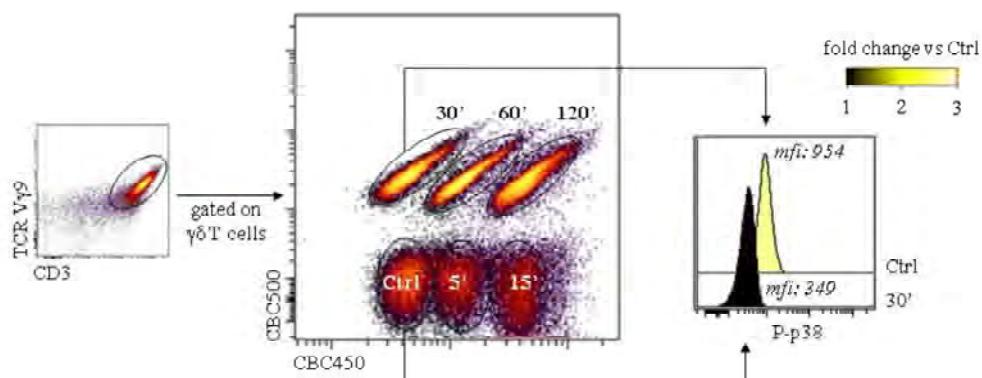
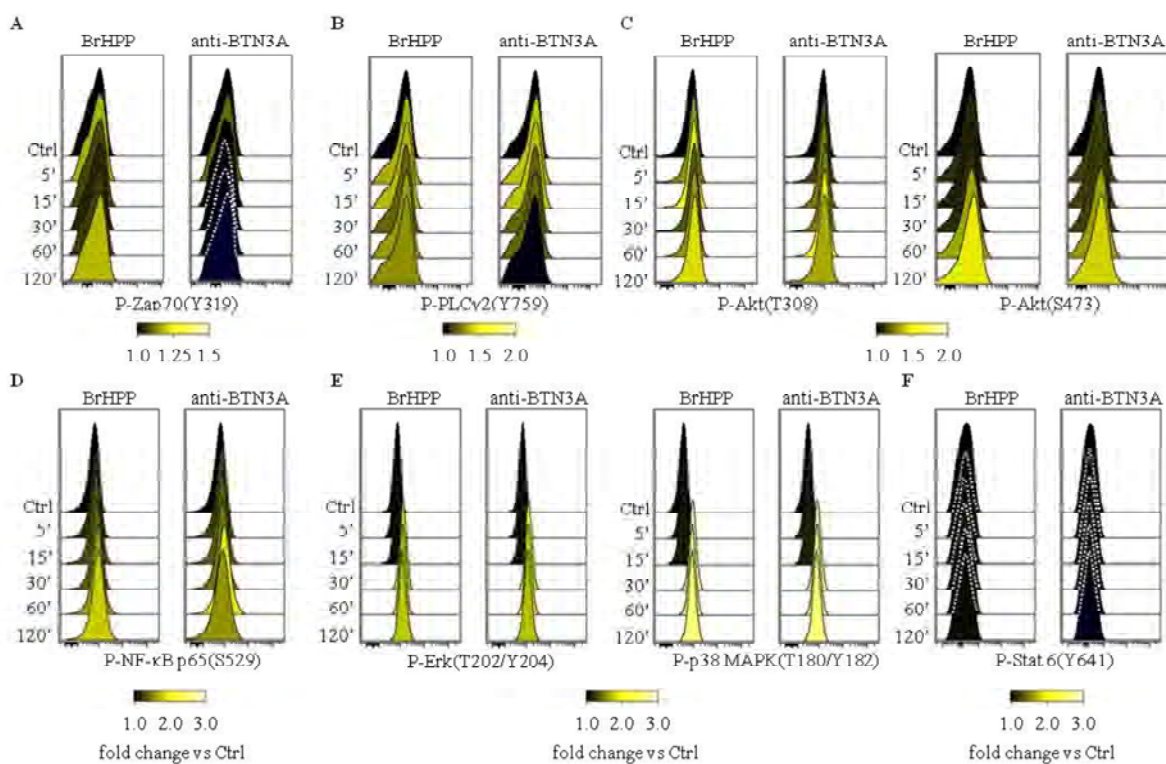


Figure 2:



Outre le message concernant les mécanismes d'action du BrHPP et de l'AcMo anti-BTN3A, cette étude nous a permis de valider la technique du FCB en réalisant les marquages de façon simultanée à tous les temps de stimulation. En effet, ici, à chaque temps de stimulation a été attribué un « code-barre » fluorescent. Ainsi cette technique représente un gain de temps lors de l'expérimentation mais apporte surtout une homogénéité de marquage entre les différentes conditions.

Au final, le FCB ainsi que le logiciel Cytobank sont deux outils facilitant la vie des cytométristes en terme de gain de temps, d'économie de réactifs et d'augmentation de la qualité des expériences et de leurs analyses. Cette technique a également été utilisée dans la suite de mes travaux.

Nous montrons ainsi que les deux agents activateurs induisent des événements similaires concernant la cascade de signalisation en aval du TCR impliquant ZAP70, PLC γ 2, Akt, NF κ B p65, MAPK p38 et Erk. La seule différence réside dans les cinétiques respectives d'activation. Les événements induits par le BrHPP et l'Ac anti-BTN3A débutent aux mêmes moments mais les signaux activés par l'Ac anti-BTN3A semblent s'arrêter plus tôt que ceux provenant de la stimulation au BrHPP.

Cette étude plaide en faveur d'un modèle qui positionne les PAgS et BTN3A dans le même processus de reconnaissance moléculaire aboutissant à la transduction d'un signal TCR dans les lymphocytes T V γ 9V δ 2.

2- Déplétion directe des cellules B par le RTX et le GA101

Le RTX est un AcMo utilisé comme traitement standard dans le traitement des LF. Ses mécanismes d'action ont été étudiés depuis de nombreuses années. De nombreuses études ont permis de connaître ses effets biologiques mais également de comprendre les mécanismes de résistance mis en place par les cellules tumorales. Le LF étant une pathologie incurable, le GA101 a été développé dans le but d'augmenter l'efficacité de cette stratégie d'immunothérapie et de pallier les mécanismes de résistance.

Afin de développer de nouvelles stratégies ou améliorer celles déjà existantes, il est nécessaire de bien comprendre les mécanismes d'action des agents thérapeutiques *in vitro*. Plusieurs équipes ont comparé les mécanismes d'action de ces deux AcMo. Il en ressort que le RTX et le GA101 présentent des caractéristiques des AcMo de type I et de type II respectivement. En effet, le RTX induit une relocalisation du CD20 dans les radeaux lipidiques, tandis que le GA101 entraîne une agrégation homotypique (195). Ces deux AcMo sont capables d'induire la mort des cellules tumorales de manière directe notamment par apoptose mais également, pour le GA101, par une mort lysosomale caspase-indépendante. Toutes les études *in vitro* ont été réalisées dans des modèles de culture cellulaire classique en 2D.

Le rôle de la masse tumorale dans l'efficacité thérapeutique a été de longue date étudié dans les tumeurs solides mais très peu dans les hémopathies malignes. Pourtant, il a été récemment montré que celle-ci influence la réponse aux traitements dans les LF (252, 287).

Afin de nous rapprocher de la physiopathologie, nous avons étudié les mécanismes d'action du RTX et du GA101 dans les MALC, un modèle de culture 3D de cellules de LF plus relevant en terme de signature génomique et d'architecture spatiale (Gravelle *et al.*, en révision).

Ainsi, nous avons traité les MALC dès la goutte puis tous les cinq jours pendant 20 jours. Nous avons essayé de nous rapprocher autant que possible du traitement effectué en clinique (une injection par semaine pendant quatre semaines). Les MALC ont été analysés à 5, 10 et 20 jours de culture. Toutes les expériences présentées dans l'article ont été réalisées avec des cellules RL mais également avec des cellules DEAU (lignée de DLBCL) et Raji (lignée de lymphome de Burkitt) afin de ne pas restreindre le modèle et l'étude à une seule lignée cellulaire. Pour prouver la relevance de ce modèle *in vitro*, certains résultats seront comparés

à ceux obtenus *in vivo* avec des xéno greffes de cellules RL dans des souris SCID-beige, ou à des biopsies de patients grâce à notre collaboration avec le Dr. C. Laurent (Service d'Anatomie et cytologie pathologiques, CHU Purpan, Toulouse). Certaines expériences ont également été réalisées avec des cultures cellulaires classiques en 2D.

Ainsi, nous avons dans un premier temps, analysé l'impact des AcMo sur la croissance des MALC. Suite à cela, nous avons déterminé le type de mort cellulaire induite par le RTX et la GA101 et l'impact de ces deux AcMo sur les voies de signalisation que l'on sait suractivées dans le LF. Enfin, nous avons évalué si les AcMo étaient capables de sensibiliser les MALC aux agents chimiothérapeutiques.

Ces travaux font l'objet d'un article accepté à *Blood Cancer Journal* (article 2).

ORIGINAL ARTICLE

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

E Decaup^{1,2,3,4,5,6}, C Jean⁷, C Laurent^{8,9}, P Gravelle^{1,2,3,4,5}, S Fruchon⁸, F Capilla¹⁰, A Marrot¹⁰, T Al Saati¹⁰, F-X Frenois⁹, G Laurent^{1,2,3,4,5,11}, C Klein¹², N Varoquaux¹³, A Savina¹⁴, J-J Fournie^{1,2,3,4,5} and C Bezombes^{1,2,3,4,5}

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

Blood Cancer Journal (2013) 3, e131; doi:10.1038/bcj.2013.32; published online 9 August 2013

Keywords: spatial organization; monoclonal antibodies; follicular lymphoma; 3D model

INTRODUCTION

Follicular lymphoma (FL) is the second most common type of B non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and makes up 40% of all adult lymphomas. Although the prognosis of FL is variable, most patients with aggressive forms of FL (with a high FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) score) ultimately die from their disease and median survival is 5–8 years.¹ In recent years, impressive progress has been made in the treatment of NHL, mainly due to combining chemotherapy with rituximab (RTX), a monoclonal antibody (MAb) directed against the membrane-associated CD20 antigen.

Considerable efforts to characterize the mechanisms underlying the de-regulation of B-cell functions in NHL have identified the involvement of B-cell receptor components, various kinases such as Btk, Syk and PKC, as well as canonical pathways, including PI3K (phosphoinositide-3 kinase)/Akt or nuclear factor-kappaB modules.^{2–6} Signaling induced by RTX treatment involves raft microdomains and causes activation or inhibition of several pathways responsible for apoptosis or proliferation/survival (for reviews, see Bonavida² and Bezombes *et al.*³). Moreover, the efficacy of RTX is believed to involve antibody-mediated mechanisms of action such as complement-dependent cytotoxicity and antibody-dependent cell cytotoxicity through Fcγ receptor-expressing cells, such as NK cells, γδ T lymphocytes and macrophages.^{7,8} Although significant advances have been

achieved using RTX in both progression-free and overall survival, a significant number of cases remain incurable and patients develop RTX-refractory disease. Thus, novel anti-CD20 antibodies have been developed such as obinutuzumab (GA101), a glycoengineered type II CD20 antibody that induces enhanced antibody-dependent cell cytotoxicity and direct cell death compared with RTX. Unlike type I antibodies, type II antibodies do not translocate CD20 into raft microdomains and display less complement-dependent cytotoxicity than type I antibodies.^{9–11} GA101 also induces a non-apoptotic cell death involving homotypic adhesion, lysosomal permeabilization, cathepsin release and production of radical oxygen species (ROS).^{12,13} Phase I/II trials of GA101 have shown promising activity, and it is currently being studied in several pivotal trials in indolent NHL, diffuse large B-cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia.^{14,15}

Like most carcinomas, NHL grow as spherical tumors. Based on carcinoma 3D models (often described as spheroids), it is acknowledged that spatial organization may profoundly affect tumor cell behavior as important functions are dictated by the collective properties of a cell population rather than those of a single cell. These include growth, metastasis, cell-to-matrix and cell-to-cell interaction, as well as intracellular signaling and resistance to anti-tumor agents or even immune escape.^{16–19} Spatial organization can exert these effects in cancer cells by

¹INSERM UMR1037–Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France; ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France; ³ERL 5294 CNRS, BP3028, Hôpital Purpan, Toulouse, France; ⁴Institut Carnot Lymphome–CALYM, Toulouse, France; ⁵Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer–TOUCAN, Toulouse, France; ⁶Institut de Recherche Roche, Boulogne Billancourt, France; ⁷Moores UCSD Cancer Center, Department of Reproductive Medicine, La Jolla, USA; ⁸INSERM UMR1043–Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan, Toulouse, France; ⁹Service Anatomie Pathologique CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France; ¹⁰INSERM, US006, ANEXPL/CREFRE, Service d'Histopathologie, CHU Purpan, Toulouse, France; ¹¹Service d'Hématologie, CHU Purpan, Toulouse, France; ¹²Roche Glycart AG, Pharma Research and Early Development (pRED), Schlieren, Switzerland; ¹³F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Switzerland and ¹⁴Roche S.A.S, Boulogne Billancourt, France. Correspondence: Dr C Bezombes, Cancer Research Center of Toulouse, INSERM U1037, CHU Purpan, Toulouse 31024, France. E-mail: christine.bezombes-cagnac@inserm.fr



affecting gene expression profiles^{18,19} or influencing major signaling pathways, such as those driven by mitogen-activated protein kinase, Akt and oncogenic products, such as HER-2.²⁰ More importantly, spatial organization is known to influence the response to antibodies, such as Trastuzumab or Pertuzumab.^{20,21}

Conventional 2D NHL cell culture models do not reflect the true effects of antibodies as they occur *in vivo* and may be of limited use. Thus, we recently created a NHL 3D culture system, the so-called multicellular aggregates of lymphoma cells (MALC) model, using a modification of the 'hanging drop' method.²² This model is useful for evaluating tumor sensitivity to antibodies as diffusion/distribution is different within a solid 3D tumor.²³

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

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and MABs

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

MALC preparation

MALC were obtained by the hanging drop method.²² Briefly, drops (20 µl) of 10⁴ RL, DEAU or Raji cells (day 0) in complete medium enriched with 1% methylcellulose (MethoCult H4230, StemCell Technologie, Grenoble, France) were placed onto the lid of a 24-well plate, which was then inverted over a plate containing 1 ml of medium. Hanging drop cultures were incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂. In parallel, a layer of 1% agarose (Life Technologies, St Aubin, France) in classical medium was added to another 24-well plate and stored for 24 h at 4 °C. After 24 h, the resulting cellular aggregates were transferred to the agarose plate and cultured at 37 °C in 5% CO₂. MABs were applied to the initial drop and every 5 days thereafter.

MALC volume was calculated using the formula $V = 4/3 \times \Pi \times L \times I^2$ (where L is the longest diameter and I is the shortest diameter).

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

Pictures were taken with a fluorescent inverted microscope Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Champigny Sur Mame, France) at magnification $\times 40$.

Viable cell number was determined by counting cells on a Malassez hemocytometer (D. Dutscher, Brumath, France) using the trypan blue exclusion method.

RL lymphoma xenograft

A total of 10 \times 10⁵ RL cells were subcutaneously injected into the right flank of SCID-Beige mice, according to the INSERM Animal Care and Use Committee-approved protocol. When tumor volumes (TVs) reached 100 mm³, the mice were divided into three groups of 8–10 animals. Phosphate-buffered saline (PBS), RTX- or GA101-treated groups were injected intraperitoneally twice a week with 25 mg/kg MAB. Tumor burden was measured three times per week with a caliper, and TV calculated using the formula $TV = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$. Animals were killed when the TV reached 2000–2500 mm³; tumor weight was measured at this time point. Tumors were embedded in paraffin and processed for immunohistochemistry labeling as described below.

Immunohistochemistry labeling

Immunostaining was performed using an automated stainer (Benchmark XT; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Antibodies directed against active anti-caspase 3 (R&D Systems, Lille, France), Ki67 (Abcam, Cambridge, UK), laminin and fibronectin (Sigma-Aldrich, Lyon, France) were used. After overnight incubation, sections were incubated with the avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Clinisciences, Nanterre, France) followed by the 3,3'-diaminobenzidine chromogen

solution and were then counterstained with hematoxylin. Negative controls were incubated in buffered solution without primary antibody.

Caspase 3 active detection by confocal microscopy

Untreated or anti-CD20 MAB-treated MALC were fixed after 20 days in 4% paraformaldehyde. MALC were pretreated with 0.1 M sodium citrate pH 6.0 by microwave incubation, permeabilized with 0.1% saponin and stained overnight at 4 °C with anti-active caspase 3 antibody (a-CASP3; rabbit polyclonal, dilution 1:1000, Abcam) in PBS, 3% bovine serum albumin/4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid and 0.1% saponin. Primary Ab was revealed by a goat anti-rabbit Ab labeled with Alexa 633 (Life Technologies) for 2 h at room temperature. Control was realized using the secondary Ab without anti-CASP3 Ab. Samples were mounted in Fluorescence Mounting Medium (DAKO, Les Ulis, France) and examined using a Zeiss LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss, Marly Le Roi, France) with a $\times 63$ Plan-Apochromat objective (1.4 oil). To detect Alexa 633 fluorescence, a helium laser was filtered at 633 nm. For each analyses, standardized conditions for pinhole size, gain and offset (brightness and contrast) were used for image capture.

In vivo caspase 3-positive cell quantification

Immunohistochemical-stained slides were digitized using a Panoramic 250 Flash digital microscope (P250 Flash, 3DHisTech, Budapest, Hungary). Whole slides were scanned using brightfield scan mode with a 20X/NA0.80 Zeiss Plan-Apochromat dry objective, and images were acquired with a two megapixel 3CCD color camera (CIS Cam Ref#VCC-F52U25CL, CIS Americas Inc., Tokyo, Japan), achieving a 0.22 µm/pixel resolution, corresponding to a $\times 56.09$ magnification at the highest optical resolution in conventional microscopy. Panoramic Viewer and HistoQuant software were used for viewing and analyzing the digital slides, respectively (RTM 1.15.0.53, 3DHisTech). A minimum of 12 annotations per slide covering >80% of the entire tissue were analyzed using the same profile file with the following characteristics: noise reduction (median filter strength = 3), object definition (HSV: 44 < Hue < 115, 36 < Saturation < 196, 5 < Value < 250; filtering by size: valid objects > 15 µm²) and object separation according to a 10-pixel distance between the center points of the two objects. These settings allowed the automatic segmentation of the detected objects and the measurement of the number of detected objects per mm².

Statistical analyses were performed on individual raw data using unpaired t-tests to compare the MAB-treated group to the PBS-treated group. Values are expressed as mean \pm s.e.m. $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Collagen I detection by second-harmonic generation

FL lymph nodes or cells were embedded in tissue-freezing media and frozen at -80 °C. Then 5-µm sections were cut on a cryostat at -20 °C. The slides were mounted in Fluorescence Mounting Medium (DAKO). Collagen detection was performed using a two-photon microscope 7MP upright microscope (Zeiss). Excitation light was provided by a Chameleon Ultra II Ti:Sapphire laser (Chameleon Ultra, Coherent Inc., Palo Alto, CA, USA) tuned to 830 nm. The average laser irradiation after the microscope objective was measured with an Ultracompact Laser Power Meter (New Focus Corp., Irvine, CA, USA), which ranged from 0.5 to 2 mW. The second-harmonic generation images were detected through a bandpass filter SP 485 (collagen emission, Semrock, Rochester, NY, USA). Images were acquired using a $\times 40$ oil immersion objective (NA = 1.4, Plan-Apochromat; Zeiss). All images were acquired with standardized conditions for gain and offset (brightness and contrast). Unprocessed images were analyzed using the Region Measurements function of the Metamorph software (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA), which calculates the integrated fluorescence intensity for the entire image.

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

Western blot analysis

MALC were dissociated with mechanical force in PBS. Cells were then washed with cold PBS and lysed in cytotbuster protein extraction reagent (Novagen, Merck, Nottingham, UK) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Western blot analyses were performed as previously described²⁴ using antibodies against laminin, fibronectin, vitronectin

(Sigma-Aldrich), cleaved caspase 3 (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France), cleaved PARP (poly ADP-ribose polymerase; BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) and β -actin (Millipore, Molsheim, France). Peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Jackson Immunoresearch Laboratories (Immunotech, Marseille, France).

Apoptosis detection

MALC were dissociated as described above, and 10^5 cells were washed with cold PBS and resuspended in Binding Buffer 1X (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) at 1 M/ml. In all, 5 μ l Annexin V-PE (phycoerythrin) and 5 μ l 7AAD (7-aminoactinomycin D; BD Biosciences) were added for 15 min at room temperature in the dark, and then apoptotic cells (Annexin V⁺/7AAD⁻) were detected on a LSR II flow cytometer (BD Biosciences).

Lysosomal permeability detection

A total of 10^5 cells from dissociated MALC were incubated with 5 μ M acridine orange (Molecular Probes, Invitrogen, Life Technologies) for 15 min at room temperature in the dark. Cells were then washed twice with PBS and analyzed with LSR II flow cytometer.

Senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity detection

To measure SA- β gal activity, we used the fluorogenic substrate C₁₂FDG (Invitrogen).²⁵ In all, 4×10^5 cells from dissociated MALC were pretreated with 100 nM bafilomycin A for 1 h at 37 °C 5% CO₂ to induce lysosomal alkalization and increase the internal pH of lysosomes to pH 6. C₁₂FDG (33 μ M) was then incubated for 2 h, after which the medium was removed. MALC were dissociated, cells were washed twice with PBS and analyzed with a LSR II flow cytometer.

Intracellular phosphospecific flow cytometry

Intracellular phosphospecific flow cytometry was performed as previously described.^{26,27} A total of 10^5 cells from dissociated MALC were fixed with BD Cytofix fixation buffer (BD Biosciences) for 10 min at room temperature. Cells were washed with wash buffer (BD Biosciences) and permeabilized with Perm Buffer III (BD Biosciences) for 30 min at 4 °C. Cells were washed, resuspended in cold 50% perm buffer III and mixed. Then either Cell Barcoding Dye 450 (BD Biosciences) at various concentrations (prepared according to the manufacturer's instructions) or dimethyl sulfoxide were added and incubated for 30 min at 4 °C. Cells were then washed and resuspended in a residual volume. Encoded samples were split equally into FACS (fluorescence-activated cell sorter) tubes for parallel stainings. Conjugated phosphospecific antibodies were added to each tube of cells for 30 min at room temperature. Antibodies against Akt-Alexa488, P-Akt(T308)-PE, P-Akt(S473)-Alexa647, Syk-FITC, P-ZAP70/Syk(Y319/Y352)-Alexa647, Phospholipase C, gamma 2 (PLC γ 2)-PE and P-PLC γ 2(Y759)-Alexa647 were all obtained from BD Biosciences. At least 50 000 events from each gated condition were collected and analyzed using a LSR II cytometer.

Mitochondrial depolarization assay

To evaluate the status of $\Delta\Psi$, we used a lipophilic fluorochrome JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide)

with the mitochondrial membrane potential detection kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. To assess mitochondrial depolarization, untreated (UT) or treated MALC were dissociated and then stained with JC-1 for 15 min at 37 °C in a CO₂ incubator. Once washed and re-suspended in PBS, the loss of red fluorescence was monitored using flow cytometry.

Cytochrome c release assays

To evaluate cytochrome c release, we used anti-cytochrome c-Alexa 488 antibodies (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Treated or UT MALC were dissociated and then fixed and permeabilized with, respectively, BD Cytofix fixation buffer and BD Perm Buffer III before staining with an anti-cytochrome c antibody for 1 h at room temperature. Cytochrome c release was monitored by analyzing green fluorescence in the FL-1 channel with flow cytometry.

Mitochondrial ROS

Mitochondrial ROS were detected using a method previously published.²⁸ Briefly, 2×10^5 cells from UT or treated MALC were stained with Mitotracker deep red and Mitotracker green (Invitrogen) at 50 nM for 30 min at 37 °C. Cells were then washed with PBS and re-suspended in cold PBS for FACS analysis.

Sub-G1 cell determination after DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) staining

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

Statistics

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

RESULTS

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

RL are FL cells carrying the t(14; 18) translocation leading to Bcl-2 overexpression. In 2D RL cultures, we previously showed that RTX induces a moderate accumulation of cells in G1 phase, growth inhibition and significant loss in clonogenic potential.²⁹ Here, we determined the effect of GA101 compared with RTX and showed that both antibodies decrease RL cell viability to a similar degree (Figure 1a). By analyzing cell death using Annexin V/7AAD labeling, we observed only a slight increase in cells in early (Annexin V⁺/7AAD⁻) and late (Annexin V⁺/7AAD⁺) apoptosis

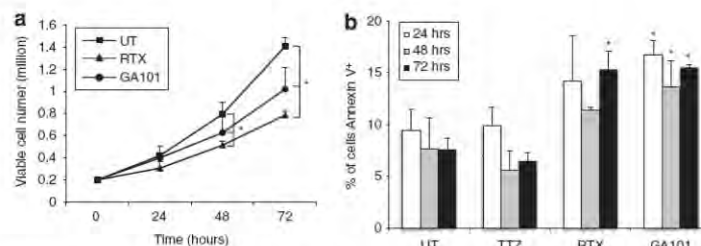


Figure 1. Effect of RTX and GA101 on 2D-cultured RL cells. **(a)** Cell viability of RL cells treated or not with 10 μ g/ml of RTX or GA101 was analyzed by exclusion of Trypan blue. **(b)** Percentage of cells in early and late apoptosis (Annexin V⁺/7AAD⁻ and Annexin V⁺/7AAD⁺) were determined by flow cytometry after 24, 48 and 72 h of treatment. Results are mean \pm s.d. of at least three independent experiments. **P* < 0.05 compared with UT cells.

after RTX and GA101 treatment. No significant differences were observed between the two antibodies (Figure 1b).

GA101 displays enhanced MALC growth inhibition

In order to investigate the role of spatial organization, we created the 3D MALC model using RL cells.²² MALC grew as oblate and relatively stiff spheroids (Figure 2A). MALC volume increased linearly with time (Figure 2B), whereas the number of cells increased exponentially throughout the culture (Figure 2C). No necrosis was observed during MALC culture (Figure 2D).

MALC stiffness could be due to an accumulation of extracellular matrix, as immunohistochemistry and western blotting showed the presence of fibronectin, vitronectin and laminin, similar to that

observed in RL xenografts or patient biopsies (Figures 2Ea and Eb). Collagen I was also found in MALC and FL tissues (Figure 2Ec).

We then sought to determine the effects of RTX and GA101 in 3D RL culture. To obtain the optimal dose of each antibody, we compared doses ranging from 0.1 to 100 µg/ml. Both antibodies showed a maximal effect on MALC volume, viable cell number and cell death at 10 µg/ml. The same results were obtained with MALC made up of diffuse large B-cell lymphoma (DEAU, Supplementary Figure S1A) and Burkitt lymphoma (Raji) (data not shown) cell lines. However, after 10 days of 3D culture >50% of Raji and DEAU cells were apoptotic under UT conditions, therefore we focused this study on MALC obtained with RL cells.

We first sought to assess TV over time following treatment with RTX, GA101 or Trastuzumab (used as negative control; data not shown). In UT cells, MALC volume increased from day 1 to day 20,

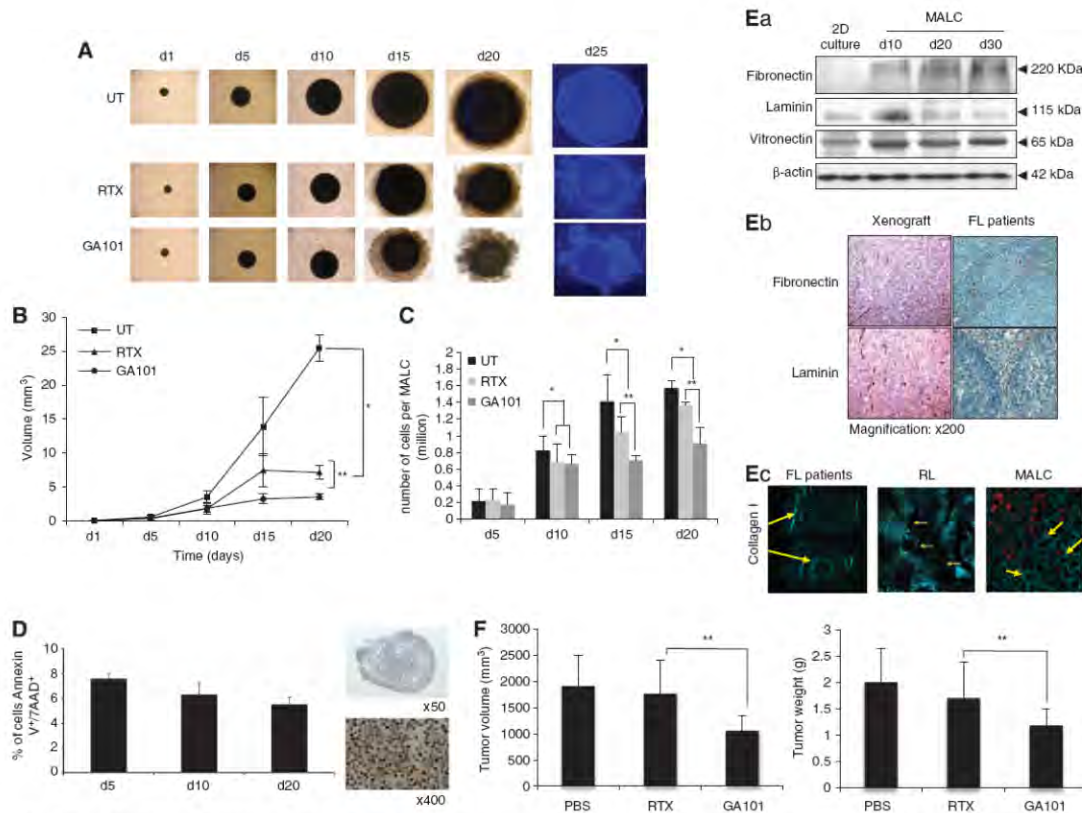


Figure 2. Effect of RTX and GA101 on MALC. (A) Pictures of treated or UT MALC were taken with an inverted Nikon Eclipse TE200 microscope at magnification $\times 40$ at different times of culture with or without Hoeschst 33342 staining. These pictures are representative of several experiments (d = day). (B) MALC were treated or not (■) with 10 µg/ml RTX (▲) or GA101 (●). MALC volume was measured at different times of culture. Results are expressed in mm³ and represent the mean \pm s.d. of nine independent experiments. Asterisk represents significant differences between UT and anti-CD20 MAb treatment ($P < 0.05$); double asterisks represents significant differences between RTX and GA101 treatment ($P < 0.05$); (d = day). (C) Number of viable cells per treated or UT MALC over time. Histograms represent mean \pm s.d. of nine independent experiments. Asterisk represents significant differences between UT and anti-CD20 MAb treatment ($P < 0.05$); double asterisks represents significant differences between RTX and GA101 treatment ($P < 0.05$); (d = day). (D) Left panel: necrosis was determined by flow cytometry analyzing Annexin V⁺/7AAD⁺ cells in MALC at 5, 10 and 20 days. Right panel: Ki67 immunohistochemistry labelling in MALC at day 10. (Ea) Fibronectin, laminin and vitronectin expression analyzed by western blotting in MALC compared with 2D RL cells. β -Actin expression was used as a control of protein expression. (Eb) Fibronectin and laminin labelling on paraffin sections of RL xenografts or lymph nodes isolated from FL patients. (Ec) Collagen I (yellow arrows) was visualized by second-harmonic generation in a lymph node from FL patients (left) and MALC (right). Results are representative of three independent experiments. (F) TV and tumor weight were measured after RL engraftment onto SCID-Beige mice. Histograms represent the mean \pm s.d. of 9 animals for PBS, 9 animals for RTX and 10 animals for the GA101-treated group. Double asterisks represents significant differences between RTX and GA101 treatment ($P < 0.05$).

maintaining the spherical structure (Figure 2A) and reaching 25 mm³ (Figure 2B), with 1.5 million viable cells/MALC (Figure 2C). RTX and GA101 treatment induced potent morphological changes with a disintegration of the peripheral layer (Figure 2A), significantly reduced MALC growth (Figure 2B) and significantly decreased the number of viable cells/MALC (Figure 2C) without modifying cell size (determined by flow cytometry, data not shown). These effects appeared significantly more pronounced in MALC treated with GA101 compared with RTX.

We further evaluated the *in vivo* effects of the two antibodies in a RL xenograft mouse model. As shown in Figure 2F, GA101 inhibited tumor growth more strongly in terms of TV and tumor

weight compared with RTX-treated animals. No such differences in antibody activity were seen in 2D RL cultured with GA101 when compared with RTX, supporting the conclusion that the spatial organization existing in 3D culture and *in vivo* affects the sensitivity to antibody treatment.

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

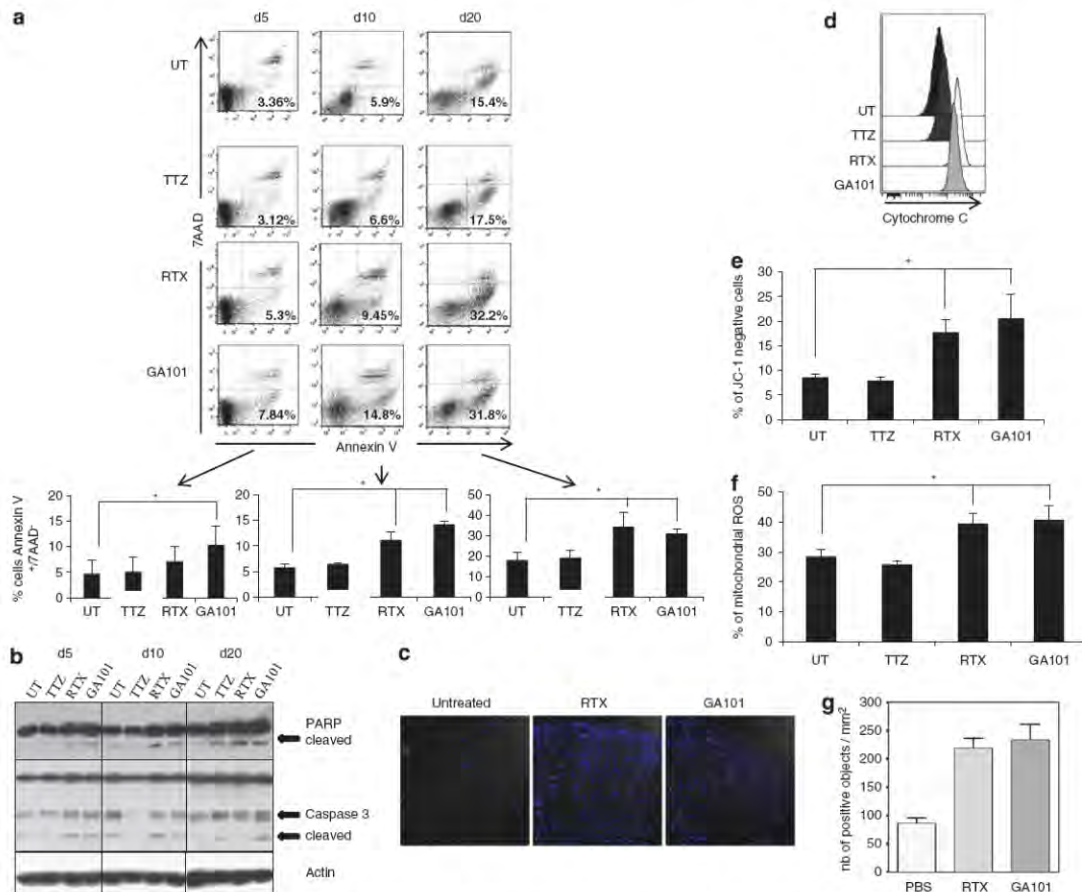


Figure 3. Induction of MALC apoptosis by RTX and GA101. (a) MALC were treated or not with 10 µg/ml of Trastuzumab (TTZ), RTX or GA101 for 5–20 days (d). Early apoptotic cells (Annexin V⁺/7AAD⁻) were detected by flow cytometry. Dot plots are representative of one experiment, and histograms represent the mean ± s.d. of FIVE independent experiments. Asterisk represents significant differences between UT and anti-CD20 MAb treatment ($P < 0.05$). (b) Detection of PARP and caspase 3 by western blot analysis in MALC treated or not with 10 µg/ml of TTZ, RTX or GA101 for 5–20 days (d). Results are representative of three independent experiments. β-Actin expression was used as a control of protein expression. (c) Caspase 3 detection by confocal microscopy in fixed and embedded representative MALC treated or not with 10 µg/ml of RTX or GA101 for 20 days. Magnification × 40. (d) Detection of cytochrome c release from mitochondria using flow cytometry in MALC treated or not with 10 µg/ml of TTZ, RTX or GA101 for 20 days. Histograms were analyzed with Cytobank (www.cytobank.org) and are representative of three independent experiments. (e) Mitochondrial depolarization was analyzed by flow cytometry in MALC treated (10 µg/ml antibody) or not for 20 days. Histograms represent the mean percentage of red-JC-1-negative cells for four independent experiments ± s.d. Asterisk represents significant differences between UT and anti-CD20 MAb treatment ($P < 0.05$). (f) ROS production was measured in MALC treated or not for 20 days with 10 µg/ml TTZ, RTX or GA101 by flow cytometry. Cells producing ROS were analyzed by double staining with Mitotracker green⁺/Mitotracker deep red⁻, and results represent the mean percentage of four independent experiments ± s.d. Asterisk represents significant differences between UT and anti-CD20 MAb treatment ($P < 0.05$). (g) Active caspase 3 quantification was performed on tumors derived from FL xenograft SCID-Beige mice injected intraperitoneally with PBS or with antibodies at 25 mg/kg twice a week.

and G0/G1 phase check points, respectively. Both cell-cycle distribution and expression of cyclins were not affected by RTX or GA101 treatment. Moreover, the proliferation rate did not differ between UT and MAB-treated conditions (data not shown). We therefore examined whether RTX and GA101 would induce apoptotic cell death, non-apoptotic (lysosomal) cell death or senescence, as reported elsewhere.^{2,3,12,13,30} We observed that both RTX and GA101 increased apoptotic cell death, with GA101 eliciting its effects earlier than RTX (Figure 3a). Anti-CD20 MAB-induced apoptosis was also observed in MALC realized with Deau cells (Supplementary Figure S1B). To avoid possible misinterpretation due to flow cytometry as previously described,³¹ the induction of apoptotic cell death by both RTX and GA101 was confirmed by western blot analysis revealing cleavage of caspase 3 and PARP (Figure 3b). In order to confirm the results obtained on disaggregated MALC, we performed caspase 3 active staining on fixed and embedded MALC. As shown in Figure 3c, RTX and GA101 induced an increase of apoptosis compared with UT MALC. In addition, RTX and GA101 caused cytochrome *c* release from mitochondria (Figure 3d), loss of $\Delta\Psi_m$ (Figure 3e) and production of ROS (Figure 3f). Apoptotic cell death induction was also confirmed *in vivo* from tumors isolated from GA101- and RTX-treated animals (Figure 3g).

In 2D RL cells treated as MAB-treated 3D cultures (that is, every 5 days), we observed a very slight induction of apoptosis in MAB-treated cells without any difference between RTX and GA101 (Supplementary Figure S2).

Interestingly, *in vitro* only GA101-treated MALC exhibited an increase in lysosomal cell death and cathepsin D release (Figure 4a and Supplementary Figure S1C for Deau cells). Furthermore, a senescence phenotype was found in GA101-treated cells, as shown by an increase in C₁₂FDG cleavage (Figure 4b). A similar effect was also observed following treatment with Cisplatin and Etoposide, both classical inducers of senescence (Figure 4b).

Altogether, these results demonstrate that both MABs induce the same extent of apoptosis but GA101—but not RTX—induces lysosomal cell death and senescence.

GA101 induces a stronger signaling inhibition than RTX in MALC. We have previously shown that RTX reduced FL survival in 2D RL culture through inhibition of the PKC ζ -mTOR (mammalian target of rapamycin) module without affecting PI3K/Akt.³² Here, we observed that, unlike RTX, GA101 does decrease Akt phosphorylation, as evaluated by fluorescent cell barcoding

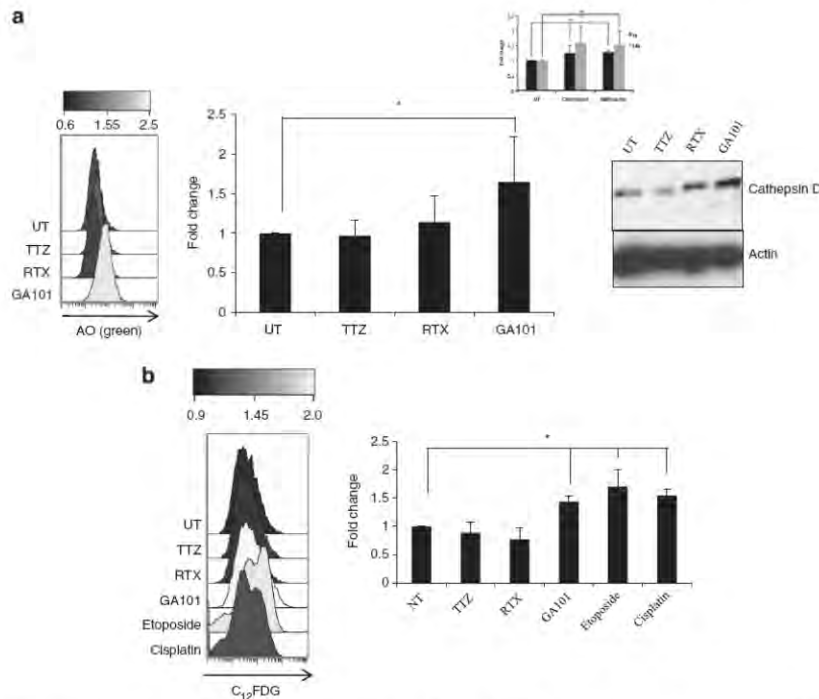


Figure 4. GA101 induces lysosomal cell death (a) and senescence (b) in MALC. (a) Left panel: Detection of lysosomal membrane permeabilization after acridine orange (AO) staining of MALC treated or not with 10 $\mu\text{g/ml}$ antibodies for 20 days. Box shows overlay of fold changes compared with UT MALC for one representative experiment. Histograms represent the mean fold change \pm s.d. of five independent experiments. $*P < 0.05$. Analysis and representation were performed with Cytobank. Insert: 2D RL culture cells treated with 50 μM chloroquine or 50 nM bafilomycin for 3 or 24 h were used as positive controls for lysosomal cell death. Right panel: MALC were treated (10 $\mu\text{g/ml}$ antibodies) or not for 20 days, and cathepsin D expression was determined by western blot analysis. Results are representative of three independent experiments. β -Actin expression was used as a control of protein expression. (b) Detection of cleavage of C₁₂FDG by SA- β Gal was measured by an increase in green fluorescence in treated and UT MALC after 20 days of culture. 2D RL culture cells treated with 2.2 μM cisplatin or 0.9 μM etoposide for 3 days were used as a positive control of senescence. Left: Overlays of fold changes comparing treated to UT cells in one representative experiment. Right: Histograms represent the mean fold change \pm s.d. of five independent experiments $*P < 0.05$. Analysis and representation were performed with Cytobank.

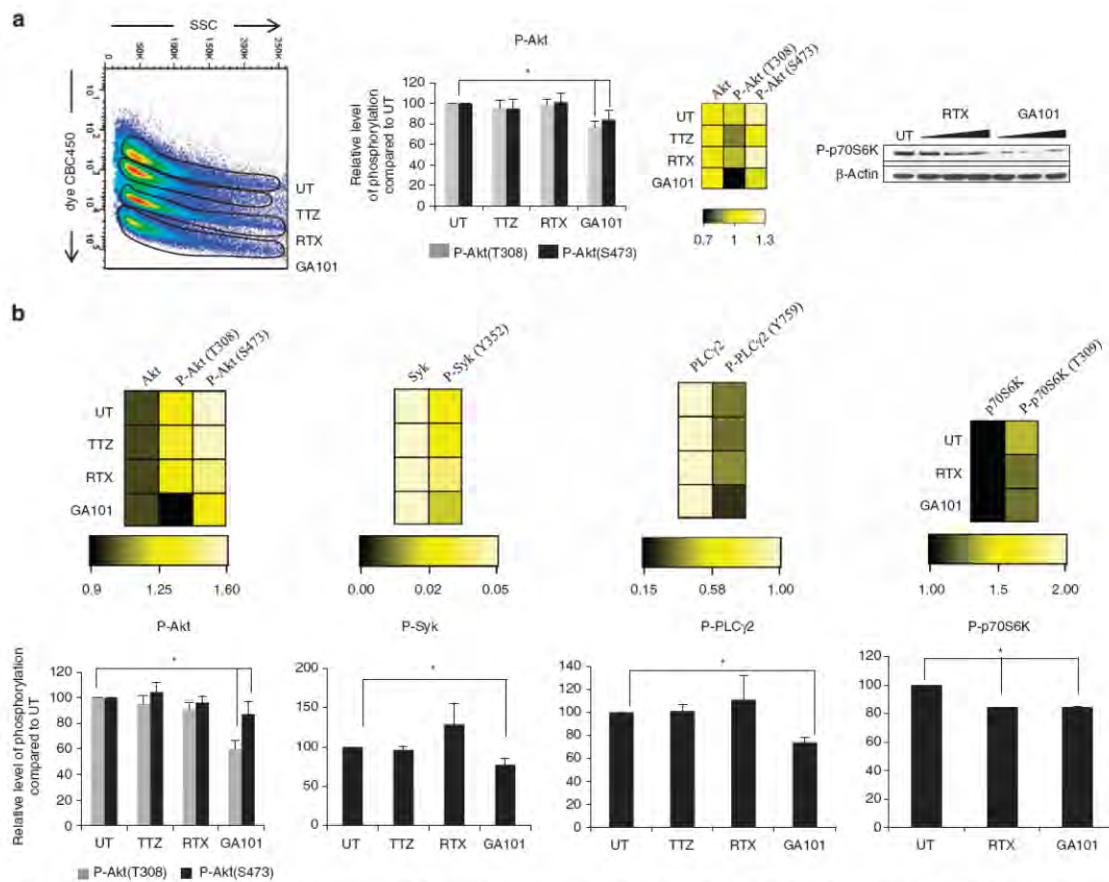


Figure 5. GA101 affects MALC signaling pathways. Cell signaling was analyzed as described in Materials and Methods. Dot plots represent all noded conditions discriminated according to the CBD450 fluorescence of either 2D RL cells treated for 72 h with 10 μg/ml antibody (a) or MALC after 20 days of antibody treatment (b). Phosphospecific stainings were analyzed for each gated condition and heatmaps represent relative levels of phospho-Akt/Akt, phospho-Syk/Syk and phospho-PLCγ2/PLCγ2 for one representative experiment in RL treated or not for 2 h or in MALC treated or not at day 20. Analysis and representation were performed with Cytobank. Histograms represent the relative percentage of phosphorylated proteins in treated 2D (a) or 3D (b) cells compared with UT cells. Results represent mean ± s.d. of three independent experiments **P*<0.05. Western blot analysis of p70S6K phosphorylation was performed in 2D RL cells treated or not with 10 μg/ml antibody for 72 h (a).

Figure 5a, left panel) and mTOR activation (Figure 5a, right panel). In 3D culture, GA101 inhibited phosphorylation of Akt at both 308 and 5473, Syk at Y352 and PLCγ2 at Y759 as well as mTOR-dependent p70S6K phosphorylation at T389 (Figure 5b). RTX induced mTOR phosphorylation (Figure 5c) but had no effect on the other kinases (Figure 5b).

Together, these results demonstrate that GA101 directly inhibits cell signaling in 3D FL culture and does so more efficiently than RTX.

Both GA101 and RTX antibodies induce chemosensitization. Previous studies have shown that when combined with chemotherapy both RTX and GA101 enhance efficacy or sensitize cells to cytotoxic drugs.^{33,34} Thus, we asked whether in 3D models antibodies could improve sensitivity to antitumoral drugs such as doxorubicin (anthracycline), bendamustine (an alkylating agent) and rapamycin (an mTOR inhibitor). We

treated MALC via two distinct protocols. Protocol 1 (Figure 6a) involved adding the antibody to the drop at the beginning of MALC formation followed by treatment with the cytotoxic drugs 24 h later. In protocol 2 (Figure 6b), established MALC were treated with antibodies (after 5 days of 3D culture) followed by addition of cytotoxic drugs 24 h later. In both protocols, we did not observe sensitization to doxorubicin or to bendamustine (data not shown). However, both antibodies sensitized the 3D-cultured cells to treatment with rapamycin (Figure 6). These results show that both RTX and GA101 sensitize 3D FL cultures to rapamycin.

DISCUSSION

To develop new therapeutic strategies (that is, new anti-CD20 antibodies), we need a better understanding of the *in vitro* mechanisms of action of these therapies. For classical 2D NHL cell cultures, we and others have described the mechanisms that

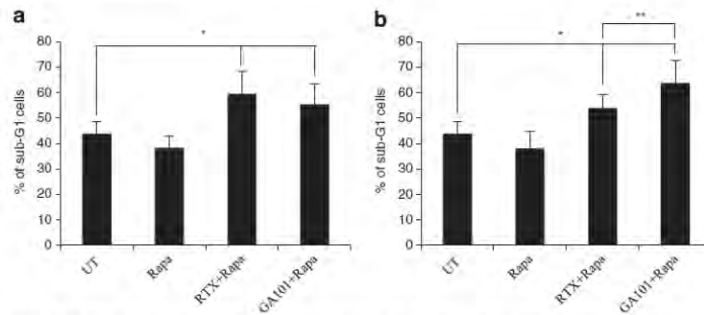


Figure 6. Antibodies sensitize MALC to rapamycin. MALC were treated in the drop (**a**) or after 5 days of culture (**b**) with 10 µg/ml antibodies. Twenty-four hours later, MALC were treated with 50 nm of rapamycin. Every 5 days, cells were submitted to the same treatment. Results represent the percentage of cells in sub-G1 phase as determined by flow cytometry after DAPI staining at day 20 and are the mean of six independent experiments ± s.d. Asterisk represents significant differences between UT and anti-CD20 MAb/rapamycin treatment ($P < 0.05$); Double asterisks represents significant differences between RTX/Rapa and GA101/Rapa treatment ($P < 0.05$).

account for the direct effect of the CD20 antibodies RTX and GA101.^{2,3,12,13} RTX and GA101 display similar efficiencies in the follicular NHL cell line RL; however, GA101 has been reported to mediate superior effects on 2D lymphoma cell lines, such as large B-cell lymphomas, mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia.^{9,35}

The importance of tumor spatial organization is becoming increasingly apparent and can significantly affect major cellular functions such as cell proliferation, survival and intracellular signaling pathways, as described for carcinoma cell spheroids. Based on these models, we used NHL cell lines to create MALC with a technique derived from the hanging drop method. MALC mimic lymphoma spatial organization, including extracellular matrix accumulation. This model is simple, feasible, reproducible, inexpensive and offers an alternative to xenografts for testing new drugs. We observed that both RTX and GA101 displayed higher efficacy in MALC compared with 2D culture. This result was unexpected, as one could have hypothesized that the increased cellular density, higher degree of compaction and ECM accumulation would have interfered with the diffusion of the antibodies into the spheroid and their subsequent effects. It is possible that 3D FL cells are in a more sensitive state because of changes to intracellular signaling pathways as a result of mechanical stress, hypoxia or modified integrin signaling networks. Clinical observations have underlined tumor burden as potentially one of the most important factors mediating resistance to RTX.^{36,37} This was recently confirmed in a study showing that mice presenting with a low tumor burden had a significantly higher complete response rate and a significant longer survival than mice with intermediate or high tumor burden.³⁸ One of the reasons for this may be differences in antibody diffusion and penetration into the center of small lymph nodes versus a less efficient diffusion in case of high tumor burden. Our model provides a powerful approach to study this phenomenon.

Here, we show that, unlike in 2D culture, RTX and GA101 induce apoptotic cell death in FL cells when organized in 3D. To avoid possible misinterpretation due to flow cytometry as previously described,³¹ we confirmed cell death induction by western blot analysis of PARP and caspase 3 cleavage (on disgregated or entire MALC), determination of cytochrome *c* release, $\Delta\Psi_m$ modification and ROS production.

Recent reports have demonstrated that, in 2D-cultured NHL cell lines, GA101 induces homotypic adhesion followed by actin reorganization, lysosomal permeabilization, cathepsin release and ROS production. Altogether, these events suggest a so-called

non-apoptotic lysosomal-mediated cell death.^{12,13} In our 3D model, we detected lysosomal cell death and cathepsin D release after 20 days of GA101 treatment. This was also accompanied by senescence, a phenomenon described by Däbritz *et al.*³⁰ for RTX. Although this has never been described for GA101, it should not be surprising as senescence is an aging process involving ROS.³⁹ Autophagy has also been described after RTX treatment in Burkitt lymphoma cell lines.⁴⁰ However, we found no significant change in the expression of the autophagic proteins LC3II and Atg proteins following RTX or GA101 treatment using both protein micro-arrays and western blot analysis (data not shown). In terms of RTX treatment, we showed that 3D conditions enhanced RTX-induced cytotoxic effects, reflecting clinical observations. For GA101, we also observed an enhancement of cytotoxic effects in 3D- compared with 2D-cultured FL cells, perhaps a result of the combination of the three different cell death mechanisms (apoptosis, lysosomal cell death and senescence). The fact that GA101 displayed a higher efficacy than RTX is in accordance with observations from *in vitro* and preclinical studies^{9,12,33} (Figure 2F) and may be related to its type-II-related mechanism of action resulting in, for example, homotypic adhesion and cell death.⁴¹ GA101 could also affect cell–cell contacts supporting the 3D structure. Indeed, we used Hoechst labeling (Figure 2A) to observe that GA101 strongly modifies the spherical organization of NHL cultured in 3D. Moreover, we cannot exclude the possibility that GA101 and RTX diffuse differently into MALC. The mechanisms of diffusion are not yet known and are currently under investigation in our laboratory.

Previous studies show that RTX and GA101 induce chemosensitization in 2D NHL cultures and xenograft FL models.^{33,34} Consistent with this, we showed that both anti-CD20 antibodies induce sensitization to rapamycin (a classical mTOR inhibitor) in 3D culture. Chemosensitization can be explained by several hypotheses. First, it may be a consequence of decreased Bcl2 expression after 10 days of antibody treatment (Supplementary Figure S3), as Bcl2 expression has been associated with resistance to mTOR inhibitors in a preclinical model.⁴² Second, antibodies could affect the 3D structure (cell–cell contacts), leading to better drug penetration. This is currently under investigation in our laboratory. Third, chemotherapeutic agents and antibodies may use the same signaling pathways (that is, ROS production, inhibition of mTOR, and so on), converging on enhanced cytotoxic effects compared with those induced by each drug as a single agent.

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

CONFLICT OF INTEREST

ED, NV and AS are employees of Institut de Recherche Roche (Boulogne Billancourt, France), F. Hoffmann-La Roche AG (Basel, Switzerland) and Roche S.A.S (Boulogne Billancourt, France) respectively. CK is an employee of Roche Glycart AG (Schlieren). SF received a grant from Roche. CB received research funding from Roche. The other authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by an institutional grant from the INSERM, Cancéropôle Grand Sud-Ouest, INCA Pair Lymphome and Roche. We thank Raphael Duran, Marie-Noelle Paludetto (CRCT, INSERM UMR1037) for performing preliminary experiments, Amandine Blanc (CRCT, INSERM UMR1037) for technical assistance Sophie Allart and Astrid Canivet (Imaging core Facility, CPTP, INSERM U1043, Toulouse, France) and Maryline Calyse (ANEXPLO/CREFRE, Service de Zootechnie, Toulouse, France). We thank Scientific Scripts (<http://www.scientificscripts.com/>) for English proofreading.

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

We also thank ImagIN Platform of the Institut Universitaire du Cancer (<https://www.imagin.univ-tlse3.fr/imagin/index.php?lang=EN>).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

REFERENCES

- Maloney DG. Treatment of follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Hematol Rep* 2005; **4**: 39–45.
- Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: Implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene* 2007; **26**: 3629–3636.
- Bezombes C, Fournié JJ, Laurent G. Direct effect of rituximab in B-cell-derived lymphoid neoplasias: mechanism, regulation, and perspectives. *Mol Cancer Res* 2011; **9**: 1435–1442.
- Witzig TE, Gupta M. Signal transduction inhibitor therapy for lymphoma. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2010; **2010**: 265–270.
- Mahadevan D, Fisher RL. Novel therapeutics for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 1876–1884.
- Sawas A, Diefenbach C, O'Connor OA. New therapeutic targets and drugs in non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Hematol* 2011; **18**: 280–287.
- Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 2003; **22**: 7359–7368.
- Taylor RP, Lindorfer MA. Immunotherapeutic mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Curr Opin Immunol* 2008; **20**: 444–449.
- Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S *et al*. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 2010; **115**: 4393–4402.
- Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, Honeychurch J, Alduaij W, Cox KL *et al*. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest* 2009; **119**: 2143–2159.

- Beers SA, Chan CH, James S, French RR, Attfield KE, Brennan CM *et al*. Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody out performs type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood* 2008; **112**: 4170–4177.
- Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH *et al*. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* 2011; **117**: 4519–4529.
- Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, Cheadle EJ, Pelicano H, Ivanov A *et al*. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood* 2012; **119**: 3523–3533.
- Sehn LH, Assouline SE, Stewart DA, Mangel J, Gascoyne RD, Fine G *et al*. A phase I study of obinutuzumab induction followed by 2 years of maintenance in patients with relapsed CD20-positive B-cell malignancies. *Blood* 2012; **119**: 5118–5125.
- Salles G, Morschhauser F, Lamy T, Milpied N, Thieblemont C, Tilly H *et al*. Phase I study results of the type II glycoengineered humanized anti-CD20 monoclonal antibody obinutuzumab (GA101) in B-cell lymphoma patients. *Blood* 2012; **119**: 5126–5132.
- Klement G, Huang P, Mayer B, Green SK, Man S, Bohlen P *et al*. Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology* 2001; **121**: 839–852.
- 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**: 3682–3687.
- 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**: 522–531.
- 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**: 872–885.
- 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.
- Pickl M, Ries CH. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene* 2009; **28**: 461–468.
- Gravelle P, Jean C, Valleron W, Laurent G, Fournié JJ. Innate predisposition to immune escape in follicular lymphoma cells. *Oncimmunology* 2012; **1**: 555–556.
- Sutherland R, Buchegger F, Schreyer M, Vacca A, Mach JP. Penetration and binding of radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their antigen binding fragments in human colon multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 1987; **47**: 1627–1633.
- 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**: 4156–4162.
- Debacqz-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nat Protoc* 2009; **4**: 1798–1806.
- 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**: 1581–1589.
- Irish JM, Myklebust JH, Alizadeh AA, Houot R, Sharman JP, Czerwinski DK *et al*. B-cell signaling networks reveal a negative prognostic human lymphoma cell subset that emerges during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 12747–12754.
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011; **469**: 221–225. Erratum in: *Nature* 2011; **475**: 122.
- Bezombes C, Grazide S, Garret C, Fabre C, Quillet-Mary A, Müller S *et al*. Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood* 2004; **104**: 1166–1173.
- Däbritz JHM, Yu Y, Rosenfeldt MT, Dörken B, Schmitt CA. Anti-CD20 immunotherapy augments the chemotherapy-induced senescence response in human lymphoma cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2010; **116**: (abstract 1827).
- Golay J, Bologna L, André PA, Buchegger F, Mach JP, Boumsell L *et al*. Possible misinterpretation of the mode of action of therapeutic antibodies *in vitro*: homotypic adhesion and flow cytometry result in artefactual direct cell death. *Blood* 2010; **116**: 3372–3373.
- 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**: 285–291.
- Dalle S, Reslan L, Besseyre de Horts T, Herveau S, Herting F, Plesa A *et al*. Preclinical studies on the mechanism of action and the anti-lymphoma activity of the novel anti-CD20 antibody GA101. *Mol Cancer Ther* 2011; **10**: 178–185.



- 34 Jazirehi AR, Bonavida B. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene* 2005; **24**: 2121–2143.
- 35 Patz M, Isaeva P, Forcob N, Müller B, Frenzel LP, Wendtner CM *et al*. Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2011; **152**: 295–306.
- 36 Berinstein NL, Grillo-López AJ, White CA, Bence-Bruckler I, Maloney D, Czuczman M *et al*. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1998; **9**: 995–1001.
- 37 Maloney DG. Follicular NHL: from antibodies and vaccines to graft-versus-lymphoma effects. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2007 226–232.
- 38 Daydé D, Ternant D, Ohresser M, Lerondel S, Pesnel S, Watier H *et al*. Tumor burden influences exposure and response to rituximab: pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling using a syngeneic bioluminescent murine model expressing human CD20. *Blood* 2009; **113**: 3765–3772.
- 39 Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* 2011; **21**: 569–576.
- 40 Turzanski J, Daniels I, Haynes AP. Involvement of macroautophagy in the caspase-independent killing of Burkitt lymphoma cell lines by rituximab. *Br J Haematol* 2009; **145**: 137–140.
- 41 Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger MO *et al*. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 2011; **118**: 358–367.
- 42 Delbaldo C, Albert S, Dreyer C, Sablin MP, Serova M, Raymond E *et al*. Predictive biomarkers for the activity of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors. *Target Oncol* 2011; **6**: 119–124.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Blood Cancer Journal website (<http://www.nature.com/bcj>)

Supplementary Figures legend:

Figure 1: Effect of RTX and GA101 on MALC realized with Deau cells

A) MALC were treated or not (■) with 10 µg/ml RTX (▲) or GA101 (●). MALC volume was measured at different times of culture. Results are expressed in mm³ and represent the mean ±SD of 3 independent experiments. * represents significant differences between UT and anti-CD20 MAbs treatment (p<0.05); ** represents significant differences between RTX and GA101 treatment (p<0.05). (d=day).

B) MALC were treated or not with 10 µg/ml of TTZ, RTX or GA101 for 5 (left panel) or 15 days (right panel). Early apoptotic cells (Annexin V⁺/7AAD⁻) were detected by flow cytometry. Histograms represent the mean ±SD of 3 independent experiments. * represents significant differences between UT and anti-CD20 MAbs treatment (p<0.05); ** represents significant differences between RTX and GA101 treatment (p<0.05).

C) Detection of lysosomal membrane permeabilization after acridine orange (AO) staining of MALC treated or not with 10 µg/ml antibodies for 15 days. Box shows overlay of fold changes compared to untreated MALC for one representative experiment. Histograms represent the mean fold change ±SD of 3 independent experiments. * represents significant differences between UT and GA101 treatment (p<0.05).

Figure 2: Apoptosis analysis on 2D RL cells treated as MALC culture

RL cells in suspensions (2D culture) were counted, diluted (at 0.2M/ml) and treated or not with 10µg/ml of TTZ, RTX and GA101 every 5 days. Apoptosis was analyzed after 5, 10, and 20 days of culture by flow cytometry using Annexin V/7AA staining. Annexin V⁺/7AAD⁻ cells were considered as apoptotic.

Figure 3: Bcl2 expression in MALC treated with antibodies

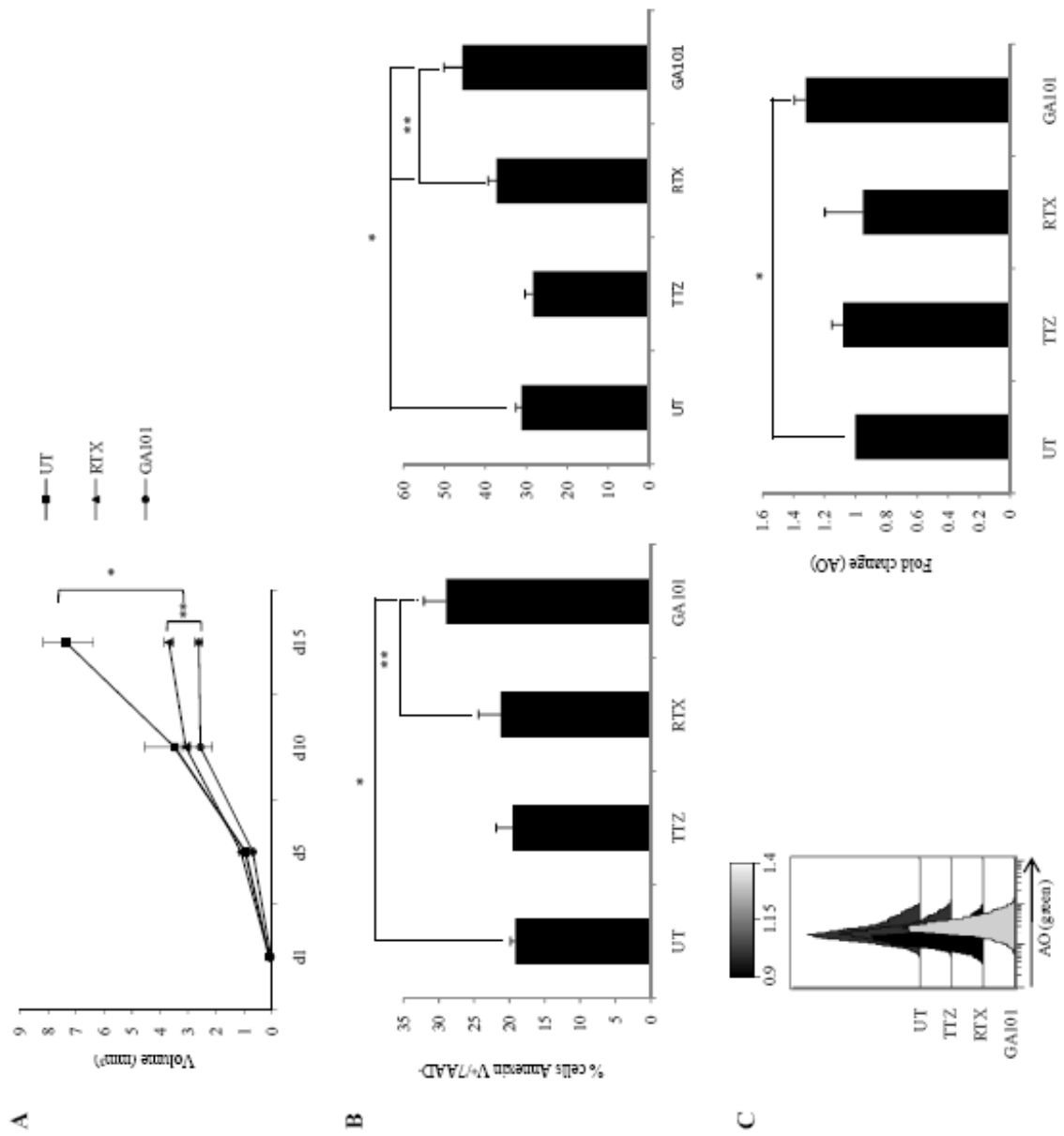
MALC were treated or not for 10 days with 10 µg/ml antibodies and Bcl2 expression was analyzed by flow cytometry (A) and Western-blot analysis (B).

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

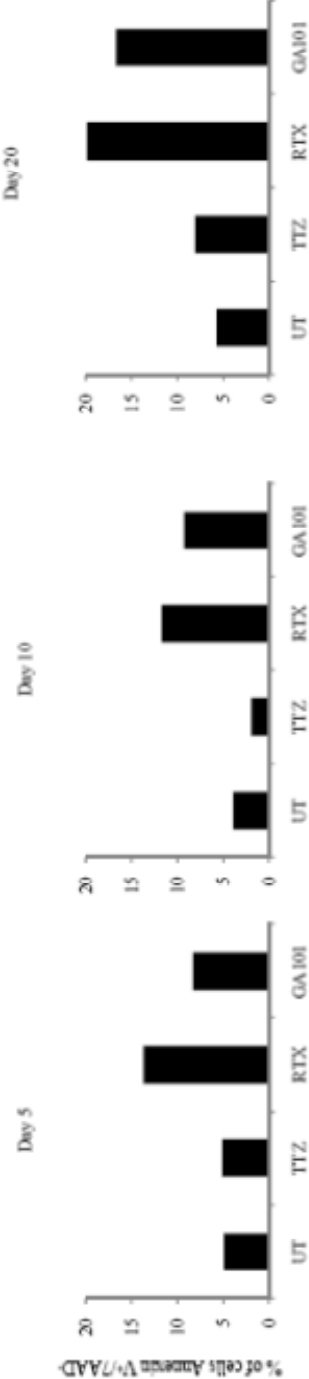
B) Representative of two independent experiments, β -actin expression was used as a control of protein expression.

#

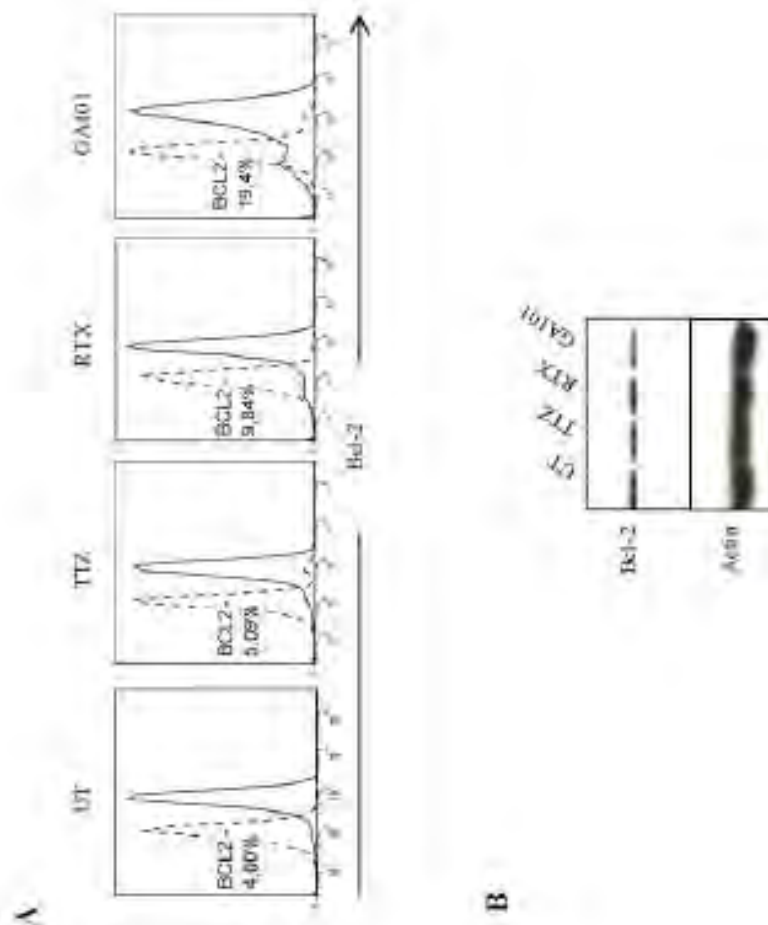
Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



Durant ce travail, nous avons prouvé la relevance de notre modèle d'étude par rapport à une culture cellulaire classique en 2D. En effet, les résultats observés avec les AcMo reflètent ceux observés *in vivo* avec les xénogreffes dans les souris SCID-beige et sont supérieurs à ceux observés dans un système de culture 2D. De plus, dans le modèle de culture 3D, les cellules mettent en place des signaux de survie et supportent l'hyperdensité cellulaire, reflétant la physiologie tumorale, contrairement aux cellules cultivées en 2D. L'accumulation de protéines de la MEC telles que la fibronectine, la vitronectine, la laminine ou encore le collagène, tel qu'il est observé dans les biopsies de patients, est un argument de plus pour appuyer la relevance de ce modèle pour des études précliniques.

Le RTX et le GA101 inhibent la croissance des MALC et ont un impact sur leur morphologie. En effet, le GA101 induit une plus forte inhibition de croissance et semble entraîner la désintégration des couches périphériques du MALC. Pour expliquer cette inhibition de croissance, deux hypothèses peuvent être envisagées: 1) une inhibition de la prolifération, 2) une augmentation de la mort cellulaire. Afin de tester la 1^{ère} hypothèse, nous avons analysé la distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire, et l'expression des cyclines A, B et D1 qui sont des régulateurs des points de contrôle, respectivement pour les phases S, G2/M et G0/G1. Nous n'avons mis en évidence aucune modification de la prolifération cellulaire induite par les AcMo (données non montrées). La 2^{ème} hypothèse est apparue comme étant celle pouvant expliquer la forte inhibition de croissance. En effet, nous montrons que le RTX et le GA101 induisent l'apoptose des cellules du MALC, et ce de manière équivalente. Récemment il a été montré que la cytométrie en flux pouvait induire un contresens dans l'analyse de la mort cellulaire induite par les AcMo, notamment ceux de type II qui induisent une agrégation homotypique. En effet, les larges agrégats pouvant contenir jusqu'à 100 cellules sont probablement exclus des analyses de cytométrie parce qu'ils n'entrent pas dans la fenêtre de morphologie. En revanche, il y a un enrichissement en cellules mortes dans la fenêtre des singulets car l'agrégation est un processus demandant de l'énergie et se produisant donc uniquement dans les cellules vivantes (296). Ainsi, afin d'éviter d'éventuels *artefacts* et une mauvaise interprétation des résultats en cytométrie en flux, l'induction d'apoptose a été confirmée par Western-blot avec le clivage de la caspase 3 et de PARP (*Poly (ADP-Ribose) Polymérase*). Par ailleurs, nous avons évalué l'apoptose sur des MALC entiers grâce à un marquage caspase 3 active. Nous avons ainsi pu observer que les deux AcMo induisent l'apoptose de façon équivalente. Afin d'expliquer l'effet supplémentaire observé avec le

GA101 sur le volume des MALC, nous avons cherché à déterminer s'il existait d'autres effets induits par les AcMo.

En plus de l'apoptose, le GA101 est capable d'induire deux autres types de mort cellulaire, que sont la mort lysosomale et la sénescence. L'induction de mort lysosomale avait déjà été décrite pour les AcMo de type II, nos résultats confirment cela dans un modèle en 3D relevant de la pathologie. Par contre, nous mettons en évidence un nouveau mode d'action des AcMo de type II, à savoir la sénescence. En revanche, l'intérêt de la sénescence dans les thérapies anti-cancéreuses reste controversé car les conséquences de ce processus physiologique peuvent être de bon ou de mauvais pronostic. Dans le cadre de notre étude, aux vues des effets du GA101 sur les MALC, il semble que la TIS ait une action anti-tumorale.

Par ailleurs, une étude a montré que le RTX était capable d'induire de l'autophagie dans des lignées cellulaires de lymphome de Burkitt (297). Ainsi, nous avons cherché à déterminer si les AcMo étaient capables d'induire, après différents temps de traitement, un mécanisme d'autophagie. Par conséquent, en réalisant des Western-blot et des protéines micro-array ciblant l'expression des protéines impliquées dans l'autophagie, telles que Atg, becline ou LC3, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'autophagie par les AcMo, et ce quelque soit le temps de traitement.

Plusieurs études ont montré que les cellules de LF présentaient une suractivation de plusieurs protéines telles que Syk, Akt, PLC γ 2 ou encore p70S6K (61, 62). Nous avons voulu étudier l'impact des AcMo sur ces voies de signalisation dans les MALC. Pour cela, nous avons utilisé la technique du FCB afin de minimiser les variations inter-échantillons et d'augmenter la précision des résultats. Grâce au FCB, nous avons observé que le GA101 inhibe l'activation de toutes ces kinases alors que le RTX inhibe seulement celle de p70S6K par un mécanisme encore non identifié.

Des études ont montré que le RTX et le GA101 induisent une chimio-sensibilisation en 2D (196, 298). Ainsi, nous avons voulu déterminer si ce phénomène pouvait se retrouver dans les MALC. Pour cela, nous avons testé la sensibilité des MALC, traités ou non avec les AcMo, à la rapamycine, la bendamustine ou la doxorubicine. Nous n'avons pas observé de sensibilisation avec la bendamustine, ni avec la doxorubicine. L'explication la plus probante est que ces agents chimiothérapeutiques agissent sur des cellules cyclantes. Or, au cours de nos expériences, nous avons vu un fort ralentissement du cycle cellulaire dans les MALC,

avec une entrée des cellules en quiescence (données non montrées). De plus, les travaux réalisés dans notre équipe ont montré un phénomène d'hypoxie au sein des MALC et il a été montré dans les années 1990 que l'hypoxie pouvait rendre les cellules résistantes à la doxorubicine (299). En revanche, nous avons pu mettre en évidence une sensibilisation à la rapamycine. La première hypothèse permettant d'expliquer ce résultat peut être la diminution de l'expression de Bcl-2 que nous avons observé après 10 jours de culture. Étant donné qu'une étude préclinique a montré que l'expression de Bcl-2 était corrélée à la résistance des cellules aux inhibiteurs de mTOR (300), il est envisageable qu'il y ait un lien entre ces deux résultats. Une deuxième hypothèse pourrait expliquer cette chimio-sensibilisation. En effet, les toutes expériences réalisées lors de ce travail ont montré que les AcMo impactaient la morphologie des MALC. Cela pourrait avoir une répercussion sur les interactions intercellulaires et ainsi faciliter la pénétration des agents thérapeutiques dans le MALC. Enfin, les agents chimiothérapeutiques et les AcMo pourraient cibler les mêmes processus (production de ROS, inhibition de mTOR etc...), agissant ainsi en synergie, ce qui explique la meilleure efficacité de l'association AcMo + agent chimiothérapeutique comparé à la monothérapie.

Au final, tous ces résultats prouvent l'efficacité du RTX et du GA101 dans un système de culture en 3D de LF en montrant d'une part que les AcMo sont plus efficace en 3D qu'en 2D. D'autre part, que GA101 présente une efficacité supérieure au RTX, ce qui confirme les études précliniques ou cliniques ainsi que les études menées *in vivo* dans un modèle de xénogreffe. Enfin, comme observé par Pickl et ses collaborateurs (260), il est important dans des études *in vitro* de disposer d'un modèle d'étude relevant au mieux de la pathologie d'intérêt. Il semble donc que le modèle 3D développé dans notre équipe, soit un bon modèle pour des études précliniques et permet d'envisager une application à plus grande échelle tel que le criblage de molécules thérapeutiques.

II- EFFETS INDIRECTS MEDIÉS PAR LE RITUXIMAB ET LE GA101

1- Introduction

Parmi les mécanismes d'action induits par les AcMo, il existe des mécanismes dits indirects impliquant leur partie Fc. On en dénombre de trois sortes: l'ADCC, la CDC et l'ADCP. Durant mes travaux de thèse nous avons étudié l'ADCC. Ce phénomène est induit par la fixation du fragment constant des AcMo sur les FcR présents à la surface des cellules effectrices telles que les cellules NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$ TCR V γ 9V δ 2. Parmi les FcR, le principal mis en jeu dans ce phénomène est le récepteur activateur Fc γ RIIIa ou CD16.

Comme détaillé en introduction, les cellules NK sont des effecteurs immunitaires qui participent activement à l'immunité anti-tumorale. Ces cellules de l'immunité innée sont capables de lyser rapidement une cellule cible de manière indépendante de l'antigène et sans activation préalable. La reconnaissance de la cellule cible peut se faire *via* les récepteurs activateurs ou inhibiteurs mais également *via* la reconnaissance d'un Ac préalablement fixé sur la cellule cible. Leur principal mécanisme d'action dans la lyse des cellules est la dégranulation de granules lytiques contenant PFN et GRZB. La PFN va conduire à la formation de pores dans la membrane plasmique laissant entrer le GZB dans le compartiment cytosolique. Suite à cela, le GZB active la voie des caspases conduisant ainsi à l'apoptose de la cellule cible.

Ainsi, en se fixant au FcR, les AcMo entraînent l'activation des cellules immunitaires notamment *via* la cascade de signalisation en aval du FcR (Figure 43). La phosphorylation des protéines de cette voie de signalisation (notamment Syk, PLC γ 2 et Akt) est le témoin intracellulaire de l'activation des cellules *via* le Fc γ RIIIa.

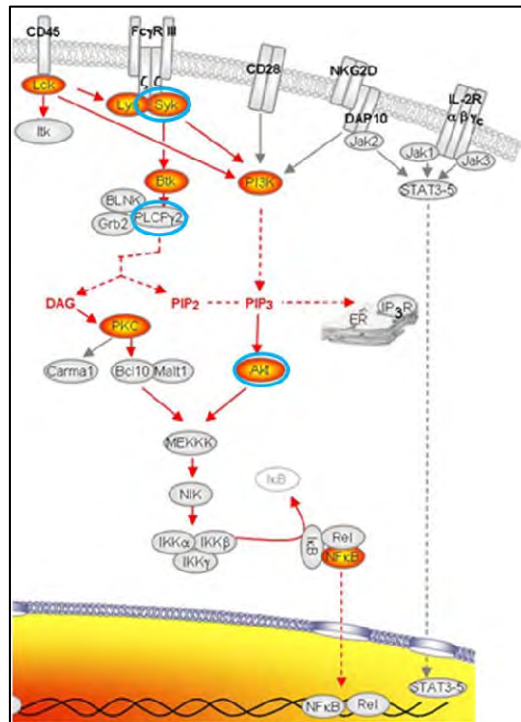


Figure 43: Signalisation en aval du FcγRIIIa ou CD16.

Le RTX et le GA101 entraînent la déplétion des cellules B par le mécanisme d'ADCC et le GA101 présente un effet supérieur. Cette plus grande efficacité peut être imputée à l'afucosylation réalisée sur le fragment Fc, qui le rend plus affiné pour le CD16 (195).

Ces travaux font l'objet d'un article en cours de préparation.

2- Méthodologie et résultats

Pour cette étude, nous avons isolés des cellules NK de donneurs sains (échantillons fournis par l'Etablissement Français du Sang (EFS), CHU Purpan, Toulouse) grâce à une séparation sur gradient de Ficoll suivie d'un tri cellulaire magnétique négatif. Ces cellules NK sont ensuite mises au contact de MALC traités ou non avec les AcMo à 10 jours de culture, ou de cellules RL en suspension. Pour déterminer le taux d'ADCC en cytométrie en flux, on analyse le CD107a, marqueur de dégranulation, sur les cellules NK (cellules CD56⁺/CD3⁻) et le DAPI, marqueur de viabilité cellulaire, sur les cellules cibles (cellules CD19⁺/CD3⁻).

Comme montré sur la figure 44, le RTX et le GA101 induisent la dégranulation des cellules NK et la mort des cellules cibles, avec un effet supérieur observé en présence de GA101. Par contre, dans tous les cas, le GA101 induit une mort cellulaire plus importante des cellules cibles.

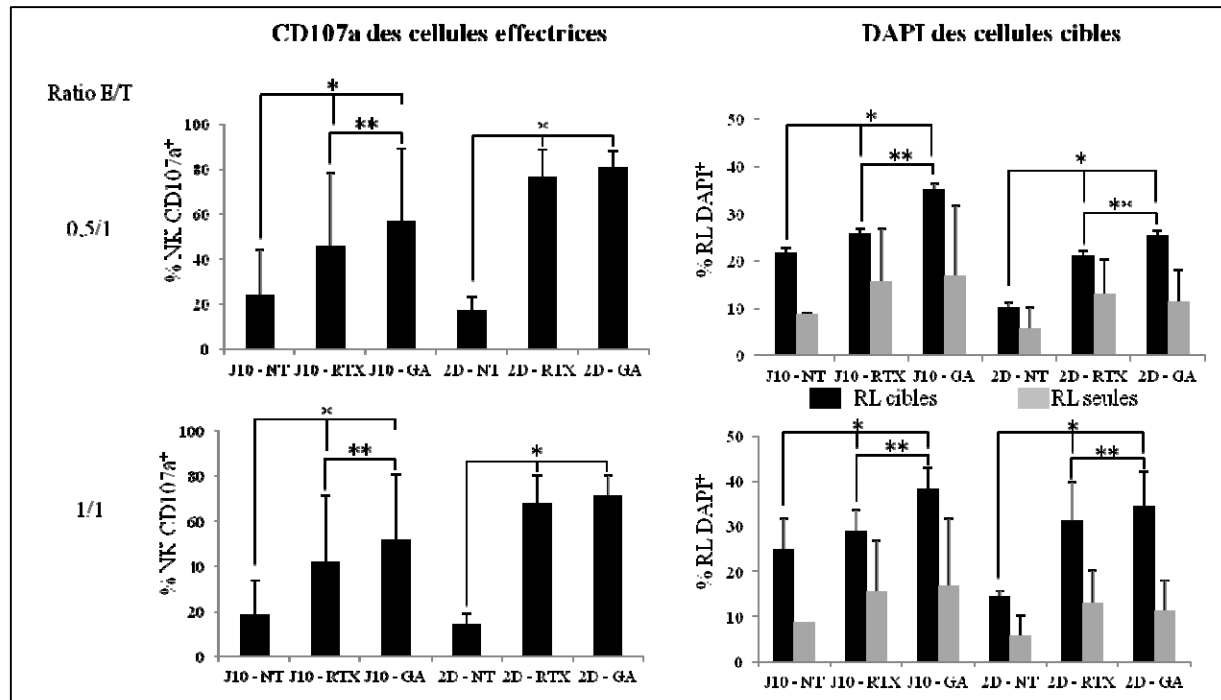


Figure 44: RTX et GA101 induisent l'ADCC des cellules de LF par les cellules NK.

Les cellules NK sont mises au contact des MALC ou des cellules RL en suspension selon deux ratios effecteurs/cibles: 0,5/1 (panel du haut) et 1/1 (panel du bas) ($n=6$). A l'issue des 4h de co-incubation, les cellules sont analysées en cytométrie en flux. Le CD107a permet de déterminer la dégranulation des cellules effectrices (panel de gauche) et le DAPI, la mort des cellules cibles (panel de droite). * = RTX et GA101 significatif par rapport au NT, ** le GA101 est significatif par rapport au RTX.

De manière étonnante, on n'observe aucune différence entre les deux ratios E/T que ce soit pour l'activation des effecteurs ou la mort des cellules cibles. Nous avons réalisé les mêmes expériences avec des lignées primaires de lymphocytes T $\gamma\delta$ TCR $V\gamma9^+$. Les résultats observés sont identiques à ceux obtenus avec les cellules NK (Figure 45).

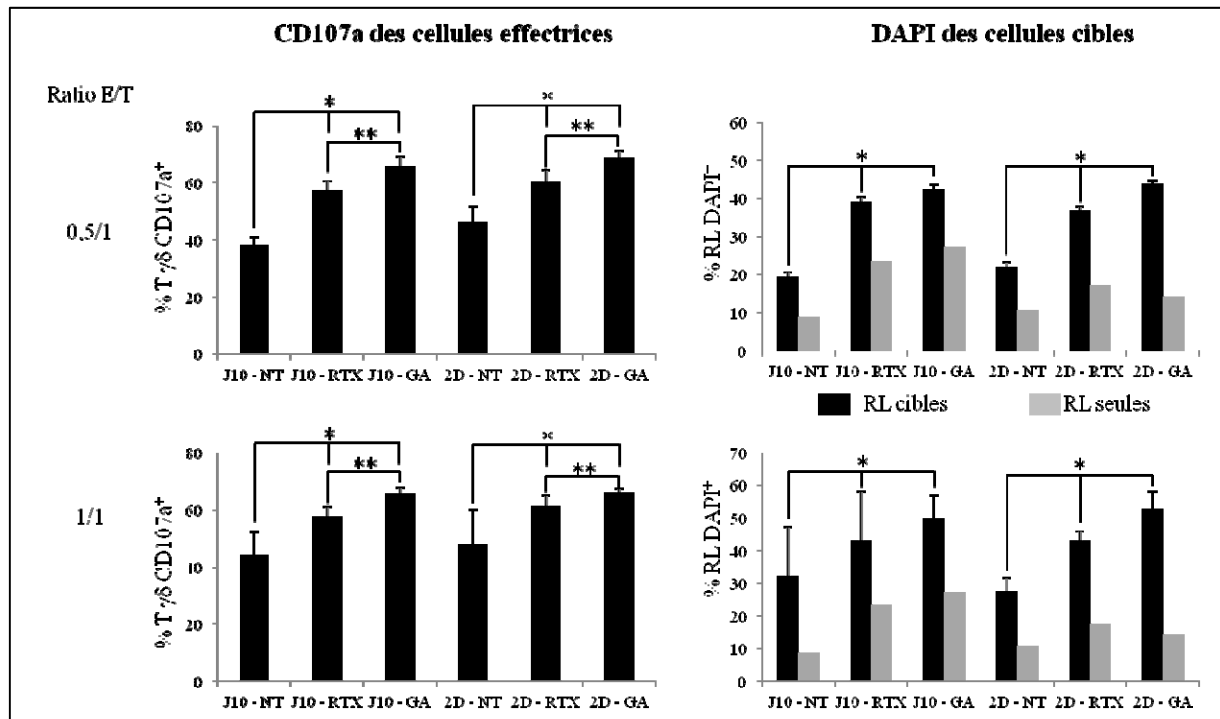


Figure 45: RTX et GA101 induisent l'ADCC des cellules de LF par les lymphocytes T $\gamma\delta$ TCRV γ 9⁺.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ TCRV γ 9⁺ sont mis au contact des MALC ou des cellules RL en suspension selon deux ratios effecteurs/cibles: 0,5/1 (panel du haut) et 1/1 (panel du bas) ($n=5$). A l'issue des 4h de co-incubation, les cellules sont analysées en cytométrie en flux. Le CD107a permet de visualiser la dégranulation des cellules effectrices (panel de gauche) et le DAPI la mort des cellules cibles (panel de droite). * = RTX et GA101 significatif par rapport au NT, ** le GA101 est significatif par rapport au RTX.

Ensuite, nous avons voulu étudier ce phénomène en microscopie confocale sur des MALC entiers. Afin de pouvoir visualiser la totalité du MALC, nous nous sommes placées à 2 jours de culture, les MALC à 10 jours de culture étant trop volumineux. Ainsi, nous avons déterminé la mort des cellules du MALC induite pendant les 4h de co-culture entre les cellules NK et les MALC entiers après marquage à l'Annexine V. Les résultats observés sur les photographies de la figure 46 confirment les observations faites en cytométrie en flux. En effet, les traitements au RTX et au GA101 en présence de cellules NK induisent la mort des MALC. Le marquage Annexine V semble plus important dans la condition GA101, ce qui est également en accord avec les résultats de cytométrie en flux.

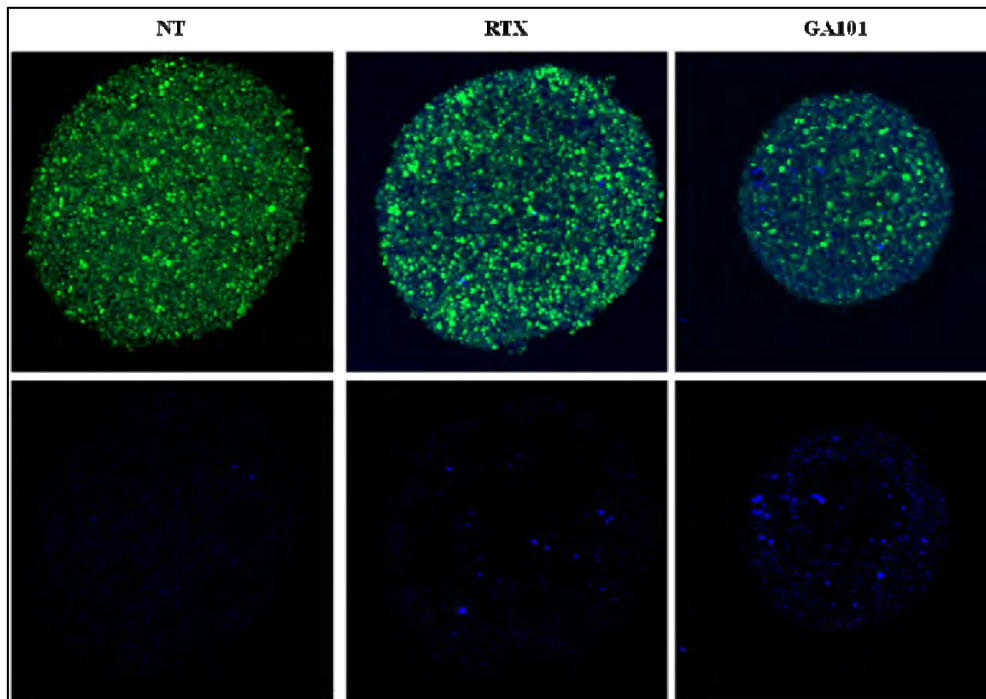


Figure 46: Le RTX et le GA101 favorisent la mort des MALC en présence de cellules NK. Des MALC GFP (NT, traités RTX ou GA101) à 2 jours de culture sont mis en culture avec des cellules NK à un ratio effecteur/cible de 10/1 pendant 4 h. L'Annexine V est ensuite ajoutée afin de visualiser les cellules mortes. Les MALC sont ensuite analysés au microscope confocal Zeiss 710. Les photographies représentent un *z-stack*. Dans le panel du haut, superposition des MALC GFP et du marquage annexine V. Dans le panel du bas, visualisation de l'annexine V seule.

Ces données de microscopie sont des observations préliminaires. D'autres expériences doivent être réalisées avec des donneurs supplémentaires pour confirmer ces données obtenues. Il serait également intéressant de reproduire ces expériences avec des lymphocytes T $\gamma\delta$ TCR V γ 9⁺ voire même à partir de biopsies de patients.

Nous avons également cherché à déterminer si le GA101 entraînait une plus forte activation des cellules NK comparativement au RTX. Pour cela, nous avons analysé la phosphorylation de trois protéines de la signalisation en aval du CD16: Syk, PLC γ 2 et Akt. Les phosphorylations/déphosphorylations étant des processus rapides, nous avons réalisés ces analyses après 5 min, 30 min, 1 h et 4 h de co-incubation entre cellules NK et MALC entiers. L'utilisation du FCB nous a permis de tester simultanément tous les temps de la cinétique.

Comme montré sur la figure 47, les deux AcMo entraînent une activation de Syk, PLC γ 2 et Akt. Chronologiquement, les deux premières protéines phosphorylées sont Syk et PLC γ 2. Sur ces événements précoces, on peut noter que la GA101 présente une efficacité supérieure à

celle du RTX. Par contre, sur des évènements plus tardifs telle que la phosphorylation d'Akt, il n'y a pas de réelle différence entre les deux AcMo.

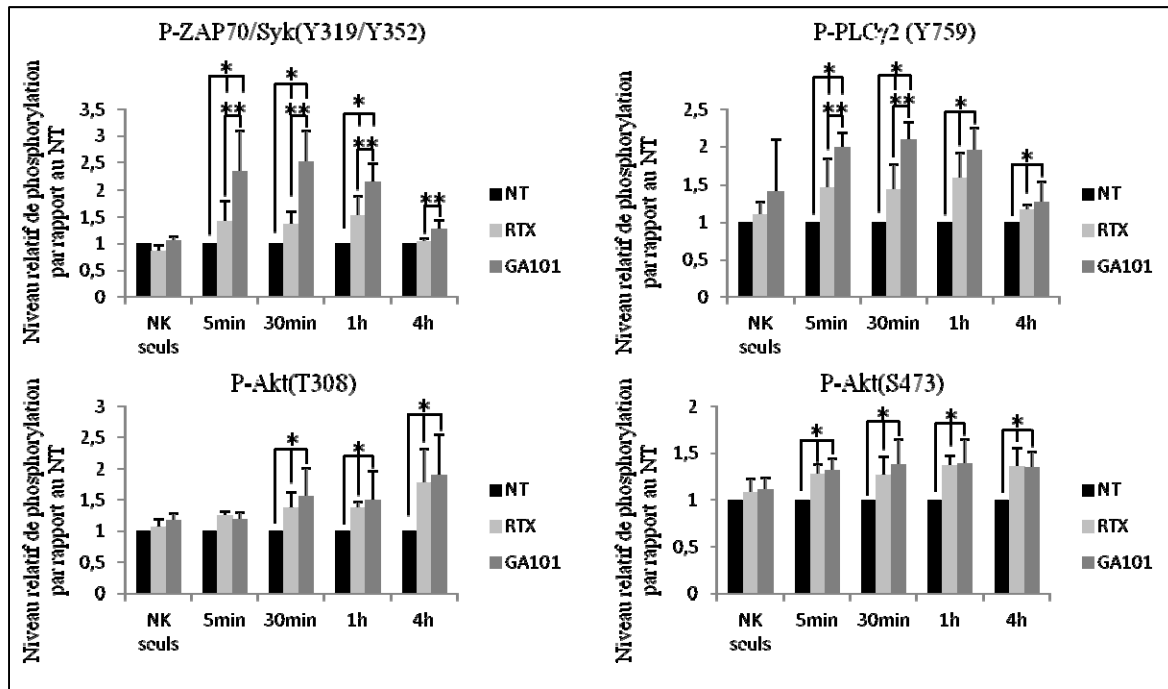


Figure 47: Le RTX et le GA101 activent la cascade de signalisation en aval du FcγRIIIa.

Des MALC à 10 jours de culture ont été mis en contact avec des cellules NK pendant 5 min, 30 min, 1 h ou 4 h avec un ratio effecteur/cible de 0,5/1 ($n=4$). Au terme de la co-incubation, les cellules sont prélevées, fixées puis perméabilisées. Les différentes conditions sont marquées avec plusieurs concentrations de colorants (CBD450 & CBD500) afin d'attribuer à chacune d'entre elles un « code-barre » fluorescent. Ensuite, tous les marquages des phosphoprotéines et les marquages de surface sont réalisés simultanément au sein d'un même tube et analysés grâce au logiciel Cytobank®.

Ces expériences ont également été réalisées sur des lignées primaires de lymphocytes T $\gamma\delta$ TCR $V\gamma9^+$. Cependant, aucun résultat significatif n'a été mis en évidence. La principale hypothèse pour expliquer ce phénomène est que nous avons utilisé des lignées pour réaliser ces expériences. Lors de l'initiation de ces lignées, les lymphocytes T $\gamma\delta$ TCR $V\gamma9^+$ sont stimulés avec du BrHPP et de l'IL-2 et sont utilisés 15 jours après, lorsque les lignées sont composées de plus de 90% de lymphocytes T $\gamma\delta$ TCR $V\gamma9^+$. Ainsi, il faudrait réaliser ces expériences avec des lymphocytes T $\gamma\delta$ TCR $V\gamma9^+$ fraîchement isolés de la même manière que pour les cellules NK.

3- Conclusion

Au total, l'ensemble de ces résultats montrent tout d'abord que le RTX et le GA101 induisent de l'ADCC dans les MALC entiers. Il s'agit là de la première fois qu'un tel phénomène est mis en évidence dans un modèle 3D de LF. La supériorité du GA101 est visible tant dans l'activation des cellules effectrices que dans la mort des cellules cibles.

Pour expliquer ces observations, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. D'une part, cette efficacité supérieure du GA101 peut être imputée aux modifications biochimiques qui ont été apportées lors du développement de cet AcMo de 3^{ème} génération. En effet, une meilleure efficacité de la liaison de l'AcMo, tant sur le CD20, par changement dans la région coudée, que sur le FcR, par afucosylation, pourrait engendrer un meilleur pontage entre la cellule effectrice et la cellule cible, expliquant ainsi une meilleure ADCC. D'autre part, la meilleure affinité pour le FcR induite par l'afucosylation de la partie Fc du GA101 pourrait générer une plus forte activation des cellules effectrices. Enfin, il est possible que la désintégration des couches périphériques du MALC générée par le GA101 observée lors de l'étude des effets directs, facilite la pénétration des cellules immunitaires dans le MALC. Ainsi, les interactions cellules effectrices – cellules cibles seraient facilitées permettant alors une meilleure ADCC.

Pour étoffer cette étude, il serait intéressant d'analyser en microscopie confocale la pénétration des cellules immunitaires au sein du MALC en temps réel (vidéo-microscopie), d'évaluer la biodiffusion des AcMo et de déterminer si la pénétration est meilleure avec le traitement des MALC par le GA101.

De plus, il serait intéressant de compléter l'étude avec les lymphocytes T $\gamma\delta$ V γ 9+ pour étendre cette action des AcMo à plusieurs types de cellules effectrices porteuses du FcR et impliquées dans l'ADCC induite par le RTX et le GA101 (93).

DISCUSSION

Mon travail de thèse a porté sur l'étude des mécanismes d'action du RTX et du GA101 dans les MALC. Il s'agit là du 1^{er} travail décrivant les mécanismes d'action du RTX et du GA101 dans un modèle de culture de cellules de LF en 3D.

Nous avons montré que, de manière directe suite à leur fixation sur le CD20, les AcMo induisent une diminution de la croissance des MALC, notamment causée par l'induction d'apoptose. L'inhibition plus importante engendrée par le GA101 peut s'expliquer par l'induction de deux types de mort cellulaire supplémentaires: la mort lysosomale et la sénescence. Grâce à la technique du FCB, nous avons montré que le GA101 inhibe les voies de signalisation classiquement activées dans les LF. Nous avons également démontré que le RTX et le GA101 sensibilisent les MALC à la rapamycine. Outre ces effets directs, les AcMo ont également une action indirecte *via* la liaison de leur fragment constant sur les FcR exprimés par les cellules immunitaires. Ainsi, nous avons montré que les AcMo induisent l'ADCC des cellules du MALC par les cellules NK et que l'action du GA101 est plus forte que celle du RTX tant dans l'activation des cellules immunitaires que dans la lyse des cellules tumorales.

Dans ce travail, nous n'avons pas abordé l'ADCP, connue également comme mécanisme d'action indirect des AcMo. En effet, selon le type de cellule immunitaire fixé par le fragment Fc, il se produira soit la lyse (si la liaison se fait avec des cellules NK ou des LT $\gamma\delta$), soit la phagocytose des cellules cibles (si la liaison se fait avec des macrophages). Dans la partie introductive de ce manuscrit, nous avons traité des mécanismes d'immuno-échappement mis en place par la tumeur et notamment de ceux permettant à la cellule tumorale d'échapper aux cellules effectrices de l'immunité. Parmi ces mécanismes, on trouve la surexpression de la protéine CD47 à la surface des cellules tumorales et notamment sur les cellules de LF (243, 301). Le CD47 est une protéine qui par sa liaison avec SIRP α exprimée par les macrophages, inhibe le processus de phagocytose (243). Nous avons voulu analyser l'expression du CD47 dans notre modèle et nous avons ainsi observé que les cellules cultivées en 2D et les cellules de MALC expriment fortement le CD47 (Figure 48). De manière intéressante, nous avons vu que l'expression du CD47 augmentait dans les MALC au cours du temps.

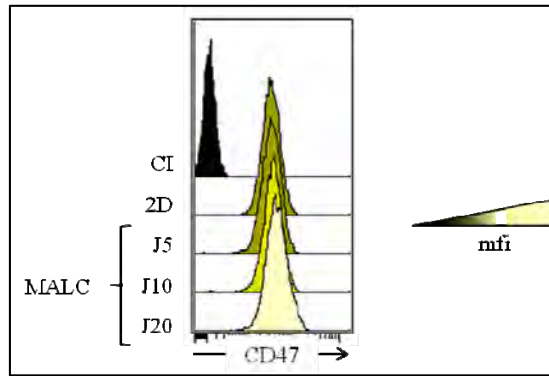


Figure 48: Expression du CD47 sur les cellules RL cultivées en 2D ou en 3D.

Histogramme représentant l'expression du CD47 sur les RL cultivée en 2D ou sur les MALC au cours du temps. CI: Contrôle Isotypique, mfi: *Mean of Fluorescent Intensity*.

Suite à ces observations, nous avons voulu déterminer l'impact des AcMo sur l'expression de cette protéine au sein des MALC. De manière étonnante, nous avons pu mettre en évidence que le GA101 diminue drastiquement cette expression (Figure 49). Le RTX induit le même phénomène mais dans une moindre mesure. L'inhibition induite par le GA101 est de plus en plus importante au cours du temps jusqu'à atteindre 40%.

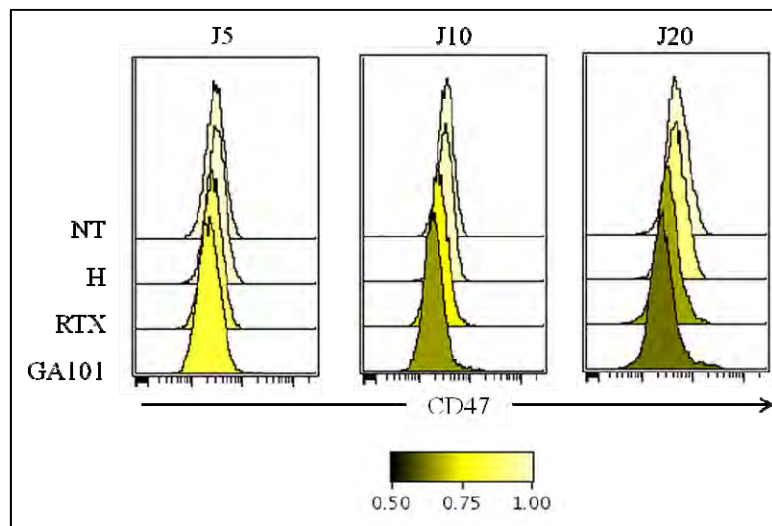


Figure 49: Expression du CD47 selon les traitements dans les MALC au cours du temps.

Histogrammes représentant les niveaux relatifs d'expression du CD47 par rapport au MALC non traité (NT). H: Herceptine.

Ces résultats ne sont que des données préliminaires mais nous encourageant à poursuivre l'étude. Il serait intéressant d'analyser les répercussions fonctionnelles de cette modulation de l'expression du CD47.

Chao et ses collaborateurs ont montré, dans le cadre d'une étude sur les LNHs, que l'association RTX – AcMo bloquant anti-CD47 augmentait considérablement la phagocytose des cellules de LNHs par les macrophages (243). Aux vues de nos observations concernant la modulation de l'expression du CD47 par les AcMo et plus particulièrement par le GA101, il serait intéressant d'étudier les effets d'une telle association avec les AcMo anti-CD20. L'immunothérapie à base d'AcMo anti-CD47 apparaît de plus en plus prometteuse aux vues des études qui ont été menées (302). L'étude menée par Tseng et ses collaborateurs a montré que les AcMo bloquants anti-CD47, induisaient *in vivo* une forte réduction de la masse tumorale (303). Ainsi, combiner le GA101 avec des AcMo bloquants anti-CD47 permettrait d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les LNHs.

SIRP α n'est pas le seul ligand de CD47. En effet, le CD47 peut également se lier à la glycoprotéine thrombospondine 1 (TSP-1). Par cette liaison, le CD47 est impliqué dans les interactions cellule – MEC car la TSP-1 contient plusieurs domaines de liaison à différents composants de la MEC telles que la fibronectine ou encore la laminine (304). Or, nous avons montré durant mes travaux de thèse une accumulation de fibronectine et de laminine dans les MALC (cf. article 2, fig. 2). La modulation du CD47 par le GA101 pourrait donc avoir un impact sur la liaison des cellules du MALC à la MEC et pourrait ainsi expliquer la désagrégation du MALC que nous avons observé lors de l'étude des effets directs du GA101 (cf. article 2, fig. 2). Une extrapolation peut être faite de toutes ces données, mettant en évidence un nouveau mécanisme d'action du GA101. En effet, le GA101, *via* l'inhibition de l'expression du CD47, pourrait diminuer les liaisons cellule – MEC entraînant ainsi une « dislocation » de la structure 3D. Cette « dislocation » pourrait faciliter la pénétration des agents thérapeutiques telle que la rapamycine. Afin d'étudier ces mécanismes, il serait intéressant d'évaluer la phagocytose en cytométrie en flux et en microscopie afin de déterminer l'impact fonctionnel de la modulation du CD47 par le GA101. De plus, il serait également intéressant d'associer le RTX et le GA101 à un AcMo bloquant anti-CD47 pour déterminer si ces AcMo agissent en synergie.

La MEC peut représenter un environnement défavorable à la pénétration des cellules immunitaires. En effet, l'équipe de Donnadieu a étudié l'impact de la MEC sur l'infiltration des cellules T. Bien qu'il semble que la présence d'un réseau fibrillaire puisse faciliter la migration des cellules T, la MEC apparaît comme un obstacle entre les lymphocytes T et les

cellules tumorales (305). En effet, dans les tumeurs solides, la MEC semble anormale. Les modifications à la fois quantitatives et qualitatives la rendent généralement plus épaisse et d'orientation linéaire. La MEC, qui peut être sécrétée par les cellules tumorales elles-mêmes, est régulée par les cellules du micro-environnement telles que les fibroblastes et les macrophages qui influencent le positionnement des fibres et la production de MEC (285). La tumeur semble de servir de la MEC comme d'un bouclier afin de prévenir l'infiltration des cellules immunitaires (306). Ce bouclier pourrait également gêner la pénétration d'agents thérapeutiques tels que les agents chimiothérapeutiques et les AcMo. Créer des failles dans ce bouclier pourrait donc représenter une approche thérapeutique intéressante.

L'union fait la force... Voilà une célèbre locution française qui prend ici tout son sens. Au même titre que la MEC peut être vue comme un bouclier, les cellules tumorales interagissent entre-elles de manière à ne laisser la place à aucune infiltration cellulaire. Altérer ces interactions pourrait être un moyen de rendre la tumeur plus perméable, notamment aux agents chimiothérapeutiques. D'autres observations faites durant mes travaux de thèse laissent penser que le GA101 est capable d'impacter ces interactions. En effet, comme montré sur la figure 50, le GA101 diminue l'expression d'ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*) sur les cellules de MALC. Après 20 jours de culture, on atteint une inhibition d'environ 40% qui pourrait être corrélée à la désintégration du MALC induite par le GA101.

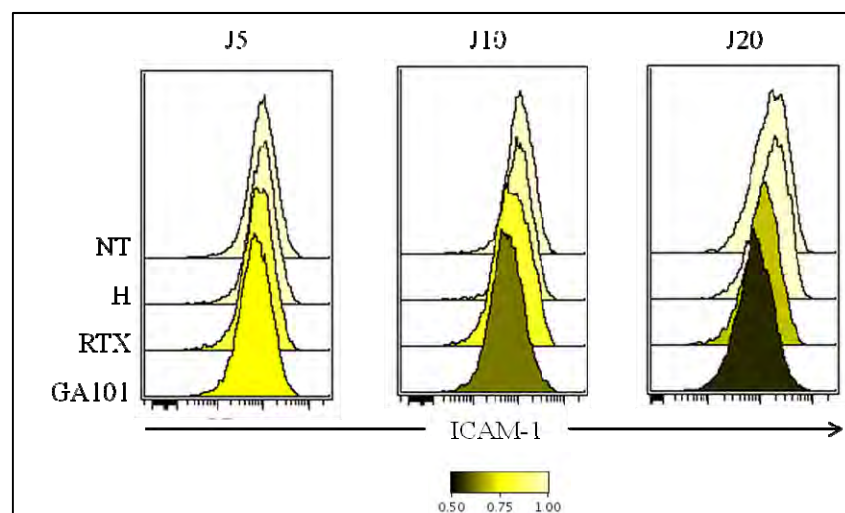


Figure 50: Inhibition de l'expression d'ICAM-1 par le GA101 dans les MALC.

Histogrammes overlay représentant les niveaux relatifs d'expression d'ICAM-1 par rapport au MALC non traité (NT). H: Herceptine

ICAM-1 est une protéine transmembranaire qui interagit avec les intégrines et principalement LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*), participant ainsi au phénomène d'adhésion intercellulaire. En altérant les interactions cellule – cellule, le GA101 pourrait diminuer la compaction tumorale facilitant par conséquent l'accès de la tumeur aux agents thérapeutiques et aux cellules immunitaires.

ICAM-1, *via* son rôle dans l'adhésion intercellulaire, participe également au processus de métastase tumorale. En effet, des travaux récemment menés par Hsin-Shan Yu et ses collaborateurs ont montré qu'ICAM-1 était impliquée dans le phénomène de métastase du cancer du pancréas. Ce processus implique ICAM-1 mais également la bradykinine et MMP-9 (*Matrix MetalloProtease*) (307). Or des travaux non publiés de notre équipe ont montré une surexpression de MMP-9 dans les MALC en comparaison avec une culture 2D classique. En diminuant ICAM-1, le GA101 pourrait également limiter ce phénomène de métastase.

Les tumeurs solides présentent une densité cellulaire élevée. Le fort compactage de ces tumeurs semble être dû à cette armature intercellulaire constituée des composants de la MEC. Les tumeurs épithéliales présentent une haute capacité à synthétiser des protéines matricielles (308). Tannock et ses collaborateurs ont montré que la quantité de composants matriciels est proportionnelle à la densité cellulaire (281). De plus, la rigidité tumorale est conférée par les interactions cellule – cellule (309) mais également par les interactions cellule – MEC (310). Enfin, toutes les cellules au sein d'une même tumeur ne sont pas exposées aux mêmes concentrations de drogues, du fait d'une diffusion différentielle à travers la MEC (281) causant ainsi des rechutes et des phénomènes de résistance (311). Il semble fort intéressant d'étudier le rôle de MEC dans le LF, qui est à l'heure actuelle très peu décrit: comprendre comment les cellules de LF sécrètent la MEC ou encore évaluer quel est l'impact de la MEC dans la biodiffusion et l'effet des AcMo.

Au total, mes travaux de thèse ont permis de caractériser les mécanismes d'action directs et indirects dans un modèle de culture de LF en 3D. Ce modèle est tout à fait innovant et permet de prendre en compte des paramètres tels que l'architecture spatiale ou les contraintes mécaniques dont on sait, par des études réalisées à partir de culture 3D de cellules carcinomateuses, l'influence sur la réponse et/ou l'efficacité thérapeutique.

Ce modèle tout à fait relevant de la physiopathologie est un outil majeur pour l'identification de nouvelles cibles (MEC, CD47...) mais également pour le criblage de nouvelles molécules thérapeutiques. La « complexification » d'un tel modèle avec l'intégration de cellules immunitaires et du micro-environnement, et la mise en culture en 3D de cellules issues de patients, représentent un challenge pour le futur.

Mes travaux de thèse s'inscrivent donc dans un projet global dont le but est, comme le disait Christian de Duve, célèbre prix Nobel qui s'est éteint cette année : « **Mieux comprendre, pour mieux guérir** ».

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Miller JF, Mitchell GF. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med.* 1968;128:801-20.
2. Mitchell GF, Miller JF. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med.* 1968;128:821-37.
3. Roitt IM, Greaves MF, Torrigiani G, Brostoff J, Playfair JH. The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views. *Lancet.* 1969;2:367-71.
4. Miller JF. Discovering the origins of immunological competence. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:1-17.
5. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:175-87.
6. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997;91:661-72.
7. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med.* 1991;173:1213-25.
8. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:107-16.
9. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 1983;302:575-81.
10. Hesse JE, Lieber MR, Mizuuchi K, Gellert M. V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev.* 1989;3:1053-61.
11. Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:359-83.
12. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:495-527.
13. Schlissel MS. Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:890-9.
14. Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:195-205.
15. Coupland SE. The challenge of the microenvironment in B-cell lymphomas. *Histopathology.* 2011;58:69-80.
16. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* 2004;197:179-91.
17. Natkunam Y. The biology of the germinal center. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007:210-5.
18. Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:845-57.
19. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity.* 2007;27:190-202.
20. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:22-33.
21. Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, et al. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem.* 1999;274:18470-6.
22. 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;102:553-63.

23. Traggiai E, Puzone R, Lanzavecchia A. Antigen dependent and independent mechanisms that sustain serum antibody levels. *Vaccine*. 2003;21 Suppl 2:S35-7.
24. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:251-62.
25. Townsend W, Linch D. Hodgkin's lymphoma in adults. *Lancet*. 2012;380:836-47.
26. Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:491-6.
27. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*. 1998;339:1506-14.
28. Bonadonna G, Bonfante V, Viviani S, Di Russo A, Villani F, Valagussa P. ABVD plus subtotal nodal versus involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin's disease: long-term results. *J Clin Oncol*. 2004;22:2835-41.
29. Duggan DB, Petroni GR, Johnson JL, Glick JH, Fisher RI, Connors JM, et al. Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: report of an intergroup trial. *J Clin Oncol*. 2003;21:607-14.
30. Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. *Histopathology*. 2011;58:4-14.
31. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Chang ET, Cole P, Mandel JS, et al. The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer*. 2007;120 Suppl 12:1-39.
32. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117:5019-32.
33. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 2012;380:848-57.
34. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109:1857-61.
35. Fisher RI, LeBlanc M, Press OW, Maloney DG, Unger JM, Miller TP. New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:8447-52.
36. Freedman A. Follicular lymphoma: 2012 update on diagnosis and management. *Am J Hematol*. 2012;87:988-95.
37. Solal-Celigny P. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Curr Treat Options Oncol*. 2006;7:270-5.
38. de Jong D, de Boer JP. Predicting transformation in follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2009;50:1406-11.
39. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 1999;341:1520-9.
40. 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;135:1130-42.
41. Wang E, Stoecker M, Burchette J, Rehder C. Follicular lymphoma with prominent Dutcher body formation: a pathologic study of 3 cases in comparison with nodal or splenic lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma. *Hum Pathol*. 2012;43:2001-11.
42. Roulland S, Faroudi M, Mamessier E, Sungalee S, Salles G, Nadel B. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. *Adv Immunol*. 2011;111:1-46.

43. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007;21:18-29.
44. Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, et al. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood*. 1995;85:2528-36.
45. 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;124:958-63.
46. Staudt LM. A closer look at follicular lymphoma. *N Engl J Med*. 2007;356:741-2.
47. 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;203:2425-31.
48. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, Compagno M, Smith P, Muramatsu M, et al. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet*. 2008;40:108-12.
49. Bastard C, Tilly H, Lenormand B, Bigorgne C, Boulet D, Kunlin A, et al. Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1992;79:2527-31.
50. 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;16:2309-17.
51. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122:3424-31.
52. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011;476:298-303.
53. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*. 2011;471:189-95.
54. Velichutina I, Shakhovich R, Geng H, Johnson NA, Gascoyne RD, Melnick AM, et al. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood*. 2010;116:5247-55.
55. Viardot A, Barth TF, Möller P, Döhner H, Bentz M. Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2003;13:183-90.
56. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood*. 2009;114:2273-9.
57. Cheung KJ, Johnson NA, Affleck JG, Severson T, Steidl C, Ben-Neriah S, et al. Acquired TNFRSF14 mutations in follicular lymphoma are associated with worse prognosis. *Cancer Res*. 2010;70:9166-74.
58. Launay E, Pangault C, Bertrand P, Jardin F, Lamy T, Tilly H, et al. High rate of TNFRSF14 gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis. *Leukemia*. 2012;26:559-62.
59. 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;99:2562-8.
60. Axford J. The impact of glycobiology on medicine. *Trends Immunol*. 2001;22:237-9.
61. Irish JM, Czerwinski DK, Nolan GP, Levy R. Altered B-cell receptor signaling kinetics distinguish human follicular lymphoma B cells from tumor-infiltrating nonmalignant B cells. *Blood*. 2006;108:3135-42.

62. 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;108:4156-62.
63. 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;111:285-91.
64. Kheirallah S, Fruchon S, Ysebaert L, Blanc A, Capilla F, Marrot A, et al. p90RSK mediates Enzastaurin antitumoral activity in follicular lymphoma cells. 2013.
65. Küppers R. Prognosis in follicular lymphoma--it's in the microenvironment. *N Engl J Med*. 2004;351:2152-3.
66. 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;351:2159-69.
67. de Jong D, Fest T. The microenvironment in follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24:135-46.
68. 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;104:502-8.
69. Coelho V, Krysov S, Ghaemmaghami AM, Emara M, Potter KN, Johnson P, et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:18587-92.
70. Whitworth PW, Pak CC, Esgro J, Kleinerman ES, Fidler IJ. Macrophages and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 1990;8:319-51.
71. Lawrence T. Inflammation and cancer: a failure of resolution? *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28:162-5.
72. 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;106:2169-74.
73. 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;115:5053-6.
74. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122:787-95.
75. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:958-69.
76. 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;27:1470-6.
77. 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;108:2957-64.
78. 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;107:3639-46.
79. 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;66:10145-52.
80. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*. 2012;23 Suppl 8:viii6-9.

81. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:11-22.
82. 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;16:637-50.
83. 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;24:5350-7.
84. Rankin L, Groom J, Mielke LA, Seillet C, Belz GT. Diversity, function, and transcriptional regulation of gut innate lymphocytes. *Front Immunol*. 2013;4:22.
85. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*. 2006;441:890-3.
86. 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;144:492-9.
87. 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;118:5371-9.
88. 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;6:114-7.
89. Malhotra A, Shanker A. NK cells: immune cross-talk and therapeutic implications. *Immunotherapy*. 2011;3:1143-66.
90. Chien YH, Konigshofer Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev*. 2007;215:46-58.
91. Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, Devilder MC, Allain-Maillet S, Fournié JJ, et al. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev*. 2007;215:123-35.
92. Braza MS, Klein B. Anti-tumour immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol*. 2013;160:123-32.
93. 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;96:400-7.
94. 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;184:134-40.
95. 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;101:2720-9.
96. Jordanova ES, Philippo K, Giphart MJ, Schuurin E, Kluin PM. Mutations in the HLA class II genes leading to loss of expression of HLA-DR and HLA-DQ in diffuse large B-cell lymphoma. *Immunogenetics*. 2003;55:203-9.
97. 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.
98. Decaup E, Mirshahi P, Rafii A, Mirshahi M, Fournié J-J, Poupot M. Oncologic Troglucytosis Protects Tumour Stromal Cells from $\gamma\delta$ Cell Cytotoxicity. *Journal of Life Sciences*. 2011;5:986-95.

99. 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.
100. 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;96:594-600.
101. 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;124:239-44.
102. 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;7:271-4.
103. Plumas J, Jacob MC, Chaperot L, Molens JP, Sotto JJ, Bensa JC. Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis. *Blood*. 1998;91:2875-85.
104. 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;122:1271-82.
105. Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*. 2001;11:130-5.
106. Barclay AN. Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha)/CD47 interaction and function. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:47-52.
107. Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol*. 2009;19:72-80.
108. Kershaw MH, Smyth MJ. Immunology. Making macrophages eat cancer. *Science*. 2013;341:41-2.
109. Chao MP, Weissman IL, Majeti R. The CD47-SIRP α pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Curr Opin Immunol*. 2012;24:225-32.
110. Mourcin F, Pangault C, Amin-Ali R, Amé-Thomas P, Tarte K. Stromal cell contribution to human follicular lymphoma pathogenesis. *Front Immunol*. 2012;3:280.
111. 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;25:390-8.
112. Amé-Thomas P, Le Priol J, Yssel H, Caron G, Pangault C, Jean R, et al. Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells. *Leukemia*. 2012;26:1053-63.
113. Farinha P, Al-Tourah A, Gill K, Klasa R, Connors JM, Gascoyne RD. The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood*. 2010;115:289-95.
114. Farinha P, Kyle AH, Minchinton AI, Connors JM, Karsan A, Gascoyne RD. Vascularization predicts overall survival and risk of transformation in follicular lymphoma. *Haematologica*. 2010;95:2157-60.
115. 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;26:795-805.
116. 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;22:1454-9.

117. Press OW, Palanca-Wessels MC. Selection of first-line therapy for advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2013;31:1496-8.
118. Reiser M, Diehl V. Current treatment of follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer.* 2002;38:1167-72.
119. Guadagnolo BA, Li S, Neuberg 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;64:928-34.
120. Michallet AS, Coiffier B. Recent developments in the treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood Rev.* 2009;23:11-23.
121. 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;15:1110-7.
122. Coiffier B, Neidhardt-Bérard EM, Tilly H, Belanger C, Bouabdallah R, Haioun C, et al. Fludarabine alone compared to CHVP plus interferon in elderly patients with follicular lymphoma and adverse prognostic parameters: a GELA study. *Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. Ann Oncol.* 1999;10:1191-7.
123. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van der Lelie H, Bron D, et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1995;333:1540-5.
124. Metzner B, Pott C, Müller TH, Gebauer W, Casper J, Kraemer D, et al. Long-term clinical and molecular remissions in patients with follicular lymphoma following high-dose therapy and autologous stem cell transplantation. *Ann Oncol.* 2013;24:1609-15.
125. 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;104:2735-42.
126. Hauke RJ, Armitage JO. Treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Curr Opin Oncol.* 2000;12:412-8.
127. Czuczman MS, Grillo-López AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1999;17:268-76.
128. Bendandi M. Idiotype vaccines for lymphoma: proof-of-principles and clinical trial failures. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:675-81.
129. 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;99:1517-26.
130. Thomas SK, Kwak LW. Lymphoma vaccine therapy: next steps after a positive, controlled phase III clinical trial. *Semin Oncol.* 2012;39:253-62.
131. 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;26:204-10.
132. D'Arcy P, Linder S. Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44:1729-38.
133. O'Connor OA. Marked clinical activity of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with follicular and mantle-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2005;6:191-9.
134. Ribrag V, Tilly H, Casasnovas O, Bosly A, Bouabdallah R, Delarue R, et al. Efficacy and toxicity of two schedules of bortezomib in patients with recurrent or refractory follicular

- lymphoma: a randomised phase II trial from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Eur J Cancer*. 2013;49:904-10.
135. O'Connor OA, Wright J, Moskowitz C, Muzzy J, MacGregor-Cortelli B, Stubblefield M, et al. Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:676-84.
136. Winer ES, Ingham RR, Castillo JJ. PCI-32765: a novel Bruton's tyrosine kinase inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012;21:355-61.
137. Schatz JH, Oricchio E, Puvvada SD, Wendel HG. Progress against follicular lymphoma. *Curr Opin Hematol*. 2013.
138. Leonard JP, Schuster SJ, Emmanouilides C, Couture F, Teoh N, Wegener WA, et al. Durable complete responses from therapy with combined epratuzumab and rituximab: final results from an international multicenter, phase 2 study in recurrent, indolent, non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2008;113:2714-23.
139. Andemariam B, Leonard JP. Should all patients with indolent lymphoma be treated with rituximab maintenance therapy? An overview of the data. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2006;7 Suppl 1:S20-3.
140. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:317-27.
141. Ansell SM, Hurvitz SA, Koenig PA, LaPlant BR, Kabat BF, Fernando D, et al. Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15:6446-53.
142. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:711-23.
143. Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, Landes S, Kneller A, Leiba M, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3044-51.
144. Hodi FS, Dranoff G. The biologic importance of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Cutan Pathol*. 2010;37 Suppl 1:48-53.
145. *Clinicaltrial*.
146. Moran AE, Kovacsovics-Bankowski M, Weinberg AD. The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2013;25:230-7.
147. Pfizer. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01307267?term=NCT01307267&rank=1>
148. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480:480-9.
149. Watier H. [From the ancient serotherapy to naked antibodies: a century of successful targeted therapies]. *Med Sci (Paris)*. 2009;25:999-1009.
150. THE ANTITOXIN TREATMENT OF DIPHTHERIA. *Br Med J*. 1894;2:1499-500.
151. SMOLENS J, VOGT AB, CRAWFORD MN, STOKES J. The persistence in the human circulation of horse and human tetanus antitoxins. *J Pediatr*. 1961;59:899-902.
152. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256:495-7.
153. Siberil S, Dutertre CA, Boix C, Teillaud JL. [Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes]. *Transfus Clin Biol*. 2005;12:114-22.

154. Capietto AH, Keirallah S, Gross E, Dauguet N, Laprévotte E, Jean C, et al. Emerging concepts for the treatment of hematological malignancies with therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Drug Targets*. 2010;11:790-800.
155. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:118-29.
156. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:714-27.
157. Molina A. A decade of rituximab: improving survival outcomes in non-Hodgkin's lymphoma. *Annu Rev Med*. 2008;59:237-50.
158. Press OW, Appelbaum F, Ledbetter JA, Martin PJ, Zarling J, Kidd P, et al. Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas. *Blood*. 1987;69:584-91.
159. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2008;359:613-26.
160. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol*. 1980;125:1678-85.
161. Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J*. 1988;7:711-7.
162. Valentine MA, Meier KE, Rossie S, Clark EA. Phosphorylation of the CD20 phosphoprotein in resting B lymphocytes. Regulation by protein kinase C. *J Biol Chem*. 1989;264:11282-7.
163. Beers SA, Chan CH, French RR, Cragg MS, Glennie MJ. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol*. 2010;47:107-14.
164. flickr.com. Available from: <http://www.flickr.com/photos/niaid/6830897205/>
165. Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J Biol Chem*. 2008;283:18545-52.
166. O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. Mice carrying a CD20 gene disruption. *Immunogenetics*. 1998;48:125-32.
167. Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol*. 1993;121:1121-32.
168. Polyak MJ, Tailor SH, Deans JP. Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment. *J Immunol*. 1998;161:3242-8.
169. Li H, Ayer LM, Lytton J, Deans JP. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J Biol Chem*. 2003;278:42427-34.
170. Mathas S, Rickers A, Bommert K, Dörken B, Mapara MY. Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer Res*. 2000;60:7170-6.
171. Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, et al. Costimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. *Leukemia*. 2003;17:1164-74.
172. Walshe CA, Beers SA, French RR, Chan CH, Johnson PW, Packham GK, et al. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2008;283:16971-84.
173. Kheirallah S, Caron P, Gross E, Quillet-Mary A, Bertrand-Michel J, Fournié JJ, et al. Rituximab inhibits B-cell receptor signaling. *Blood*. 2010;115:985-94.

174. Liang Y, Tedder TF. Identification of a CD20-, FcepsilonRIbeta-, and HTm4-related gene family: sixteen new MS4A family members expressed in human and mouse. *Genomics*. 2001;72:119-27.
175. Grigore R, Berteșteanu SV, Mogoantă CA. Immunologic and cytogenetic markers expressed in non-Hodgkin lymphoma of head and neck. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53:99-104.
176. van Meerten T, Hagenbeek A. CD20-targeted therapy: the next generation of antibodies. *Semin Hematol*. 2010;47:199-210.
177. Shimizu R, Kikuchi J, Wada T, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells. *Leukemia*. 2010;24:1760-8.
178. 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;113:4885-93.
179. Valentine MA, Cotner T, Gaur L, Torres R, Clark EA. Expression of the human B-cell surface protein CD20: alteration by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:8085-9.
180. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H, et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1561-70.
181. Bil J, Winiarska M, Nowis D, Bojarczuk K, Dabrowska-Iwanicka A, Basak GW, et al. Bortezomib modulates surface CD20 in B-cell malignancies and affects rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity. *Blood*. 2010;115:3745-55.
182. Venugopal P, Sivaraman S, Huang XK, Nayini J, Gregory SA, Preisler HD. Effects of cytokines on CD20 antigen expression on tumor cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2000;24:411-5.
183. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*. 2003;22:7359-68.
184. Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M. The epitope recognized by rituximab. *Blood*. 2006;108:1975-8.
185. Deans JP, Robbins SM, Polyak MJ, Savage JA. Rapid redistribution of CD20 to a low density detergent-insoluble membrane compartment. *J Biol Chem*. 1998;273:344-8.
186. Winiarska M, Bil J, Wilczek E, Wilczynski GM, Lekka M, Engelberts PJ, et al. Statins impair antitumor effects of rituximab by inducing conformational changes of CD20. *PLoS Med*. 2008;5:e64.
187. 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;26:133-43.
188. Protheroe A, Edwards JC, Simmons A, MacLennan K, Selby P. Remission of inflammatory arthropathy in association with anti-CD20 therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38:1150-2.
189. Perosa F, Favoino E, Caragnano MA, Prete M, Dammacco F. CD20: a target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2005;4:526-31.
190. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-33.

191. Coiffier B. Monoclonal antibody as therapy for malignant lymphomas. *C R Biol.* 2006;329:241-54.
192. Chan HT, Hughes D, French RR, Tutt AL, Walshe CA, Teeling JL, et al. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res.* 2003;63:5480-9.
193. Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M, et al. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood.* 2011;118:358-67.
194. Klein C, Lammens A, Schäfer W, Georges G, Schwaiger M, Mössner E, et al. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs.* 2013;5:22-33.
195. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood.* 2010;115:4393-402.
196. Dalle S, Reslan L, Besseyre de Horts T, Herveau S, Herting F, Plesa A, et al. Preclinical studies on the mechanism of action and the anti-lymphoma activity of the novel anti-CD20 antibody GA101. *Mol Cancer Ther.* 2011;10:178-85.
197. clinique GA101. Available from: www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=GA101&Search=Search
198. GA101 c. clinique GA101. Available from: www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=GA101&Search=Search
199. Goede V, Fischer K, Busch R, Jaeger U, Dilhuydy MS, Wickham N, et al. Chemoimmunotherapy with GA101 plus chlorambucil in patients with chronic lymphocytic leukemia and comorbidity: results of the CLL11 (BO21004) safety run-in. *Leukemia.* 2013;27:1172-4.
200. Radford J, Davies A, Cartron G, Morschhauser F, Salles G, Marcus R, et al. Obinutuzumab (GA101) plus CHOP or FC in relapsed/refractory follicular lymphoma: results of the GAUDI study (BO21000). *Blood.* 2013.
201. Morschhauser FA, Cartron G, Thieblemont C, Solal-Céligny P, Haioun C, Bouabdallah R, et al. Obinutuzumab (GA101) Monotherapy in Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma or Mantle-Cell Lymphoma: Results From the Phase II GAUGUIN Study. *J Clin Oncol.* 2013.
202. Reichert JM. Antibodies to watch in 2013: Mid-year update. *MAbs.* 2013;5:513-7.
203. Robak T. GA-101, a third-generation, humanized and glyco-engineered anti-CD20 mAb for the treatment of B-cell lymphoid malignancies. *Current Opinion In Investigational Drugs;* 2009. p. 588-96.
204. Bakkour W, Coulson IH. GA101 (a Novel Anti-CD20 Monoclonal Antibody)-Induced Lichenoid Eruption. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2012;2:3.
205. Bezombes C, Grazide S, Garret C, Fabre C, Quillet-Mary A, Müller S, et al. Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood.* 2004;104:1166-73.
206. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene.* 2007;26:3629-36.
207. Reslan L, Dalle S, Herveau S, Perrial E, Dumontet C. Apoptotic induction by anti-CD20 antibodies in chronic lymphocytic leukemia: comparison of rituximab and obinutuzumab. *Leuk Lymphoma.* 2013.
208. de Duve C. The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol.* 2005;7:847-9.

209. Grønbaek K, Jäättelä M. Engaging the lysosomal compartment to combat B cell malignancies. *J Clin Invest*. 2009;119:2133-6.
210. Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, et al. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood*. 2011;117:4519-29.
211. Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, Cheadle EJ, Pelicano H, Ivanov A, et al. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood*. 2012;119:3523-33.
212. Česen MH, Pegan K, Spes A, Turk B. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res*. 2012;318:1245-51.
213. Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, Honeychurch J, Alduaij W, Cox KL, et al. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest*. 2009;119:2143-59.
214. Fehrenbacher N, Bastholm L, Kirkegaard-Sørensen T, Rafn B, Bøttzauw T, Nielsen C, et al. Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2. *Cancer Res*. 2008;68:6623-33.
215. Jak M, van Bochove GG, Reits EA, Kallemeijn WW, Tromp JM, Umana P, et al. CD40 stimulation sensitizes CLL cells to lysosomal cell death induction by type II anti-CD20 mAb GA101. *Blood*. 2011;118:5178-88.
216. Däbritz JHM, Yu Y, Rosenfeldt MT, Dörken B, Schmitt CA. Anti-CD20 Immunotherapy Augments the Chemotherapy-Induced Senescence Response In Human Lymphoma cells. *ASH meeting*. 2010.
217. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005;436:725-30.
218. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436:642.
219. Feldser DM, Greider CW. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell*. 2007;11:461-9.
220. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:9363-7.
221. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102:1536-46.
222. te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2002;62:1876-83.
223. Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res*. 2003;63:2705-15.
224. Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol*. 2001;11:S27-31.
225. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12072-7.
226. Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci*. 2005;118:485-96.

227. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004;104:2635-42.
228. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*. 2006;24:19-28.
229. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83:435-45.
230. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6:443-6.
231. Funakoshi S, Longo DL, Murphy WJ. Differential in vitro and in vivo antitumor effects mediated by anti-CD40 and anti-CD20 monoclonal antibodies against human B-cell lymphomas. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*. 1996;19:93-101.
232. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2003;278:3466-73.
233. Bologna L, Gotti E, Manganini M, Rambaldi A, Intermesoli T, Introna M, et al. Mechanism of action of type II, glycoengineered, anti-CD20 monoclonal antibody GA101 in B-chronic lymphocytic leukemia whole blood assays in comparison with rituximab and alemtuzumab. *J Immunol*. 2011;186:3762-9.
234. Rafiq S, Butchar JP, Cheney C, Mo X, Trotta R, Caligiuri M, et al. Comparative assessment of clinically utilized CD20-directed antibodies in chronic lymphocytic leukemia cells reveals divergent NK cell, monocyte, and macrophage properties. *J Immunol*. 2013;190:2702-11.
235. Laprevotte E, Ysebaert L, Klein C, Valleron W, Blanc A, Gross E, et al. Endogenous IL-8 acts as a CD16 co-activator for natural killer-mediated anti-CD20 B cell depletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2013;37:440-6.
236. medical-dictionary. voie classique du complément. Available from: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/terminal+complement+pathway>
237. Harjunpää A, Junnikkala S, Meri S. Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol*. 2000;51:634-41.
238. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. 2001;98:3383-9.
239. Bellosillo B, Villamor N, López-Guillermo A, Marcé S, Esteve J, Campo E, et al. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood*. 2001;98:2771-7.
240. Zhou X, Hu W, Qin X. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *Oncologist*. 2008;13:954-66.
241. Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003;101:949-54.
242. Matlawska-Wasowska K, Ward E, Stevens S, Wang Y, Herbst R, Winter SS, et al. Macrophage and NK-mediated killing of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells targeted with a-fucosylated anti-CD19 humanized antibodies. *Leukemia*. 2013;27:1263-74.

243. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell*. 2010;142:699-713.
244. Selenko N, Maidic O, Draxier S, Berer A, Jäger U, Knapp W, et al. CD20 antibody (C2B8)-induced apoptosis of lymphoma cells promotes phagocytosis by dendritic cells and cross-priming of CD8+ cytotoxic T cells. *Leukemia*. 2001;15:1619-26.
245. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1147-57.
246. Rafiq K, Bergtold A, Clynes R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest*. 2002;110:71-9.
247. Abès R, Gélizé E, Fridman WH, Teillaud JL. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood*. 2010;116:926-34.
248. Cartron G, Zhao-Yang L, Baudard M, Kanouni T, Rouillé V, Quittet P, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol*. 2008;26:2725-31.
249. Kimby E, Jurlander J, Geisler C, Hagberg H, Holte H, Lehtinen T, et al. Long-term molecular remissions in patients with indolent lymphoma treated with rituximab as a single agent or in combination with interferon alpha-2a: a randomized phase II study from the Nordic Lymphoma Group. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:102-12.
250. Hilchey SP, Hyrien O, Mosmann TR, Livingstone AM, Friedberg JW, Young F, et al. Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a "vaccinal effect" of rituximab. *Blood*. 2009;113:3809-12.
251. Pauwels PJ, Dumontet C, Reichert JM, Beck A, Goetsch L, Corvaia N, et al. 7th cancer scientific forum of the Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes: March 20-21, 2012, Lyon, France. *MAbs*. 2012;4:434-44.
252. Cartron G, Trappe RU, Solal-Céligny P, Hallek M. Interindividual variability of response to rituximab: from biological origins to individualized therapies. *Clin Cancer Res*. 2011;17:19-30.
253. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Céligny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fcγ3A gene. *Blood*. 2002;99:754-8.
254. Dall'Ozzo S, Tartas S, Piantaud 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;64:4664-9.
255. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res*. 2007;67:1270-81.
256. Meyer zum Büschenfelde C, Feuerstacke Y, Götze KS, Scholze K, Peschel C. GM1 expression of non-Hodgkin's lymphoma determines susceptibility to rituximab treatment. *Cancer Res*. 2008;68:5414-22.
257. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol*. 2006;176:2600-9.
258. Pedersen AE, Jungersen MB, Pedersen CD. Monocytes mediate shaving of B-cell-bound anti-CD20 antibodies. *Immunology*. 2011;133:239-45.
259. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1971;46:113-20.

260. Pickl M, Ries CH. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene*. 2009;28:461-8.
261. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen*. 2004;9:273-85.
262. 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;36:141-57.
263. 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;8:878-84.
264. Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol*. 1999;1:E131-8.
265. Gudjonsson T, Rønnev-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;30:247-55.
266. 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;6:95-104.
267. 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;78:576-82.
268. 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;19:151-9.
269. Nygren P, Kristensen J, Jonsson B, Sundström C, Lönnerholm 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;6:1121-8.
270. Mueller-Klieser W. Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000;36:123-39.
271. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:839-45.
272. Smalley KS, Lioni M, Herlyn M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2006;42:242-7.
273. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*. 1988;240:177-84.
274. Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland RM. Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *Br J Cancer*. 1987;56:325-7.
275. 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;148:3-15.
276. Cheng NC, Wang S, Young TH. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials*. 2012;33:1748-58.

277. Selden C, Khalil M, Hodgson H. Three dimensional culture upregulates extracellular matrix protein expression in human liver cell lines--a step towards mimicking the liver in vivo? *Int J Artif Organs*. 2000;23:774-81.
278. Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol*. 1998;79:1-23.
279. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Kreutz M. Brave little world: spheroids as an in vitro model to study tumor-immune-cell interactions. *Cell Cycle*. 2006;5:691-5.
280. Tannock IF. Tumor physiology and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2001;20:123-32.
281. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:583-92.
282. Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*. 2002;70:537-46.
283. 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;2:205-16.
284. 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.
285. Peranzoni E, Rivas-Caicedo A, Bougherara H, Salmon H, Donnadieu E. Positive and negative influence of the matrix architecture on antitumor immune surveillance. *Cell Mol Life Sci*. 2013.
286. Gravelle P, Jean C, Valleron W, Laurent G, Fournié JJ. Innate predisposition to immune escape in follicular lymphoma cells. *Oncoimmunology*. 2012;1:555-6.
287. Daydé D, Ternant D, Ohresser M, Lerondel S, Pesnel S, Watier H, et al. Tumor burden influences exposure and response to rituximab: pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling using a syngeneic bioluminescent murine model expressing human CD20. *Blood*. 2009;113:3765-72.
288. Krutzik PO, Clutter MR, Trejo A, Nolan GP. Fluorescent cell barcoding for multiplex flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*. 2011;Chapter 6:Unit 6.31.
289. Krutzik PO, Nolan GP. Fluorescent cell barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling. *Nat Methods*. 2006;3:361-8.
290. Irish JM, Myklebust JH, Alizadeh AA, Houot R, Sharman JP, Czerwinski DK, et al. B-cell signaling networks reveal a negative prognostic human lymphoma cell subset that emerges during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:12747-54.
291. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*. 1994;264:267-70.
292. Poupot M, Fournié JJ. Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunol Lett*. 2004;95:129-38.
293. Espinosa E, Belmont C, Pont F, Luciani B, Poupot R, Romagné F, et al. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J Biol Chem*. 2001;276:18337-44.
294. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné CM, Mönkkönen H, Mönkkönen J, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood*. 2012;120:2269-79.

295. Palakodeti A, Sandstrom A, Sundaresan L, Harly C, Nedellec S, Olive D, et al. The molecular basis for modulation of human V γ 9V δ 2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *J Biol Chem*. 2012;287:32780-90.
296. Golay J, Bologna L, André PA, Buchegger F, Mach JP, Boumsell L, et al. Possible misinterpretation of the mode of action of therapeutic antibodies in vitro: homotypic adhesion and flow cytometry result in artefactual direct cell death. *Blood*. 2010;116:3372-3; author reply 3-4.
297. Turzanski J, Daniels I, Haynes AP. Involvement of macroautophagy in the caspase-independent killing of Burkitt lymphoma cell lines by rituximab. *Br J Haematol*. 2009;145:137-40.
298. Jazirehi AR, Bonavida B. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene*. 2005;24:2121-43.
299. Luk CK, Veinot-Drebot L, Tjan E, Tannock IF. Effect of transient hypoxia on sensitivity to doxorubicin in human and murine cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:684-92.
300. Delbaldo C, Albert S, Dreyer C, Sablin MP, Serova M, Raymond E, et al. Predictive biomarkers for the activity of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors. *Target Oncol*. 2011;6:119-24.
301. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*. 2009;138:271-85.
302. Unanue ER. Perspectives on anti-CD47 antibody treatment for experimental cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:10886-7.
303. Tseng D, Volkmer JP, Willingham SB, Contreras-Trujillo H, Fathman JW, Fernhoff NB, et al. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:11103-8.
304. Sick E, Jeanne A, Schneider C, Dedieu S, Takeda K, Martiny L. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *Br J Pharmacol*. 2012;167:1415-30.
305. Salmon H, Donnadieu E. [The extracellular matrix: an obstacle to T cell-tumor cell interaction]. *Med Sci (Paris)*. 2012;28:824-6.
306. 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;122:899-910.
307. Yu HS, Lin TH, Tang CH. Involvement of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation in bradykinin promotes cell motility in human prostate cancers. *Int J Mol Sci*. 2013;14:13329-45.
308. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, et al. 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*. 1999;5:662-8.
309. Ivascu A, Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int J Oncol*. 2007;31:1403-13.
310. Shield K, Riley C, Quinn MA, Rice GE, Ackland ML, Ahmed N. Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis. *J Carcinog*. 2007;6:11.
311. Kyle AH, Huxham LA, Yeoman DM, Minchinton AI. Limited tissue penetration of taxanes: a mechanism for resistance in solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2804-10.

ANNEXES

Annexe 1:



Journal of Life Sciences 5 (2011) 986-995

Oncologic Trogocytosis Protects Tumour Stromal Cells from $\gamma\delta$ Cell Cytotoxicity

Emilie Decaup^{1,2}, Pejman Mirshahi³, Arash Rafii⁴, Massoud Mirshahi³, Jean-Jacques Fournié^{1,2} and Mary Poupot^{1,2}

1. INSERM UMR1037-Cancer Research Center of Toulouse, CNRS ERL, CHU Purpan, Toulouse 31024, France

2. University of Toulouse 3, Toulouse 31000, France

3. UMRS 872 INSERM, University of Pierre et Marie Curie-Paris 6 and University of Paris Descartes, Team 18, CRC, 15 Rue de l'Ecole de Médecine, Paris Cedex 06 75270, France

4. Department of Genetic Medecine and Obstetrics and Gynecology, WCMC-Qatar, Doha, Qatar

Received: June 27, 2011 / Accepted: July 25, 2011 / Published: December 30, 2011.



Oncologic Trogocytosis Protects Tumour Stromal Cells from $\gamma\delta$ Cell Cytotoxicity

Emilie Decaup^{1,2}, Pejman Mirshahi³, Arash Rafii⁴, Massoud Mirshahi³, Jean-Jacques Fournié^{1,2} and Mary Poupot^{1,2}

1. INSERM UMR1037-Cancer Research Center of Toulouse, CNRS ERL, CHU Purpan, Toulouse 31024, France

2. University of Toulouse 3, Toulouse 31000, France

3. UMRS 872 INSERM, University of Pierre et Marie Curie-Paris 6 and University of Paris Descartes, Team 18, CRC, 15 Rue de l'Ecole de Médecine, Paris Cedex 06 75270, France

4. Department of Genetic Medicine and Obstetrics and Gynecology, WCMC-Qatar, Doha, Qatar

Received: June 27, 2011 / Accepted: July 25, 2011 / Published: December 30, 2011.

Abstract: Tumours progressively develop chemoresistance and immunoescape abilities thanks to support from their stromal microenvironment. In ovarian carcinomas, for instance, tumour-associated mesenchymal stem cells (TAMC) can transfer multi-drug-resistant proteins to develop metastases. However, since the microenvironment of such carcinomas is frequently infiltrated by both TAMC and $\gamma\delta$ T lymphocytes, the consequences of interactions between these cell types were unclear. Here, we report that whilst $\gamma\delta$ T lymphocytes were not activated when co-incubated *in vitro* with TAMC, their cell membranes were trogocytosed by the TAMC. Since TAMC constitutively express a low level of HLA class I, which is increased by trogocytosis of $\gamma\delta$ cell-derived HLA class I, the interaction increased the expression of HLA class-I molecules on TAMC. In addition, $\gamma\delta$ T lymphocytes are HLA-unrestricted cytolytic cells and their activity is regulated by inhibitory receptors (KIR) for self-HLA class I. Hence, although the lytic activity of $\gamma\delta$ T lymphocytes for unrelated target cells was unaffected by trogocytosis, it spared the TAMC. Therefore, interactions between TAMC and cytolytic $\gamma\delta$ T cells avoided the killing of these stromal cells due to an active transfer of their protective HLA class-I molecules. These results suggest that trogocytosis contributes to the maintenance of cancer-associated stromal cells.

Key words: Membrane transfer, tumour microenvironment, stromal cells, HLA-class I molecules.

1. Introduction

Despite the presence of tumour-infiltrating T cells, ovarian cancer is the most lethal gynaecological malignancy due to frequent peritoneal metastasis and ascitis [1, 2], a tolerant tumourous microenvironment encompassing immunoregulatory cells and immunosuppressive mediators [3-5]. The tumour stroma generally plays an essential role in tumour cell survival and growth via the production of cytokines, growth factors or metalloproteinases [6, 7]. It can also promote metastatic invasion through mesenchymal stem cell (MSC)-derived chemokine CCL5 [8] or

through N-cadherin, released from cancer cells interacting with tumour-associated mesenchymal stem cells (TAMC) [9]. Stromal fibroblasts and TAMC also promote tumour growth and angiogenesis [10, 11]. Direct interactions between stromal and cancer cells prevent their apoptosis via the up-regulation of anti-apoptotic proteins [12] or CXCL12 [13]. Moreover, TAMC from ovarian carcinomas can confer chemoresistance through oncologic trogocytosis, mediating the transfer of multi-drug resistant proteins [14].

Beside its direct tumour-promoting activities, the tumour microenvironment also favours tumour immunoescape. MSC and tumour-associated fibroblasts can inhibit natural killer (NK) cell

Corresponding author: Mary Poupot, Ph.D., research fields: immunology and oncology. E-mail: mary.poupot@inserm.fr.

proliferation, cytotoxicity and cytokine production through indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2 [15, 16]. MSC also inhibit $\alpha\beta$ T cell proliferation, either by soluble TGF β , NO and PGE2 or by cell contact-mediated PD1 signalling [17-19], whereas MSC (and ovarian cancer TAM) inhibit $\gamma\delta$ T cell proliferation and cytokine production [20, 21]. In addition, MSC can also impair the maturation and function of dendritic cells [22, 23]. Hence the tumour stroma protects against immunological attacks via various means.

However, the activity of immune cells on stromal cells is still poorly documented. In the tumour microenvironment, IFN γ induces MSC to secrete immunosuppressive molecules [24, 25]. In response to MSC, however, NK cells remain capable of killing targets through NKG2D or Nkp30 signalling combined with a low level of inhibitory ligands on the targets [26]. We previously showed that T CD4, T CD8 and $\gamma\delta$ T lymphocyte proliferation and cytokine production are immunosuppressed by TAMC from ovarian carcinoma patients [20]. Moreover, ovarian and mammary carcinoma tissue microarrays evidenced a correlation of chemoresistance with the presence of TAMC [14]. Independent tissue microarray studies revealed the presence of tumour-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes in ovarian carcinomas [2]. Considering these observations, we questioned the molecular consequences of direct interactions between TAMC and $\gamma\delta$ T lymphocytes. Here, we report that upon direct contact, the TAMC selectively acquire HLA class-I molecules from the $\gamma\delta$ T lymphocytes through oncologic trogocytosis. Although they were spared from $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity by acquiring their protective HLA class-I molecules, the TAMC did not impair the $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity of cancer cell targets. Thus, oncologic trogocytosis could represent a new mechanism of immunological protection of the tumour stroma, and thereby contribute to the development of tumours.

2. Materials and Methods

2.1 Antibodies and Flow Cytometry

Fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs): anti-HLA-ABC-PE-Cy5, anti-CD107a-PE-Cy5, anti-TCR V γ 9-PE, anti-NKAT2-PE and anti-NKB1-PE were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA); anti-CD3-PB and anti-TCR V γ 9-FITC were purchased from Biolegend (San Diego, CA); anti-CD166-PE, anti-CD25-PE-Cy5, anti-NKG2D-PE-Cy5, anti-NKG2A-PE and anti-CD94-PE were purchased from Beckman Coulter (Fullerton, CA); anti-CD166-AlexaFluor 647 was purchased from Serotec (Oxford, UK); and 1-7F9-APC was purchased from Innate Pharma (Marseille, France).

The lipophilic fluorochrome PKH67 was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and the cytoplasmic Cell Tracker CMTMR (5-(and 6)-(((4-chloromethyl) benzoyl) amino) tetramethylrhodamine) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR).

Flow cytometry was performed with LSR-II and FACSDiva (BD Biosciences) and FlowJo 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR) software.

2.2 Reagents

rhIL-2 was provided by Sanofi-Aventis (Labège, France) and the synthetic phosphoantigen bromohydrin pyrophosphate (BrHPP) was provided by Innate Pharma (Marseille, France).

Cells were cultured in complete medium containing RPMI 1640 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μ g/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin and 1 mM sodium pyruvate (Cambrex Biosciences, Rockland, ME).

2.3 Culture of TAMC

The TAMC were isolated from the ascitis fluids of untreated ovarian cancer patients (stage III) undergoing ascitis evacuation [14].

Immunohistochemical characterization of the

TAMC involved staining for cytokeratin, vimentin, CD45, CD20, CD68, CD34, Protein S100, myeloperoxidase, CD166, CD146, CD10 and CD3, as previously described Ref. [14]. Briefly, primary cultures of TAMC isolated from five different ovarian carcinoma patients were infected by the SV40 large T antigen-expressing retroviral vector. The LT-expressing TAMC were selected in a medium containing neomycin (experiment performed by the Laboratoire de Therapie Genique, CHU Nantes, France). The immortalized TAMC cell line M16 was cultured at 37°C in 5% CO₂ and complete RPMI medium supplemented with 10% FCS.

2.4 $V\gamma9V\delta2$ T Cells Samples and Culture

Fresh blood samples were collected from different healthy donors and the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared on a Ficoll-Hypaque density gradient (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) by centrifugation (800 g for 30 min at room temperature). Primary $\gamma\delta$ T cell lines were obtained from PBMCs by *in vitro* PBMC culture for 14 days in complete medium supplemented with 10% Fetal Clone I (HyClone/Thermo Fisher Scientific, Brebières, France), BrHPP (3 μ M) and rhIL-2 (300 IU/mL) on day 0 followed by supplementation of rhIL-2 (300 IU/mL) every three days. The TCR phenotype of all of the $\gamma\delta$ T cells lines comprised > 90% TCRV $\gamma9^+$ cells.

2.5 Cytotoxicity Assays

The Daudi Burkitt's lymphoma cell line, the ovarian carcinoma cell line called OVCAR and the TAMC used as target cells were cultured at 37°C in complete medium and 10% FCS. Specific lysis by $\gamma\delta$ T cells was measured by the standard 4 h [⁵¹Cr] release assay. The percentage of specific lysis was obtained by $((\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})) \times 100$. Maximum release was determined by adding 0.1% Triton X-100. Data are presented as the mean of triplicate samples.

2.6 Expression of CD107a

After a 4 h co-incubation at 37°C in medium with PE-Cy5-conjugated anti-CD107a or the isotopic control antibody of the $\gamma\delta$ T cells and Daudi cells in the presence or absence of the TAMC line at different ratios, the cells were labelled for the TCR V $\gamma9$ and the CD166. The expression of CD107a was then analysed by flow cytometry on the gated $\gamma\delta$ T cells specifically.

2.7 Trogocytosis

The cells were stained with the lipophilic dyes PKH67 (green) or with cytoplasmic CMTMR (red) according to the manufacturer's instructions; 2×10^5 PKH67-labelled cells were co-cultured for 3 h at 37°C with 10^5 CMTMR-labelled cells in 96-well U-bottom tissue culture plates. The cells were then washed twice with PBS containing 2 mM EDTA and green fluorescence was analysed by flow cytometry and confocal microscopy.

2.8 Transfer of the Membrane Proteins

We applied two settings for assessing the transfer of membrane proteins. The first method was the co-culture of TAMC and $\gamma\delta$ T cells for 3 h, separation of the cells with PBS containing 2 mM EDTA and then labelling of the cells with PE-Cy5-conjugated anti-HLA-ABC, PE-Cy5-conjugated antibody directed to NKG2D or PE-Cy5-conjugated antibody directed to CD25. The HLA-ABC expression by the CD166⁺ TAMC and by TCR V $\gamma9^+$ $\gamma\delta$ T cells was then analysed by flow cytometry.

The second method was labelling the $\gamma\delta$ T cells with PE-Cy5-conjugated anti-HLA-ABC for 10 min at 4°C, washing twice with PBS and co-incubating these cells for 3 h with the TAMC (at TAMC/ $\gamma\delta$ T cell ratio of 1/2). After 3 h, all cells were labelled for TCR V $\gamma9$ and CD166 prior to analysing HLA-ABC expression by flow cytometry.

2.9 Confocal Microscopy of Trogocytosis

The PKH67 and CMTMR orange

(CMTMR)-stained cells were processed for confocal microscopy as follows. After 3 min or 3 h of co-culture, the cells were gently suspended and plated on poly-L-lysine (Sigma-Aldrich)-coated slides for 5 min at 37°C. After fixation with PBS containing 4% p-formaldehyde, the cells were washed and directly mounted in PBS containing 90% glycerol and 2% 1-4-diazabicyclo (2.2.2) octane (DABCO; Sigma-Aldrich). The samples were examined using a Carl Zeiss LSM 510 confocal microscope (Jena, Germany).

2.10 Statistical Analysis

Data are means and SD from independent experiments performed with $\gamma\delta$ T cells from different healthy donors. The normality and equal variance of each sample series were evaluated prior to statistical analysis by the specified tests. A one-tailed, paired Student's *t*-test was used whenever appropriate or a one-way Mann-Whitney rank-sum test was used otherwise, with $\alpha = 5\%$ for statistical significance. All statistical analyses were performed using the SigmaStat 3.0 software (SPSS, Chicago, IL).

3. Results

3.1 Strong $\gamma\delta$ T Cell Trogocytosis by TAMC

Since direct cell contact with lymphocytes usually favours molecular transfers onto the lymphocyte cell membrane, a process called trogocytosis, we first asked whether or not the direct cell contact of $\gamma\delta$ lymphocytes with TAMC led to trogocytosis. Therefore, TAMC stained with PKH67 were co-incubated with $\gamma\delta$ T cells for 3 min and 3 h, and the PKH67 green fluorescence on the $\gamma\delta$ T lymphocytes (gated) was compared at these two time points. For microscopy, the $\gamma\delta$ T lymphocytes were stained before co-culture with the CMTMR red cytoplasmic fluorochrome. Both flow cytometry (Fig. 1, top) and confocal microscopy analysis (Fig. 1, bottom) indicated that $\gamma\delta$ T cells acquired a minute amount of PKH67 upon cell contact with TAMC, indicating that the level of trogocytosis of TAMC by $\gamma\delta$

lymphocytes was very low (Fig. 1A).

In contrast, strikingly different results were obtained when analysing trogocytosis in the opposite direction. The $\gamma\delta$ T cells stained with PKH67 were co-incubated with TAMC for 3 min and 3 h, and the PKH67 green fluorescence on the TAMC (gated) was compared as above. For microscopy, the TAMC were stained before co-culture with the CMTMR red cytoplasmic fluorochrome. We found that upon direct cell contact, the TAMC acquired a high amount of green fluorescence from the $\gamma\delta$ T cells (Fig. 1B). Since this fluorochrome is stably inserted into cell membranes, its appearance on the TAMC meant that these cells had

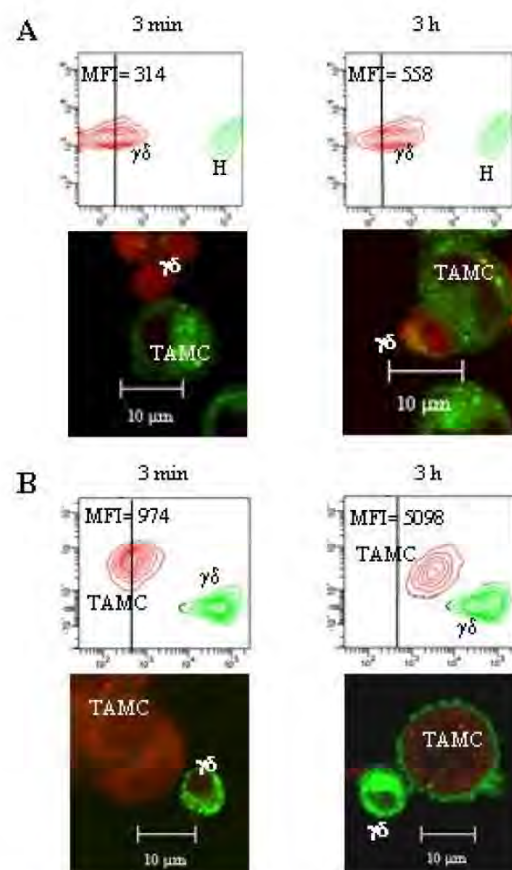


Fig. 1 Trogocytosis of $\gamma\delta$ T cells by TAMC.

A: MFI of PKH67 on gated CMTMR⁺ $\gamma\delta$ T cells after 3 min or 3 h of contact with PKH67⁺ TAMC measured by flow cytometry (top) and by confocal microscopy (bottom); **B:** MFI of PKH67 on gated CMTMR⁺ TAMC after 3 min or 3 h of contact with PKH67⁺ $\gamma\delta$ T cells measured by flow cytometry (top) and by confocal microscopy (bottom).

mediated a strong trogocytosis of the $\gamma\delta$ T lymphocytes upon cell contact.

Together, these results indicated that direct contact between $\gamma\delta$ lymphocytes and TAMC leads to an almost unidirectional trogocytosis of $\gamma\delta$ cells by the TAMC.

3.2 TAMC Acquired $\gamma\delta$ T Cell-Derived HLA Class-I Molecules by Trogocytosis

We thus questioned whether the trogocytosis of $\gamma\delta$ T cells led to the acquisition of $\gamma\delta$ T cell-derived membrane proteins by the TAMC. Using the same experimental conditions as above, we then labelled all cells in the co-cultures with antibodies directed against different $\gamma\delta$ T cell membrane proteins. Before the co-culture, the TAMC weakly expressed HLA class-I molecules and did not express any of the $\gamma\delta$ T cell markers $V\gamma 9V\delta 2$ TCR, NKG2D and IL2-receptor α chain CD25. After 3 h of contact with $\gamma\delta$ T cells, however, although the TAMC still lacked expression of $V\gamma 9V\delta 2$ TCR, NKG2D, CD25 and CD69 (data not shown), their HLA class-I expression was increased (Fig. 2A). On average, from four independent experiments, the mean fluorescence intensity of HLA-A,B,C at the cell surface of TAMC co-cultured with the $\gamma\delta$ T cells became three times higher than that of the TAMC alone (Fig. 2B).

However, the increased HLA class-I expression by the TAMC in contact with the $\gamma\delta$ T cells could have been due to the up-regulation of endogenous HLA class-I. In order to assess this, the $\gamma\delta$ T cells were labelled with PE-Cy5-conjugated anti-HLA-A,B,C prior to contact with the TAMC. Both HLA-labelled $\gamma\delta$ T cells and TAMC were then co-cultured for 3 h, separated with EDTA solution and analysed by flow cytometry. Under these conditions, the TAMC co-incubated with labelled $\gamma\delta$ T cells were positive for HLA-A,B,C-PE-Cy5 whereas those co-incubated for only 3 min were not (Fig. 2C).

These data indicated that trogocytosis of the $\gamma\delta$ T cells by the TAMC increased the level of HLA class-I molecules at their cell surface most significantly

through the selective acquisition of $\gamma\delta$ T cell-derived molecules.

3.3 TAMC Are Weakly Killed by $\gamma\delta$ T Cells

The primary $\gamma\delta$ T cell lines expressed the inhibitory

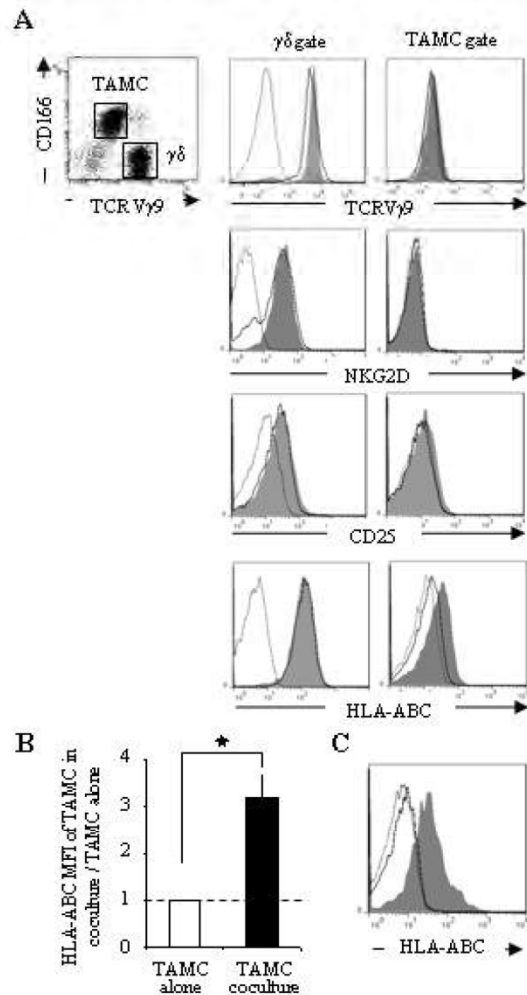


Fig. 2 Trogocytosis of $\gamma\delta$ T cell-derived HLA class-I molecules by TAMC.

A: Expression of TCRV $\gamma 9$, NKG2D, CD25 and HLA-A,B,C by the TAMC (H gate) and by the $\gamma\delta$ T cells ($\gamma\delta$ gate) after 3 h of contact (shaded histogram) and 3 min of contact (black line) compared to the isotypic control (dotted line); **B:** Mean of the ratio of the MFI of the HLA-A,B,C for the TAMC alone (white bar) or after a 3 h co-culture with the $\gamma\delta$ T cells (black bar) from four independent experiments; **C:** Expression of HLA-A,B,C by the TAMC after 3 h (shaded histogram) or 3 min (black line) of contact with the $\gamma\delta$ T cells labelled with the anti-HLA-A,B,C compared to the isotype control (dotted line).

receptors CD94/NKG2A, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1 and KIR2DS2 (Fig. 3A). Since self-HLA class-I molecules are ligands for the KIR inhibitory receptors expressed by the $\gamma\delta$ T cells, their presence at the cell surface of TAMC might protect against cytolysis by $\gamma\delta$ T lymphocytes. We thus tested whether or not the 4 h of cell contact with TAMC induced the $\gamma\delta$ T cells to secrete their lytic granules and kill these target cells. Lytic granule secretion by $\gamma\delta$ T cells, as monitored by cell surface expression of the CD107a marker, was not significant when co-incubated with TAMC (Fig. 3B). Accordingly, the TAMC were weakly killed by the $\gamma\delta$ T cells under these conditions (Fig. 3C). These results indicated that 4 h of contact between TAMC and $\gamma\delta$ T cells spared the stromal cells from cytolytic attacks. In order to refute the possibility that it is merely reflected incubation with inactivated $\gamma\delta$ T cells, the same experiment was performed in the presence of the strong agonist BrHPP, known to trigger $\gamma\delta$ T cell responses within seconds [27]. Again, the TAMC were spared from cytolysis mediated by BrHPP-activated $\gamma\delta$ T lymphocytes (Fig. 3C).

3.4 TAMC Do Not Inhibit the Allogenic Lysis Function of the $\gamma\delta$ T Cells

The above result suggested that cell contact with TAMC might have abrogated any lytic activity from the activated $\gamma\delta$ T cells. To address this, we asked whether or not co-incubation of TAMC and $\gamma\delta$ T cells inhibited the strong killing of Daudi cells, a well-known $\gamma\delta$ T cell target cell line of HLA class-I-deficient Burkitt's lymphoma [28]. When in the presence of Daudi target cells alone, 50% of the $\gamma\delta$ T cells were induced to secrete cytolytic granules. When tested in the presence of Daudi cells plus increasing numbers of TAMC or culture supernatant, however, the same rate of secreting $\gamma\delta$ T cells were recorded, suggesting that the presence of TAMC had not abrogated any lytic activity from the activated $\gamma\delta$ T cells (Fig. 4A). Accordingly, the specific lysis of Daudi cells was not affected by the presence of TAMC in the

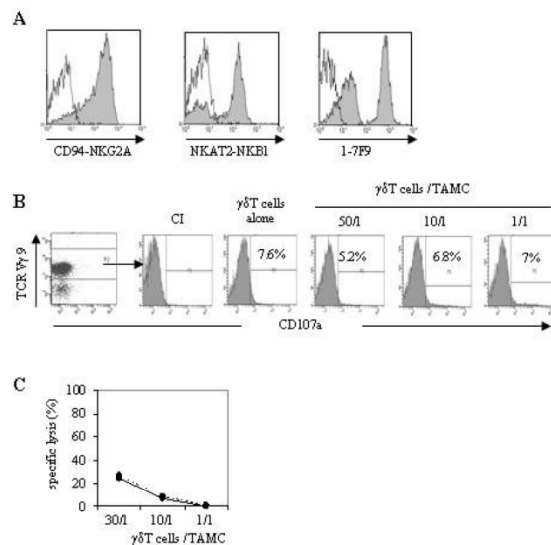


Fig. 3 Weak lysis of the TAMC by the $\gamma\delta$ T cells.

A: Expression of KIR inhibitory receptors by the $\gamma\delta$ T cells (shaded histogram) compared to the isotypic control (black line), the NKAT2 antibody recognized KIR2DL2, KIR2DL3 and KIR2DS2; the NKB1 antibody recognized KIR2DL1, and the 1-7F9 antibody recognized KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1 and KIR2DS2; **B:** Expression (%) of the CD107a by the $\gamma\delta$ T cells alone or after 3 h of contact with the TAMC compared to the isotopic control (CI); **C:** Percentage of specific lysis of the TAMC by the $\gamma\delta$ T cells reactivated (dotted line) or not (black line) by the BrHPP.

co-culture (Fig. 4B). Along the same line, the low level of lysis of the ovarian carcinoma cell line OVCAR was not affected by TAMC initially derived from the ascites of ovarian carcinoma patients (Fig. 4C). Again, a similar conclusion was reached when this type of experiment was performed in presence of BrHPP. The strong $\gamma\delta$ T cell stimulus triggered a higher specific lysis of OVCAR, but this was not impaired by the presence of TAMC (Fig. 4D).

Altogether, these results indicated that co-incubation with TAMC had not broadly abrogated all cytolytic activity by $\gamma\delta$ T lymphocytes, but only that directed against the TAMC.

4. Discussion

In this study, we showed that direct contact between $\gamma\delta$ T lymphocytes and TAMC induces the trogocytosis

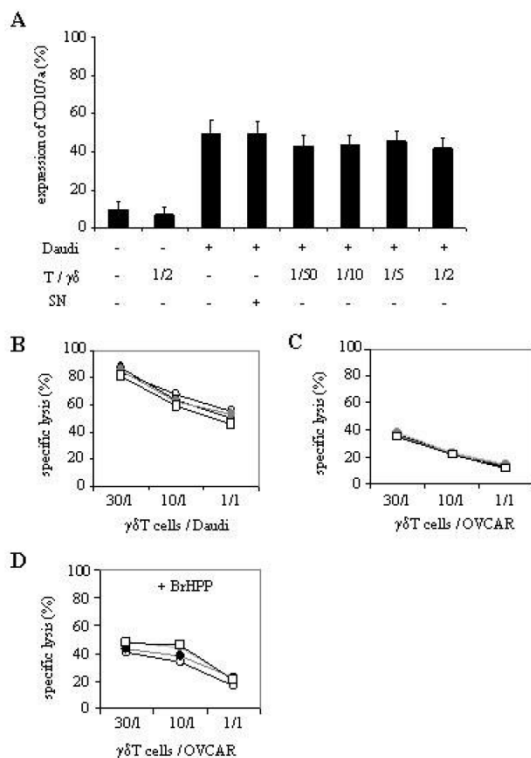


Fig. 4 TAMC did not inhibit the allogenic lysis function of the $\gamma\delta$ T cells.

A: Expression of CD107a by the $\gamma\delta$ T cells activated or not by the Daudi cell line and in the presence or absence of the TAMC or of their culture supernatant (SN); **B:** Specific lysis of Daudi cells by $\gamma\delta$ T cells without TAMC (white circle), with TAMC (1/2 ratio: black circle, 1/50 ratio: grey circle), and with the supernatant of the TAMC culture (white square); **C:** Specific lysis of OVCAR cells by the $\gamma\delta$ T cells without TAMC (white circle), with TAMC (1/2 ratio: black circle, 1/50 ratio: grey circle), and with the supernatant of the TAMC culture (white square); **D:** Specific lysis of OVCAR cells by the $\gamma\delta$ T cells without TAMC (white circle), with TAMC (1/2 ratio: black circle, 1/50 ratio: grey circle), with the supernatant of the TAMC culture (white square) with reactivation of the $\gamma\delta$ T cells by BrHPP.

of $\gamma\delta$ cells, leading to a selective acquisition of their HLA class-I molecules at the cell surface of TAMC. This did not impair the anti-tumour cytolytic activity of $\gamma\delta$ T lymphocytes, although their lytic activity spared these stromal cells.

Usually, $\gamma\delta$ T cells are considered as immune cytotoxic effectors that engage immunological synapses, recognize target cells and kill them [29-31].

The conjugation of a cytolytic CD8 T lymphocyte to its target cell involves a fusion of both plasma membranes at the immunological synapse [32], a structure prone to yielding to trogocytosis. The immunological synapses of cytolytic $\gamma\delta$ T lymphocytes and their target cells also permit the acquisition of cell membrane molecules through trogocytosis [27]. In addition, both trogocytosis and the release of cytolytic granules occur simultaneously in these immunological synapses [28]. Although trogocytosis between non-immune cells was depicted previously [14, 33-35], few reports have documented the reciprocal acquisition of immune cell-derived markers such as NK cell receptors [36] or CD4⁺ T cell proteins [37] by non-immune cells. Here, we showed for the first time the transfer of $\gamma\delta$ T cell-derived membrane molecules onto the membrane of stromal cells and particularly HLA-class I molecules. Some studies showed the transfer of HLA molecules such as HLA-G1 but from the target (APC) onto CD4 or CD8 T cells and not from the effector cells on the target [38]. Moreover, the selectivity of the molecular acquisition by TAMC, i.e. of $\gamma\delta$ T cell-derived HLA class-I molecules but not of CD25, CD69, V γ 9V δ 2 TCR or NKG2D, is puzzling, but not unprecedented. The T cells efficiently acquire CD9 and moderately acquire CXCR4 (but not MeCP2) from the surface of HEK cells by trogocytosis [39]. Whatever the molecular mechanism underlying this molecular specificity, however, TAMC constitutively express a very low amount of HLA class-I molecules, so conceivably, their trogocytically-increased level of cell surface HLA class-I molecules could protect against lytic attack by the $\gamma\delta$ T lymphocytes. The level of KIR on the $\gamma\delta$ cells supports the view that their cytolytic activity might be dampened by self-HLA class-I ligands. This model is supported by the weak lysis of TAMC that we report here.

5. Conclusion

Here, we showed for the first time the specific transfer of $\gamma\delta$ T cell-derived membrane HLA-class I

molecules onto the membrane of tumor-associated stromal cells.

The microenvironment of ovarian carcinomas contains $\gamma\delta$ T [2], NK [40] and TAMC [14] tumour-infiltrating cells. Therefore, physiologically, the TAMC could acquire a higher level of self-HLA class-I molecules through immunological synapses with $\gamma\delta$ T cells and thus be spared from cytolytic attack. However, NK cells are able to kill foetal and adult stromal cells such as MSC by NKG2D or TRAIL-mediated pathways, and this killing can be inhibited by the up-regulation of HLA class-I molecules upon exposure to IFN γ [26, 41]. Moreover, cancer-associated stromal cells might differ from healthy stromal cells and represent better targets for cytolytic lymphocytes. For instance, MSC from AML patients show abnormal morphology and impaired differentiation [42]. MSC from patients with multiple myeloma also display distinct genomic and phenotypic profiles compared to MSC from healthy individuals [43, 44]. Due to these distinctive characteristics, cancer-associated stromal cells could therefore be targeted by cytolytic effector cells. Their ability to acquire protective molecules like HLA-class I upon trogocytosis could be a salvage mechanism for their maintenance in the microenvironment. In fact, stromal cells have dual facets of bioactivity. At the same time they can be immunosuppressive for T or NK cell functions [15, 18, 20, 21, 45-47] and they can also support tumour development by conferring chemoresistance [14], promoting metastases [13, 48] and favouring tumour progression [49-51].

Trogocytosis has been proposed as a mechanism leading to the modulation of immune responses, mediating the acquisition of multidrug resistance in tumour cells, favouring fusion of the oocyte with spermatozoa and facilitating the antiviral role of T cells [33, 34, 52, 53].

Thus, we propose that by contributing to the maintenance of cancer-associated stromal cells, trogocytosis might also participate in tumour

progression. Future studies at our laboratory will determine whether or not the targeting of cancer-associated stromal cells and their cell interactions might have a therapeutic activity for cancer.

Acknowledgments

This work was supported by institutional grants from l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by the Innate Pharma, Marseille. The authors would like to thank the "Plateau Technique d'Imagerie Cellulaire de Toulouse Purpan" for the confocal microscopy.

References

- [1] J. Pfisterer, J.A. Ledermann, Management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer, *Semin. Oncol.* 33 (2 Suppl. 6) (2006) 12-16.
- [2] M.R. Raspollini, F. Castiglione, D. Rossi Degl'innocenti, G. Amunni, A. Villanucci, F. Garbini, et al., Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma, *Ann. Oncol.* 16 (4) (2005) 590-596.
- [3] W. Zou, V. Machelon, A. Coulomb-L'Hermin, J. Borvak, F. Nome, T. Isaeva, et al., Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells, *Nat. Med.* 7 (12) (2001) 1339-1346.
- [4] R. Yigit, L.F. Massuger, C.G. Figdor, R. Torensma, Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination, *Gynecol. Oncol.* 117 (2) (2010) 366-372.
- [5] U.K. Scarlett, J.R. Cubillos-Ruiz, Y.C. Nesbeth, D.G. Martinez, X. Engle, A.T. Gewirtz, et al., *In situ* stimulation of CD40 and Toll-like receptor 3 transforms ovarian cancer-infiltrating dendritic cells from immunosuppressive to immunostimulatory cells, *Cancer Res.* 69 (18) (2009) 7329-7337.
- [6] L.A. Liotta, E.C. Kohn, The microenvironment of the tumour-host interface, *Nature* 411 (6835) (2001) 375-379.
- [7] L.M. Coussens, C.L. Tinkle, D. Hanahan, Z. Werb, MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis, *Cell* 103 (3) (2000) 481-490.
- [8] A.E. Karnoub, A.B. Dash, A.P. Vo, A. Sullivan, M.W. Brooks, G.W. Bell, et al., Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis, *Nature*

- 449 (7162) (2007) 557-563.
- [9] R. Lis, J. Capdet, P. Mirshahi, M. Lacroix-Triki, F. Dagonnet, C. Klein, et al., Oncologic trogocytosis with Hospicells induces the expression of N-cadherin by breast cancer cells, *Int. J. Oncol.* 37 (6) (2010) 1453-1461.
- [10] A. Orimo, P.B. Gupta, D.C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naem, et al., Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion, *Cell* 121 (3) (2005) 335-348.
- [11] M. Pasquet, M. Golzio, E. Mery, A. Rafii, N. Benabbou, P. Mirshahi, et al., Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis, *Int. J. Cancer* 126 (9) (2010) 2090-2101.
- [12] M. Konopleva, S. Konoplev, W. Hu, A.Y. Zaritsky, B.V. Afanasiev, M. Andreeff, Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins, *Leukemia* 16 (9) (2002) 1713-1724.
- [13] R. Lis, C. Touboul, P. Mirshahi, F. Ali, S. Mathew, D.J. Nolan, et al., Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12, *Int. J. Cancer* 128 (3) (2011) 715-725.
- [14] A. Rafii, P. Mirshahi, M. Poupot, A.M. Faussat, A. Simon, E. Ducros, et al., Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours, *PLoS. One* 3 (12) (2008) 3894.
- [15] G.M. Spaggiari, A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M.C. Mingari, L. Moretta, Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2, *Blood* 111 (3) (2008) 1327-1333.
- [16] M. Balsamo, F. Scordamaglia, G. Pietra, C. Manzini, C. Cantoni, M. Boitano, et al., Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (49) (2009) 20847-20852.
- [17] K. Sato, K. Ozaki, I. Oh, A. Meguro, K. Hatanaka, T. Nagai, et al., Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells, *Blood* 109 (1) (2007) 228-234.
- [18] L. Martinet, S. Fleury-Cappellesso, M. Gadelorge, G. Dietrich, P. Bourin, J.J. Fournie, et al., A regulatory cross-talk between $V\gamma 9V\delta 2$ T lymphocytes and mesenchymal stem cells, *Eur. J. Immunol.* 39 (3) (2009) 752-762.
- [19] A. Augello, R. Tasso, S.M. Negrini, A. Amateis, F. Indiveri, R. Cancedda, et al., Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway, *Eur. J. Immunol.* 35 (5) (2005) 1482-1490.
- [20] L. Martinet, R. Poupot, P. Mirshahi, A. Rafii, J.J. Fournie, M. Mirshahi, et al., Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T cell immune responses, *Int. J. Cancer.* 126 (9) (2010) 2143-2152.
- [21] I. Petrini, S. Pacini, M. Petrini, R. Fazzi, L. Trombi, S. Galimberti, Mesenchymal cells inhibit expansion but not cytotoxicity exerted by gamma-delta T cells, *Eur. J. Clin. Invest.* 39 (9) (2009) 813-818.
- [22] X.X. Jiang, Y. Zhang, B. Liu, S.X. Zhang, Y. Wu, X.D. Yu, et al., Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells, *Blood* 105 (10) (2005) 4120-4126.
- [23] S. Beyth, Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, et al., Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness, *Blood* 105 (5) (2005) 2214-2219.
- [24] M. Krampera, L. Cosmi, R. Angeli, A. Pasini, F. Liotta, A. Andreini, et al., Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 24 (2) (2006) 386-398.
- [25] H. Maby-El Hajjami, P. Ame-Thomas, C. Pangault, O. Tribut, J. DeVos, R. Jean, et al., Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: Role of indoleamine-2,3 dioxygenase, *Cancer Res.* 69 (7) (2009) 3228-3237.
- [26] G.M. Spaggiari, A. Capobianco, S. Becchetti, M.C. Mingari, L. Moretta, Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation, *Blood* 107 (4) (2006) 1484-1890.
- [27] E. Espinosa, J. Tabiasco, D. Hudrisier, J.J. Fournie, Synaptic transfer by human gamma delta T cells stimulated with soluble or cellular antigens, *J. Immunol.* 168 (12) (2002) 6336-6343.
- [28] J. Gertner, A. Wiedemann, M. Poupot, J.J. Fournie, Human gammadelta T lymphocytes strip and kill tumor cells simultaneously, *Immunol. Lett.* 110 (1) (2007) 42-53.
- [29] P. Fisch, E. Meuer, D. Pende, S. Rothenfusser, O. Viale, S. Kock, et al., Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human $V\gamma 9/V\delta 2$ T cells in tumor immunity, *Eur. J. Immunol.* 27 (12) (1997) 3368-3379.
- [30] M. Todaro, M. D'Asaro, N. Caccamo, F. Iovino, M.G. Francipane, S. Meraviglia, et al., Efficient killing of human colon cancer stem cells by $\gamma\delta$ T lymphocytes, *J. Immunol.* 182 (11) (2009) 7287-7296.
- [31] B. Favier, E. Espinosa, J. Tabiasco, C. Dos Santos, M. Bonneville, S. Valitutti, et al., Uncoupling between immunological synapse formation and functional outcome in human gamma delta T lymphocytes, *J. Immunol.* 171 (10) (2003) 5027-5033.

- [32] J.C. Stinchcombe, G. Bossi, S. Booth, G.M. Griffiths, The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges, *Immunity* 15 (5) (2001) 751-761.
- [33] V. Barraud-Lange, N. Naud-Barriant, M. Bomsel, J.P. Wolf, A. Ziyat, Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa, *FASEB J.* 21 (13) (2007) 3446-3449.
- [34] A. Levchenko, B.M. Mehta, X. Niu, G. Kang, L. Villafania, D. Way, et al., Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (6) (2005) 1933-1938.
- [35] M. Poupot, J.J. Fournie, Spontaneous membrane transfer through homotypic synapses between lymphoma cells, *J. Immunol.* 171 (5) (2003) 2517-2523.
- [36] B. Vanherberghen, K. Andersson, L.M. Carlin, E.N. Nolte-'t Hoen, G.S. Williams, P. Hoglund, et al., Human and murine inhibitory natural killer cell receptors transfer from natural killer cells to target cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (48) (2004) 16873-16878.
- [37] T. He, C. Tang, Y. Liu, Z. Ye, X. Wu, Y. Wei, et al., Bidirectional membrane molecule transfer between dendritic and T cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359 (2) (2007) 202-208.
- [38] J. LeMaout, J. Caumartin, M. Daouya, B. Favier, S. Le Rond, A. Gonzalez, et al., Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells, *Blood* 109 (5) (2007) 2040-2048.
- [39] S. Daubeuf, A. Aucher, C. Bordier, A. Salles, L. Serre, G. Gaibelet, et al., Preferential transfer of certain plasma membrane proteins onto T and B cells by trogocytosis, *PLoS One* 5 (1) (2010) e8716. doi: 10.1371/journal.pone.0008716.
- [40] H.P. Dong, M.B. Elstrand, A. Holth, I. Silins, A. Berner, C.G. Trope, et al., NK-and B-cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma, *Am. J. Clin. Pathol.* 125 (3) (2006) 451-458.
- [41] Y. Terui, Y. Mishima, N. Sugimura, K. Kojima, T. Sakurai, R. Kuniyoshi, et al., Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma, *Clin. Cancer Res.* 15 (7) (2009) 2523-2530.
- [42] Z.G. Zhao, Y. Liang, K. Li, W.M. Li, Q.B. Li, Z.C. Chen, et al., Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases, *Stem. Cells Dev.* 16 (4) (2007) 637-648.
- [43] M. Garayoa, J.L. Garcia, C. Santamaria, A. Garcia-Gomez, J.F. Blanco, A. Pandiella, et al., Mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients display distinct genomic profile as compared with those from normal donors, *Leukemia* 23 (8) (2009) 1515-1527.
- [44] L. Garderet, C. Mazurier, A. Chapel, I. Ernou, L. Boutin, X. Holy, et al., Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma, *Leuk Lymphoma* 48 (10) (2007) 2032-2041.
- [45] R. Ramasamy, C.K. Tong, H.F. Seow, S. Vidyadaran, F. Dazzi, The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function, *Cell Immunol.* 251 (2) (2008) 131-136.
- [46] F. Gieseke, J. Bohringer, R. Bussolari, M. Dominici, R. Handgretinger, I. Muller, Human multipotent mesenchymal stromal cells employ galectin-1 to inhibit immune effector cells, *Blood* 116 (19) (2010) 3770-3779.
- [47] M. Najar, G. Raicevic, H.I. Boufker, H. Fayyad Kazan, C. De Bruyn, N. Meuleman, et al., Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources, *Cell Immunol.* 264 (2) (2010) 171-179.
- [48] F.T. Martin, R.M. Dwyer, J. Kelly, S. Khan, J.M. Murphy, C. Curran, et al., Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: Stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT), *Breast Cancer Res. Treat.* 124 (2) (2010) 317-326.
- [49] L. Kucerova, M. Matuskova, K. Hlubinova, V. Altanerova, C. Altaner, Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells, *Mol. Cancer* 9 (1) (2010) 129. doi: 10.1186/1476-4598-9-129.
- [50] S.A. Patel, J.R. Meyer, S.J. Greco, K.E. Corcoran, M. Bryan, P. Rameshwar, Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta, *J. Immunol.* 184 (10) (2010) 5885-5894.
- [51] V.R. Placencio, X. Li, T.P. Sherrill, G. Fritz, N.A. Bhowmick, Bone marrow derived mesenchymal stem cells incorporate into the prostate during regrowth, *PLoS one* 5 (9) (2010) e12920. DOI: 10.1371/journal.pone.0012920.
- [52] K.A. Ahmed, M.A. Munegowda, Y. Xie, J. Xiang, Intercellular trogocytosis plays an important role in modulation of immune responses, *Cell Mol. Immunol.* 5 (4) (2008) 261-269.
- [53] G. Chaudhri, B.J. Quah, Y. Wang, A.H. Tan, J. Zhou, G. Karupiah, et al., T cell receptor sharing by cytotoxic T lymphocytes facilitates efficient virus control, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (35) (2009) 14984-14989.

Annexe 2:

The American Journal of Pathology, Vol. 184, No. 1, January 2014



The American Journal of
PATHOLOGY

ajp.amjpathol.org

TUMORIGENESIS AND NEOPLASTIC PROGRESSION

Cell Growth in Aggregates Determines Gene Expression, Proliferation, Survival, Chemoresistance, and Sensitivity to Immune Effectors in Follicular Lymphoma

Pauline Gravelle,^{*†‡§¶} Christine Jean,^{*†‡} Julien Familiades,^{*†‡§¶} Emilie Decaup,^{*†‡§¶||} Amandine Blanc,^{*†‡§¶} Christine Bezombes-Cagnac,^{*†‡§¶} Camille Laurent,^{†*†||} Ariel Savina,^{†‡} Jean-Jacques Fournié,^{*†‡§¶} and Guy Laurent^{*†‡§¶||}

From the National Institute of Health and Medical Research (INSERM) UMR1037-Cancer, Research Center of Toulouse, Toulouse; University of Toulouse III: Paul Sabatier,[†] Toulouse; the National Center for Scientific Research ERL 5294,[‡] Toulouse; the Carnot Lymphoma Institute (CALYM),[§] Toulouse; the Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer: TOUCAN,[¶] Toulouse; the Roche Research Institute,^{||} Boulogne Billancourt; INSERM UMR1047,** Center for Pathophysiology of Toulouse Purpan, Toulouse; the Departments of Anatomopathology^{††} and Hematology,^{§§} Hospital Purpan, Toulouse; and S.A.S. Roche,^{‡‡} Boulogne Billancourt, France*

Publié dans American Journal of Pathology



TUMORIGENESIS AND NEOPLASTIC PROGRESSION

Cell Growth in Aggregates Determines Gene Expression, Proliferation, Survival, Chemoresistance, and Sensitivity to Immune Effectors in Follicular Lymphoma

Pauline Gravelle,^{*†‡§¶} Christine Jean,^{*†‡} Julien Familiades,^{*†‡§¶} Emilie Decaup,^{*†‡§¶||} Amandine Blanc,^{*†‡§¶} Christine Bezombes-Cagnac,^{*†‡§¶} Camille Laurent,^{†**††} Ariel Savina,^{‡‡} Jean-Jacques Fournié,^{*†‡§¶} and Guy Laurent^{*†‡§¶§§}

From the National Institute of Health and Medical Research (INSERM) UMR1037-Cancer,* Research Center of Toulouse, Toulouse; University of Toulouse III: Paul Sabatier,[†] Toulouse; the National Center for Scientific Research ERL 5294,[‡] Toulouse; the Carnot Lymphoma Institute (CALYM),[§] Toulouse; the Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer: TOUCAN,[¶] Toulouse; the Roche Research Institute,^{||} Boulogne Billancourt; INSERM UMR1047,** Center for Pathophysiology of Toulouse Purpan, Toulouse; the Departments of Anatomopathology^{††} and Hematology,^{§§} Hospital Purpan, Toulouse; and S.A.S. Roche,^{‡‡} Boulogne Billancourt, France

Accepted for publication
September 26, 2013.

Address correspondence to
Pauline Gravelle, Ph.D., Cancer
Research Center of Toulouse —
Equipe 9, CHU Purpan, 31024
Toulouse cedex 3, France. E-
mail: pauline.gravelle@inserm.
fr or paulinegravelle@hotmail.
com.

Lymphomas grow as dense aggregates in patients, but whether this spatial organization affects lymphoma cell biology is unknown. We grew follicular lymphoma (FL) cells *in vitro* as multicellular aggregates of lymphoma cells to investigate this question. Gene expression analysis revealed that 612 genes were differentially expressed when cells grew in multicellular aggregates of lymphoma cells rather than in suspension. These genes correspond to several G0 biological processes, such as hypoxia, activation of NF- κ B pathway, and negative regulation of cell cycle, a gene signature also found in the transcriptomes from FL biopsies. Pimonidazole staining, HIF-1A accumulation, and VEGFA release confirmed that cells in multicellular aggregates of lymphoma cells actually respond to hypoxia. In adaptation to such conditions, they also displayed an activated NF- κ B 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, multicellular aggregates of lymphoma cells were also found to be less sensitive to purified natural killer cells. To conclude, our study shows that in FL, spatial organization results in dramatic changes in FL biology, including gene expression, proliferation, drug resistance, and immune escape. (*Am J Pathol* 2014, 184: 282–295; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.09.018>)

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

This disease is characterized by a low proliferation rate and subsequent slow tumor cell 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 in eradicating minimal residual disease. However, the molecular basis of all these features remains to be elucidated, although

Supported by 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). The authors have received funding contracts from Institut National du Cancer (RITUXOP), Institut Carnot-Lymphome (CALYM), and Fondation de France (2009002593).

P.G. and C.J. contributed equally to this work.

Current address of C.J., Department of Reproductive Medicine, Moores Cancer Center, University of California, San Diego, San Diego, CA.

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 have involved cell suspensions that are not representative of the carcinoma-like architecture of FL spherical tumors *in vivo*. The three-dimensional (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 compounds,⁵ as well as to ionizing radiation, because of hypoxia.⁶ Finally, growth in aggregates results in decreased sensitivity to immune effectors such as cytotoxic T lymphocytes.^{7–9}

We designed a novel method of 3D *in vitro* culture of non-Hodgkin lymphoma 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.

Materials and Methods

Cell Lines and Reagents

The t(14,18)⁺ FL ATCC RL cell line (ATCC, Manassas, VA) was cultured at 37°C in humidified 5% CO₂ in complete medium. Hypoxia experiments were performed in a hypoxic chamber (0.1% O₂) or with 10 μmol/L cobalt chloride (CoCl₂). PKH67 and plasmids were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) concentrations were determined by using the QIA51 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kit (Merck Millipore, Molsheim, France).

Peripheral blood mononuclear cells were collected from healthy donors (Etablissement Français du Sang, CHU Purpan, Toulouse) and separated by Ficoll-Hypaque density gradient (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Negative selection of NK cells was performed with the EasySep Human NK Cell Enrichment Kit, according to the manufacturer's instructions (STEMCELL Technologies, 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, France).

Multicellular Aggregates of Lymphoma Cells

MALC were produced by an adaptation of the hanging drop method.¹⁰ Cell suspensions (500,000 cells/mL) were prepared in complete medium containing 1% Methocult (STEMCELL Technologies), and 20 μL of this suspension

were dropped onto coverslips of a 24-well culture plate. After 24 hours incubation, all drops were transferred by returning the coverslip to a dish previously coated with 1% agarose (Invitrogen, Saint Aubin, France). All of the MALC culture medium was then renewed every 5 days. The number of cells in MALC was estimated by trypan blue counting; their volume (*V*) was calculated by measuring two diameters (*L* = longest diameter and *l* = shortest diameter) and using the formula:

$$V = 4/3 \times \pi \times L \times l^2/2^3. \quad (1)$$

Cell Imaging

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

Western Blot Analysis

MALC were dissociated, washed with PBS, lysed in Cyto-buster (Merck Millipore), and Western blot analysis was performed as described.¹¹ Antibodies used were against α-tubulin (Sigma-Aldrich), β-actin (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), hypoxia-inducible factor 1-α (HIF1A) (Cayman Biochem, Montluçon, France), phospho-Ser536 NF-κB-P65, NF-κB-P65 (total), P21 (Cell Signaling Technology, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), P27 (Santa Cruz Biotechnology, Le-Perray-en-Yvelines, France), origin recognition complex (ORC2) (MBL International, Woburn, MA), and peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit or anti-mouse Ig (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Montluçon, France). Cell fractionation has been described elsewhere.¹²

Flow Cytometry

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

Phenotype

MALC were dissociated in PBS by mechanical force; cells were then washed with cold PBS and stained with the following fluorochrome-conjugated antibodies: briefly, phycoerythrin (PE)-conjugated intercellular adhesion molecule (ICAM; CD54) (Beckman Coulter), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated human leukocyte antigen (HLA)-ABC, PE-conjugated HLA-E (eBiosciences, Paris,

France), and FITC-conjugated FAS antibody (Beckman Coulter) were incubated on cells for 20 minutes at 4°C, and then washed with cold PBS prior to analysis by flow cytometry.

Degranulation Assay and CD107a Expression

For the degranulation assay, MALC cells or RL cells in suspension were harvested and incubated at 37°C with NK cells at a 1:1 ratio for 4 hours. Reactions were stopped on ice, and cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-human CD107a (BD Pharmingen; BD Biosciences) or isotype-matched control antibody in staining buffer containing 1% fetal calf serum. Fluorescence was analyzed by flow cytometry.

Pimonidazole Assay

Oxygen deprivation was measured with a Hypoxyprobe-1 Plus Kit (NPI Inc, Burlington, MA). MALC were incubated in medium containing 100 µmol/L pimonidazole for 2 hours at 37°C, and then dissociated, washed, fixed with 2% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature, washed again, and finally incubated for 20 minutes with 1% FITC-conjugated anti-pimonidazole antibody.

5-Bromo-2-Deoxyuridine Incorporation Assay and Cell-Cycle Analysis

MALC medium was replaced by medium containing 10 µmol/L 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) and incubated 1 hour at 37°C, MALC were then dissociated and washed (PBS 0.5% bovine serum albumin). Ice-cold ethanol (100 µL) was added to cells and incubated (20 minutes at room temperature). Cells were washed and incubated in 500 µL of 2 mol/L HCl buffer (20 minutes at room temperature) before incubation (5 minutes) with 0.1 mol/L Na₂B₄O₇ (pH 8.5). Anti-BrdU-FITC (BD Biosciences) was added to cells (20 minutes at room temperature). Cells were then washed twice and incubated (30 minutes at room temperature in the dark) with 10 µg/mL propidium iodide (Invitrogen) and 500 µg/mL RNase A (Invitrogen).

High-Resolution Cell-Cycle Analysis

Quiescent cells were detected by a high-resolution cell-cycle analysis technique.¹³ After fixation (20 minutes at room temperature in ice-cold ethanol), cells were stained for Ki-67 (clone Ki-67; BioLegend, Saint Quentin en Yvelines, France), washed, and then labeled with 7-AAD (BD Biosciences) for 30 minutes at room temperature to visualize their DNA content. The raw percentages from cytometry are shown as ratios: induction of quiescence (fold change) = (% quiescent among treated cells)/(% quiescent among untreated cells).

Cell-Cycle Fractionation

We used a cell-cycle fractionation technique¹⁴ to sort the quiescent and cycling viable cells from MALC. The DNA content were stained with 10 µg/mL Hoechst 33342 (Invitrogen) for 45 minutes at 37°C, washed, and then stained with 2 µmol/L pyronin Y (Sigma-Aldrich) for 45 minutes 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 types of cells was evaluated by trypan blue counting.

Cytotoxicity Assay

The sensitivity of cells to NK cytotoxicity was measured by a conventional 4-hour ⁵¹Cr release assay by using triplicate cultures in round-bottom 96-well plates. Target cells (1 × 10⁶ cells) (suspension RL cells or cells dissociated from MALC) were labeled with 100 µCi of ⁵¹Cr (sodium chromate, 1 mCi/mL; PerkinElmer, Courtaboeuf, France). After 1-hour incubation at 37°C, cells were washed three 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 µL of RPMI containing 5% fetal calf serum per well of 96-well round-bottomed microtiter plates. Microtiter plates were centrifuged at 300 × g for 5 minutes and incubated at 37°C. After 4 hours of culture, 50 µL of cell-free supernatants were transferred to a LumaPlate microplate (PerkinElmer), and the radioactivity was measured on a TopCount microplate scintillation and luminescence counter (PerkinElmer). 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 Systems, 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) and anti-pimonidazole (NPI). After incubation with antibodies, sections were incubated with the avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA) followed by staining with diaminobenzidine (DAB) chromogen solution.

Lentivector Production and RL Cell Transduction

The pLKO.1-puro-CMVtagFP635 vector was used for all transduction experiments. *HIF1A* gene inhibition used the

Table 1 Sequences Used for *HIF1A* Gene Inhibition (sh3810 and sh10819) and Control (shc013)

shRNA	Sequence
sh3810	5'-CCGGGTGATGAAAGAATTACCGAATCTCGAGATTCGGTAATTCCTTCATCACTTTT-3'
sh10819	5'-CCGGTGCTCTTTGTGGTGGATCTACTCGAGTAGATCCACCACAAAGAGCATTTT-3'
shc013	Empty vector

sequences sh3810 and sh10819 (Table 1) and, as control, shc013 (empty vector) (plasmids maps are provided in Supplemental Figure S1). RL cells were transduced with lentivector particles carrying these constructs produced by the INSERM UMR1037 vector facility (Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France). After subcloning of transduced cells and puromycin selection, the subclones specified in the text were used.

Gene Expression Analysis

RNA was extracted from cells grown either in suspension or in MALC. cDNA were prepared from 200 ng of RNA per sample, and hybridized to GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Affymetrix (Santa Clara, CA) microarrays (ProfileXpert, Lyon, France). Raw data corresponding to both experiments (MALC#2D and quiescent#cycling) are available on the NCBI Gene Expression Omnibus website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; accession number GSE41856). Additional raw data files from purified germinal center cells (GC) ($n = 10$), FL cells purified from biopsies ($n = 38$), and five B-EBV lymphoblastoid cell lines were downloaded from the NCBI GEO

website (GEO dataset GSE12195¹⁵). Raw data were analyzed using robust multiarray average algorithms, then normalized by dChip (<http://www.hsph.harvard.edu/cli/complab/dchip>, last accessed September 15, 2012), log₂ converted and collapsed to 20,606 unique genes with Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, <http://www.broadinstitute.org/gsea>, last accessed September 15, 2012). 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 AutoCompare¹⁶ (Fred's Softwares, AutoCompare_win-400.zip, <https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products/data-mining>, last accessed September 20, 2012). Expression levels of genes shared by reference pathways and experimental gene set were compared between sample groups as specified in the text. For these comparisons, expression levels were normalized and heat maps were generated by Genesis software version 1.7.6 (Genomics and Bioinformatics Graz, http://genome.tugraz.at/genesis/client/genesisclient_download.shtml, last accessed October 1, 2012). Significantly differently expressed genes were defined according to the false discovery rate-corrected Q -value.

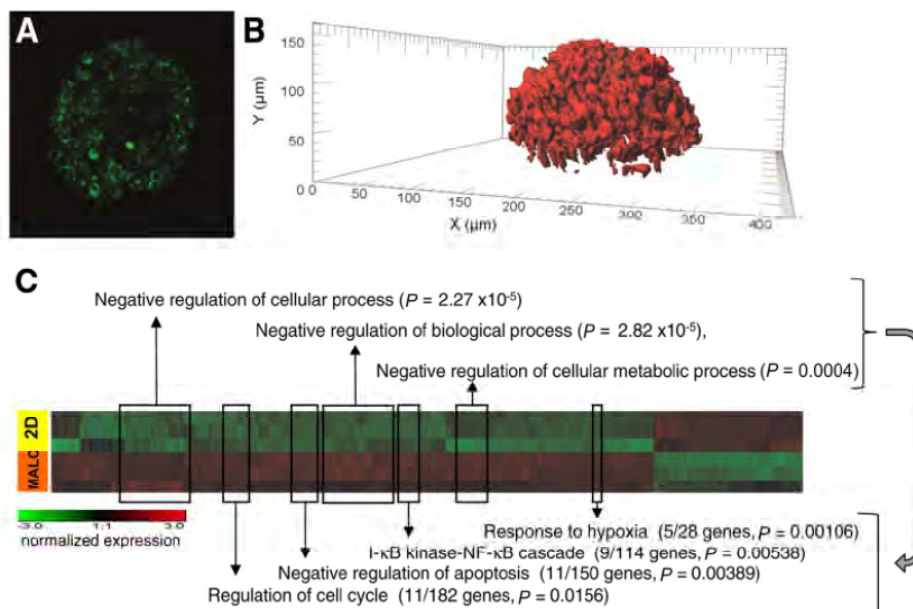


Figure 1 MALC imaging, modeling, and gene expression. **A:** Fluorescence image of PKH67 MALC was captured by two-photon microscopy 2 days after transfer. **B:** Analysis and 3D reconstitution were performed with Imaris version 3.1 3D software. **C:** Heat map represents the clustering of genes deregulated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

Table 2 List of Specific Pathways with the Corresponding Genes Represented by the Analyzed 612 Genes

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

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 the 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 culture. In general, MALC were visible to the eye and routinely reached volumes of about 30 mm³ within 3 weeks of culture. Visualization of 3-day-old MALC from PKH67-stained RL cells by

biphoton microscopy showed oblate spheroids composed of a dense and homogeneous cell population (Figure 1, A and B). Immunohistochemistry of 10-day-old MALC revealed a CD20⁺, CD10⁺, CD5⁻, and CD34⁻ phenotype that was similar to that seen in two-dimensional (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 >7000 genes were differentially expressed in MALC (*P* < 0.05), 612 of which displayed significant changes of expression level (>2-fold, both up and down) (Figure 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 × 10⁻⁵), *negative regulation of biological process* (39 genes, *P* = 2.82 × 10⁻⁵), *negative regulation of cellular metabolic process* (18 genes, *P* = 0.0004), and *negative regulation of apoptotic process* (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) (Figure 1C). These genes are listed in Table 2.

Thus, FL cells could stably grow in tridimensional aggregates. In such conditions, they displayed a distinct gene expression pattern that reflected adaptation to hypoxia, induction of prosurvival pathway, and an antiproliferative status, the latter being expected from other 3D culture models.

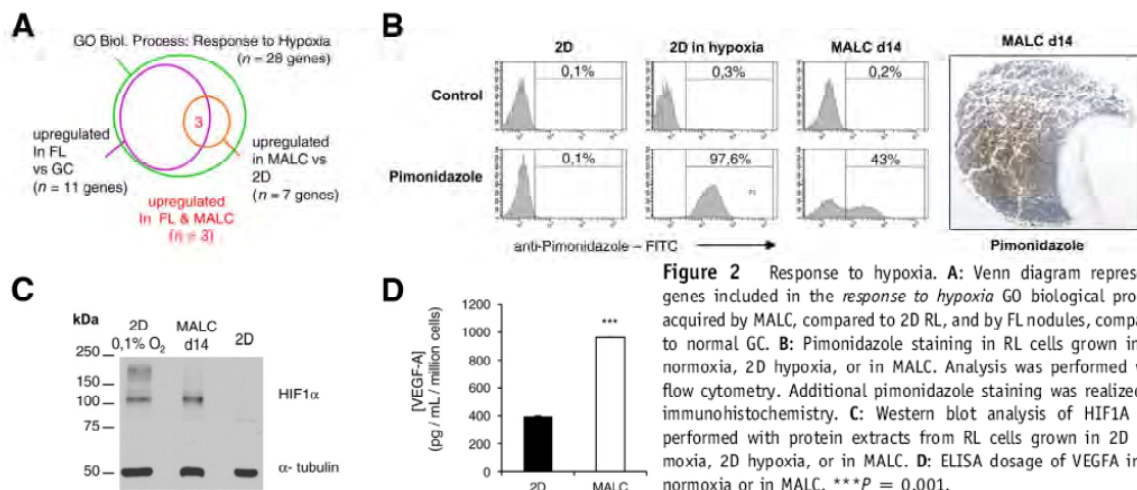


Figure 2 Response to hypoxia. **A**: Venn diagram represents genes included in the *response to hypoxia* GO biological process acquired by MALC, compared to 2D RL, and by FL nodules, compared to normal GC. **B**: Pimonidazole staining in RL cells grown in 2D normoxia, 2D hypoxia, or in MALC. Analysis was performed with flow cytometry. Additional pimonidazole staining was realized by immunohistochemistry. **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 VEGFA in 2D normoxia or in MALC. ****P* = 0.001.

Table 3 Comparison of Genes Up-Regulated Using Gene Signature Response to Hypoxia According to GO-Biological Process Database

All	FL vs GC	MALC vs 2D	Intersection
ALAS2	ARNT2	BNIP3	CD24
ANG	BNIP3	CD24	EGLN1
ARNT2	CD24	CXCR4	VEGF
BNIP3	EGLN1	EGLN1	
CD24	EPAS1	PLOD1	
CHRNA7	HIF1A	SMAD3	
CHRN2	HSP90B1	VEGF	
CLDN3	NARFL		
CREBBP	PLOD2		
CXCR4	SMAD4		
EGLN1	VEGF		
EGLN2			
EP300			
EPAS1			
HIF1A			
HSP90B1			
MT3			
NARFL			
NF1			
PDIA2			
PLOD1			
PLOD2			
PML			
SMAD3			
SMAD4			
TGFB2			
VEGF			

MALC Models Hypoxia Occurring in FL

We first asked whether 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 *response to hypoxia* according to the GO biological process database. Seven of these 28 genes were differentially up-regulated in MALC versus 2D cultures ($P < 0.01$), including the above-mentioned 5 genes (Figure 1C) with fold change >2 and P value >0.05 (Table 2). In addition, 11 of the 28 genes were also significantly up-regulated ($P < 0.01$) in FL cells relative to normal GC (Supplemental Figure S2), three of which were up-regulated and shared with MALC (Figure 2A and Table 3).

This suggested 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. 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 (Figure 2B). This experiment showed that the classic 2D cultures do not comprise hypoxic cells unless they are maintained for 48 h 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 (Figure 2B), hence the gene signature of MALC reflected the sensing of hypoxic conditions in the center of MALC. Because adaptation to hypoxic conditions usually involves stabilization of the HIF1A protein,¹⁸ we asked whether HIF1A was present in the cell lysates from MALC. The Western blots showed that HIF1A protein in MALC was expressed to the same extent as in 2D culture submitted to severe hypoxia conditions (0.1% O₂) (Figure 2C). Interestingly, confluent cell cultures did not display HIF1A expression (data not shown). Furthermore, because HIF1A protein induces the production of proangiogenic factors such as VEGFA,¹⁹ we asked whether this also occurs in MALC. VEGFA production was found to be increased in MALC relative to 2D cultures (Figure 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 non-Hodgkin lymphoma cells,²⁰ so we wondered whether this feature was also recovered in the MALC model. The above-depicted gene expression signature of MALC (Figure 1C) encompasses up-regulation of a set of nine genes corresponding to *I- κ B kinase/NF κ B cascade*. At this point, we wondered whether this activation pattern might be found in FL nodules. To address this possibility, we compared the gene signature of MALC versus 2D with the one of FL versus normal GC cells (see above) in terms of the 102 genes involved in the *NF- κ B cascade*, because they are listed in the GO biological process compendium. Sixteen of these 102 genes were differentially regulated in MALC versus 2D ($P < 0.01$). In addition, we found that 66 of the 102 *NF- κ B cascade* genes were significantly ($P < 0.01$) up-/down-regulated in FL nodules relative to normal GC (Supplemental Figure S3). Seven of these genes were similarly up-/down-regulated in both MALC and FL samples, six of them being up-regulated: *PTPLADI* is the only down-regulated gene in FL as in MALC (Figure 3A, Table 4). 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, *PTPLADI*, *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>, last

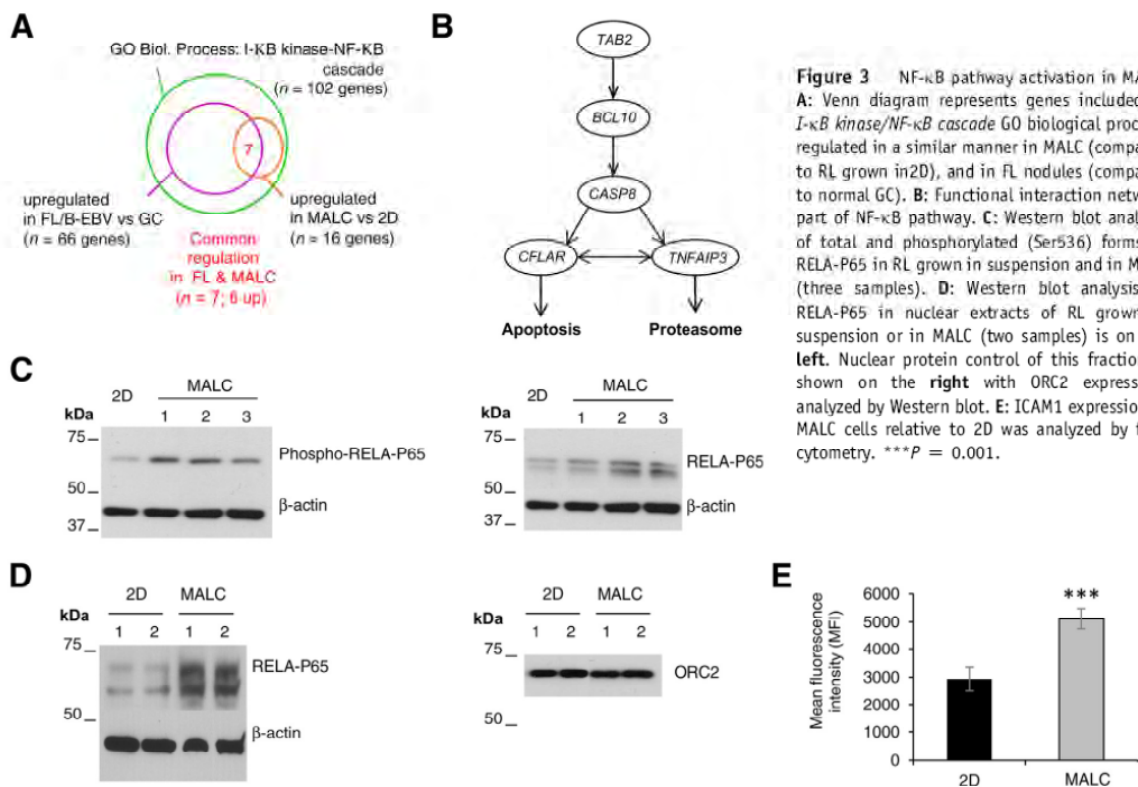


Figure 3 NF-κB pathway activation in MALC. **A:** Venn diagram represents genes included in I-κB kinase/NF-κB cascade GO biological process, regulated in a similar manner in MALC (compared to RL grown in 2D), and in FL nodules (compared to normal GC). **B:** Functional interaction network part of NF-κB pathway. **C:** Western blot analysis of total and phosphorylated (Ser536) forms of RELA-P65 in RL grown in suspension and in MALC (three samples). **D:** Western blot analysis of RELA-P65 in nuclear extracts of RL grown in suspension or in MALC (two samples) is on the left. Nuclear protein control of this fraction is shown on the right with ORC2 expression, analyzed by Western blot. **E:** ICAM1 expression in MALC cells relative to 2D was analyzed by flow cytometry. ****P* = 0.001.

accessed October 10, 2012) (Figure 3B). These genes are listed in Table 4.

We were thus prompted to check whether the NF-κB pathway was really activated at the cellular level. To this aim, we analyzed 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 (Figure 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 (Figure 3D) (the quality control for cell fractionation is shown in Supplemental Figure S4). Finally, we investigated the expression of ICAM1, a protein regulated by the NF-κB pathway.²³ We found that, indeed, ICAM1 was overexpressed in MALC relative to 2D cultures (Figure 3E).

Thus, a functional NF-κB pathway was found in MALC. This suggests that by culturing lymphoma cells in aggregates, we induce a proinflammatory phenotype.

MALC Growth Induces a Cell-Cycle Exit

We next investigated cell-cycle regulators in MALC versus 2D as well as in FL versus 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) (Figure 4A, Supplemental Figure S5, and Table 5); *CDKN1B* was the only one up-regulated in MALC as in FL; the others genes were all underexpressed in both groups. This transcriptome profile was highly suggestive of a 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 (Figure 4B). During the first week of *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 1 week, MALC proliferation was sustained with a mean doubling time of 7 days. Along with the culture, however, the cell death rate remained consistently below 10%. Cell cycle, when analyzed by BrdU/propidium iodide double staining, revealed that cells from MALC accumulated in the G0/G1 phase after 7 days of culture, whereas their S-phase decreased (Figure 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 the 7-AAD^{diploid}, Ki-67^{negative} phenotype revealing accumulation of quiescent cells in MALC. Quiescent cells represented 49% of all cells

Table 4 Comparison of Genes Up-Regulated Using Gene Signature *NF- κ B Cascade* According to the GO Biological Process Database

All		B-EBV and FL vs GC		MALC vs 2D	Intersection
<i>APOL3</i>	<i>NEK6</i>	<i>APOL3</i>	<i>TMEM9B</i>	<i>BCL10</i>	<i>BCL10</i>
<i>ATP2C1</i>	<i>NUP62</i>	<i>ATP2C1</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>BCL3</i>	<i>CASP8</i>
<i>BCL10</i>	<i>OTUD7B</i>	<i>BCL10</i>	<i>TNFRSF10B</i>	<i>CASP8</i>	<i>CFLAR</i>
<i>BCL3</i>	<i>PLEKHG5</i>	<i>CARD10</i>	<i>TNFRSF1A</i>	<i>CFLAR</i>	<i>LITAF</i>
<i>BIRC2</i>	<i>PLK2</i>	<i>CASP1</i>	<i>TNFSF10</i>	<i>IKBKG</i>	<i>MAP3K7IP2</i>
<i>BST2</i>	<i>PPM1A</i>	<i>CASP8</i>	<i>TNFSF14</i>	<i>IRAK2</i>	<i>PTPLAD1</i>
<i>CANT1</i>	<i>PPP5C</i>	<i>CD40</i>	<i>TRADD</i>	<i>LITAF</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>CARD10</i>	<i>PRDX4</i>	<i>CFLAR</i>	<i>TRAF3IP2</i>	<i>MAP3K7IP2</i>	
<i>CARD8</i>	<i>PTPLAD1</i>	<i>CXXC5</i>	<i>TRIM13</i>	<i>MIB2</i>	
<i>CARD9</i>	<i>REL</i>	<i>ECT2</i>	<i>TRIM38</i>	<i>PTPLAD1</i>	
<i>CASP1</i>	<i>RELA</i>	<i>F2R</i>	<i>TSPAN6</i>	<i>RIPK2</i>	
<i>CASP8</i>	<i>RHOA</i>	<i>FAF1</i>	<i>VAPA</i>	<i>SLC20A1</i>	
<i>CC2D1A</i>	<i>RHOC</i>	<i>FASLG</i>	<i>ZDHHC13</i>	<i>SLC35B2</i>	
<i>CD40</i>	<i>RHOH</i>	<i>FKBP1A</i>	<i>ZDHHC17</i>	<i>TMEM101</i>	
<i>CFLAR</i>	<i>RIPK1</i>	<i>FLNA</i>		<i>TNFAIP3</i>	
<i>CHUK</i>	<i>RIPK2</i>	<i>GJA1</i>		<i>UBE2N</i>	
<i>CXXC5</i>	<i>RPL17</i>	<i>GOLT1B</i>			
<i>ECM1</i>	<i>SECTM1</i>	<i>GPR177</i>			
<i>ECOP</i>	<i>SLC20A1</i>	<i>HMOX1</i>			
<i>ECT2</i>	<i>SLC35B2</i>	<i>HTR2B</i>			
<i>EDARADD</i>	<i>SLC44A2</i>	<i>IRAK1</i>			
<i>EEF1D</i>	<i>SQSTM1</i>	<i>IRAK1BP1</i>			
<i>ERC1</i>	<i>STAT1</i>	<i>LGALS1</i>			
<i>F2R</i>	<i>TFG</i>	<i>LITAF</i>			
<i>FADD</i>	<i>TIAF1</i>	<i>LTBR</i>			
<i>FAF1</i>	<i>TICAM1</i>	<i>MALT1</i>			
<i>FASLG</i>	<i>TLR6</i>	<i>MAP3K3</i>			
<i>FKBP1A</i>	<i>TMED4</i>	<i>MAP3K7</i>			
<i>FLNA</i>	<i>TMEM101</i>	<i>MAP3K7IP2</i>			
<i>GJA1</i>	<i>TMEM9B</i>	<i>MIER1</i>			
<i>GOLT1B</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>NDFIP1</i>			
<i>GPR177</i>	<i>TNFRSF10B</i>	<i>OTUD7B</i>			
<i>HMOX1</i>	<i>TNFRSF1A</i>	<i>PLK2</i>			
<i>HTR2B</i>	<i>TNFSF10</i>	<i>PPM1A</i>			
<i>IKBKE</i>	<i>TNFSF14</i>	<i>PRDX4</i>			
<i>IKBKG</i>	<i>TNFSF15</i>	<i>PTPLAD1</i>			
<i>IRAK1</i>	<i>TRADD</i>	<i>REL</i>			
<i>IRAK1BP1</i>	<i>TRAF2</i>	<i>RELA</i>			
<i>IRAK2</i>	<i>TRAF3IP2</i>	<i>RHOA</i>			
<i>LGALS1</i>	<i>TRAF5</i>	<i>RHOC</i>			
<i>LGALS9</i>	<i>TRAF6</i>	<i>RHOH</i>			
<i>LITAF</i>	<i>TRIM13</i>	<i>RIPK1</i>			
<i>LTBR</i>	<i>TRIM38</i>	<i>RPL17</i>			
<i>MALT1</i>	<i>TRIP6</i>	<i>SECTM1</i>			
<i>MAP3K3</i>	<i>TSPAN6</i>	<i>SLC20A1</i>			
<i>MAP3K7</i>	<i>UBE2N</i>	<i>SLC44A2</i>			
<i>MAP3K7IP2</i>	<i>VAPA</i>	<i>SQSTM1</i>			
<i>MIB2</i>	<i>VISA</i>	<i>STAT1</i>			
<i>MIER1</i>	<i>ZDHHC13</i>	<i>TFG</i>			
<i>NDFIP1</i>	<i>ZDHHC17</i>	<i>TIAF1</i>			
<i>NDFIP2</i>	<i>ZNF675</i>	<i>TLR6</i>			

in 3-week-old MALC (Figure 4D), in contrast to confluent cell cultures, which did not contain quiescent cells (data not shown). Loss of Ki-67 expression without associated necrosis was confirmed by immunohistochemistry in MALC (Figure 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 (Figure 4E). Thus, growth in aggregates resulted in a dramatic decrease in cell proliferation and entry into quiescence.

Table 5 Comparison of Cell-Cycle Regulators in MALC

All			FL vs GC		MALC vs 2D	Intersection
<i>AIF1</i>	<i>CHEK2</i>	<i>NEK11</i>	<i>AIF1</i>	<i>IL8</i>	<i>ATM</i>	<i>CDKN1B</i>
<i>ALOX15B</i>	<i>CHFR</i>	<i>NEK2</i>	<i>ANLN</i>	<i>JMY</i>	<i>BCCIP</i>	<i>CDT1</i>
<i>ANAPC2</i>	<i>CITED2</i>	<i>NEK6</i>	<i>ATR</i>	<i>KHDRBS1</i>	<i>CCNG1</i>	<i>DDB1</i>
<i>ANLN</i>	<i>CKS1B</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>BIRC5</i>	<i>KNTC1</i>	<i>CD28</i>	<i>HCFC1</i>
<i>APBB1</i>	<i>CKS2</i>	<i>NPM2</i>	<i>BMP2</i>	<i>LATS2</i>	<i>CDK5RAP1</i>	<i>PKMYT1</i>
<i>APBB2</i>	<i>CUL1</i>	<i>NUSAP1</i>	<i>BRSK1</i>	<i>MAD2L1</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>PPM1G</i>
<i>APC</i>	<i>CUL2</i>	<i>PA2G4</i>	<i>BTG3</i>	<i>MAD2L2</i>	<i>CDT1</i>	<i>UBE2C</i>
<i>ASNS</i>	<i>CUL3</i>	<i>PCBP4</i>	<i>BUB1</i>	<i>MAP2K6</i>	<i>CUL2</i>	
<i>ATM</i>	<i>CUL4A</i>	<i>PIN1</i>	<i>BUB1B</i>	<i>MFN2</i>	<i>DDB1</i>	
<i>ATR</i>	<i>CUL5</i>	<i>PKMYT1</i>	<i>CCNA2</i>	<i>MLF1</i>	<i>EIF4G2</i>	
<i>BCCIP</i>	<i>DDB1</i>	<i>PLAGL1</i>	<i>CCND1</i>	<i>NEK2</i>	<i>ERCC2</i>	
<i>BIRC5</i>	<i>DHRS2</i>	<i>PML</i>	<i>CCND2</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>HCFC1</i>	
<i>BMP2</i>	<i>DIRAS3</i>	<i>PPM1G</i>	<i>CCND3</i>	<i>NUSAP1</i>	<i>ING4</i>	
<i>BMP7</i>	<i>DLG1</i>	<i>PPP1R13B</i>	<i>CCNE2</i>	<i>PCBP4</i>	<i>MFN2</i>	
<i>BRSK1</i>	<i>EIF4G2</i>	<i>PPP1R15A</i>	<i>CCNT1</i>	<i>PKMYT1</i>	<i>PKMYT1</i>	
<i>BTG3</i>	<i>ERCC2</i>	<i>PPP1R9B</i>	<i>CD28</i>	<i>PPM1G</i>	<i>PPM1G</i>	
<i>BUB1</i>	<i>EREG</i>	<i>PRMT5</i>	<i>CDC16</i>	<i>PPP1R13B</i>	<i>RAD9A</i>	
<i>BUB1B</i>	<i>ERN1</i>	<i>PTEN</i>	<i>CDC25A</i>	<i>PPP1R15A</i>	<i>SMAD3</i>	
<i>C9ORF127</i>	<i>FANCG</i>	<i>PTPRC</i>	<i>CDC25C</i>	<i>PTEN</i>	<i>TBRG4</i>	
<i>CCNA2</i>	<i>FBXO5</i>	<i>RAD1</i>	<i>CDC2L5</i>	<i>RAD1</i>	<i>TRIAP1</i>	
<i>CCND1</i>	<i>FOXO1</i>	<i>RAD17</i>	<i>CDC45L</i>	<i>RAD17</i>	<i>UBE2C</i>	
<i>CCND2</i>	<i>GADD45A</i>	<i>RAD9A</i>	<i>CDC6</i>	<i>RASSF1</i>		
<i>CCND3</i>	<i>GAS1</i>	<i>RASSF1</i>	<i>CDC7</i>	<i>RBBP8</i>		
<i>CCNE2</i>	<i>GAS7</i>	<i>RB1</i>	<i>CDK5RAP3</i>	<i>RHOB</i>		
<i>CCNG1</i>	<i>GML</i>	<i>RBBP8</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>RINT1</i>		
<i>CCNG2</i>	<i>GMNN</i>	<i>RHOB</i>	<i>CDKN1C</i>	<i>RUNX3</i>		
<i>CCNK</i>	<i>GTF2H1</i>	<i>RINT1</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>SESN1</i>		
<i>CCNT1</i>	<i>GTPBP4</i>	<i>RPRM</i>	<i>CDKN2C</i>	<i>SPHK1</i>		
<i>CD28</i>	<i>HCFC1</i>	<i>RUNX3</i>	<i>CDKN2D</i>	<i>TBRG4</i>		
<i>CDC16</i>	<i>HERC5</i>	<i>SERTAD1</i>	<i>CDKN3</i>	<i>TBX3</i>		
<i>CDC23</i>	<i>HEXIM1</i>	<i>SESN1</i>	<i>CDT1</i>	<i>TGFA</i>		
<i>CDC25A</i>	<i>HEXIM2</i>	<i>SMAD3</i>	<i>CHEK1</i>	<i>TIMELESS</i>		
<i>CDC25C</i>	<i>HPGD</i>	<i>SMC1A</i>	<i>CHEK2</i>	<i>TIPIN</i>		
<i>CDC2L5</i>	<i>HUS1</i>	<i>SPHK1</i>	<i>CKS1B</i>	<i>TP53</i>		
<i>CDC37</i>	<i>IL8</i>	<i>STK11</i>	<i>CKS2</i>	<i>TP53BP2</i>		
<i>CDC45L</i>	<i>ING4</i>	<i>TBRG1</i>	<i>CUL3</i>	<i>TRIAP1</i>		
<i>CDC6</i>	<i>INHA</i>	<i>TBRG4</i>	<i>CUL4A</i>	<i>TTK</i>		
<i>CDC7</i>	<i>INHBA</i>	<i>TBX3</i>	<i>CUL5</i>	<i>UBE2C</i>		
<i>CDK10</i>	<i>JMY</i>	<i>TGFA</i>	<i>DDB1</i>	<i>UHMK1</i>		
<i>CDK2</i>	<i>KHDRBS1</i>	<i>TGFB1</i>	<i>EIF4G2</i>	<i>UHRF2</i>		
<i>CDK5R1</i>	<i>KNTC1</i>	<i>TGFB2</i>	<i>ERN1</i>	<i>ZAK</i>		
<i>CDK5RAP1</i>	<i>LATS1</i>	<i>TIMELESS</i>	<i>FANCG</i>	<i>ZWINT</i>		
<i>CDK5RAP3</i>	<i>LATS2</i>	<i>TIPIN</i>	<i>FBXO5</i>			
<i>CDK7</i>	<i>MAD2L1</i>	<i>TP53</i>	<i>FOXC1</i>			
<i>CDKN1B</i>	<i>MAD2L2</i>	<i>TP53BP2</i>	<i>GAS1</i>			
<i>CDKN1C</i>	<i>MADD</i>	<i>TRIAP1</i>	<i>GAS7</i>			
<i>CDKN2A</i>	<i>MAP2K6</i>	<i>TTK</i>	<i>GMNN</i>			
<i>CDKN2B</i>	<i>MAPK12</i>	<i>UBE2C</i>	<i>GTF2H1</i>			
<i>CDKN2C</i>	<i>MFN2</i>	<i>UHMK1</i>	<i>HCFC1</i>			
<i>CDKN2D</i>	<i>MLF1</i>	<i>UHRF2</i>	<i>HEXIM1</i>			
<i>CDKN3</i>	<i>MNAT1</i>	<i>ZAK</i>	<i>HEXIM2</i>			
<i>CDT1</i>	<i>MYC</i>	<i>ZBTB17</i>	<i>HPGD</i>			
<i>CHEK1</i>	<i>NBN</i>	<i>ZWINT</i>	<i>HUS1</i>			

Because hypoxia induces quiescence in hematopoietic stem cells,²⁶ we questioned whether the quiescent MALC cells arose by adaptation to hypoxic conditions. 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 three times more quiescent cells than the normoxic cultures did (Figure 4F). Along with the response to hypoxia, stabilization of the

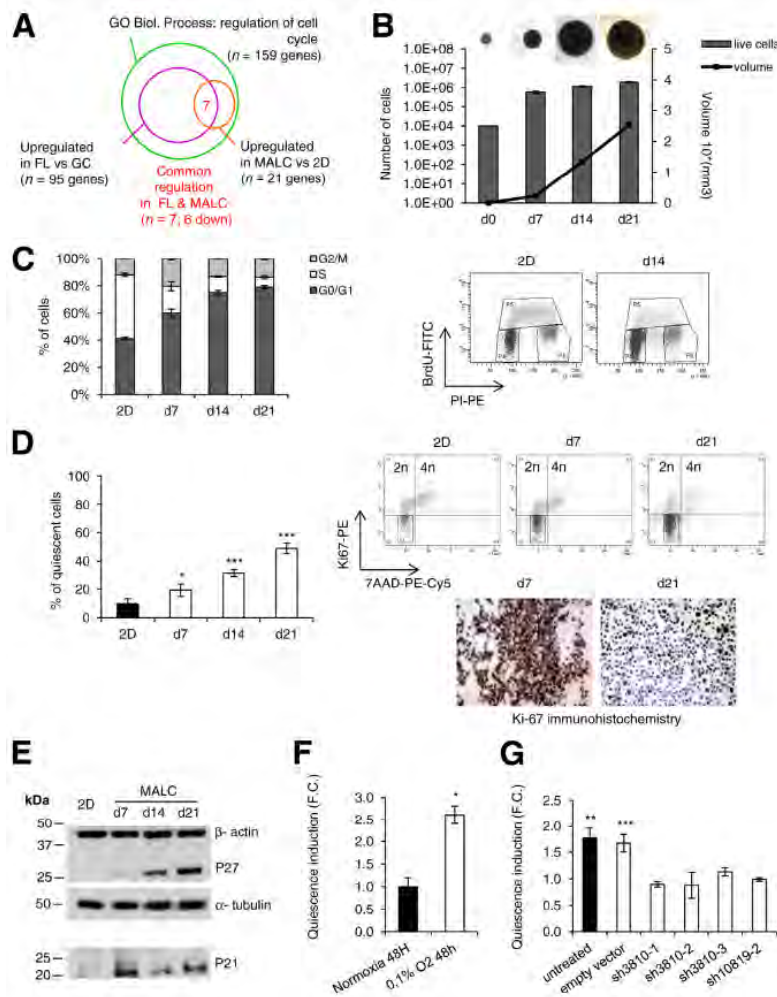


Figure 4 Negative regulation of cell cycle. **A:** Venn diagram represented genes included in regulation of cell cycle GO biological process, regulated in a similar manner in MALC (compared to RL grown in 2D), and in FL nodules (compared to normal GC). **B:** Number of cells per MALC was evaluated by trypan blue counting, and the volume was calculated using the formula described in *Materials and Methods*, at different culture times. **C:** Cell-cycle regulation in 2D RL and MALC was studied by BrdU/propidium iodide co-staining. **D:** Quiescence entry of MALC cells was quantified by high-resolution cell-cycle analysis. Quiescence was also measured by immunohistochemical staining for Ki-67 at day (d) 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 days 7, 14, and 21. **F:** Quantification of quiescence entry in RL cells grown in 2D normoxia and 2D hypoxia. **G:** Effects of CoCl_2 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). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. F.C., fold change; PI-PE, propidium iodide - phycoerythrin.

HIF1A protein mediates cell-cycle arrest in mouse embryonic fibroblasts and splenic B lymphocytes.²⁷ Thus, we investigated the role of HIF1A in the quiescence of MALC cells. RL cells grown in suspension were treated with the HIF1A protein stabilizer CoCl_2 , and the induced quiescent cells were measured. First, CoCl_2 -treated RL cells comprised twice as many quiescent cells as in the untreated counterpart. By contrast, CoCl_2 -treated RL cell clones previously transduced with various shRNA targeting the *HIF1A* gene did not enter into quiescence (Figure 4G). Altogether, these results suggest 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 a Quiescent Cell Subpopulation

On the basis of 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^{dim}, Hoechst 33342^{diploid}, and Ki-67^{dim} phenotypes as well as their cycling counterparts (Figure 5A). In the quiescent cell fraction, >80% of cells were Ki-67 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: 4273 genes were differentially expressed by quiescent cells relative to the cycling ones. As illustrated in Table 6, 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 6) and protein levels (data not shown); *CHEK1* was also down-

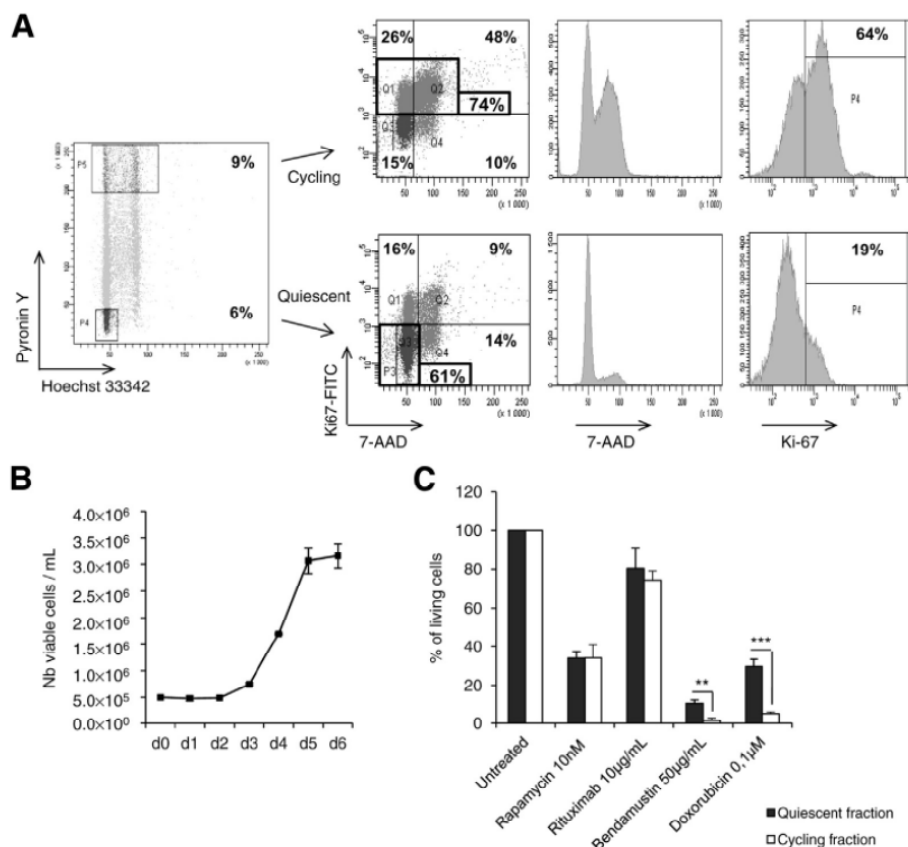


Figure 5 Entry to quiescence and chemoresistance in MALC. **A:** Sorting efficacy of Hoechst 33342/pyronin staining. **B:** Growth potential of quiescent cells. **C:** Differential sensitivity of quiescent and proliferating cells to drugs. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

regulated at the protein level (data not shown). All these changes in quiescent MALC cells suggest a coordinated process converging toward protection and survival. To check whether quiescent cells actually were more chemoresistant, we compared the sensitivity of these and cycling cells to the FL drugs doxorubicin, rituximab, bendamustine, and rapamycin. The quiescent cells were more resistant to doxorubicin and bendamustine, but not to rituximab or rapamycin (Figure 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 coculturing 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 effector-to-target ratio was indeed observed (Figure 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 (Figure 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, and -E) (Figure 6C).

Discussion

This study depicts for the first time a method for *in vitro* 3D culture of FL cells. This method sets up appropriate conditions to produce stiff, spheroid-like aggregates growing stably for >3 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 indeed shows that MALC represents an invaluable model for screening new genotoxic drugs and therapeutic monoclonal antibodies in lymphoma, because spheroids have been used for preclinical studies of targeted therapy in solid tumors.^{29,30} MALC could be obtained with Raji (Burkitt) and DEAU (diffuse large B-cell lymphoma) cell lines, but not with primary neoplastic B cells (including chronic lymphocytic leukemia) and even some B lymphoma cell lines such as Karpas 422 and DOHH2 (data not shown).

Table 6 List of Fold Changes in the mRNA Levels of Various Genes in Quiescent MALC Cells

Family/function	Gene symbols	Folds	P value (Student's <i>t</i> -test)
Quiescence	<i>CDKN1B</i>	2.11	1.46E-03
	<i>MXI 1</i>	1.96	1.50E-05
	<i>CDKN1A</i>	1.32	4.96E-02
Detoxification	<i>TXNDC13</i>	1.87	2.47E-03
	<i>GSTA1</i>	1.65	6.13E-03
	<i>GSTM4</i>	1.62	6.71E-03
Survival	<i>BCL2</i>	2.11	1.98E-04
	<i>RELA</i>	1.68	2.98E-03
	<i>REL</i>	1.59	5.51E-03
	<i>PKC eta</i>	1.52	2.28E-02
	<i>RELB</i>	1.5	2.52E-02
DNA damage tolerance	<i>CASP3</i>	0.73	4.83E-02
	<i>CHEK1</i>	0.25	3.22E-05
Drug resistance	<i>BRCA1</i>	0.22	1.19E-04
	<i>ABCA1</i>	1.68	3.82E-02
Drug targets	<i>ABCA7</i>	1.65	1.11E-02
	<i>ABCD4</i>	1.48	6.84E-03
	<i>TOP2A</i>	0.11	3.04E-06

This study shows that the expansion of MALC comprised two steps. During the first week, FL cells actively proliferated and thus MALC grew quickly, although later, cell-cycle exit of an increasing rate of MALC cells progressively stopped its growth, as reported for prostate carcinoma cell-derived spheroids.³¹ Isolated Ki-67^{negative} cells did overexpress the *CDKN1A*^(p21), *CDKN1B*^(p27), and *MXI-1* genes that mediate quiescence in various cellular models.^{32–34} 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 models 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 suggests 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 P27.³⁷ The contribution of hypoxia to the G0 status of MALC cells does not rule out, however, the contribution of additional stresses such as mechanical compression by high cell densities or stiffness because of an extracellular matrix (data not shown).

At the protein level, our study reveals interesting similarities between MALC and FL clinical settings, including reduced Ki-67 expression and increased HIF1A expression in biopsies,^{38,39} and elevated VEGFA concentration in serum.⁴⁰ At the genomic level, we have found major differences in terms of gene expression between MALC and 2D cultures, both 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-κB pathway by using the AutoCompare software, a method that has been previously validated.⁴¹ Bioinformatic meta-analysis of transcriptome dataset of Compagno et al¹⁵ pinpointed interesting similarities in the 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-κB pathway. It is important to note that although NF-κB has received very little attention in FL compared to diffuse large B-cell lymphoma,²⁰ there is some evidence that this pathway is indeed activated in FL tissue samples.⁴² We nevertheless propose here that HIF1A- or NF-κB-targeting drugs might represent interesting candidates for FL therapy.

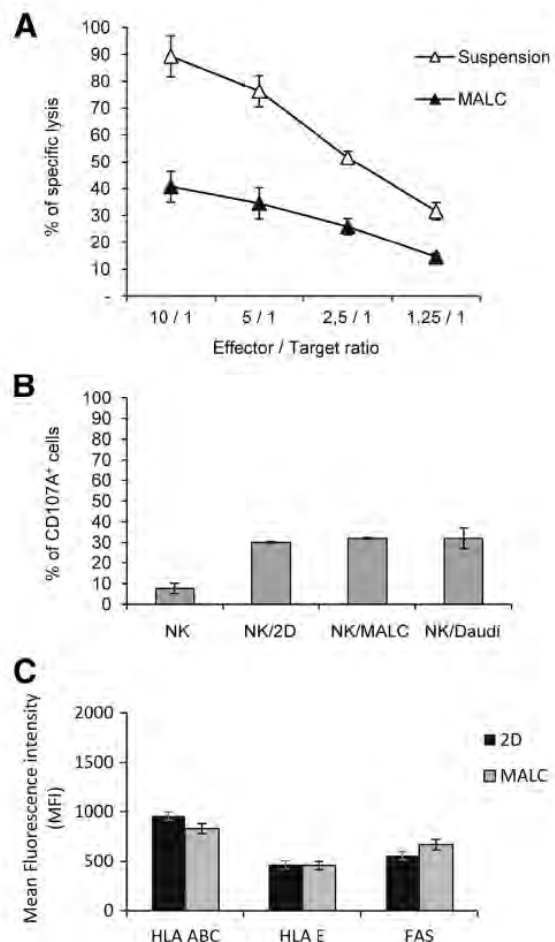


Figure 6 MALC display resistance to NK cell lysis independent of degranulation modification by effector or phenotypic modification on target cells. **A:** ⁵¹Cr release assay. Results are presented as percentages of the specific lysis obtained for the different effector-to-target ratios. **B:** Degranulation of NK cells cultured for 4 hours 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.

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 mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor. The high degree of chemoresistance raises several hypotheses related to doxorubicin's mechanism of action. Indeed, after transmembrane penetration, this drug operates through reactive oxygen species production⁴³ as well as DNA double-strand breaks because of 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 antiapoptotic signaling through enhanced NF- κ B, BCL2, and protein kinase C (PKC) pathways. It is important to note that previous studies have already documented in FL tissue samples activation of NF- κ B pathway,⁴² up-regulation of PKC expression,⁴⁴ as well as some degree of BCL2 regulation correlated with cell proliferation in parallel with t(14;18).² Furthermore, the topoisomerase II α 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 reactive oxygen species 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 (Figure 6C) or the expression of PI-9, a granzyme B inhibitor (data not shown). Another hypothesis is that the mechanism could involve a defect in the formation of the immunological synapse as it has been described for FL cells derived from patients and co-incubated with autologous NK cells.⁴⁵ *In vivo*, it is possible that intrinsic resistance of FL cells to natural immune effectors associates with a defect in immune infiltration, both mechanisms converging toward immune escape. The latter hypothesis is currently under investigation in our laboratory. In the same perspective, the sensitivity of MALC to other immune effectors, such as cytotoxic T lymphocytes, should also be 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. The MALC model should provide new targets for increasing sensitivity to genotoxic drugs and immune intervention.

Acknowledgments

We thank the respective institutions for access to the Cancer Research Center of Toulouse's vectorology platform, the Center for Physiopathology of Toulouse-Purpan's flow cytometry facility, the genomic and microgenomic facility ProfileXpert (University of Lyon), and the Department of Pathology of Hospital Purpan (Toulouse).

P.G. realized experiments, analyzed and interpreted data, made the figures, and wrote the paper. C.J. realized experiments and analyzed and interpreted data. J.F. performed data mining and statistical analysis. E.D. and A.B. performed experiments. C.B. and A.S. provided IHC images. C.L. provided samples and interpreted IHC. J.J.F. and G.L. interpreted data and wrote the paper.

Supplemental Data

Supplemental material for this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.09.018>.

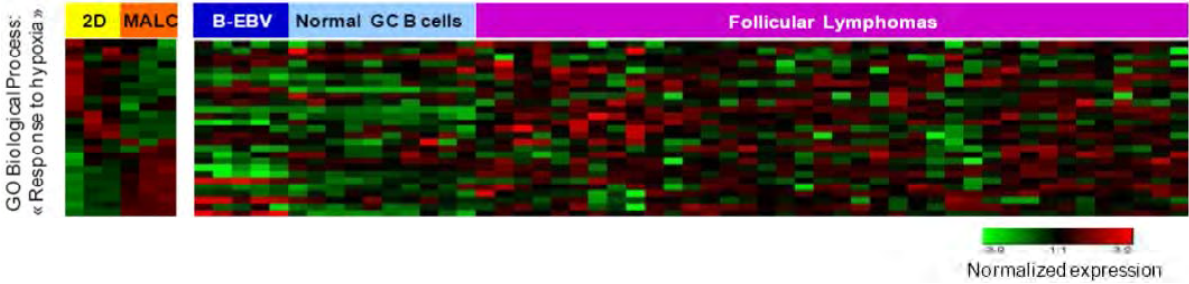
References

- 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, 114:826–834
- 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, 144:716–725
- 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, 121:839–852
- Zietarska M, Maugard CM, Filali-Mouhim A, Alam-Fahmy M, Tonin PN, Provencher DM, Mes-Masson AM: Molecular description of a 3D *in vitro* model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Mol Carcinog* 2007, 46:872–885
- Wartenberg M, Frey C, Diederhagen 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, 75:855–863
- Overgaard J: Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol* 2007, 25:4066–4074
- Dangles-Marie V, Richon S, El-Behi M, Echehakar 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, 63:3682–3687
- 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, 96:1072–1082
- 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

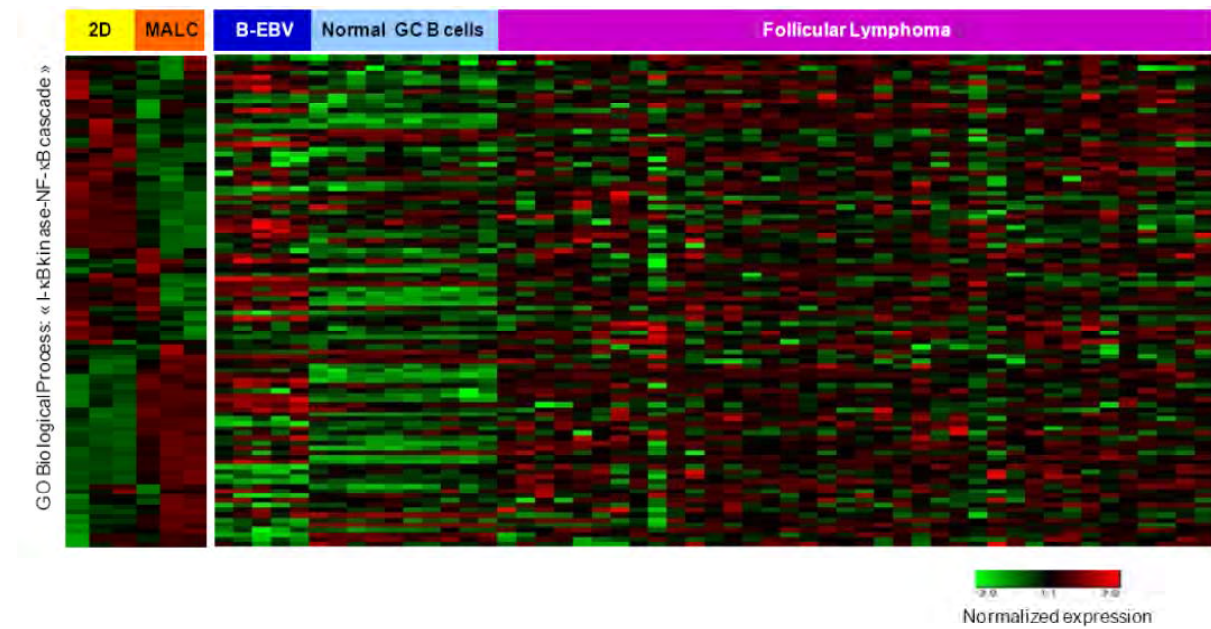
- cytotoxic T lymphocytes specific for Melan-A/MART-1 tumor-associated antigen. *Ann Surg* 2005, 242:851–857, discussion 858
10. Timmins NE, Nielsen LK: Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol Med* 2007, 140:141–151
 11. Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, Haue 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, 281:13525–13532
 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, 20:8602–8612
 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, 24:1347–1355
 14. Gothot A, Pyatt R, McMahon 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, 26:562–570
 15. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, Bertoni F, Ponzoni M, Scandura 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, 459:717–721
 16. Pont F, Tosolini M, Ycart B, Fournié JJ. Edited by Leung HCE. *nwCompare* and *AutoCompare* softwares for proteomics and transcriptomics data mining—application to the exploration of gene expression profiles of aggressive lymphomas. *Integrative Proteomics*. Tech Open Access Publisher, 2012. <http://dx.doi.org/10.5772/29555>
 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, 10:1091–1094
 18. Bárdos JI, Ashcroft M: Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1755:107–120
 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, 16:4604–4613
 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, 194:1861–1874
 21. Laherty CD, Hu HM, Opari 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, 267:24157–24160
 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, 111:3813–3820
 23. Roebuck KA, Finnegan A: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 1999, 66:876–888
 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, 271:18337–18341
 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, 8:105–114
 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, 38:847–851
 27. Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickett RC, Johnson RS: Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003, 23:359–369
 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, 81:1361–1365
 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, 37:655–661
 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, 175:129–140
 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. Ezoe S, Matsumura I, Satoh Y, Tanaka H, Kanakura Y: Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Cycle* 2004, 3:314–318
 35. Tindall MJ, Dyson L, Smallbone K, Maini PK: Modelling acidosis and the cell cycle in multicellular tumour spheroids. *J Theor Biol* 2012, 298:107–115
 36. Labarbera DV, Reid BG, Yoo BH: The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012, 7:819–830
 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, 276:7919–7926
 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, 141:676–680
 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, 40:253–260
 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'faqihi-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, 42:228–240
 42. Green MR, Gandhi MK, Courtney MJ, Marlon P, Griffiths L: Relative abundance of full-length and truncated FOXP1 isoforms is associated with differential NFkappaB activity in Follicular Lymphoma. *Leuk Res* 2009, 33:1699–1702
 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, 1813:1144–1152
 44. Leseux L, Laurent G, Laurent C, Rigo M, Blanc A, Olive D, Bezombes C: PKC zeta mTOR pathway: a new target for rituximab therapy in follicular lymphoma. *Blood* 2008, 111:285–291
 45. 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, 114:4713–4720



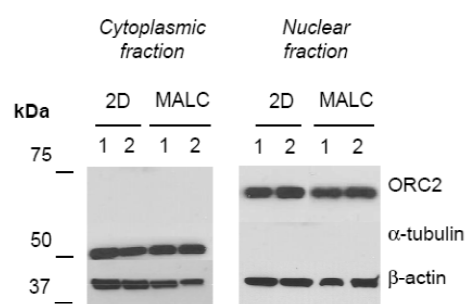
Supplemental figure 2:



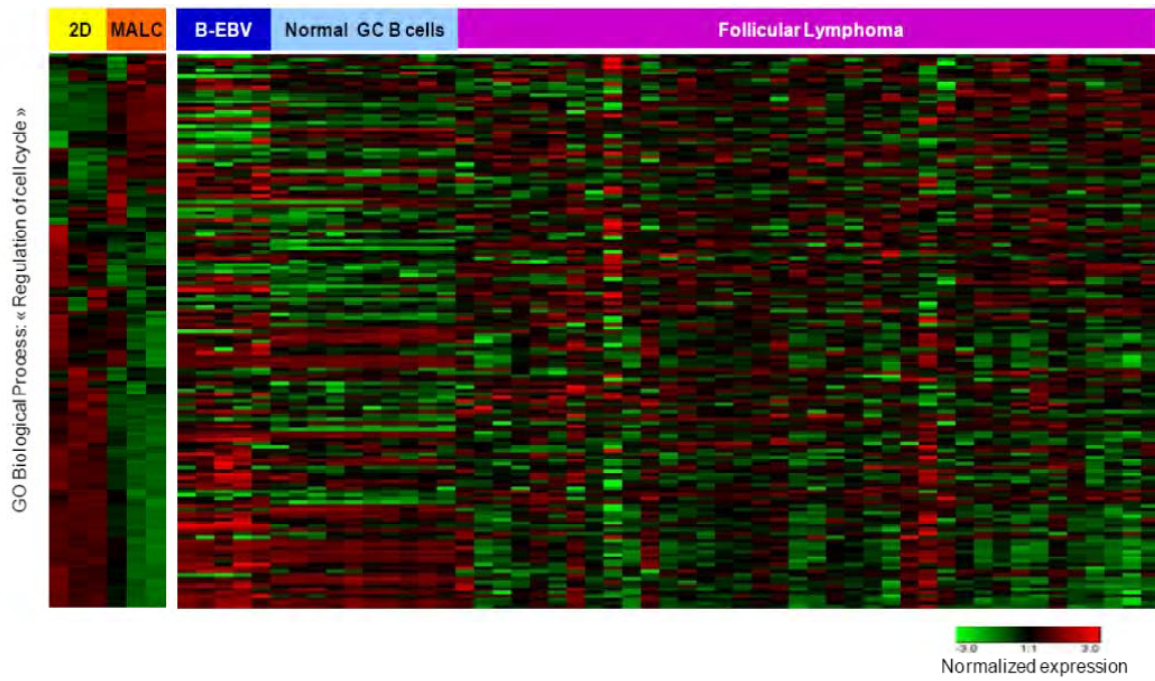
Supplemental figure 3:



Supplemental figure 4:



Supplemental figure 5:



Characterization of intracellular signals activated by anti-CD20 monoclonal antibodies in a 3 dimensional culture of follicular lymphoma cells

Follicular lymphoma (FL) is the second most frequent subtype of non-hodgkin's lymphoma. FL cells are characterized by overexpression of Bcl-2, an antiapoptotic protein, due to the t(14;18) translocation. FL is an incurable disease despite numerous therapeutic strategies.

Anti-CD20 monoclonal antibodies (mAbs) have revolutioned treatments and particularly with the development of Rituximab (RTX, chimeric mAb). To overcome resistance against RTX and thanks to engineering progress, mAbs are constantly improved. So Obinutuzumab (GA101, humanized mAb) was developed as a worthy successor of RTX.

The aim of my thesis project is to compare mechanisms of action of these two mAbs. To do that, it is essential to work on a model relevant for our pathology: the FL. FL is characterized by the development of tumoral mass in patients' lymph node. That's why we used a 3D culture model created in the lab. This model called MALC (Multicellular Aggregates of Lymphomatous Cells) derived from the hanging drop technique. It permits us to obtain 3D structures with RL cells (FL cell line) on which we compared the two mAbs RTX and GA101 (with mAb control: herceptin).

We showed that both RTX and GA101 inhibit MALC growth and induce apoptosis directly. Furthermore, GA101 is able to induce senescence and lysosomal cell death. Thanks to fluorescent cell barcoding method, we observed that both mAbs inhibit signaling pathways classically increased in FL cells. Moreover, indirectly, RTX and GA101 increase cytotoxic activity of NK cells and T $\gamma\delta$ lymphocytes vis-à-vis to MALC through antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC). GA101 is more efficient than RTX either in activation of effector cells and in target cells lysis. We further observed that both RTX and GA101 was able to decrease CD47 expression on FL cells, counteracting immunoescape strategy developed by tumoral cells.

Knowing the improvements brought to GA101 compared to RTX and according to in vitro studies showing better efficiency of GA101, chances are high that this mAb is going to represent with dignity the 3rd mAb generation in the fight against FL.

Keywords: lymphoma, spheroids, monoclonal antibodies