



HAL
open science

Etude comparative de nouvelles approches thérapeutiques dans le lymphome à cellules du Manteau : utilisation des inhibiteurs de mTOR kinase et BTK

Sawsaneh Alkhaeir

► To cite this version:

Sawsaneh Alkhaeir. Etude comparative de nouvelles approches thérapeutiques dans le lymphome à cellules du Manteau : utilisation des inhibiteurs de mTOR kinase et BTK. Cancer. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS432 . tel-01429944

HAL Id: tel-01429944

<https://theses.hal.science/tel-01429944>

Submitted on 9 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016 SACL432

Thèse de doctorat de
L'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-sud

Ecole Doctorale n° 582

CBMS Cancérologie : biologie - médecine - santé
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

Sawsaneh ALKHAEIR

**Etude comparative de nouvelles approches thérapeutiques
dans le lymphome à cellules du Manteau :
Utilisation des inhibiteurs de mTOR kinase et BTK**

Thèse présentée et soutenue à Imagine - Paris le 21 Novembre 2016

Composition du Jury :

Professeur Christian AUCLAIR : Président
Professeur Didier BOUSCARY:Examinateur
Docteur Vincent RIBRAG : Rapporteur
Professeur Thierry MOLINA : Rapporteur

Professeur Olivier HERMINE : Directeur de thèse
Docteur Ivan CRUZ MOURA : Co-directeur de thèse

A mon pays La Syrie...

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse,

Je suis particulièrement reconnaissante à monsieur le professeur Christian AUCLAIR pour ses encouragements au début de mes études en France lorsque j'étais encore en master 2. Je le remercie vivement d'avoir accepté de présider ce jury.

Mes sincères remerciements à messieurs les professeurs Didier BOUSCARY, Thierry MOLINA, et au docteur Vincent RIBRAG pour avoir aussi accepté l'évaluation de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à mon Directeur de thèse, monsieur le professeur Olivier HERMINE pour la confiance qu'il m'a accordée, ses conseils, ses encouragements et aussi son engagement à faire aboutir ce projet.

Je remercie le Dr. IVAN CRUZ MOURA pour la participation à la direction de ce travail, son encadrement et son soutien continu.

Merci à tous.

Sawsaneh ALKHAEIR

Mes sincères remerciements à tous les membres de l'équipe Hermine. Pour votre accueil chaleureux et vos conseils, vos encouragements et vos rires qui m'ont donné la force et la volonté de pouvoir continuer.

Merci à Flavia, pour ton aide continue depuis deux ans, pour la relecture et même les conseils dans mes démarches administratives. Merci à Morgane et à Michaël pour la relecture de ce projet.

Merci à Florence et à Etienne pour votre aide et aussi pour votre amitié. Je vous souhaite bonne continuation.

Je te remercie Aurélie Fricot pour tout ce que tu m'as appris et pour chaque fois que tu as pris soin de mes lignées.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont accueilli avec un sourire, des fois même avec des gâteaux : Thiago, Mathilde, Hervé, Simon, Sofia, Michèle, Alexandre, Justine, Sandra, Marie et Julien.

Merci à Zakia pour tout le temps que tu as consacré.

Enfin, merci à Francine pour les conseils précieux et pour la confiance que tu m'as donné.

J'aimerais aussi exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes formidables avec lesquelles je travaille depuis deux ans dans le service de biologie cellulaire à Saint Louis. Tous d'abord le Professeur Chomienne qui m'a accueilli dans son équipe et qui m'a soutenu pour pouvoir avancer dans ma thèse de science et également dans mon parcours comme hématologue.

Je remercie du fond de cœur le Dr Christine Dosquet pour ses conseils et pour son encouragement quotidien qui m'ont été précieux et qui m'ont aidé à affronter toutes les difficultés. Je la remercie particulièrement pour ses qualités humaines qui font d'elle une personne très précieuse.

Je remercie les deux docteurs qui partagent avec moi le petit bureau à S.Louis :

Emmanuelle, je te remercie pour la relecture de mon manuscrit et aussi pour ton soutien. Je te souhaite la plus belle des réussites.

Merci également à Nabih pour toute la joie et les fous rires et pour les corrections de dernière minute.

Merci à Armelle et Véronique à l'hôpital du jour cinétique, pour avoir été à mes côtés. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

Et bien sûr toute l'équipe : le Dr. Bruno Cassinat, le Dr. Marie-Hélène Schlageter, Nadia, Dominique et tous les autres.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à l'ensemble des personnes que j'ai rencontré dans le service d'hématologie de Versailles notamment le professeur Sylvie Castaigne qui m'a encouragé pour faire aboutir mon projet scientifique.

Je tien à présenter tous mes vifs remerciement à mes amies de Choisy le Roi surtout Françoise pour les corrections de mon Français.

A Caroline, Nathalie, Verlaine et Elodie : merci pour chaque fois vous avez accueilli ma fille le soir lorsque je prenais soin de mes cellules et de mes membranes.

A tous ceux qui m'ont aidé et m'ont aimé : Josiane, Gaëlle et Mathieu, je peux vous dire maintenant que mon travail a pu aboutir grâce à vous. J'ai surtout trouvé une autre famille.

A maman,

A mes frères Assadek et Alhusein, ma sœur Hadeel

A Line

Et à Ghislain

On va se réunir un jour

Sawsana

A papa ...

RESUME:

Le lymphome à cellules du manteau (LCM) représente 6 à 8% des lymphomes non hodgkiniens. La voie PI3Kinase/AKT/m-TOR, voie activée de manière constitutive dans cette pathologie, est la cible thérapeutique du temsirolimus récemment utilisé dans le LCM avec des effets modestes. Dans le but d'obtenir une inhibition plus importante de la voie PI3K/AKT j'utilise dans ce projet deux nouvelles molécules:

- Le NVP-BEZ 235 (BEZ) qui inhibe à la fois mTORC1 et la PI3kinase
- l'AZD8055 (AZD), un inhibiteur des complexes mTORC1 et mTORC2.

Ces deux inhibiteurs inhibent l'activité catalytique de m-TOR en bloquant ses sites de liaison à l'ATP. En utilisant différentes lignées de LCM, j'ai démontré que l'effet de ces deux nouveaux inhibiteurs sur la survie cellulaire est plus important que celui du Temsirolimus. Cela est probablement dû à l'inhibition de la phosphorylation de l'AKT et la 4EBP. J'ai aussi mis en évidence que ces drogues sont à l'origine d'une mort cellulaire par apoptose. J'ai ensuite démontré que l'inhibition d'autophagie, un mécanisme de résistance, peut renforcer l'effet de l'inhibition de la voie m-TOR kinase.

La deuxième partie de ce projet étudie la synergie entre les inhibiteurs de m-TOR kinase et l'aracytine (traitement de référence du LCM). J'ai pu mettre en évidence un effet additif important dans les lignées cellulaires. J'ai trouvé en western blot que l'aracytine inhibe la phosphorylation des substrats de la voie Akt –mTOR notamment le 4EBP. Ceci peut expliquer l'effet obtenu de cette association.

Dans la troisième partie j'ai testé l'ibrutinib (un inhibiteur de la voie Btk) sur les lignées de LCM. J'ai confirmé son effet modeste mais j'ai pu également démontrer qu'il est capable à induire une inhibition plus importante de la survie cellulaire lorsqu'il est associé à l'aracytine. Cependant l'ibrutinib s'est révélé antagoniste aux inhibiteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR, cela reste difficile à décortiquer.

Enfin, j'ai trouvé un effet additif de l'ibrutinib en combinaison avec la doxorubicine (un anthracycline utilisé dans le traitement conventionnel de LCM). Cependant je n'ai pas obtenu le même effet lorsque j'ai combiné les inhibiteurs de m-TOR avec la doxorubicine. Afin d'expliquer ces résultats, j'ai étudié l'effet de ces molécules sur l'expression de GST π , enzyme de détoxification connue pour avoir un rôle important dans la résistance de LCM à l'anthracycline. J'ai mis en évidence une diminution de l'expression de GST π par l'ibrutinib. Les inhibiteurs de mTOR n'ont pas un effet sur l'expression de GST π . L'ibrutinib pourrait donc sensibiliser le LCM à l'anthracycline en diminuant l'expression de GST π .

En conclusion, ces travaux *in vitro* pourraient être une base nécessaire pour la mise au point des nouvelles approches thérapeutiques dans le LCM.

SUMMARY:

Mantle cell lymphoma (MCL) represents 6 to 8% of non-Hodgkin's lymphomas.

The PI3K / AKT / m-TOR pathway constitutively activated in this disease is the target of temsirolimus used as treatment of MCL relapse. However, important resistance is observed. As a consequence we tried to obtain a more important inhibition of PI3K / AKT pathway using two new molecules:

- NVP-BEZ 235 (BEZ) which inhibits both mTORC1 and PI3K
- AZD8055 (AZD) an inhibitor of mTORC1 and mTORC2 complexes.

Both inhibit the catalytic activity of m-TOR by blocking its binding sites for ATP.

Using different cell lines of MCL, we have shown that the effect of these new inhibitors on cell survival was more important than that of Temsirolimus. This is probably because contrary to temsirolimus, the two new molecules can inhibit AKT and 4EBP phosphorylation. We also demonstrated that these drugs induce cell death by apoptosis. Combined with BafilomycinA1 (an inhibitor of autophagy), these drugs induced a more important inhibition of cell survival. Autophagy is a mechanism of tumor escapement and can be enhanced by m-TOR inhibitors.

In the second part of this project we studied the synergy between the m-TOR kinase inhibitors and aracytine (conventional treatment of MCL). We revealed a significant additive effect in MCL cell lines. We demonstrated by Western blot analysis that aracytine inhibits S6 and 4EBP phosphorylation. This may explain the results obtained from this drug association.

We then confirmed a modest effect of Ibrutinib (an inhibitor of Btk pathway). However, we also showed that it can induce a significant inhibition of cell survival when combined with aracytine. In this study, Ibrutinib proved antagonist effect to PI3K-AKT-mTOR inhibitors. The mechanisms of these results remain unclear.

Finally, we have demonstrated an additive effect of Ibrutinib in combination with doxorubicin (a conventional treatment of MCL). We did not obtain the same results when we combined m-TOR inhibitors with doxorubicin. To explain these data, we studied the effect of these drugs on the expression of G σ π by western blot. This enzyme is known to have an important role in MCL resistance to anthracycline. Importantly, Ibrutinib induced a decrease in the expression of G σ π but AZD8055, Temsirolimus and NVP-BEZ235 had no effect.

In conclusion, these studies in vitro are important for the development of new therapeutic approaches in MCL

REMERCIEMENTS

RESUME

LISTE DES ABREVIATIONS

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Lymphome à Cellules du Manteau Rationnel.....	1
1.1.1. Définition ethistorique.....	1
1.1.2. Epidémiologie et facteurs de risque	1
1.1.3. Diagnostic	2
1.1.3.1. Description cytologique anatomopathologique et phénotypique.....	2
Baséesur la classification OMS dee 2008.....	2
Révision de la classification OMS : proposition de 2016.....	4
1.1.3.2. Caryotype, biologie moléculaire.....	7
1.1.4. Formes cliniques, facteurs de pronostic	7
1.1.4.1. Présentation clinique.....	7
1.1.4.2. Facteurs de pronostic	8
1.2. Lymphopoïèse B :	10
1.2.1. Lymphopoïèse B précoce	10
1.2.1.1. La Recombinaison V(D)J et la translocation origine de LCM	11
1.2.2. Lymphopoïèse tardive	11
1.2.3. Lymphomagénèse du LCM : selon la classification OMS proposée en 2016	13
1.3. Physiopathologie du LCM et anomalies génétiques	14
1.3.1. Translocation (11;14)(q13;q32).....	14
1.3.2. Anomalies des voies de réparation de l'ADN et du cycle cellulaire.....	17
1.2.3. Autres anomalies génétiques.....	17
1.2.4. LCM et microenvironnement	18
1.3.5. Anomalies des voies de signalisation	19
1.3.5.1. La voie PI3K -AKT-mTOR kinase.....	19
- PI3K- AKT.....	19
- mTOR	22
- Le complexe mTORC1.....	22
- 4EBP-eIF4E.....	23
- Le complexe m-TORC2.....	24
- PI3K -Akt-m TOR dans le lymphome de Manteau	25
1.3.5.2. La voie BTK : Bruton's kinase.....	26
- Rôle pathologique de Btk.....	27
- La voie Btk dans les hémopathies malignes B et dans le LCM.....	28
1.3.5.3. L'Interaction des deux voies de signalisation : BTK et AKT	29
1.4. Traitement du LCM.....	31
1.4.1. Traitement de Sujets jeunes	31
1.4.1.1. Anti-CD20	31
1.4.1.2. Intensification thérapeutique.....	31
1.4.1.3. Impact de l'Aracytine à forte dose.....	32
1.4.1.4. Traitement de la rechute	34
1.4.2. Traitement de sujets âgés.....	35
1.4.3. Nouvelles thérapeutiques ciblées.....	37
1.4.3.1. Les inhibiteurs de la voie PI3K–AKT–mTOR.....	37
1.4.3.1.1. Les inhibiteurs de 1ère génération, inhibiteur de mTORC135	
Temsirolimus	37
Mécanismes de résistance au temsirolimus	38

1.4.3.1.2. Les inhibiteurs de 2eme génération.....	40
Nouveaux inhibiteurs dans le LCM	41
NVP-BEZ235	41
AZD8055.....	42
1.4.3.1.3. Diabète secondaire aux inhibiteurs de mTOR.....	42
1.4.3.2. Les inhibiteurs de Btk	45
Ibrutinib.....	45
Résistance à l'Ibrutinib.....	46
Rôle de NFkB dans la résistance du LCM à l'Ibrutinib.....	46
1.5. Mécanisme de résistance dans le LCM	49
1.5.1. Glutathion : synthèse, transport et catabolisme	49
1.5.1.1. Glutathion S transférase pi.....	51
1.5.1.2. Résistance de LCM aux agents anticancéreux - Rôle de GSTpi	53
1.5.2. Autophagie : définition, historique.....	56
1.5.2.1. Rôle de l'autophagie dans les cancers en général	56
1.5.2.2. Rôle de la voie mTOR dans la régulation d'autophagie.....	58
OBJECTIFS DE L'ETUDE	62
RESULTATS EXPERIMENTAUX	
Matériels EtMéthodes	
Article :Targetedtherapies combined to referential chemotherapy for the treatment of mantle cell lymphoma -Role of GSTP1.	64
Data supplémentaires	84
Matériels et Méthodes	84
Résultats supplémentaires	85
DISCUSSION.....	86
CONCLUSION.....	92
BIBLIOGRAPHIE.....	93

LISTE DES ABREVIATION

Ag: antigène

AID : Activation -induced cytidine deaminase

ALAT : Alanine Transférase

AMM : Autorisation de mise en Marché

Ara-c: aracytine, Cytosine Arabinoside

ASAT: Aspartate transférase

Atg: Autophagy related genes

ATM: ataxia telangiectasie mutated

ATP: Adénosine triphosphate

Bcl2: B-cell lymphoma 2

BCR: B Cell Receptor

Btk: Bruton Tyrosine Kinase

CCND1: cycline D1

CDK: cyclin dependant kinase

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CDR3 :Complementarity-determining region3

CG: centre germinatif

CGH: comparative genomic hybridization

CHOP: cyclophosphamide, doxorubicine, oncovin (Vincristine), prednisone

DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma

E μ : Enhancer μ

E2F: facteur de transcriptin E2F

FISH: Fluorescence in situ hybridisation

GELA: groupe d'étude des lymphomes de l'adulte

GSH: Glutathion

GST π : glutathione-s-transferase pi (GSTP) (GST π)

HyperCVAD: cyclophosphamide, vincristine, doxorubicine / méthotrexate, aracytine

Ig: Immunoglobuline

IGH: chaîne lourde des immunoglobulines

IGHV: région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines

IgM : Immunoglobuline de Surface M

IgVH : Chaîne Lourde d'immunoglobuline

LB : lymphome de Burkitt

LCM: lymphome à cellules du manteau

LDH: lactate deshydrogénase

LED : Lupus érythémateux disséminé

LLC: leucémie lymphoïde chronique
LLI: lymphome lymphocytaire intermédiaire
LNH: lymphome non-hodgkinien
LYSA: lymphoma study association
MAPkinase: Mitogen-activated protein kinases
MGG: May-Grünwald Giemsa
MIPI: mantle cell lymphoma international prognostic index
MTC: major translocation cluster
mTOR: mammalian target of rapamycin
NFkB: nuclear factor kappa B
OS: survie globale
OMS: organization mondiale de la santé
PCR: polymérase chain reaction
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
Q-PCR: PCR quantitative
RAG1 et 2: Recombination Activating Gene 1 et 2
RB1: gène du rétinoblastome
RB1: rétinoblastome
RC: rémission complète
R-CHOP: Rituximab, cyclophosphamide, doxorubicine, oncovin, prednisone
RCu: Rémission complète incertaine
R-DHAP: rituximab, dexaméthasone, aracytine, cisplatine
REAL : Revised European American Lymphoma
R-FC : Rituximab -Fludarabine + Cyclophosphamide
R-FC: rituximab, fludarabine, endoxan
RG : Réponse Globale
ROS : Reactive Oxidative Species (dérivés réactifs de l'oxygène)
RP: rémission partielle
RT-PCR : PCR en temps réel
RT-PCR: reverse transcriptase PCR
SSR: séquence signal de recombinaison
STAT3: signal transducer and activator of transcription 3
SYK: Spleen tyrosine kinase
XLA: X-Linked Ammaglobulinémie

LISTE DES FIGURES:

Figure 1 : Formes cytologiques de LCM

Figure 2 : Etude immunohistochimique de LCM in situ

Figure 3 : Etude cytologique et immunohistochimique de LCM.

Figure 4 : Emergence de clone t(11;14)(q13;q32) lors de la différenciation lymphoïde B

Figure 5 : développement et progression des deux formes majeures de LCM dans la classification 2016

Figure 6 : Les voies moléculaires impliquées dans la pathogénèse du LCM

Figure 7 : Les Interactions cellulaires et moléculaires entre les cellules du LCM et le microenvironnement

Figure 8 : La voie de signalisation PI3K IA

Figure 9 : Les membres de la voie PI3K fréquemment mutés

Figure 10 : La sensibilité des cellules tumorales à l'inhibition de mTOR par les nouvelles générations des inhibiteurs de mTOR.

Figure 11 : Rôles des complexes mTORC1 et mTORC2

Figure 12 : La voie Btk

Figure 13 : Expression de Btk dans le LCM : Etude immunohistochimique

Figure 14 : Co-localisation membranaire de Btk et Akt

Figure 15 : La phosphorylation de Btk est partiellement PI3K dépendante

Figure 16 : Le métabolisme de l'aracytine

Figure 17 : schéma global de l'approche thérapeutique de LCM

Figure 18 : Structure de temsirolimus

Figure 19 : mécanismes de résistance à la rapamycine

Figure 20 : structure de NVP-BEZ235

Figure 21: l'inhibition de la phosphorylation de la voie AKT-mTOR kinase dans les lignées cellulaires LCM comparaison rapamycine et NVP-BEZ235

Figure 22: structure d'AZD8055

Figure 23: Résistance à l'insuline : conséquence de l'inhibition de PI3K/mTORC1/2

Figure 24 : illustration de mécanisme de la mutation BTK C481S.

Figure 25: Les mutations du gène PLCG2 humain

Figure 26: Illustration de la résistance à l'Ibrutinib avec la mutation (R665W) PLC γ 2

Figure 27: Structure de Glutathion réduit (GSH)

Figure 28: Illustration de la synthèse de Glutathion de novo :

Figure 29 : Rôle de GSH dans l'apoptose et la cytotoxicité :

Figure 30 : Rôle de GSTP1 dans l'apoptose.

Figure 31 : Relation entre l'expression de CCDN1 et GSTpi

Figure 32 : L'effet de l'inhibition du transfert nucléaire du GSTpi sur la viabilité cellulaire dans les lignées cellulaires LCM

Figure 33: L'autophagie contribue à la progression tumorale : mécanismes.

Figure 34: Les différentes phases de l'autophagie.

Figure 35: Régulation d'autophagie par mTORC1 : mTORC1

Figure 36: tester les nouveaux inhibiteurs de mTOR dans des cellules primaires LCM

Figure 37: comparer l'effet d'AZD8055, NVP-BEZ235 et temsirolimus sur le cycle cellulaire

Figure 38 : L'ibrutinib inhibe la phosphorylation de substrats de mTOR kinase

Liste des tableaux :

Tableau 1 : les modifications proposées pour la future classification OMS 2016/2017

Tableau 2:l'expression des protéines de la voie mTOR dans les échantillons de LCM avant traitement

Tableau 3 : comparaison de caractéristiques majeuresdes lignées du LCM

1. INTRODUCTION :

1.1. Lymphome à cellules du Manteau – Rationnel

1.1.1. Définition et historique

Le lymphome à cellules du manteau (LCM) est une prolifération monoclonale de la lignée lymphocytaire B mature composée de cellules monomorphes de taille petite à moyenne avec un contour nucléaire irrégulier. Le LCM est caractérisé par la translocation t(11;14)(q13;q32) qui conduit à une surexpression constitutionnelle de la cycline D1 (Sander et al. 2015). Il a été initialement identifié comme un lymphome centrocytique dans la classification de Kiel (Brittinger et al. 1984). Le terme «lymphome à cellules du manteau» est employé à partir des années 1990 (Weisenburger, Kim, et Rappaport 1982) (Banks et al. 1992). Par la suite il a été identifié comme un lymphome B agressif dans la classification REAL (Revised European American Lymphoma) et plus tard dans la classification OMS (organisation mondiale de santé) (Harris et al. 1994) (Campo et al. 2011).

1.1.2. Epidémiologie et facteurs de risque :

Le LCM représente 6 à 8 % des LNH (lymphomes non hodgkiniens) avec une incidence de 0,4 pour 100.000 personnes/an. Cette incidence augmente progressivement avec l'âge en atteignant presque 2 cas pour 100.000 habitants pour la tranche des 60-69 ans (Leux et al. 2014) (Dreyling et al. 2013) avec une nette prédominance masculine (sex ratio de 2 pour 1). Malgré des arguments biologiques pour un rôle de la stimulation antigénique chronique (Hadzidimitriou et al. 2011), Il n'existe pas de preuves de l'implication de virus ou bactéries dans la genèse du LCM, ni de corrélation établie avec les déficits immunitaires primitifs.

1.1.3. Diagnostic :

1.1.3.1. Description cytologique, anatomopathologique et phénotypique :

Basée sur la classification OMS de 2008:(« WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition - WHO - OMS - » 2016)

Le lymphome à cellules du Manteau dit classique est une prolifération tumorale nodulaire ou diffuse, dans la zone du manteau du follicule lymphoïde. Dans des rares cas, cette prolifération peut être restreinte à la zone interne du manteau constituant des fines couronnes de cellules tumorales autour du centre germinatif, ce forme histologique correspond au lymphome à cellules du manteau « *in situ*»
Figure 2.

Les cellules du LCM sont monomorphes, normalement des lymphocytes de taille petite à moyenne avec des noyaux aux contours irréguliers. Ces cellules ressemblent plutôt à des centrocytes. Le noyau contient une chromatine relativement dense avec un nucléole présent mais discret. Les cellules néoplasiques ou transformées comme les centroblastes ou les immunoblastes n'existent pas dans le LCM. Dans de nombreux cas ils existent des cellules épithélioïdes qui peuvent donner un aspect du ciel étoilé.

La transformation histologique de LCM à un lymphome B à grandes cellules n'existe pas. Le LCM peut en revanche rechuter en une forme plus agressive.

Les modes d'invasion tumorale de LCM sont trois :

- In situ
- Nodulaire, les cellules tumorales une infiltration de forme nodulaire.
- Diffuse, une forme qui efface l'architecture ganglionnaire.

En plus de ces formes histologiques, deux variants cytologiques sont distingués et considérés des formes agressives **Figure 1 :**

- **La forme blastoïde :** les cellules tumorales ressemblent à des lymphoblastes avec des noyaux à chromatine fine dite poudrée et qui présentent un index mitotique très élevé.
- **La forme pléomorphe :** constituée de cellules pléomorphes souvent de grande taille à des noyaux de contours irrégulière généralement avec un cytoplasme très claire et des nucléoles plus importants.

Il est toujours important d'évaluer la prolifération cellulaire dans le LCM soit par estimer la proportion de cellules Ki67 positive ou par le nombre des mitoses figurantes.

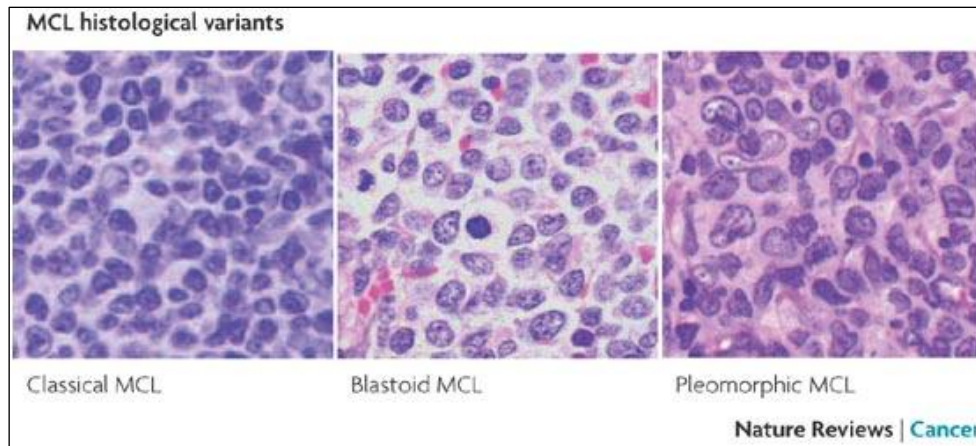


Figure 1 : Formes cytologiques de LCM : classique, blastoïde et pléomorphe (Jares, Colomer, et Campo 2007a)

Les cellules de LCM expriment les immunoglobulines de surface IgM/IgD de manière relativement intense et plus fréquemment avec une restriction lambda que Kappa. Elles sont d'habitude positives pour les CD5, FMC-7 et CD43 mais négative pour le CD10 et le BCL6. Le CD23 est négative ou faiblement positive.

Des phénotypes plus compliqués ont été décrits incluant par exemple l'absence de CD5 ainsi que le CD10+, BCL6+. En tous cas la cycline D1 est positive, ce qui indique l'importance de ce dernier surtout dans les cas de LCM *insitu*. **Figure 2**

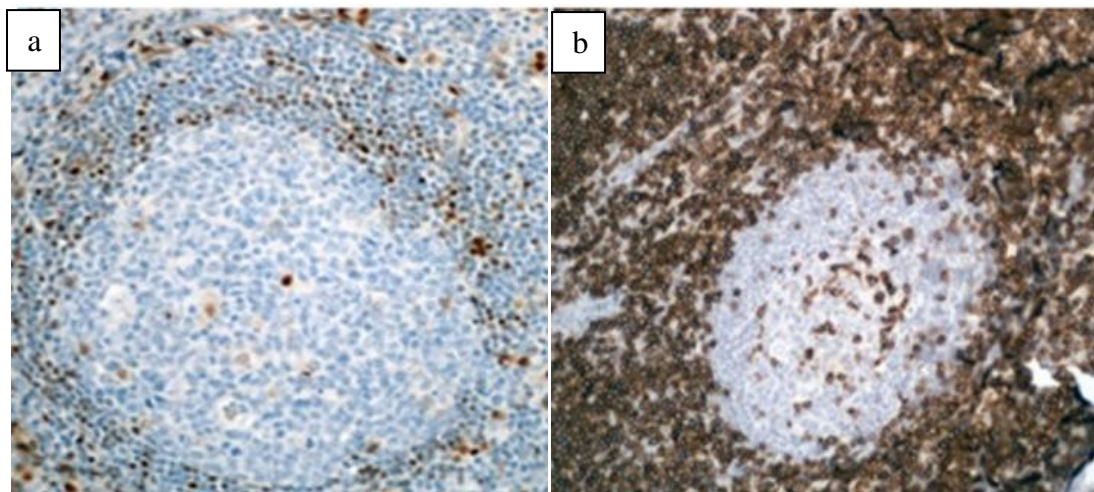


Figure 2.a: Etude immunohistochimique de LCM *in situ* avec un marquage anti cycline D1 montre les cellules cyclineD1+ dans la zone de manteau (X200). **b** : Etude immunohistochimique avec un marquage anti CD5 montre les cellules CD5+ dans la zone de manteau et quelques cellules T CD5+ dans le centre germinatif. (X200). (Hsu et al. 2014)

Révision de la classification OMS : propositions de 2016 :

Une révision de la classification OMS des néoplasies lymphoïdes a été publiée récemment. Dans cette révision le LCM indolent est divisé en deux formes cliniques qui reflètent deux différents voies de développement : (Swerdlow et al. 2016)

I : Le LCM classique : IGHV non muté -ou faiblement muté- et SOX11 exprimé. Cette forme se manifeste par une atteinte ganglionnaire ainsi qu'une atteinte des tissus lymphoïdes. L'acquisition d'autres anomalies moléculaires/ cytogénétiques pourraient conduire à une forme plus agressive blastoïde ou pléomorphe de LCM.

II : Le LCM de forme leucémique non nodulaire avec la mutation IGHV mais le SOX 11 non exprimé. Cette forme est souvent cliniquement indolente, se présente par un envahissement de sang périphérique, médullaire et souvent splénique. Néanmoins, les anomalies secondaires incluant celle de *TP53* pourrait conduire à une maladie agressive.

Dans cette révision, le lymphome à cellules du manteau *in situ* est appelé :Néoplasie à cellules du manteau *in situ* pour insister sur le faible taux de progression.

Il est caractérisé par la présence des cellules Cycline D1+, typiquement dans la zone interne de manteau de follicule lymphoïde. Cette localisation ne suggère pas le diagnostic de LCM et souvent découverte d'une manière fortuite, des fois associée à d'autres lymphomes (Carvajal-Cuenca et al. 2012).

Le tableau suivant résume les nouvelles modifications proposées dans la classification OMS en 2016

LCM	1 ^{er} sous Type	2 ^{ème} sous Type
manifestations Moléculaires	IGHV non muté SOX11 exprimé	IGHV muté SOX11 non exprimé
manifestations Cliniques	Ganglionnaire, cliniquement agressif	Sang périphérique, moelle osseuse, rate, indolent mais peut évoluer à une forme agressive
<ul style="list-style-type: none">- Les mutations ont une importance clinique comme le <i>TP53</i>, <i>NOTCH1/2</i> trouvés dans une petite proportion taux des LCM.- Le réarrangement <i>CCDN1</i> existe dans la moitié des LCM négatif pour <i>CCDN1</i>.- Le nouveau nom de LCM <i>in situ</i> est : Néoplasie du manteau <i>in situ</i> pour souligner le risque clinique minime.		

Tableau 1 : les modifications proposées pour la future classification OMS 2016/2017

Figure 3)

a) HES

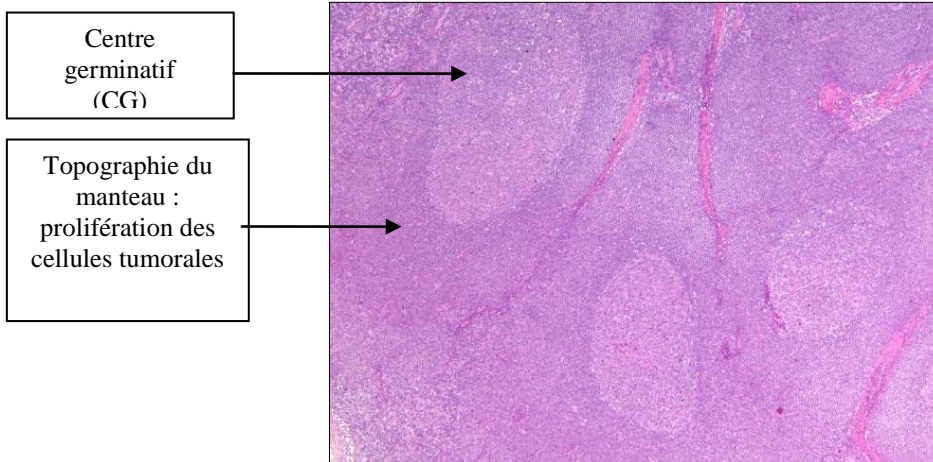


Fig3-a:Coloration Hemalun Eosine Safran (HES).Lymphome à cellules du Manteau dans une topographie du Manteau : Présence d'une population lymphoïde monomorphe, présence des centres germinatifs réactionnelles.

b) Immunomarquage CD5+ :

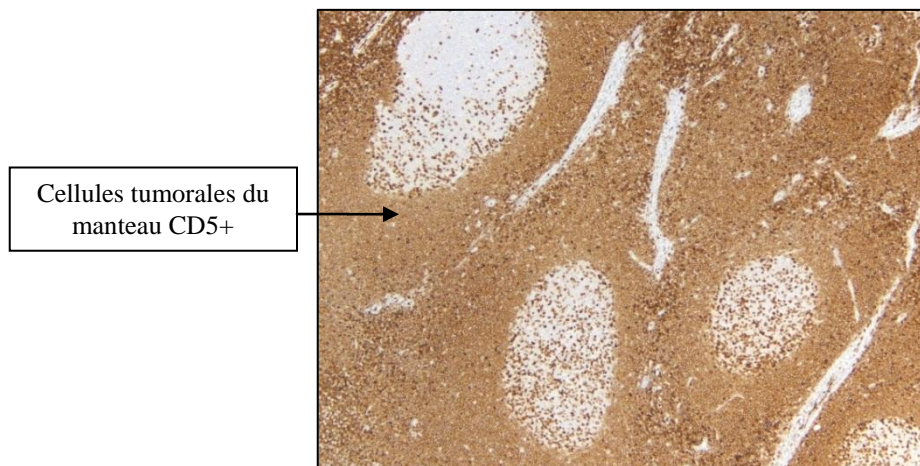


Fig 3-b : Etude immunohistochimique avec un marquage anti CD5. Au sein des centresgerminatifs, quelques lymphocytes T sont marqués par le CD5 et entourées d'une population tumorale B CD5+ CD5+.

c) Immunomarquage CD20 :

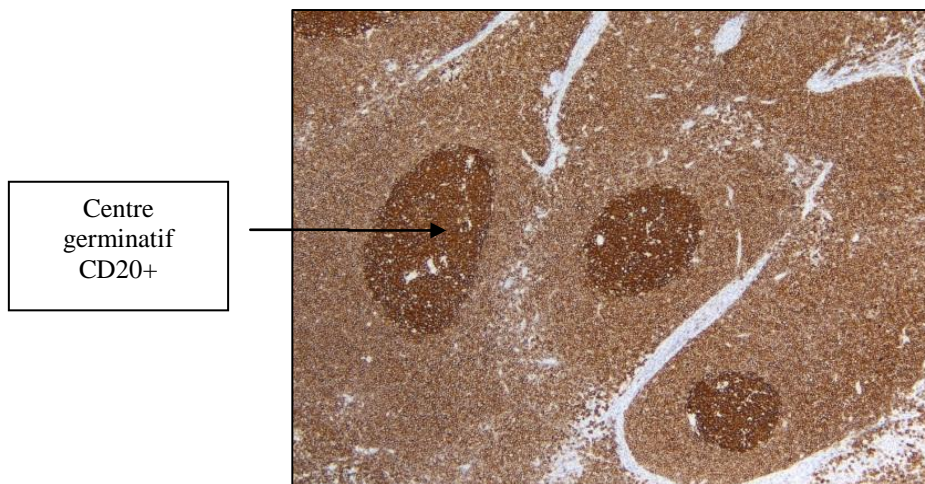


Fig 3-c : Etude immunohistochimique avec un marquage anti CD20. Les centres germinatifs sont CD20 forts et entourés par une infiltration lymphoïde tumorale CD20+.

d) Immunomarquage Cycline D1 :

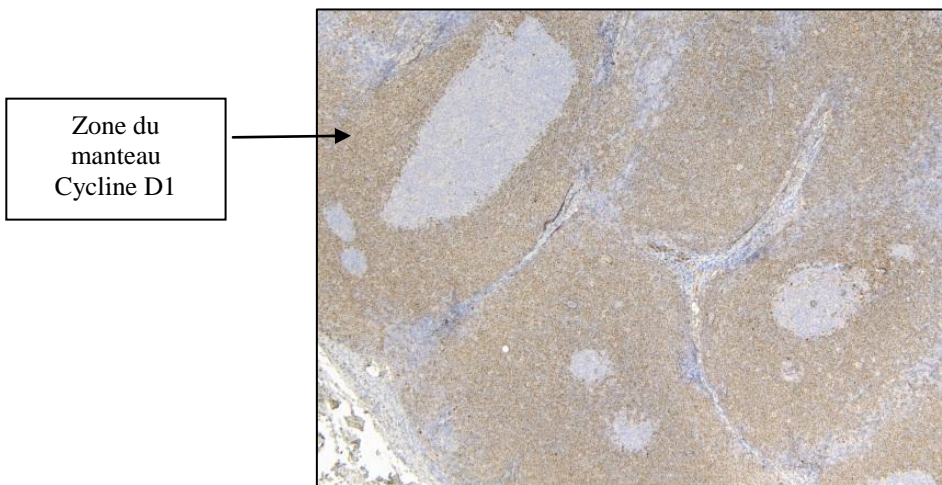


Fig3-d : Etude immunohistochimique avec un marquage anti Cycline D1. La prolifération monomorphe située en topographie du manteau est cyclineD1 positive. Les centres germinatifs résiduels sont cycline D1 négatifs.

Figure-3) : Etude cytologique et immunohistochimique de LCM : Images issue de laboratoire d'anatomopathologie, Hôpital Necker. Dr. Julie Bruneau.

1.1.3.2. Caryotype, biologie moléculaire :

La translocation t(11 ; 14)(q13 ; q32) est caractéristique du LCM. Elle est retrouvée dans la majorité des cas (90 % des cas) et considérée comme l'événement génétique principal dans le LCM. Comme conséquence à cette translocation, la Cycline D1 est surexprimée par le fait qu'elle est sous le contrôle de l'enhancer $E\mu$ du gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (IgVH). (Campo et al. 2011)

D'autres translocations variantes plus rares de CCDN1 ont été aussi documentées, par exemple avec la chaîne légère de l'immunoglobuline. Il existe des rares cas de LCM négatifs pour la cycline D1 mais représentent un profil indiscutable de LCM et ont une surexpression des cyclines D1 et D3. Les auteurs ont aussi cité quelques cas de ces LCMs négatifs pour la CCDN1 portant la translocation t(2 ; 12)(p12 ; p13), une fusion entre la cycline D2 et le gène de la chaîne légère kappa (Wlodarska et al. 2008)

1.1.4. Formes cliniques, facteurs de pronostic :

1.1.4.1. Présentations cliniques :

L'âge médian au diagnostic est 60-65 ans, 30% des patients ont des symptômes systémiques et plus de 70% présentent une maladie disséminée avec un stade Ann Arbor de III ou IV (atteinte médullaire dans 70% à 90% des cas (Dreyling et European Mantle Cell Lymphoma Network 2014). La présentation clinique classique est un envahissement ganglionnaire mais l'atteinte d'autres organes n'est pas rare. Une splénomégalie est présente dans 55% des cas (Kotwal et al. 2015) (Swerdlow et Williams 2002), une hépatomégalie dans 35% des cas. 15 à 25% des patients atteints de LCM nodulaire ont des atteintes intestinales (Vetro et al. 2015), qui parfois peuvent se présenter au premier plan comme une polypose lymphomateuse. Les atteintes amygdaliennes ou cutanées sont moins fréquentes (Wehkamp et al. 2015). L'atteinte du système nerveux central est rarement présente au diagnostic (<5%) mais peut se voir lors de l'évolution de la maladie, surtout dans les formes blastoïdes (Ferrer et al. 2008). L'envahissement médullaire est fréquent chez 90% des patients tandis que la forme leucémique circulante est retrouvée chez 25% des patients (Swerdlow et Williams 2002). Une anémie, un taux de LDH et de β 2-microglobuline élevés peuvent être détectés dans la moitié des cas; un pic monoclonal se retrouve généralement à un faible taux.

Une forme particulière de LCM indolent, définie par la présence d'une splénomégalie et d'une lymphocytose peu importante sans syndrome tumoral ganglionnaire significatif est caractérisée par une évolution peu agressive. Les études sur la biologie et l'histologie des LCM indolents montrent qu'ils présentent majoritairement une forme morphologique non blastoïde, un faible index de

prolifération, la présence de mutations somatiques au niveau des segments *IGVH*, peu d'anomalies génétiques secondaires et en général SOX11 négatif (Verónica Fernández et al. 2010) **tableau 1**. Dans la majorité des cas, le LCM est disséminé au diagnostic. Son évolution se caractérise par des rechutes malgré une réponse initiale au traitement. 20 à 30 % des patients peuvent être de forme blastoïde au diagnostic dont le pronostic est très mauvais (Dreyling et al. 2013). Le LCM reste donc une maladie agressive en dehors de quelques cas exceptionnels de LCM indolent (Delfau-Larue et al. 2015).

1.1.4.2. Facteurs de pronostic :

Un « Mantle cell lymphoma (MCL) International Prognostic Index (MIPI) » a été développé en 2008 comme un premier score pronostic spécifique en LCM (Hoster et al. 2008), il est calculé en utilisant les valeurs de :

- 1- Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS) ;
- 2- l'âge du patient ;
- 3- le dosage de la Lactate deshydrogenase (LDH), et
- 4- le nombre des leucocytes circulants.

La valeur pronostique de MIPI a été confirmée récemment (Hoster et al. 2014). La prolifération des cellules tumorales évaluée par le pourcentage des cellules exprimant le Ki67 en immunohistochimie a été considérée également comme un facteur pronostique (Klapper et al. 2009)

Le MIPI biologique (MIPIb) est le score modifié afin de permettre d'inclure l'index de prolifération cellulaire (Ki-67) (Hoster et al. 2008). L'index mitotique et l'index de prolifération Ki67 sont généralement bas <40% dans la forme classique et plus élevés > 40 % dans les formes pléomorphes et blastoïdes (Pervez, Haroon, et Awan 2015). La valeur pronostique de Ki67 a été confirmée très récemment pour être liée à la survie globale. La forme blastoïde était associée à une courte survie globale indépendamment de MIPI mais pas de Ki-67. Plus important les patients ayant une expression de Ki-67 $\geq 30\%$ avaient des réponses thérapeutiques moins satisfaisantes que les patients avec une expression de Ki-67 inférieure à 30% dans les deux formes blastoïde et non blastoïde de LCM (Hoster et al. 2016).

SOX11 est un facteur de transcription normalement non exprimé dans le tissu lymphoïde mais son expression est très spécifique aux formes classiques de LCM. Il est exprimé dans 90 à 95% des LCMs (Sander et al. 2015). Sa valeur pronostique est débattue.

Une étude de l'expression de SOX11 en immunohistochimie ou PCR quantitative dans de larges séries de patients atteints de LCM a confirmé l'association entre l'absence d'expression de SOX11, le statut «hyper-muté» d'*IGHV* avec peu d'anomalies génétiques, une forme clinique non tumorale leucémique et une plus longue survie (Ondrejka et al. 2011)(Del Giudice et al. 2012). Cependant, il a été démontré dans d'autres études que certaines tumeurs SOX11 négatives pouvaient être associées à une plus mauvaise évolution, ou encore que les patients indolents présentaient le même niveau d'expression de SOX11 que les autres (X. Wang et al. 2008). En général, le rôle de SOX11 est contradictoire. Les LCMs non exprimant le SOX11 ont une courte survie par rapport aux LCMs exprimant le SOX11. (1.5 vs 3.2 ans, $p = 0.014$) (Nygren et al. 2012). En revanche, une étude multivariée a confirmé que le *TP53* est le seul gène à avoir un rôle significatif comme un marqueur moléculaire (Nordström et al. 2014). Ainsi, SOX11 lui-même ne peut être utilisé comme facteur pronostique ni comme un élément guidant la thérapeutique mais comme un biomarqueur utile à l'identification d'un sous type particulier de LCM notamment les Cycline D1 négative.

Les futures modifications de la classification OMS de LCM proposées en 2016 soulignent le fait que les LCMs exprimant le SOX11 n'ont pas une hypermutation *IGHV* et sont cliniquement agressifs, tandis que les LCMs négatifs pour le SOX11 ont un *IGHV* muté et se présentent en une forme clinique indolente. **Tableau 1.** (« WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition - WHO - OMS - » 2016)(Swerdlow et al. 2016)

La surexpression et les mutations *p53* ainsi que les délétions de *p16* et de *p21* sont également liées aux formes plus agressives telles que les variants blastoïdes (Bernard et al. 2001).

1.2. Lymphopoïèse B :

Il est important de comprendre la lymphopoïèse normale afin de comprendre l'origine cellulaire des cellules de LCM.

La lymphopoïèse B se passe dans deux étapes : précoce et tardive.

1.2.1. Lymphopoïèse B précoce :

Cette étape se situe dans la moelle osseuse. Elle est indépendante de toute stimulation antigénique. Les progéniteurs hématopoïétiques s'y différencient en lymphocytes B naïfs ayant un récepteur B fonctionnel mais n'ayant pas encore rencontré l'antigène. Après cette étape indépendante de la stimulation antigénique, la suite de la maturation se fait dans les organes lymphoïdes secondaires.

La différenciation d'un Lymphocyte B nécessite donc l'obtention d'un récepteur de surface fonctionnel spécifique à l'antigène: le BCR(B-cell Receptor). Ce récepteur est constitué d'une immunoglobuline de surface composée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères kappa ou lambda(Levine et al. 2000). L'Immunoglobuline est composée d'une région variable (V) responsable de la reconnaissance de l'antigène. Cette région variable est reliée à une région constante (C) responsable de la fonction effectrice de l'immunoglobuline.

L'élément fondamental dans la lymphopoïèse précoce pour obtenir un BCR fonctionnel est la recombinaison des gènes VDJ du gène IGH codant pour les régions variables des chaînes lourdes et la recombinaison des gènes VJ des gènes IGK et IGL codant pour les régions variables des chaînes légères. Le locus IGH qui code pour les chaînes lourdes se situe sur le chromosome 14q32. Le locus IGK qui code pour les chaînes légères kappa (κ) se situe sur le chromosome 2p12 et le locus (IGL) qui code pour les chaînes légères lambda(λ) se situe sur le chromosome 22q11. Il existe environ 50 gènes Variables (V), 20 gènes de Diversité (D) 6 gènes de Jonction (J) et 9 gènes C (Constant).

La recombinaison entre les différents gènes V, D et J dans un lymphocyte B, initiée par les enzymes RAG «Recombination Activating Gene» 1 et 2, permet donc l'introduction d'une première étape de diversité de récepteurs au sein du précurseur lymphoïde B (Fugmann 2010). Un deuxième mécanisme de diversité est liée à l'étape de jonction entre ces différents gènes, dépendantes de la reconnaissance, puis de l'enchaînement de séquences d'ADN non codantes, appelées « séquence signal de recombinaison » (SSR). Cette deuxième étape est finalisée par un mécanisme de réparation non homologue de l'ADN qui introduit une diversité supplémentaire par l'adjonction ou la soustraction de nucléotides.

Le réarrangement génique introduit donc de la diversité au sein du répertoire des immunoglobulines en deux manières: tout d'abord à travers les différentes combinaisons possibles de segments V, D et J; puis une diversité jonctionnelle par l'addition ou soustraction de nucléotides lors de la jonction. Les différentes possibilités d'association entre les chaînes lourdes et légères constituent un troisième mécanisme de diversité. Ces mécanismes permettent la génération d'un répertoire de lymphocytes B naïfs composé de 10^{11} récepteurs différents.

1.2.1.1. La Recombinaison V(D)J et la translocation origine de LCM :

Malgré les mécanismes de régulation et de réparation, des erreurs de réparation des cassures doubles brins de l'ADN peuvent toujours survenir lors de ces réarrangements et aboutir à des translocations. Ces translocations peuvent avoir lieu entre le locus des immunoglobulines et un oncogène. En effet, lors de la recombinaison V(D)J l'enzyme RAG peut reconnaître par erreur une séquence SSR dite « cryptique » située sur un locus X différent des chaînes lourdes d'Ig en 14q. Lorsque cette erreur est poursuivie, une translocation entre ce locus X et le locus 14q peut survenir, le locus X devenant alors sous la dépendance des séquences régulatrices des IgH (les Enhancers). Si le locus X contient un oncogène, la translocation peut être le point de départ d'un processus de transformation tumoral.

Ce mécanisme pourrait expliquer l'initiation de la lymphomagenèse du LCM. Dans ce dernier, le chromosome partenaire dans la translocation est le chromosome 11, avec un point de cassure à proximité du locus 11q13. La translocation t(11;14)(q13;q32) retrouvée dans la quasi-totalité (90%) des cas est considérée comme l'élément fondateur de la lymphomagenèse.

Rapidement après sa description, l'oncogène cible sur le locus 11q13 a été identifié, il s'agit de *CCND1*, codant pour la cycline D1, protéine régulatrice du cycle cellulaire (de Boer et al. 1995). 30 à 50% des translocations t(11;14) décrites dans le LCM surviennent au niveau du Major Translocation Cluster (MTC) au stade de progéniteurs B dans la moelle osseuse (Yin et Luthra 2013)

1.2.2. Lymphopoïèse tardive :

Cette étape se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires. C'est une étape antigène dépendante. Le lymphocyte B mature naïf exprimant une immunoglobuline de surface (IGMet/ou IgD) quitte la moelle osseuse et se dirige vers les organes lymphoïdes secondaires. Après sa rencontre avec l'antigène, les lymphocytes B vont former le centre germinatif dans le follicule secondaire, où ils vont subir de nouvelles modifications génétiques. Ces nouvelles modifications constituent un processus d'hypermutation somatique puis de commutation de classe, initié par l'enzyme activation-induced cytidine deaminase (AID) (Muramatsu et al. 2000).

Les lymphocytes B naïfs du follicule primaire sont repoussés, par le follicule secondaire, en périphérie du centre germinatif pour former la zone du manteau. A la sortie du centre germinatif certains lymphocytes matures ou centrocytes évoluent vers un pool de cellules B mémoires et d'autres se différencient en plasmocytes sécrétant des immunoglobulines spécifiques de l'Ag rencontré.

Les petites cellules à noyaux clivés du LCM sont probablement les équivalents néoplasiques des lymphocytes B matures naïfs pré-germinatifs normaux présents dans le follicule primaire et dans la zone du manteau du centre germinatif. Ces lymphocytes expriment une IgM de surface avec une région variable ayant subi un réarrangement V(D)J. Bien que la translocation initiale ait lieu dans une cellule B immature au niveau de la moelle osseuse, l'effet oncogénique de cette aberration chromosomique n'est pas suffisant pour permettre le développement d'un lymphome. Celui-ci apparaît quand la cellule a atteint le stade naïf mature pré-germinatif en raison de nouvelles anomalies génétiques (Jares, Colomer, et Campo 2007). Bien que les lymphocytes B tumoraux du LCM soient issus de la transformation de lymphocyte B de la zone du manteau, ceux-ci ont subi le processus d'hypermutation somatique spécifique du centre germinatif, comme l'ont montré les études immunogénétiques des gènes *IGHV* du LCM (Hadzidimitriou et al. 2011). Le taux de mutations des gènes *IGHV* reste néanmoins très inférieur aux taux retrouvés dans les LLC (Cogliatti et al. 2005) (Camacho et al. 2003). Il semblerait qu'il y ait une corrélation entre le taux des mutations somatiques et une présentation clinique indolente faiblement tumorale associée à une meilleure survie (Navarro et al. 2012).

Ces éléments permettent de proposer un modèle physiopathologique de lymphomagenèse en plusieurs étapes (figure 4).

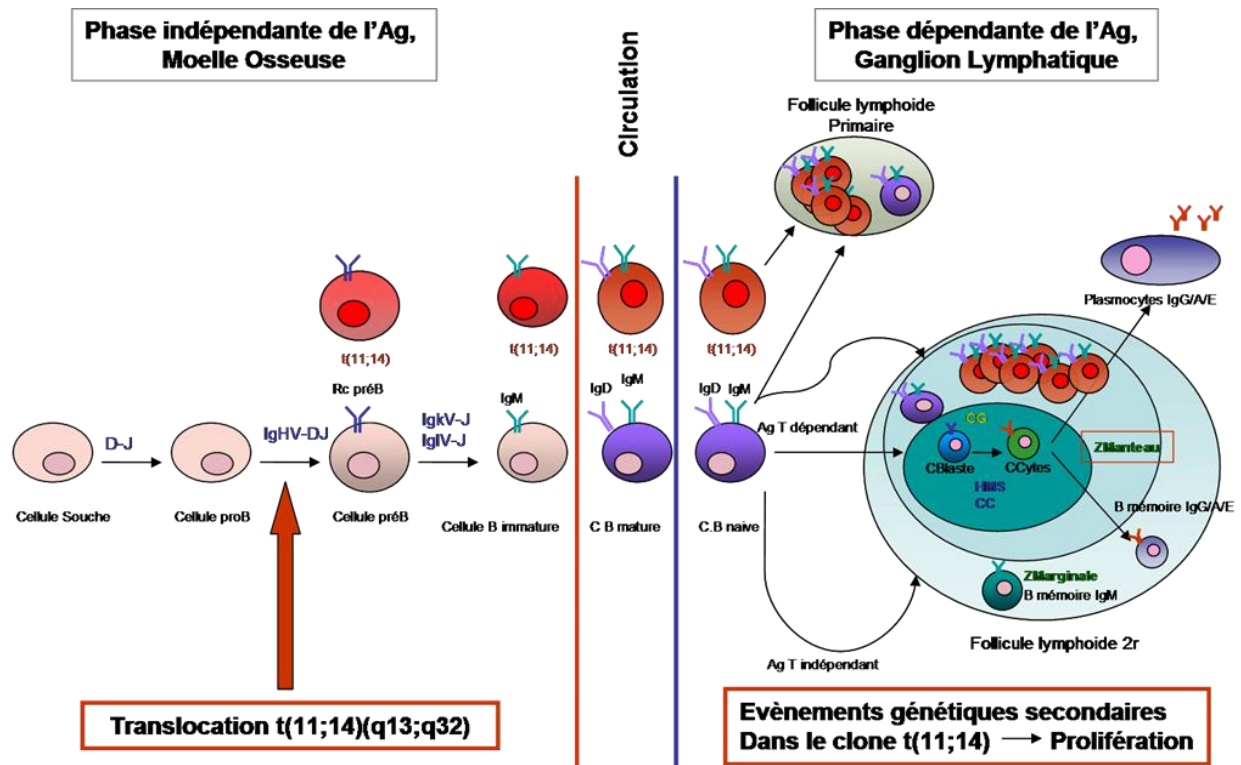


Figure 4 : Emergence du clone t(11;14)(q13;q32) lors de la différenciation lymphoïde B.

La translocation survient lors de la recombinaison V(D)J, via l'enzyme RAG dans la moelle osseuse. L'avantage sélectif est acquis au stade de la cellule B naïve, dans le ganglion, au niveau du follicule lymphoïde primaire, ou dans la zone du manteau du follicule lymphoïde secondaire. (Swerdlow, International Agency for Research on Cancer, et World Health Organization 2008)

1.2.3 Lymphomagenèse du LCM : selon la classification OMS proposée en 2016

La future révision de la classification OMS proposée en 2016 met en évidence les deux voies de lymphomagenèse conduisant à deux formes cliniques différentes du LCM. Ces deux mécanismes sont illustrés dans la **figure 5**.

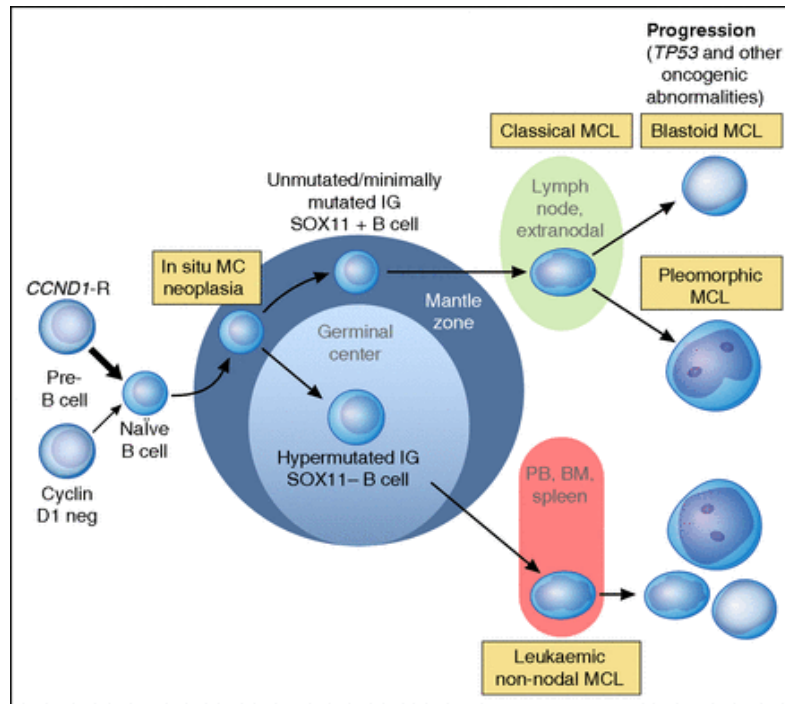


Figure 5: Développement et progression des deux formes majeurs de LCM (modifié de Jares et al (Swerdlow et al. 2016). Les cellules précurseurs B (normalement positives pour la *CCND1* mais des fois négatives) devient des cellules B naïves matures anormales qui vont initialement coloniser la zone interne de manteaux représentant une néoplasie de la zone du manteau. Ces cellules atteintes déjà des anomalies génétiques additionnelles comme l'ATM inactivé peuvent progresser à un LCM classique qui exprime très souvent le *SOX11*. Elles sont génétiquement instables et capables d'acquérir d'autres anomalies de régulation de cycle cellulaire, de réparation d'ADN et de survie cellulaire et d'autres voies de signalisation. Plus tard la progression à un LCM blastoïde ou pléomorphe peut arriver. Une plus petite partie des néoplasies de la zone du manteau pourraient subir une mutation somatique vraisemblablement dans le centre germinatif conduisant à un LCM négative pour le *SOX11* et génétiquement stable pour plus longtemps et envahie plutôt le sang périphérique, la moelle osseuse et quelques fois la rate. Néanmoins, ces LCM peuvent aussi subir des anomalies moléculaires et cytogénétiques additionnelles particulièrement de *TP53* conduisant à une progression clinique et même des fois morphologique.

1.3. Physiopathologie du LCM et anomalies génétiques :

1.3.1 Translocation (11;14)(q13;q32)

La translocation $t(11;14)(q13;q32)$, anomalie cytogénétique caractéristique des LCM, est retrouvée dans 95% des cas (Jares, Colomer, et Campo 2007a). La Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) permet de détecter le réarrangement en mettant en évidence une fusion du signal *IGH* et *CCND1*. Cette translocation juxtapose l'oncogène *CCND1* (11q13) à la séquence régulatrice des *IgH* (14q32) (enhancer E_{μ}) (Bosch et al. 1994), et elle a comme conséquence l'amplification de l'expression de l'oncogène *CCND1*, un membre de la famille des cyclines de type D. La cycline D1 n'est normalement pas exprimée dans les cellules B matures et rarement dans les autres pathologies lymphoïdes B.

La surexpression de cyclineD1 est donc un marqueur pour le diagnostic de LCM, bien que pas totalement spécifique (de Boer et al. 1995). La cycline D1 est impliquée dans la régulation des phases précoces du cycle cellulaire ; un taux élevé peut accélérer la transition entre la phase G1 et la phase S et favoriser la prolifération tumorale(Veronica Fernández et al. 2005).

Comme les autres cyclines, la CyclineD1 forme des complexes incluant des partenaires catalytiques - les kinases dépendantes des cyclines ou CDK (CDK4 et 6)et entraîne la phosphorylation et l'inactivation du gène suppresseur de tumeur retinoblastoma1 (RB1). Ce dernier perd alors son effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire. RB1 hyperphosphorylée dans le LCM, notamment dans les formes agressives(Jares, Colomer, et Campo 2007a)joue un rôle central dans la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire en séquestrant et inactivant le facteur de transcription E2F. Ce dernier est lui-même impliqué dans la transactivation de gènes essentiels à l'entrée en phase S et à la réplication comme la cycline E qui forme également des complexes avec les CDK(H. S. Zhang et al. 2000).

De plus, une quantité importante de complexes cyclineD1/CDK4 pourrait renforcer le lien entre le complexe CDK4-cyclineD1 et la protéine inhibitrice de cycle cellulaire (p27)et les rendre incapables d'arrêter la phase G1. L'effet oncogénique de la cyclineD1 peut être indépendant de CDK et du cycle cellulaire via sa capacité à réguler de nombreux facteurs transcriptionnels comme par exemple STAT3(signal transducer and activator of transcription 3), CEBP β (CCAAT/enhancerbindingprotein β), ou BMYB(MYB relatedgene B) (Jares, Colomer, et Campo 2007a).

La *CCND1* reste quand même un oncogène dont l'effet est faible et insuffisant à lui seul pour développer le LCM. Les études moléculaires ont identifié plusieurs anomalies du cycle cellulaire et des voies de signalisation, ainsi que d'autres mutationsqui pourraient également jouer un rôle dans la lymphomégénèse. (Bea et al. 2013). En effet, les modèles de souris transgéniques où le *CCND1*est placé sous la dépendance de l' EnhancerE μ pour reproduire la t(11;14)(q13;q32) ont permis de mettre en évidence que la surexpression de la cyclineD1 seule n' est pas suffisante pour le développement d' un LCM (Katz et al. 2014)(Lovec et al. 1994). La découverte de 1 à2% de la translocation t(11;14) dans le sang de sujets sains renforce également cette hypothèse (Hirt et al. 2004). Ainsi d'autres anomalies sont nécessaires pour aboutir à un lymphome.L'altération des différentes voies moléculaires dans le LCM est schématisée dans la **figure 6**.

Les mutations de *CCND1* sont corrélées avec la surexpressionde *SOX11* (86% de *CCND1* sont mutés lorsque *SOX11* est surexprimé, vs seulement 18 % dans les LCM *SOX11* non surexprimé) (Bea et al 2013) mais aussi avec les mutations de *IGHV* (58% vs 19%). Cela pourrait confirmer l'hypothèse que les mutations de *CCND1* sont acquises dans l'environnement du centre germinatif.

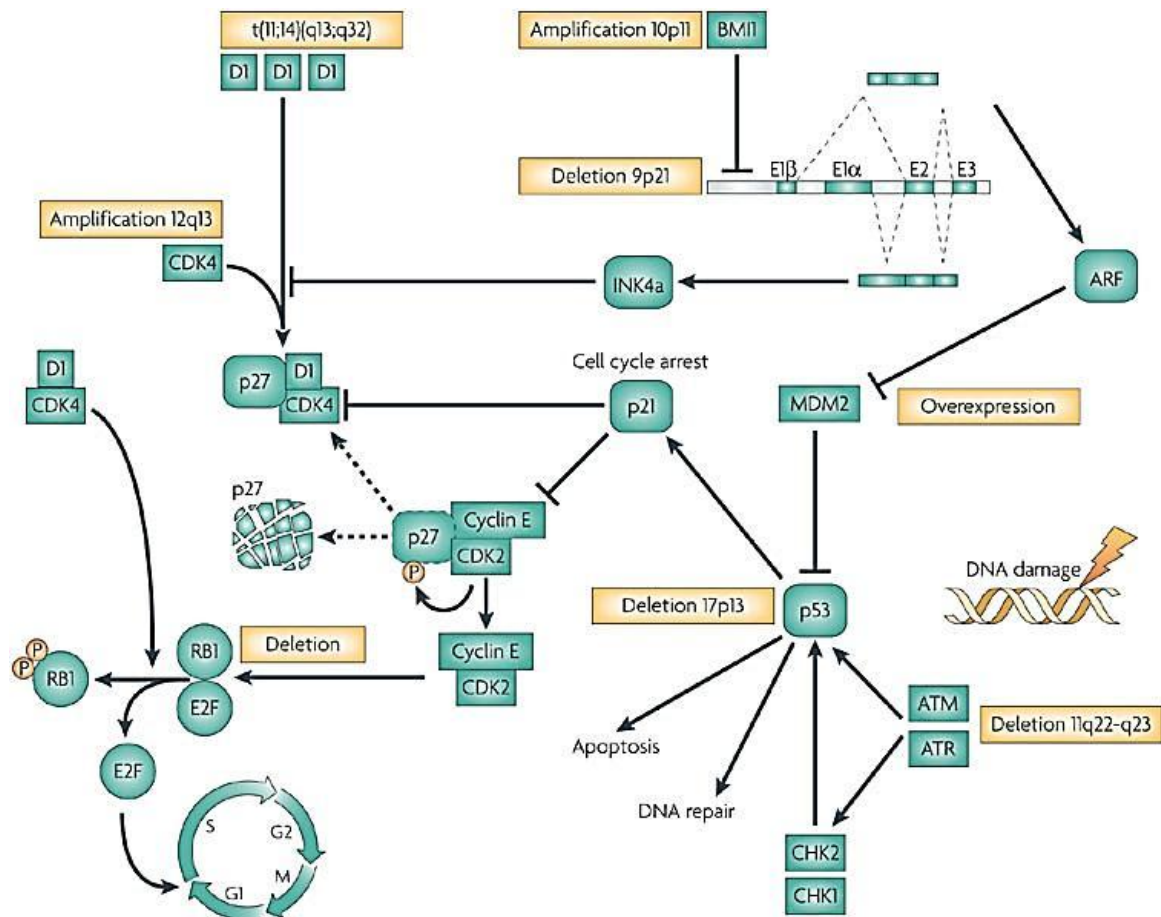


Figure 6: Voies moléculaires impliquées dans la pathogenèse du MCL. La t(11;14)(q13;q32) aboutit à la surexpression constitutive de la cycline D1. Cette dernière se lie à la cyclin-dépendant kinase 4 (CDK4) et contrôle la transition G1-S du cycle cellulaire. La dérégulation de la cycline D1 et la surexpression de CDK4 favorise l'hyperphosphorylation et par conséquent l'inactivation de la protéine du rétinoblastome Rb1. De plus, la présence de fort taux de complexecycline D1/CDK4 permet la décomplexation de p27 de complexe cycline E/CDK2, menant à l'activation du complexe. Les délétions homozygotes du locus CDKN2A qui code pour l'inhibiteur des CDK INK4A favorisent la présence d'une forte activité du complexe cyclineD1/CDK4. Une alternative à la perte d'INK4A, l'oncogène BMI1 peut être amplifié et/ou fortement exprimé dans certains cas de MCL. Le locus CDKN2A code également pour ARF qui régule négativement MDM2 (mouse double minute 2 homologus), une ubiquitine ligase induisant la dégradation de p53. Ces altérations ainsi que les mutations de TP53 mènent fréquemment à la dérégulation de la voie p53. Il peut également y avoir une dérégulation de la voie deréponse aux lésions de l'ADN, incluant ATM. D'après(Jares, Colomer, et Campo 2007b)

1.3.2. Anomalie des voies de réparation de l'ADN et du cycle cellulaire :

Une étude génomique utilisant plusieurs mécanismes moléculaires comme le séquençage du génome complet et le séquençage d'exome réalisés par Silvia Béa a révélé un spectre hétérogène de mutations impliquées dans le développement du LCM (Bea et al. 2013). L'Ataxiatelangiectasia (*ATM*) qui est un élément clé dans la réparation de l'ADN est muté ou inactivé dans 40 à 75% des cas.

Bea *et al* ont montré que la mutation d'*ATM* se trouve dans 55% des LCM qui expriment la protéine *SOX11*. Les mutations d'*ATM* n'ont pas été trouvées dans les cas de LCM non exprimant la protéine *SOX11* ($p=0.023$). D'autres mutations ont été citées comme les mutations *TP53* qui ont été corrélées avec l'altération de *17p*. Par ailleurs, aucun lien n'a été remarqué entre *TP53* et *SOX11*.

En effet, la majorité des LCMs sont génétiquement instables. D'autres mutations induisent aussi des anomalies de cycle cellulaire. Le *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) est muté dans 18 à 31% des cas. Cette mutation correspondant à une délétion homozygote du locus situé en 9p21 est associée à des présentations histologiques blastoïdes (Delfau-Larue et al. 2015). Ce gène code normalement pour deux protéines suppresseurs de tumeur *INK4a* (p16) et le régulateur de p53: *ARF* (p14) qui inhibent la progression du cycle cellulaire. Cette mutation perturbe les mécanismes de réparation de l'ADN en stabilisant la protéine p53 (Kridel et al. 2012).

Un autre mécanisme de ces altérations est une mutation inactivatrice de la kinase *CHK2* qui agit en aval d'*ATM*. Cette mutation induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M en cas de lésion de l'ADN (Jares, Colomer, et Campo 2007). **Figure 6.**

1.3.3. Autres anomalies génétiques :

Certains des LCMs ne présentent pas de translocation $t(11;14)$ et n'expriment pas la cycline D1 (5% des cas). Un niveau élevé d'expression des cyclines D2 et D3 a été démontré chez ces patients (Geske et al. 2006). Les translocations $t(2;12)(p12;p13)$, $t(12;22)(p13;q21)$ ou encore $t(12;14)(p13;q32)$ fusionnant la *cyclineD2* avec le locus de la chaîne légère κ ou λ ou celui de la chaîne lourde des immunoglobulines ont été rapportées (Wlodarska et al. 2008).

La mutation *NOTCH1* a été identifiée dans 12 % des LCMs (Kridel et al. 2012). Quarante-six pourcent des *NOTCH1* mutées correspondent à un domaine C-Ter PEST tronqué (exon 34). *NOTCH1* a un rôle d'activateur de transcription, en faveur de la différenciation des lymphocytes B. Son altération induit alors une augmentation de son effet oncogénique et il est particulièrement corrélé avec une forme clinique de type blastoïde (67% vs 19% $p=0.026$) et avec une moins bonne survie globale (OS: 3ans de survie 33% vs 60%) (Bea *et al* 2013).

La *CCDN1* a été décrite comme une cible de *NOTCH1* (Cohen et al. 2010)(Guo et al. 2009)mais cela n'a pas été confirmé ultérieurement. *NOTCH1* a alors un effet indépendant de *CCDN1*(Kridel et al. 2012).

L'inhibition spécifique de *NOTCH1* par shRNA induit la baisse de l'expression de BCL-2, de la procaspase-3, de la procaspase-9, de p-Akt, de p-mTOR et de p-70S6K. L'inhibiteur de la voie de *NOTCH1* pourrait inhiber la prolifération des lignées du LCM Jeko-1, induire l'apoptose des cellules. Les mécanismes peuvent d'autre part être associés à l'inhibition de la phosphorylation de la voie Akt/mTOR kinase (Zhu et Huang 2015).

La mutation *NOTCH2* peut se trouver dans les LCMs, et plus fréquemment dans les formes blastoïdes (66 vs 18%, p=0.001). En règle générale, les mutations de *NOTCH2* sont plus fréquentes dans les tumeurs solides.

Les mutations *NOTCH1/2* existent dans 9,5% des LCM étudiés avec un profil blastoïde (67% vs 13%), et une survie globale significativement plus courte (- de 3ans OS : 24 vs 63%) (Bea et al, 2013).

Les altérations de locus 8q24 (*MYC*) qui se manifestent par la translocation t(8;22)(q24;q11) ou par une trisomie 8 ne sont pas fréquentes dans le LCM mais pourraient être associées à une forme blastoïde(Michaux et al. 2004).

1.3.4. LCM et le microenvironnement tumoral:

En plus des anomalies génétiques des cellules B malignes, le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans la pathogenèse du LCM. Les chémokines comme CXCR4 et CXCR5, ainsi que les molécules d'adhésion comme les CCR7, VLA-4 auraient un rôle dans l'attraction des cellules tumorales et donc dans la dissémination extra nodale de la maladie. Quand elles adhèrent au stroma du microenvironnement, quelques cellules tumorales pourraient devenir résistantes à la chimiothérapie, ce qui pourrait expliquer la rechute du LCM (Kurtova et al. 2009).

Les cellules de la moelle osseuse et les cellules tumorales elles-mêmes sécrètent l'interleukine-6 (IL6) qui active la voie de phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) impliquée dans la croissance et la survie du LCM. (L. Zhang et al. 2012). Il a été suggéré que les cellules T régulatrices (Yang et al. 2006)et les macrophages(Argatoff et al. 1997)du microenvironnement du LCM inhibent la réponse anti tumorale de l'hôte. La présence de lymphocytes T régulateurs et les macrophages est associée à un pronostic défavorable dans d'autres lymphomes(Sánchez-Aguilera et al. 2006), en particulier le lymphome folliculaire (Kiaii et al. 2013). Dans le LCM ce lien reste à confirmer. L'expression de PD-L1 est aussi un autre mécanisme par lequel les cellules du LCM pourraient inhiber la réponse des lymphocytes T anti-tumoraux et inhiber l'immunité anti-tumorale (L. Wang et al. 2013).

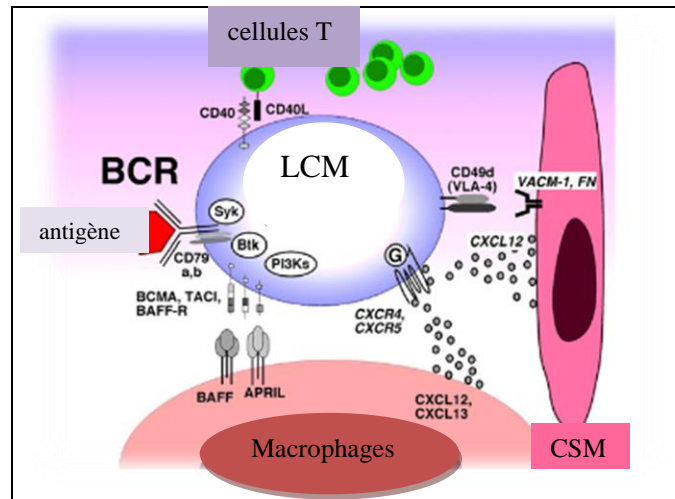


Figure 7. Interactions cellulaires et moléculaires entre les cellules du LCM et le microenvironnement : Adapté d'après (Burger et Ford 2011). CSM : cellules mésenchymateuses du stroma, LCM : cellules du lymphome du manteau. Les cellules mésenchymateuses et les macrophages attirent les LCMs par les récepteurs des chémokines qui sont fortement exprimés par les LCMs. Les molécules d'adhésion VLA-4 se fixent aux VCAM-1 et FN (fibronectin) renforçant l'adhésion. Les macrophages expriment des membres de la famille du TNF :BAFF et APRIL qui déclenchent un signal de survie des LCMs lorsqu'ils se fixent sur les récepteurs correspondants: BCMA, TACI, BAFF-R. L'activation de BCR déclenche les voies de signalisation Btk, PI3K. Ces interactions favorisent la survie cellulaire et la résistance tumorale.

1.3.5. Anomalies des voies de signalisation :

1.3.5.1 La voie PI3K -AKT-mTOR kinase:

- PI3K- AKT :

Les Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (aussi appelées phosphatidylinositol 3-kinases, phosphatidylinositol-3-kinases, PI 3-kinases, PI(3)Ks, PI-3Ks) sont une famille de sérine-théronine kinases impliquée dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. Elles sont regroupées en 3 classes : classe I, II, et III. La classe I est divisée en deux catégories, A et B. Les PI3K de classe IA, sont constituées d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa (p85), pré-associée à une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110) dont il existe 3 isoformes, α , β et δ , d'expression cellulaire différente. Après stimulation d'un récepteur à activité tyrosine kinase transmembranaire (RTK) par son facteur de croissance (ligand), la sous-unité p85 s'associe au récepteur phosphorylé sur une tyrosine. Cette association peut être directe, ou indirecte par l'intermédiaire d'adaptateurs moléculaires de la famille IRS (Insuline Receptor Substrate) ou GAB (Grb2 associated kinase) permettant l'activation de la sous-unité catalytique p110 (figure 8).

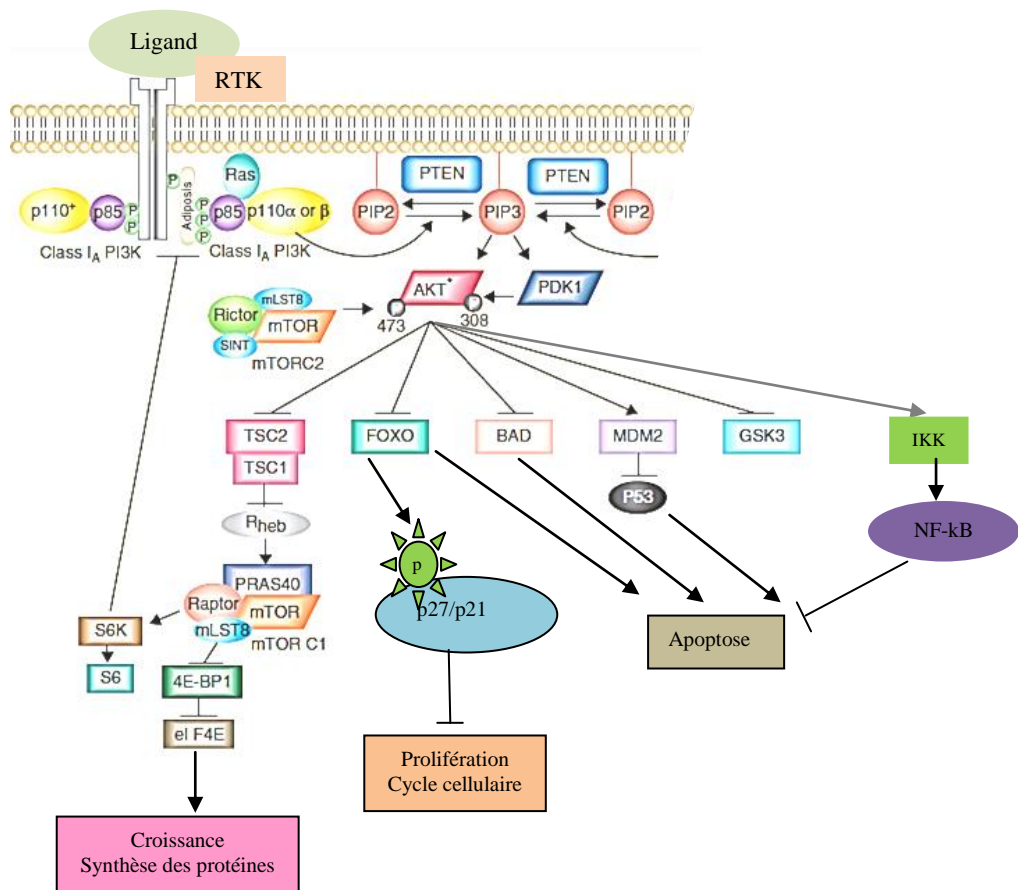


Figure 8.:La voie de signalisation de PI3K de classe IA.D'après (Fasolo et Sessa 2008). Bad : Bcl-2/Bcl-X(L)-antagonist; FOXO: forkhead box class O; GAB: Grb2 associated kinase; GSK3: glycogensynthase kinase-3; IKK: I κ B kinase; IRS: insulinreceptorsubstrate; NF- κ B: Nuclear factor κ B; MDM2: murine double-minute 2 p53-binding protein; PDK1: PIP3 Dependant-Kinase; PIP2: phosphoinositide bis-phosphate; PIP3: phosphoinositide tris-phosphate; PTEN: phosphatase and tensin homologue; p27kip1: cyclin-dependant kinase inhibitor p27; RTK: récepteur tyrosine kinase; TSC2: tuberousscleriscomplex

La sous unité p110 phosphoryle le phosphoinositide bis-phosphate (PIP2) - résidu inositol de localisation sous-membranaire- en phosphoinositide tris-phosphate (PIP3) pour permettre le recrutement à la membrane plasmique des protéines telles PDK1 et la sérine thréonine kinase (*Akt* aussi connue comme Protéine Kinase B PKB), principale cible des PI3K sur la sérine 473. La kinase PDK1 peut alors phosphoryler Akt sur la thr308.

Cependant, pour être pleinement active, Akt doit être phosphorylée sur au moins deux résidus: la thr308 (par PDK1) et la ser473 par le complexe mammalien Target Of Rapamycine 2 (mTORC2)(Tamburini et al. 2008). L'Akta un rôle dans de nombreux processus cellulaires et a des cibles multiples dont cinq majeures:figure8.

1- Les facteurs de transcription de la famille FOXO (ou FKHRL1) : la phosphorylation de ces protéines sur trois sites par Akt induit leur inactivation par transfert du noyau vers le cytoplasme; Akt bloque ainsi la transcription FOXO-dépendante des inhibiteurs du cycle cellulaire p27^{Kip1} et RBL2 et des protéines proapoptotiquesBim et Fas-L(Chapuis et al. 2010).

2- Bad : phosphorylée par Akt, Bad bloque l'interaction avec Bcl-XL, qui peut par conséquent jouer son rôle anti-apoptotique.

3- L'ubiquitine ligase mdm2 : phosphorylée par Akt, elle permet l'inhibition de la protéine p53 par rétention dans le cytoplasme et son envoi vers le protéasome pour être dégradée.

4- Le complexe IKK : qui phosphoryle l'I κ B, inhibiteur de facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa B), ce dernire est donc libéré et activé pour déclencher la transcription des gènes anti-apoptotiques (Chapuis et al. 2010).

5- La protéine TSC2 du complexe TSC1/TSC2 (aussi nommée hamartine/tubérine) : est un inhibiteur de la protéine Ras Homologue enriched in Brain (Rheb) qui est une GTPase capable (sous forme active) d'interagir avec mTOR et d'activer le complexe m-TORC1. Akt inhibe par phosphorylation l'activité de TSC2 ; cela active le complexe mTORC1(Willems et al. 2012).

La voie PI3K/Akt est activée constitutivement dans de nombreux cancers. Différents membres de cette voie peuvent comporter diverses anomalies génétiques acquises: Le récepteur Tyrosine kinase (RTK), AKT. Les deux anomalies les plus fréquentes sont celles de PTEN (Phosphatase and TENsinhomolog) et de la sous-unité catalytique p110 α .

PTEN est un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 10. C'est une phosphatase qui déphosphoryle PIP3. Il s'agit donc d'un antagoniste de la PI3K. Sa fonction peut être limitée par des mutations comme des pertes monoalleliques ou d'autres délétions mais aussi par des évènements épigénétiques ou post-traductionnels. Après le p53, le PTEN est un des gènes les plus fréquemment modifiés en cancérologie (Yuan et Cantley 2008).**Figure.9**

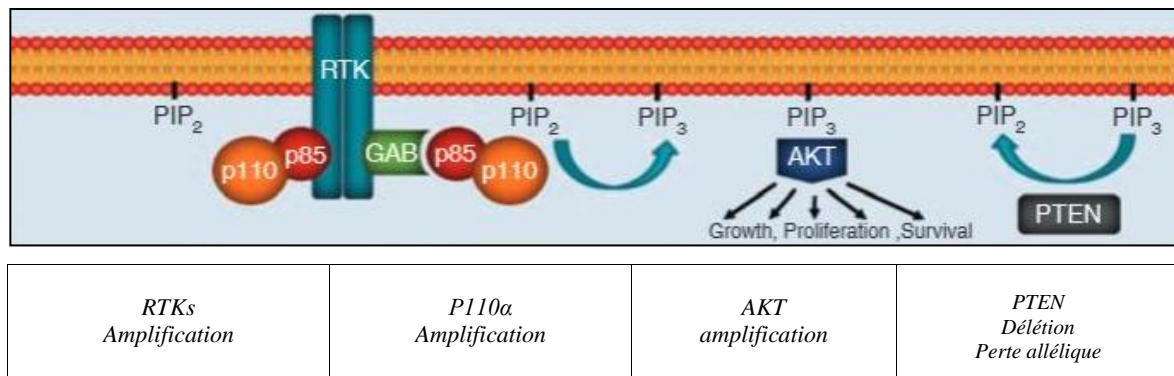


Figure 9: Les membres de la voie PI3K fréquemment mutés.

- mTOR :

La protéine mTOR est une sérine thréonine kinase de 289 kDa, dont le gène est situé en 1p36.2. Elle appartient à la famille PIKK (phosphoinositide kinase-related kinase). C'est une protéine très conservée entre les espèces et d'expression ubiquitaire. Elle s'associe avec différentes protéines pour former deux complexes distincts : mTORC1 et mTORC2.

- Le complexe mTORC1 :

Il intervient dans la synthèse protéique et lipidique et régule aussi l'autophagie. Ce complexe contient la protéine m-TOR qui a un domaine à activité sérine/thréonine kinase à son extrémité C-terminale et donc une forte homologie avec le domaine catalytique des PI3K. L'extrémité N-terminale de mTOR contient le domaine FRB (FKBP12-Rapamycine binding domain) dont l'intégrité est indispensable à l'action de la Rapamycine. Le complexe mTORC1 est caractérisé par l'association de mTOR avec Raptor (Regulatory Associated Protein of mTOR), qui agit en recrutant les substrats de mTOR sur ses domaines TOS (TOR signaling) (Hara et al. 2002). Raptor est une protéine de 150 kDa indispensable pour l'activation de mTOR. Son invalidation chez la souris conduit à une mortalité embryonnaire précoce, diminue la masse cellulaire et la prolifération des blastocytes (Guertin et al. 2006). Raptor pourrait également permettre de stabiliser le complexe mTORC1. Ce complexe a été initialement défini par sa sensibilité à la rapamycine et à ses dérivés, qui, après liaison au FKBP12, bloque l'interaction entre mTOR et Raptor inhibant la fonction de mTORC1 sans modifier son activité catalytique (Oshiro et al. 2004). Le mTORC1 contient aussi la protéine Mammalian Lethal with sec13 protein 8 (mLST8) - également nommée GβL - qui a un rôle moins important que Raptor, ainsi que DEP domain-containing mTOR-interacting protein (DEPTOR) et proline-rich Akt substrate of 40-kDa (PRAS40) qui sont des régulateurs négatifs. Akt phosphorylée permet la phosphorylation de ce dernier, sa dissociation et ensuite l'activation de mTORC1 (Ma et Blenis 2009).

Le mTORC1 est un régulateur important de la synthèse protéique dont l'activité est liée à la présence de facteurs de croissance et à la disponibilité en nutriments. Il est capable de phosphoryler plusieurs substrats dont les plus importants sont les protéines S6K (S6 Kinases). Ces dernières appartiennent à la famille des protéines AGC et elles sont constituées de deux membres : S6K1 et S6K2. La p70S6K est l'isoforme le plus étudié de S6k1, la p85S6K est l'autre isoforme. S6K1 phosphoryle de nombreux autres substrats, intervenant dans la synthèse protéique via la maturation des ARN messagers, intervenant également dans l'initiation et l'élongation de la traduction dite CAP-dépendante ou encore dans la survie cellulaire. Plusieurs de ses substrats (rpS6, eIF4B, eEF2K, BAD, GSK3, CCT β) peuvent également être phosphorylés par RSK un substrat de la voie ERK/MAPK. Cela explique la convergence entre les voies mTOR et ERK/MAPK.

- **4E-BP1-eIF4E**

Le second principal substrat de mTORC1 est le répresseur traductionnel 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1) qui est le plus connu parmi les membres de la famille 4E-BP. C'est une protéine de 13 kDa présente sous forme hypophosphorylée en l'absence d'activation de mTORC1. Le 4E-BP1 constitue avec l'eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) un complexe inactif de pré-initiation de la traduction composé des sous-unités eIF4E, eIF4A et eIF4G. mTORC1 rend ce complexe actif en phosphorylant le 4E-BP1. Il libère donc l'eIF4E pour permettre la formation du complexe eIF4F qui recrute ensuite l'ARNm au ribosome pour initier la traduction (Blagden et Willis 2011). Le taux de eIF4E/4E-BP pourrait déterminer l'efficacité des inhibiteurs de mTORC1 dans les cancers (Alain et al. 2012). **Figure 10.**

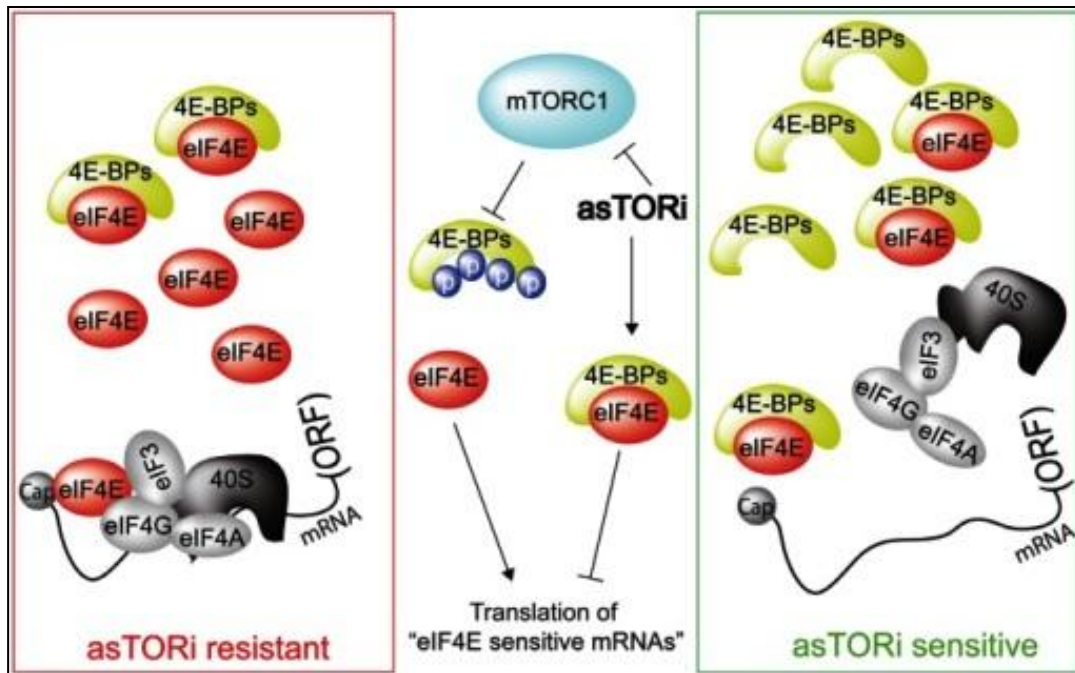


Figure 10: Sensibilité des cellules tumorales à l'inhibition de mTOR par les nouvelles générations des inhibiteurs de mTOR. asTORi : active site mTORinhibitors, ORF : open readingfram. Lorsque le ratio eIF4E/4E-PB est bas, les cellules tumorales sont plus sensibles au asTORi (cadre vert). Quand ce taux est augmenté, les cellules sont résistantes au asTORi, (le cadre rouge) D'après (Alain, Sonenberg, et Topisirovic 2012).

Dans ce sens, il a été récemment démontré que la lignée cellulaire VAL (une lignée de DLBCL) résistante aux inhibiteurs de mTOR. Cette lignée n'exprime pas la 4EBP1, cela pourrait expliquer la résistance (Mallya et al. 2014) et pourrait faire de l'expression de 4EBP1 un biomarqueur de la résistance aux inhibiteurs de la voie PI3K-Akt-mTOR.

- Le complexe m-TORC2 :

Impliqué dans la formation du cytosquelette et la survie cellulaire, le complexe mTORC2 est composé de mTOR, Rictor (rapamycin- insensitive companion of TOR), SIN1 (stress-activated map kinase-interacting protein 1) et mLST8. Il s'associe aussi avec le régulateur négatif DEPTOR et avec PPR5/PROTOR dont la fonction est inconnue. Les mécanismes d'activation du complexe mTORC2 sont peu documentés. Le complexe TSC1/TSC2 semble avoir un effet activateur. Il existe une liaison entre les deux complexes mTOR, le mTORC1 est placé en théorie en amont du mTORC2 aboutissant à son activation **figure 11**. mTORC2 participe aussi à l'activation d'Akt puisqu'il est responsable de sa phosphorylation sur la sérine⁴⁷³. (Müller et al. 2013). **Figure 8**

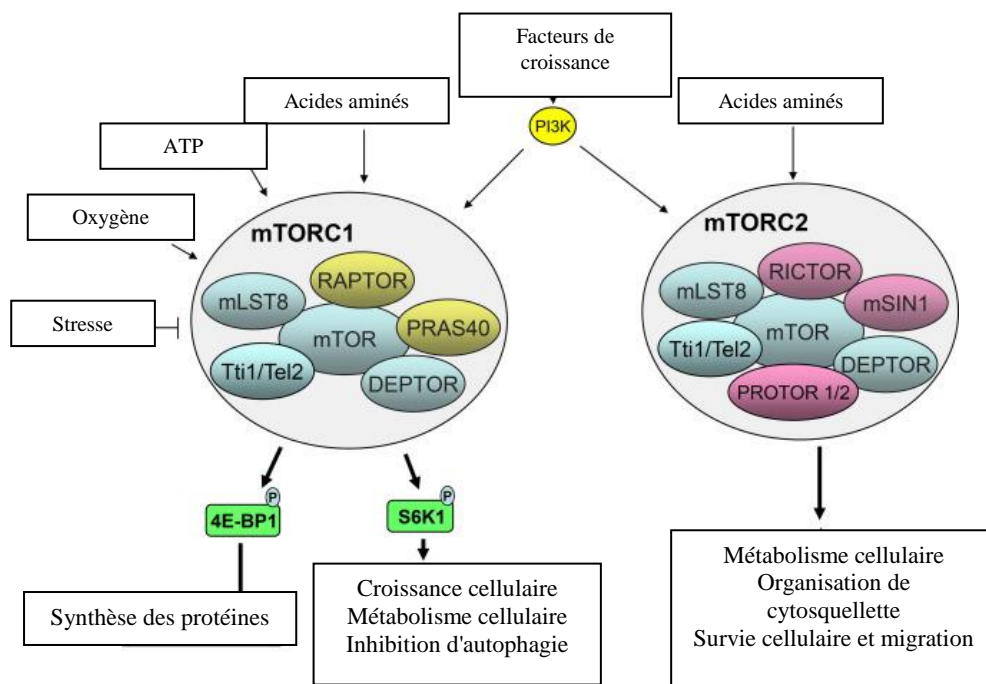


Figure 11 : les complexes mTORC1 et mTORC2. Rôle dans la synthèse des protéines, la survie, la croissance cellulaire, et l'inhibition de l'autophagie. mTORC2 exerce aussi un rôle dans l'organisation de cytosquelette (Vergès et Cariou 2015)

- PI3K -Akt-m TOR dans le lymphome de Manteau :

Il a été démontré que la voie PI3K/Akt-mTOR kinase est activée dans le LCM et contribue à la prolifération et la survie tumorale. Cela a été confirmé par une étude par immunohistochimie dans une population de 30 patients atteints de LCM ainsi que dans des lignées cellulaires (Peponi et al. 2006). **Tableau 2.**

Protéine	n : nombre d'échantillons positifs N : nombre total d'échantillons	Pourcentage d'échantillons positifs (exprimant la protéine)
pAkt ^{ser 473}	n=10 N=30	33%,
p-mTOR ^{ser2448}	n=13, N=21	62%
p-p70S6K	n=22, N=22	100%
p rpS6K	n=5, N=25	25%
p4E-BP	n=13, N=14	93%
peIF-4 ^E	n=16, N=29	55%

Tableau 2 : l'expression des protéines de la voie mTOR dans les échantillons de LCM avant traitement.

Cette même étude a montré que l'inhibition sélective de mTOR par siRNA dans la lignée JEKO induit un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1-S ainsi qu'une augmentation de p21, p27 (protéines inhibitrices de cycle cellulaire) et une diminution de Cycline D1. La voie mTOR peut donc être une excellente cible thérapeutique.

Plus loin dans cette introduction nous allons aborder l'application clinique des inhibiteurs de cette voie dans le LCM.

1.3.5.2. La voie BTK : Bruton's kinase :

En 1952, Ogden Bruton a décrit pour la première fois la X-Linked Agammaglobulinémie (XLA) chez un enfant de 8 ans atteint d'infection respiratoire sévère et d'une absence de gammaglobuline (Buckley 1998). Il a été démontré plus tard que l'agammaglobulinemia est aussi associée à un manque de lymphocytes B dans le sang périphérique. Les patients atteints ont moins de 2% de lymphocytes B circulants (Ponader et Burger 2014).

La mutation du gène Bruton's tyrosine kinase (Btk) aussi connue sous le nom d'Agammaglobulinemia Tyrosine Kinase (ATK) a été identifiée 40 ans plus tard en 1993 comme la mutation principale de cette maladie. Le rôle primordial du Btk dans le développement et la maturation des lymphocytes B est donc confirmé (Thomas et al. 1993).

Btk (Bruton Tyrosine kinase) est un gène qui code pour une protéine tyrosine kinase non récepteur, cytoplasmique, de la famille des tyrosines kinases (Tec) (Castillo, Treon, et Davids 2016). Les protéines de la famille Tec sont exprimées essentiellement par les cellules hématopoïétiques et jouent globalement un rôle dans les voies de signalisation intracellulaire mais aussi dans la régulation du cytosquelette (Finkelstein et Schwartzberg 2004).

Le Btk transmet et amplifie les signalisations de plusieurs molécules de surface comme les récepteurs des cytokines et des facteurs de croissance, les récepteurs des chémokines, les récepteurs spécifiques à l'antigène (BCR) et les intégrines (Burger et Montserrat 2013).

Dans les lymphocytes B et sous sa forme inactive non phosphorylé, Btk se localise dans le cytoplasme. L'activation du récepteur (BCR) par un antigène déclenche une phosphorylation des protéines kinases cytoplasmiques comme Lyn (une protéine de la famille Src) et Syk (Spleen Tyrosine kinase : une protéine de la famille Syk) conduisant à la phosphorylation de Btk. L'activation de cette dernière conduit à sa délocalisation au niveau membranaire par des mécanismes peu connus. Par la suite, d'autres protéines en aval sont phosphorylées et activées pour déclencher les voies de signalisation telles que les voies MAPk, ERK, JNK, et notamment les voies PI3K et NF κ B (Lindvall et Islam 2002). Le rôle de la signalisation Btk est alors indispensable dans la prolifération, la survie, la différenciation et aussi l'apoptose (Ponader et Burger 2014) **figure 12.**

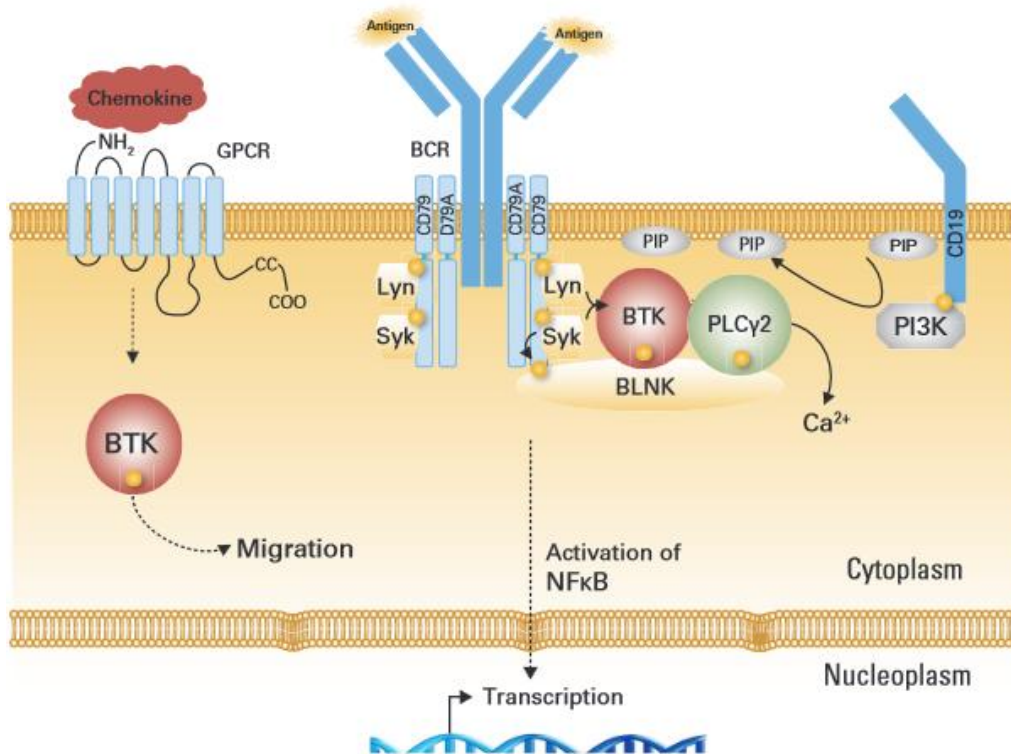


Figure 12 : la voie Btk impliquée dans la transcription, la survie cellulaire.

-Rôle pathologique de Btk :

Dans un modèle de souris transgénique, il est démontré que la surexpression de Btk dans les cellules B entraîne la formation spontanée de centres germinatifs, l'augmentation du nombre de cellules plasmocytaires, la production d'auto-anticorps antinucléaires, conduisant à un "LED like" (lupus érythémateux disséminé (LED) affectant les reins, les poumons et les glandes salivaires. L'Ibrutinib (un inhibiteur de Btk) a diminué la prolifération des cellules B dans les centres germinatifs des cellules plasmocytaires. Il a normalisé l'activation et la différenciation des cellules B (Kil et al. 2012). Bien que ces changements pathologiques soient absents chez les souris transgéniques qui surexpriment un Btk mutant inactif. Il est aussi rapporté que le Btk joue un rôle dans le métabolisme osseux en transmettant dans les ostéoclastes des signaux en aval du récepteur activateur du NF-κB et ITAM. Les souris délétées en Btk et Tec montrent une sévère ostéoporose par un défaut de résorption osseuse (Shinohara et al. 2008).

- La voie Btk dans les hémopathies malignes et dans le LCM :

En plus de son rôle dans la lymphopoïèse normale, Btk joue un rôle dans la signalisation des cellules B malignes. Dans le type activé du lymphome B à grandes cellules ABC (DLBCL), l'hyperactivation chronique de la signalisation BCR peut être induite par des mutations activatrices comme par exemple les mutations des sous-unités du récepteur BCR (CD79a et CD79b) mais peut aussi être mutation-indépendante (Wilson et al. 2015). Cette signalisation va activer d'une manière constitutive plusieurs voies de signalisation en aval dont principalement la voie NF- κ B (Davis et al. 2010). Dans le lymphome de Burkitt (LB) il est décrit qu'une signalisation excessive (tonic signaling) de récepteur B implique la voie PI3K (Schmitz et al. 2012). Dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) c'est une activation induite par un antigène qui semble être impliquée. Dans d'autres lymphomes, l'activation de BCR est déclenchée par la liaison à des auto-antigènes ou même autres antigènes de l'environnement (Binder et al. 2010).

Cinar et al ont confirmé la surexpression de Btk dans le LCM (Cinar et al. 2013). Cette étude a comparé par immunohistochimie l'expression de Btk dans les échantillons des patients atteints de LCM et d'autres tissus lymphoïdes bénins. Une expression modérée à forte du Btk est observée dans toutes les zones de follicule lymphoïde mais aussi dans tous les échantillons de LCM n = (19/19). Les cellules de ces échantillons ont une forte expression cytoplasmique diffuse et membranaire de Btk (**figure ; 12 C-E**). En revanche, le Btk est fortement exprimé par les lymphocytes de la zone du manteau des tissus lymphoïdes réactifs bénins (**figure.13 ; A et B**). Une plus faible expression est donc observée dans les cellules du centre germinatif avec de nombreuses cellules individuelles dispersées dans les domaines inter folliculaires.

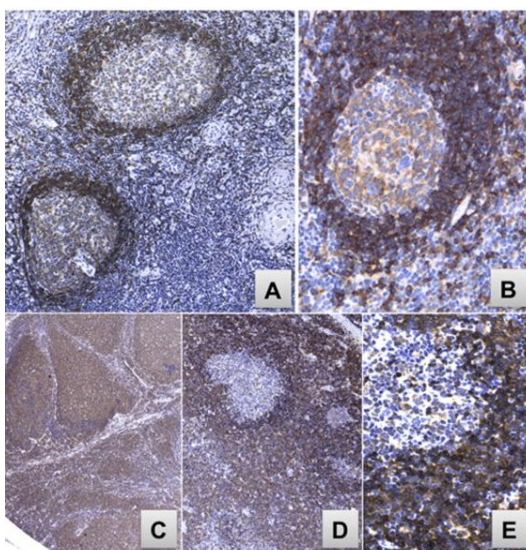


Figure 13: Expression de BTK dans le LCM. Etude immunohistochimie.

A- B : l'expression de BTK dans un tissu lymphoïde bénin.

C-E : forte expression diffuse cytoplasmique et membranaire de BTK dans un ganglion atteint de LCM D'après (Cinar et al. 2013).

Dans une autre étude, une analyse phospho-protéomique dans les lignées de LCM ainsi que dans des cellules primaires a été réalisée par une technique de Phosphoscan. Cette dernière peut montrer le profil de phosphorylation des peptides, en particulier la phosphorylation sur les Tyrosines (Rikova et al. 2007). Elle montre une activation des voies de signalisation en aval de cette phosphorylation. Cette étude a donc confirmé que les protéines BTK et SYK sont hyperphosphorylées dans les lignées (JEKO, Granta-519, REC-1). Ces données ont été confirmées par des Western Blot à partir de lysats de cellules des patients. Syk a été trouvée phosphorylée dans 83% des cas (5/6 cas), tandis que Lyn dans 100% des cas (6/6 cas) (Pighi et al. 2011). Ces protéines jouent un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire. Elles peuvent être alors des cibles thérapeutiques. Ainsi, plusieurs molécules ciblant cette voie ont été développées, notamment l'Ibrutinib qui a démontré des résultats intéressants dans le traitement des maladies lymphoïdes B. Nous allons détailler ce traitement dans le LCM plus loin dans cette synthèse.

1.3.5.3. L'Interaction des deux voies de signalisation : BTK et AKT

L'interaction entre les deux voies est loin d'être simple, elle a été démontrée pour la première fois en 2002. L'activation de PI3k recrute le Btk à la membrane via une association de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) et du domaine PH de Btk comme le montre la figure.14.

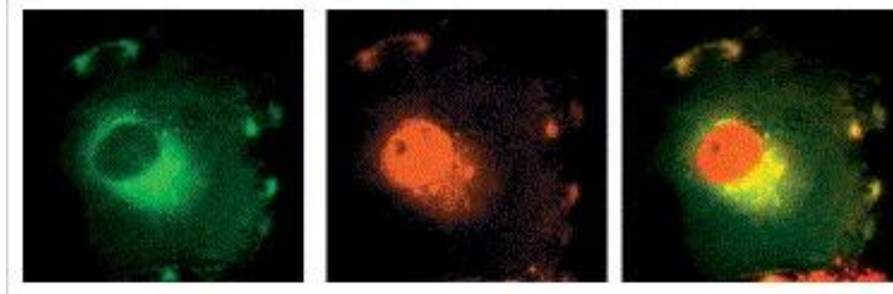


Figure.14 : Co-localisation membranaire de Btk et Akt : les cellules COS-7 transfectées par Btk-GFP (vert) et Akt WT (orange)Lindvall et Islam 2002

Plus important encore, la phosphorylation de Btk a été démontrée partiellement dépendante de celle de PI3K(Lindvall et Islam 2002).

L'interaction entre les deux voies de signalisation a un impact thérapeutique. Plusieurs hypothèses ont proposé de renforcer l'inhibition de la voie Btk par un inhibiteur de PI3K lorsqu'il y a résistance aux inhibiteurs de Btk.

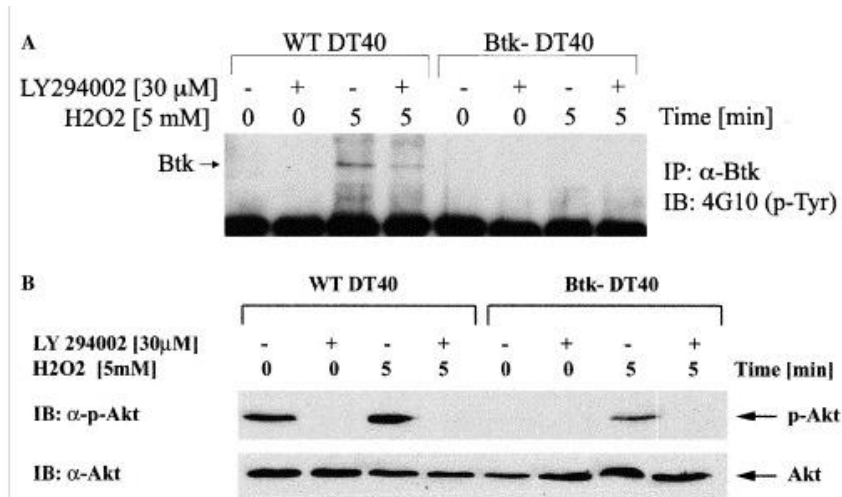


Figure.15 : La phosphorylation de Btk est partiellement PI3K dépendante : les cellules WTDT40 et Btk-DT40 sont d'abord traitées par 30 μ M de LY294002 (un inhibiteur de PI3K) puis stimulées par H2O2 pendant le temps indiqué. Les lysats cellulaires totaux sont immunoprécipités pour être analysé en western blot. D'après Lindvall et al.

1.4. Traitement du LCM :

La décision thérapeutique dépend de plusieurs arguments cliniques et biologiques. Les formes agressives et tumorales nécessitent une prise en charge rapide et un traitement de type immuno-polychimiothérapie. Comme pour les autres LNH, l'âge est un critère majeur dans le choix du traitement.

1.4.1. Traitement de Sujets jeunes :

1.4.1.1 Anti-CD20

Dans les années 2000, le traitement d'induction reposait sur les anthracyclines. La combinaison thérapeutique type CHOP: Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone) a abouti à des taux de rémissions complètes (RC) autour de 30%, et de réponse globale (RG) de l'ordre de 70 à 80% (Barista, Romaguera, et Cabanillas 2001). Différentes études ont montré le bénéfice de l'immunothérapie par Rituximab (anti CD20) en association avec la chimiothérapie. Le Rituximab a amélioré, d'une part les taux de RG (Réponse Globale) et RC(94% avec du R-CHOP versus 74% avec CHOP seul et 34% avec du R-CHOP versus 7% avec du CHOP seul respectivement),et d'autre part la survie sans progression (SSP) (HR=0.61, p=0.0096, 28 mois avec du R-CHOP versus 14 mois avec du CHOP seul)(Lenz et al. 2005)(Schulz et al. 2007).

1.4.1.2. L'Intensification thérapeutique :

L'intensification thérapeutiquesuivieparune autogreffe de cellules souches hématopoïétiques a été associée à une amélioration de la survie sans rechute. Cela a été démontré en 2005 par le groupe européen (EMCL network) dans une étude de phase III comparant une consolidation classique avec 2 cures de CHOP puis un traitement par interféron à une consolidation par BEAM suivie par une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (p=0.01) (Dreyling et al. 2005). Le groupe de recherche Nordique avec son étude MCL2 a actualisé ces données et a démontré qu'une immunochimiothérapie suivie par une autogreffe en première ligne est associée à une survie globale de plus de 10 ans et une médiane de survie sans progression de 7,4 ans (Geisler et al. 2012)(Geisler et al. 2008).

1.4.1.3 Impact de l'Aracytine à forte dose :

L'Aracytine (Ara-c) (CytosineArabinoside) est un agent analogue de la Pyrimidine permettant l'arrêt de la synthèse d'ADN et l'apoptose de la cellule tumorale. Il a acquis une place centrale dans le traitement de ces lymphomes (Dreyling et al. 2013).

L'Ara-cest une pro-drogue qui doit être transporté dans la cellule et transformé en une molécule active par phosphorylation(Klanova et al. 2014)(Lamba 2009). Lorsqu'il est administré en dose standard, l'Ara-cest transporté dans la cellule via des transporteurs spécifiques,principalementl'intermédiaire hENT1/SLC29A1(Clarke et al. 2006). Cependantl'administration de fortes doses permet la diffusion à travers la membrane plasmatique indépendamment des transporteurs spécifiques(Capizzi et al. 1991).Il subit ensuite plusieurs étapes enzymatiques médiés notamment par le deoxycytidine (CDK) pour le transformer à une forme active transportée dans le noyau. Il inhibe la synthèse de l'ADN en prenant la place des nucléosides naturels bloquant alors la division cellulaire conduisant à une apoptose (**figure 16**).

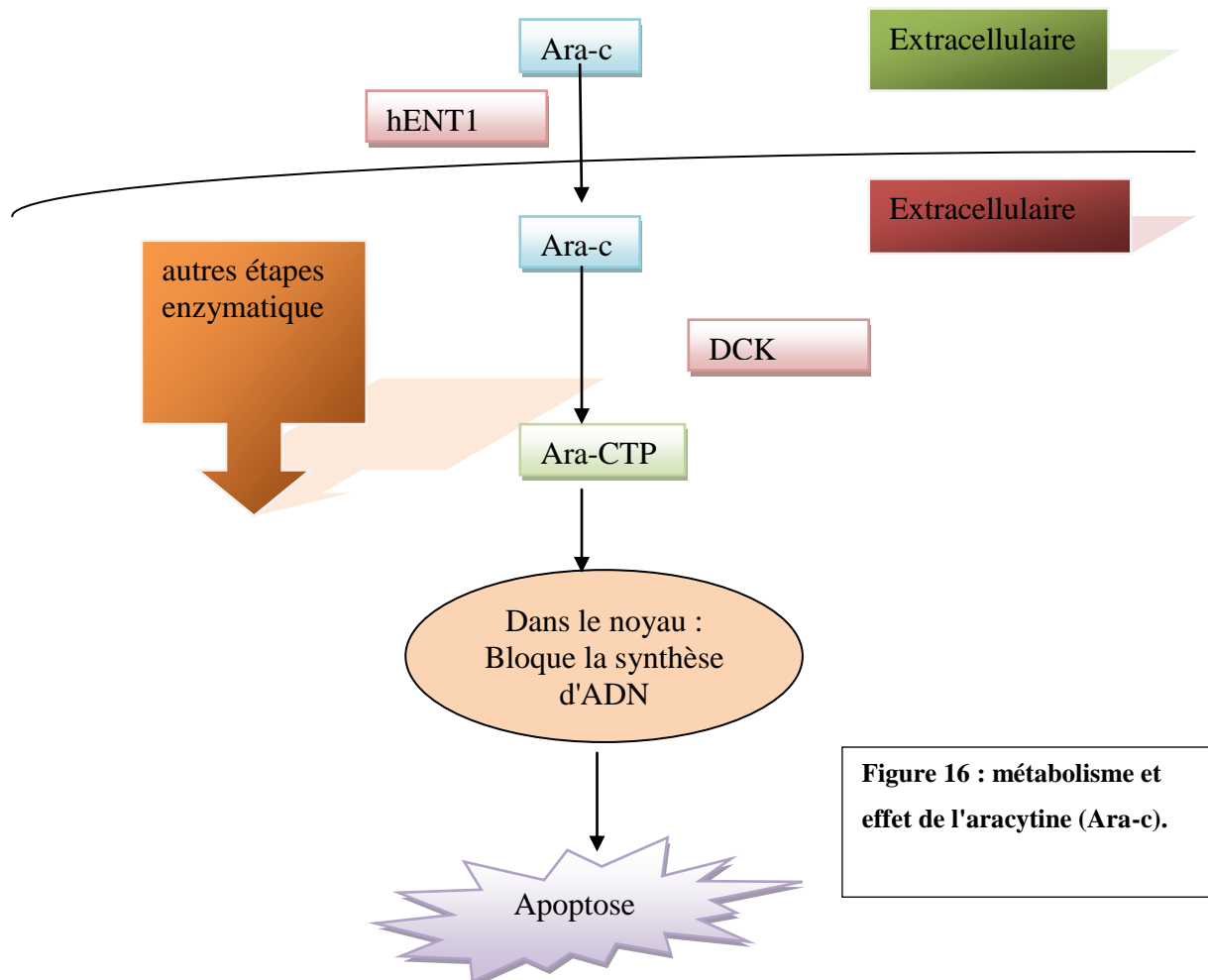


Figure 16 : métabolisme et effet de l'aracytine (Ara-c).

Plusieurs études ont démontré que l'utilisation de fortes doses d'Ara-c dans le traitement d'induction, pourrait améliorer le taux de réponse. Un essai de phase II, mené par le groupe d'étude des lymphomes de l'adulte (LYSA) utilisant comme traitement d'induction une alternance R-CHOP/R-DHAP, suivie d'une autogreffe, a permis d'obtenir 95% de réponse globale et 75% de survie à 5 ans (Delarue et al. 2013). Un essai mené par l'équipe du M.D Anderson avec une induction par hyperCVAD/MA (Cyclophosphamide en dose fractionnée, Doxorubicine, Vincristine, Dexaméthasone ; en alternance avec de fortes doses de Méthotrexate et d'Ara-c) a permis d'observer 40% de RC et 97% de réponse globale (Romaguera et al. 2005). Ces résultats ont été confirmés dans un essai de phase III mené au sein du réseau EMCL. Cette étude a comparé R-CHOP à une alternance R-CHOP/R-DHAP suivie d'une autogreffe. Les résultats sont en faveur de l'alternance avec plus de rémissions complète suivant l'autogreffe, mais aussi une amélioration de la survie sans rechute. (54% de rémission complète versus 40% pour le bras contenant R-CHOP seul ($p=0.0003$)). La médiane de survie sans rechute après l'autogreffe était de 46 mois dans le bras R-CHOP et de 88 mois dans le bras utilisant l'alternance avec R-DHAP, $p=0.0382$, HR=0.68). Plus important, et après un suivi de 51 mois, une différence de survie a été observée entre les deux bras de traitement avec une survie plus longue dans le bras de l'alternance (non atteinte versus 82 mois, $p=0.045$). La toxicité hématologique était en revanche plus marquée avec l'Ara-c à forte dose (Dreyling et al. 2013) (Harel et al. 2011) (Hermine et al. 2016). Le groupe Nordique a également démontré une supériorité d'un traitement d'induction basé sur du R-CHOP renforcé (ou R-maxi-CHOP) associé à de fortes doses d'araC et suivi d'une autogreffe (Geisler et al. 2008).

Le groupe Européen recommande donc une induction contenant de l'Ara-c à forte dose suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques comme traitement de référence chez les sujets de moins de 65 ans.

Cependant l'Ara-c à forte dose a été critiqué. D'une part, car il s'agit d'un traitement lourd associé à des effets secondaires non négligeables tels que la toxicité hématologique et neurologique. Cette toxicité ne permet pas d'utiliser ce protocole thérapeutique chez tous les patients. Seulement 25 % des patients atteints de LCM peuvent profiter de ce traitement à forte dose d'aracytine (Martin 2015). Ce sont des patients âgés de moins de 65 ans et en bon état général selon les critères de ECOG performance status

Enfin, l'immunochimiothérapie par l'Ara-c à forte dose suivie par une autogreffe n'a pas un effet favorable chez les patients atteints de LCM présentant des délétions de CDKN2A (p16) et de TP53. Ces patients ont un pronostic extrêmement défavorable et sont plutôt des candidats pour des stratégies thérapeutiques alternatives (Delfau-Larue et al. 2015).

1.4.1.4 . Traitement de la rechute

Malgré l'amélioration du pronostic avec l'introduction de ces nouvelles stratégies thérapeutiques, il n'est pas possible de guérir le LCM qui rechute systématiquement. Le traitement des rechutes reste un challenge thérapeutique. De nombreux agents thérapeutiques ont néanmoins démontré une efficacité en deuxième ligne.

Le Bortezomib est un inhibiteur du protéasome 26S. Ce dernier permet la dégradation des protéines ubiquitinilées et est présent en plus grande quantité dans les cellules lymphomateuses. *In vitro*, le Bortezomib agit en inhibant la voie NFκB, en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et l'apoptose, par une diminution de la phosphorylation d'Akt et de l'autophosphorylation de mTOR. Cette action sur la voie Akt/mTOR est médiée, entre autres, par la déphosphorylation du Facteur Eukaryote d'Initiation de la traduction 4E (eIF4E) (Qu et al. 2015). Le Bortezomib a fait la preuve de son efficacité en monothérapie (RG = 3%) et lorsqu'il est associé à une immunochimiothérapie par du Rituximab et du Bendamustine en rechute. Il a ainsi reçu l'autorisation de mise sur le marché en rechute d'un LCM aux Etats-Unis après l'étude de Fisher *et al* en 2006 (Fisher et al. 2006) (Fugmann 2010). En 2015, cette molécule a également eu l'autorisation de la FDA en première ligne de traitement des patients atteints de LCM associé au Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine et Prednison. VcR-CAP (Raedler 2015).

La Bendamustine est un agent initialement développé en Allemagne de l'Est il y a plus de 40 ans. Sa structure chimique permet un mécanisme d'action double comme alkylant et analogue des purines. L'efficacité de cette molécule a été démontrée dans des essais de phase II mais également de phase III associant la Bendamustine au Rituximab et à d'autres chimiothérapies chez des patients réfractaires ou en rechute (Czuczman et al. 2015). Ces différents essais ont abouti à une AMM de la bendamustine pour les lymphomes malins indolents résistants ou en rechute (Rummel et al. 2016).

Les agents immunomodulateurs (IMiD), avec le Lenalidomide ou la Thalidomide ont également montré leur efficacité en rattrapage de LCM (Habermann et al. 2009). Les résultats de l'étude MCL-002 (SPRINT) ont été présentés à l'EHA 2015. C'est une étude de phase II dans les LCMs réfractaires ou récidivants et non éligibles au traitement intensif. Celle-ci a démontré la supériorité du Lenalidomide en monothérapie comparé au traitement choisi par l'investigateur (Trněný et al. 2016). Le mécanisme d'action exact est complexe, et semble varier d'une pathologie à l'autre.

Entre autres, ils entraînent une inhibition de multiples voies de signalisation cellulaire (NFκB, STAT3, MAPkinase (mitogenactivatedprotein kinase), Akt), et exercent également leur effet à travers une modulation du système immunitaire (en stimulant la réponse anti tumorale *via* les lymphocytes NK/T) (Camicia, Winkler, et Hassa 2015).

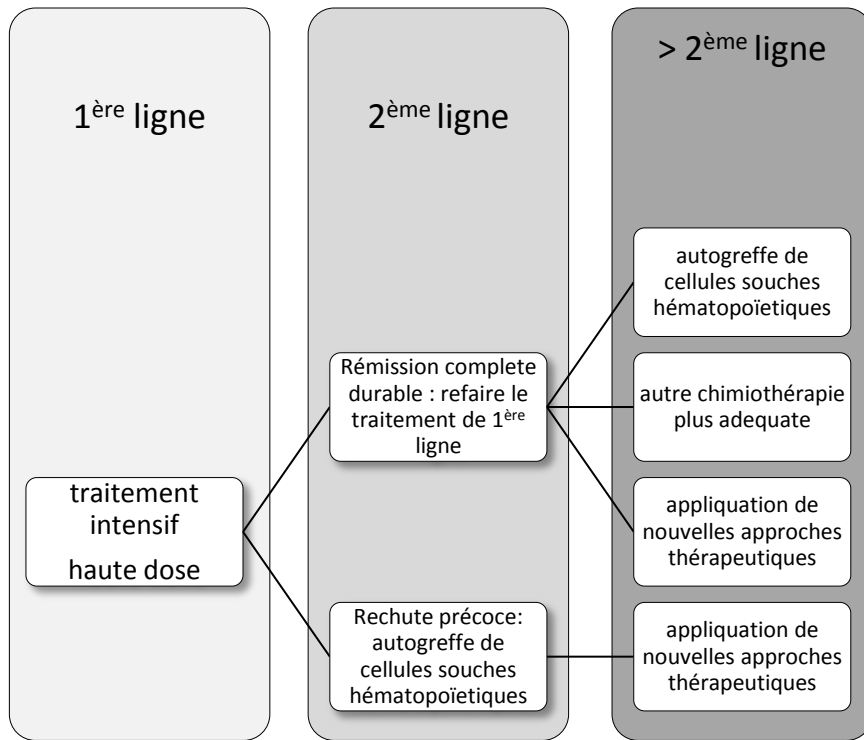
Une des autres voies fréquemment altérées dans le LCM est la modulation épigénétique de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur ou d'oncogènes. Les cellules tumorales présentent une activité déacétylase augmentée. Une inhibition de la déacétylation des histones par un inhibiteur d'histone déacétylase (iHDAC) pourrait restaurer un profil d'expression normale. Les iHDAC comme le Vorinostat ou le Panobinostat présentent des résultats précoces encourageants dans le LCM en rechute (taux de réponse de l'ordre de 30%) mais ceci n'a toujours pas été confirmé en essai de phase II (Kirschbaum et al. 2011).

Etant donnée la complexité de la physiopathologie du LCM et la variété des voies de signalisation impliquées, de nouvelles approches thérapeutiques complémentaires ciblant d'autres anomalies décrites ont été développées tout au long de ces dernières années. Ici nous allons détailler les inhibiteurs de la voie PI3K-Akt-mTOR et les inhibiteurs de Btk.

1.4.2. Traitement de Sujets âgés :

Chez ces sujets fragiles, la tolérance au traitement est une question primordiale. Lors d'un essai Européen de phase III randomisé incluant des sujets de plus de 60 ans, le R-CHOP a montré une supériorité comme traitement de première ligne par rapport au schéma R-FC (Fludarabine + cyclophosphamide) avec une différence significative en terme de survie (survie à 4 ans de 62% versus 47%, $p=0.005$) ainsi qu'un profil de toxicité en faveur du traitement par R-CHOP (Kluin-Nelemans et al. 2012).

L'efficacité démontrée de Cytarabine à forte dose incluse dans le RDHAP chez les sujets jeunes encourage le groupe Européen à l'utiliser lors de futurs essais chez les sujets âgés, avec un schéma adapté et avec de plus faibles doses de cytarabine aboutissant à une toxicité plus acceptable (Dreyling et al. 2013). Le Rituximab a été associé au Cytarabine et la Bendamustine (R-BAC) dans une étude de phase II, chez des patients âgés de plus de 65 ans ou à des patients réfractaires non éligibles à l'autogreffe. Cette étude a démontré une bonne efficacité de cette association mais une toxicité hématologique importante notamment chez les sujets âgés (Visco et al. 2013). Pour diminuer cette toxicité, un schéma adapté à l'âge avec des doses réduites de cytarabine à 500mg est en cours d'évaluation (R-BAC500) (« Rituximab, bendamustine, and cytarabine (RBAC500) as induction therapy in elderly patients with mantle cell lymphoma: a phase II study | New Evidence » 2016



b)

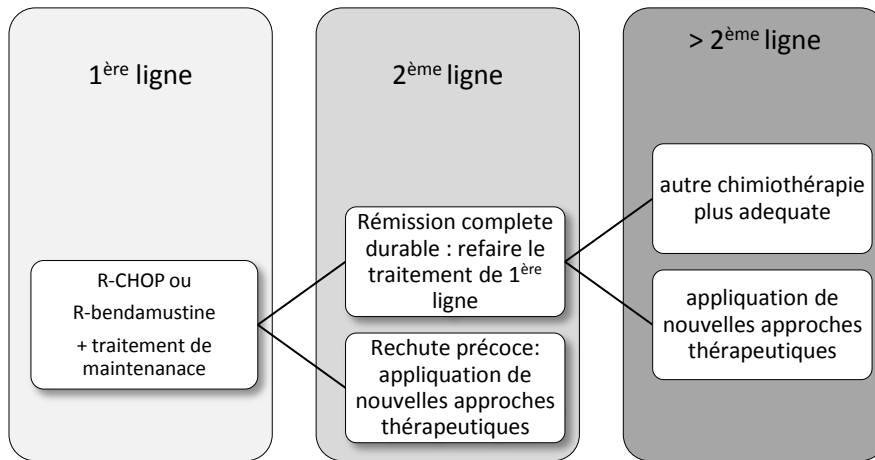


Figure 17 : schéma global de l'approche thérapeutique de LCM, d'après (Kirschey, Wagner, et Hess 2012). a) chez les sujet jeunes. b) chez les sujets âgés.

1.4.3. Nouvelles thérapeutiques ciblées

1.4.3.1. Les inhibiteurs de la voie PI3K–AKT–mTOR:

1.4.3.1.1. Les inhibiteurs de 1ère génération, inhibiteur de mTORC1 :

- **Temsirolimus :**

La Rapamycin (AY-22,989) a été identifiée il y a 40 ans comme le premier inhibiteur de mTOR (Sehgal, Baker, et Vézina 1975). Aussi connue comme Sirolimus, ce macrolide a des effets antiprolifératifs qui ont conduit à l'utiliser comme un immunosuppresseur (Morelon et al. 2001). Rapamycine se fixe d'une manière réversible sur le FKBP12 (FK506-binding protein). Ce complexe inhibe l'activité de mTORC1. Dans les cellules B malignes, le sirolimus peut provoquer un arrêt du cycle cellulaire, réduire la prolifération et inhiber la croissance cellulaire *in vitro* ou retarder la progression tumorale dans des modèles animaux (Sin et al. 2007)(Wanner et al. 2006). Trois Rapalogues (Everolimus, Ridaferolimus et Temsirolimus) ont été développés plus récemment. Plus stables que le sirolimus, ils ont donné des effets anticancéreux dans de nombreuses études cliniques. Le temsirolimus (CCI-779, Toricel®) est utilisé dans le LCM. Contrairement à la Rapamycine, c'est une molécule plus stable et hydrosoluble

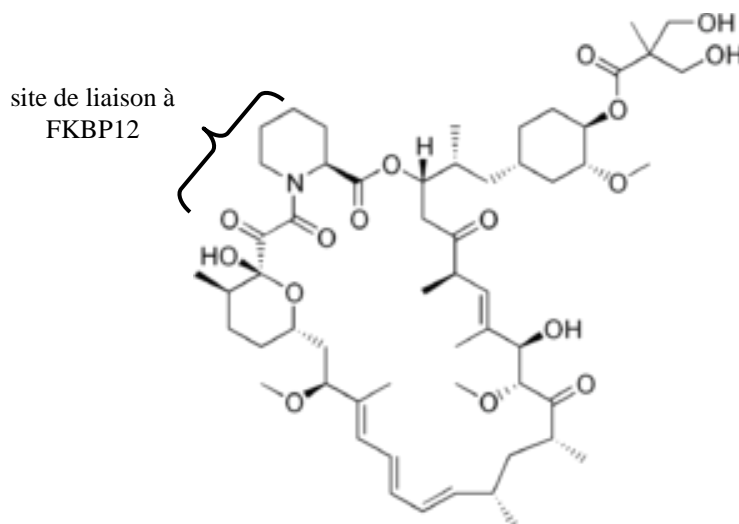


Figure 18 : structure de temsirolimus. D'après (Kirschey, Wagner, et Hess 2012)

Dans de nombreuses études cliniques, le temsirolimus a montré une certaine efficacité similaire à un traitement des LCMs en rechute ou réfractaires.

En monothérapie, les résultats restent quand même modérés. Hess et al ont mené une étude de phase III pour comparer le temsirolimus au choix de l'investigateur. Le temsirolimus à la dose de 175 mg une fois par semaine pour 3 semaines suivi par 75mg par semaine a abouti à 22% de réponse globale avec une survie sans progression à 4,8 mois et une survie globale à 12,8 mois (Hess et al. 2009). Suite à cette étude, le temsirolimus a été approuvé comme un traitement de rechute de LCM. Une autre étude a plus récemment évalué l'effet thérapeutique de temsirolimus comparé au choix de l'investigateur, mais dans trois groupes différents des patients selon le score pronostic MIPI simplifié. Cette étude a conclu que le temsirolimus a significativement prolongé la survie globale (18 mois pour le groupe de temsirolimus vs 10,5 mois pour le group choix de l'investigateur) mais seulement dans le groupe de low risk. Par contre, les patients classés initialement dans le MIPI high risk n'ont pas eu un bénéfice de temsirolimus (Hess et al. 2015).

Plusieurs études *in vitro*, *in vivo* et même des essais thérapeutiques ont combiné le temsirolimus aux chimiothérapies conventionnelles. Ces études ont démontré un effet additif de la combinaison. Par exemple, le Rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, induit une apoptose plus importante lorsqu'il est utilisé avec le temsirolimus. En effet, le Rituximab semble pouvoir inhiber la voie de signalisation ERK1/2 (Extracellular Signal - regulated kinase), ce qui explique son interaction avec la voie Akt/mTOR et comme conséquence son effet additif avec le temsirolimus (Jazirehi et al. 2004). Plus récemment, une étude clinique de phase II qui a combiné le Rituximab au temsirolimus a abouti à un taux de réponse globale de 59% et 13% de rémission complète (Ansell et al. 2011).

- Mécanismes de résistance au temsirolimus :

I - Le rétrocontrôle négatif de mTORC1 sur la voie PI3k/AKT : rpS6K1, un des substrats de mTORC1, lorsqu'il est phosphorylé, inhibe l'Insuline receptor substrate (IRS1) qui est une protéine adaptatrice nécessaire à l'activation de la voie PI3K en aval du récepteur membranaire. IRS1 phosphorylé ne se fixe plus sur la PI3K, ce qui permet de la dégrader par le protéasome (Tamburini et al. 2008). Le mTORC1 phosphorylé et hyperactivé exerce donc un contrôle négatif sur la PI3K et Akt. L'inhibition de mTORC1 peut bloquer cet effet de rpS6K et donc active davantage la signalisation PI3K/Akt. Cela représente un mécanisme de résistance.

II - Interaction mTORC1 et mTORC2: Ce dernier n'est normalement pas inhibé par la rapamycine ou ses dérivés. Le complexe FKBP12-rapamycine se fixe seulement sur le mTORC1 (Sarbasov et al. 2004). Le mTORC2 non inhibé demeure impliqué dans la régulation de cytosquelette et la survie cellulaire. Il est décrit que les molécules mTOR (nouvellement synthétisées) peuvent également être libres et indépendantes des complexes mTORC1/2.

Toutefois, le complexe FKBP12-rapamycine se fixe aussi sur ces mTORs libres intracellulaires. Il a été montré dans des lignées cellulaires que l'exposition prolongée à la Rapamycine peut aussi induire une inhibition de mTORC2. Le mécanisme de cet effet n'est pas bien connu mais cette longue exposition pourrait associer le FKBP12-Rapamycine à une large partie de molécule de mTOR libre (Fasolo et Sessa 2011)(Sarbasov et al. 2006). Il est alors nécessaire d'avoir les bonnes conditions de temps d'exposition pour que la rapamycine puisse inhiber le mTORC2 et donc l'Akt.

III- La rapamycine n'a pas un effet sur la 4E-BP1 impliquée dans la synthèse protéique: La rapamycine cible la phosphorylation de mTORC1 et son substrat S6 ribosomale mais pas la 4E-BP, protéine inhibitrice du facteur eIF4E. La phosphorylation de 4E-BP entraîne sa dissociation d'eIF4E qui peut aller s'associer à eIF4G afin de promouvoir la lecture de l'ARN messager (ARNm)(Fingar et al. 2004). Cela entraîne la traduction de plusieurs oncogènes tels que MYC, VEGFA et cycline D1 (Rosenwald et al. 1995)(Eyre et al. 2014).

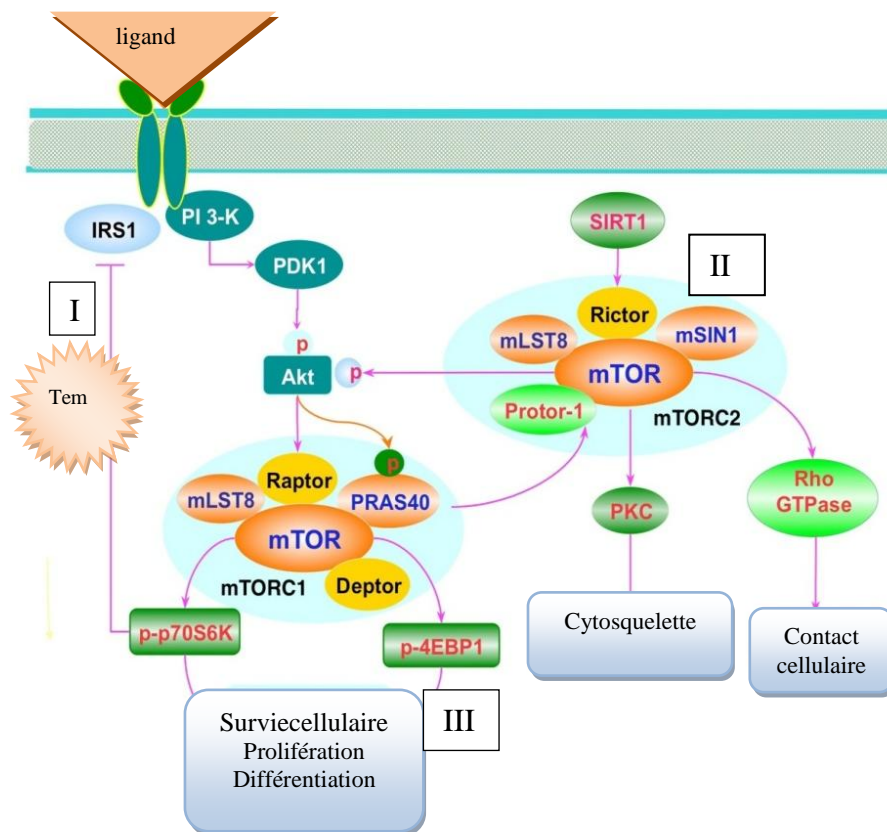


Figure 19: mécanismes de résistance à la Rapamycine (temsirolimus). I : le rétrocontrôle négatif de mTORC1 sur la voie PI3k/AKT, II : mTORC2 non inhibé. III : p4EBP non inhibée

IV - L'interaction avec d'autres voies de signalisation : l'inhibition de la voie m-TOR peut aussi conduire à l'activation de la voie MEK/ERK par l'intermédiaire de l'axe S6K1/PI3K/Ras (Carracedo et Pandolfi 2008). Cette voie joue un rôle compensateur car elle aussi est impliquée dans la

prolifération, la survie cellulaire ainsi que l'angiogenèse et la différenciation. Son rôle a été démontré dans l'oncogenèse du lymphome (Ogasawara, Yasuyama, et Kawauchi 2003). L'interaction entre deux voies de signalisation peut être en effet à l'origine de résistance lors de l'application d'un traitement ciblé.

La Rapamycine est connue pour ne pas avoir un effet sur le cycle cellulaire dans les cellules de LCM. Une seule étude *In vitro*, dans les lignées cellulaires Granta et NCEB, démontre que la Rapamycine induit un arrêt de cycle cellulaire à la phase G0/G1, mais n'a pas d'effet sur l'expression de CyclineD1 ou sur les protéines de cycle cellulaire p27. Il n'a également pas induit une apoptose significative (Hipp et al. 2005). L'effet de la rapamycine est donc cytostatique et n'est pas cytotoxique (Müller et al. 2013).

Dans l'ensemble, les résultats des études *in vivo*, *in vitro* et les essais cliniques suggèrent une efficacité limitée du Temsirolimus dans le LCM. Plusieurs études sont toujours en cours, notamment dans le cadre de LCM réfractaire récidivant. Toutefois, le développement de nouveaux inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR a gagné beaucoup d'intérêt ces dernières années.

1.4.3.1.2. Les inhibiteurs de 2ème génération:

Les inhibiteurs de la voie mTOR de deuxième génération sont définis par le mécanisme d'action. Ils se fixent d'une manière compétitive et réversible au niveau du site catalytique de la kinase et permettent de bloquer son activité enzymatique. Ces composés se divisent en deux groupes:

- ✓ Les inhibiteurs de mTOR dites TORKinhibes : ils inhibent le mTOR au sein des deux complexes mTORC1 et mTORC2. Exemple : AZD8055, OSI-027. (García-Martínez et al., 2009) (Chresta et al., 2010).
- ✓ Les Dual kinases inhibiteurs: ils ciblent le PI3K ainsi que le mTOR car les domaines de kinases p110 α et β (sous unité de PI3K) et ceux de mTOR ont la même structure. Exemples : XL765, PKI-587, NVPBEZ235, BGT226. Les dual inhibitors inhibent complètement les kinases PI3K, AKT et mTORC1 et 2. Ils sont potentiellement plus efficaces que la Rapamycine. (Maira et al. 2008).

Ces inhibiteurs ont donné des résultats prometteurs *in vitro*, mais aussi *in vivo*. Ils ont induit un effet antiprolifératif dans de nombreuses lignées cellulaires. Ils ciblent le mTORC2 et inhibent la phosphorylation de p70S6K et 4E-BP, bloquant donc le rétrocontrôle négatif et l'activation d'Akt induite par les rapalogues (Feldman et Shokat 2010). Plusieurs de ces TORKinhibes ont montré une forte activité anti-tumorale sur un large éventail de tumeurs solides et hématologiques. Des études de développement clinique sont en cours.

- Nouveaux inhibiteurs dans le LCM:

- NVP-BEZ235:

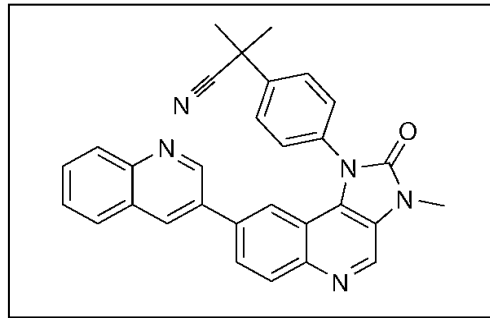


Figure 20 : structure de NVP-BEZ235

Un nouveau dual inhibiteur de la voie PI3K cible la PI3k et le mTORC1/2. Müller et son équipe l'ont testé dans les lignées cellulaires JEKO et Granta-519 de LCM et ont démontré qu'il est capable d'inhiber la phosphorylation pAkt^{ser473}, pS6k^{ser371}, p4EBP^{T37/64} de façon dose dépendante (Müller et al. 2013).

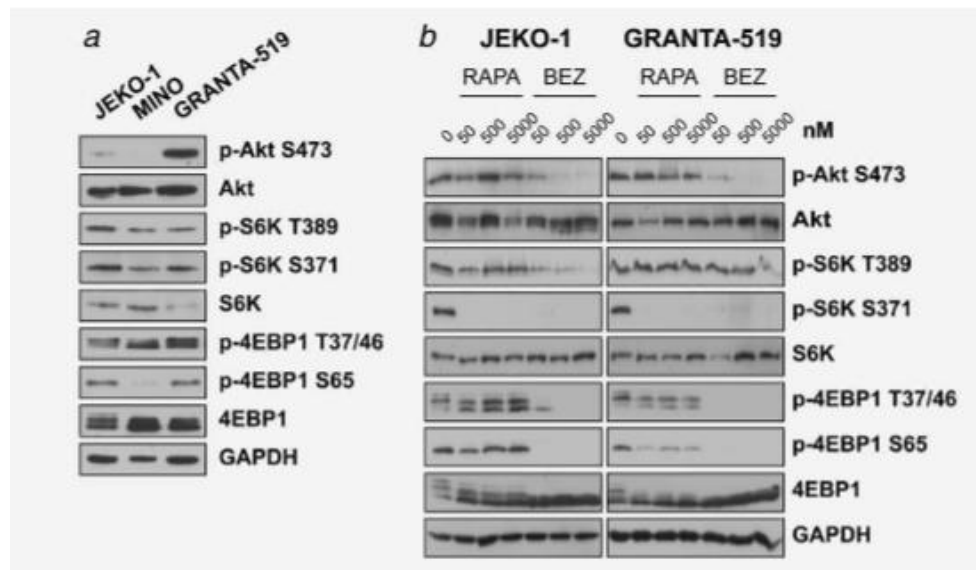


Figure 21 : inhibition de la phosphorylation de la voie AKT-mTOR kinase comparaison entre la rapamycine et le NVP-BEZ235 dans les lignées cellulaires LCM

Toujours dans la même étude et en comparaison à la Rapamycine, le NVP-BEZ235 a diminué la prolifération des lignées cellulaires (JEKO, GRANTA), mais a aussi induit l'apoptose (à partir de la dose 500nM) via l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak membres de la famille Bcl2. Plus important : le NVP BEZ235 a diminué l'expression de la protéine antiapoptotique Mcl1.

- **AZD8055 :**

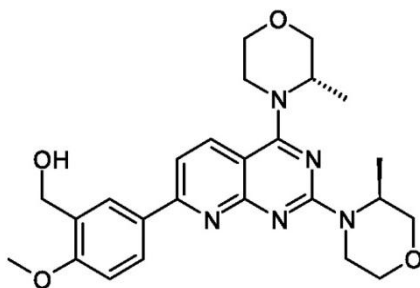


Figure 22 : structure d'AZD8055

AZD8055 est un membre de la classe des dual inhibiteurs mTORC1 / mTORC2. Il a montré un effet inhibiteur de la phosphorylation de l'Akt et le mTORC2 non trouvé avec les rapalogues de 1ère génération dans des modèles précliniques. Une étude préclinique *in vitro* a démontré que l'AZD8055 inhibe fortement la phosphorylation d'Akt sur le site ser473, mTORC2 et la phosphorylation de 4E-BP1 sur les thréonines 37/46. Dans la même étude, les données *in vivo* ont suggéré que les lymphomes non hodgkiniens peuvent être sensibles au traitement avec AZD8055 (Chresta et al. 2010). Une étude clinique de phase I a évalué la tolérance, l'efficacité préliminaire, la pharmacocinétique (PK) et pharmacodynamique (PD) du AZD8055 chez les patients atteints de tumeurs malignes solides ou de lymphomes avancés. La dose maximale tolérée dans cette étude est de 90mg deux fois par jours par la voie orale. L'effet secondaire le plus important démontré est une certaine augmentation des enzymes hépatiques: aspartate transférase (ASAT) et alanine transférase (ALAT). Aucune régression ou rémission significative n'a été démontrée, mais une stabilité de certaines tumeurs solides, et non dans les lymphomes (Naing et al. 2012). Les résultats préliminaires dans cette étude en combinaison avec les autres data *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs tumeurs solides expliqueront l'importance de continuer la recherche pour un meilleur traitement et notamment les combinaisons de molécules thérapeutiques ciblant plusieurs voies de signalisation.

1.4.3.1.3. Diabète secondaire aux inhibiteurs de mTOR:

La voie de signalisation PI3K-Akt-mTOR est impliquée non seulement dans la croissance cellulaire mais également dans le métabolisme glucidique. Les inhibiteurs de cette voie sont à l'origine d'hyperglycémies fréquentes, et parfois sévères. Leur effet hyperglycémiant s'explique par une promotion d'une résistance à l'insuline, et d'une possible réduction de l'insulino-sécrétion (Vergès et Cariou 2015).

Les mécanismes moléculaires liants l'inhibition de mTOR à la survenue de troubles du métabolisme glucidique sont complexes et imparfaitement connus. Il a été suggéré, par Laplante et Sabatini, que les inhibiteurs mTOR exerçaient un effet contrasté sur le métabolisme glucidique. Cela signifie qu'une activité mTOR trop importante exerce un effet délétère sur le métabolisme glucidique, mais une activité minimale en présence des inhibiteurs de mTOR a aussi le même effet et induit un diabète secondaire (Laplante et Sabatini 2012).

Les effets de mTOR sur l'homéostasie glucidique sont complexes. Le mTORC1 favorise la résistance à l'insuline dans le tissu adipeux, en favorisant la phosphorylation de la sérine sur IRS-1, ce qui a pour conséquence de réduire l'activation de PI3kinase (Um et al. 2004). L'activité mTORC1 est augmentée dans le tissu adipeux, le foie et le muscle des animaux insulino-résistants, ce qui explique un effet délétère sur la sensibilité à l'insuline (Khamzina et al. 2005). Ainsi, dans le foie, la phosphorylation du résidu sérine d'IRS-1 réduit l'activation de la voie PI3Kinase-Akt (mécanisme de contrôle négative) avec, pour conséquence, une augmentation de la néoglucogénèse. A l'opposé, mTORC1 au niveau musculaire, favorise le métabolisme oxydatif. Les animaux knock-out (KO) pour mTORC1 présentent une réduction de la masse musculaire mais aussi des capacités oxydatives musculaires (Khamzina et al. 2005). Par ailleurs, le mTORC1 régule la masse et la fonction des cellules β de Langerhans et joue donc un rôle dans la sécrétion de l'insuline. En effet, mTORC1 active la fonction de la cellule β ; l'activation constitutive de mTORC1 dans les cellules β améliorant ainsi l'insulino-sécrétion. Ce mécanisme est en relation avec une augmentation de la taille et du nombre des cellules β . Cependant, une activation prolongée de mTORC1 dans les cellules β favorise leur apoptose par la voie JNK (Shigeyama et al. 2008). Cette activation accrue JNK par l'inhibition de mTOR peut être un autre facteur induisant la résistance à l'insuline.

Une hyperglycémie et une résistance à l'insuline ont été observées dans les études avec AZD8055. Plusieurs rapports ont suggéré le rôle de mTORC2. Ce dernier est un régulateur positif de la glycolyse. D'une manière intéressante, le traitement avec AZD8055 a induit une réduction de la glycolyse dans des modèles animaux (Chresta et al. 2010).

Le rôle important du complexe mTORC2 sur le métabolisme du glucose est également suggéré par plusieurs études démontrant une intolérance au glucose chez les souris KO pour RICTOR, une sous-unité spécifique de mTORC2. Une réduction de 30 % de l'absorption du glucose a été observée chez ces souris (Kleinert et al. 2014). L'inhibition de PI3k/mTOR C1 et 2 par NVP BEZ235 dans des modèles murins a aussi induit une hyperglycémie, mais moins importante (Gallagher et al. 2012).

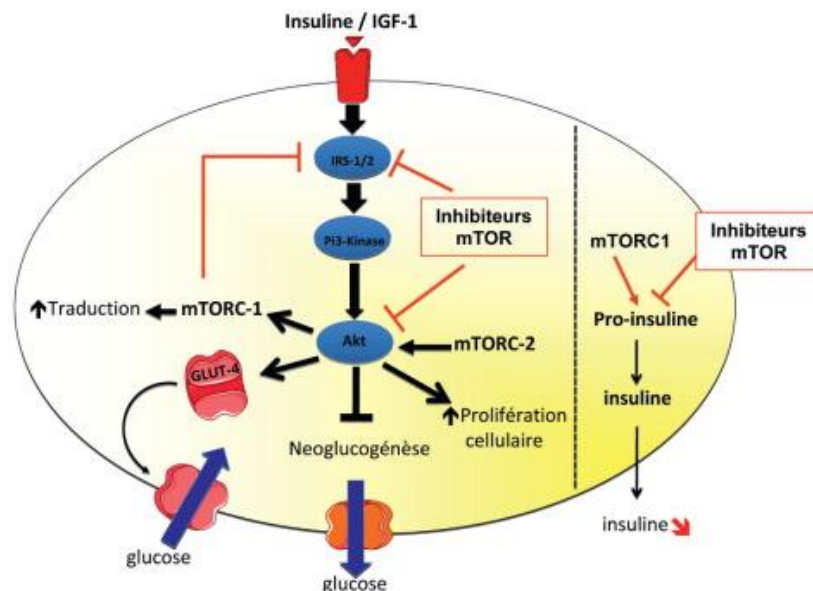


Figure 23 :Résistance à l'insuline : conséquence de l'inhibition de PI3K/mTORC1/2 (Vergès et Cariou 2015)

1.4.3.2. Les inhibiteurs de Btk :

- Ibrutinib :

Le rôle important de BTK dans les tumeurs malignes à cellules B impose cette protéine comme une cible thérapeutique intéressante. Les études de la structure et de la fonction de cette molécule ont abouti à la découverte de plusieurs inhibiteurs efficaces. Certains inhibiteurs se fixent d'une manière compétitive mais réversible au site kinase de l'ATP (Adénosine Triphosphate)(Evans et al. 2013). Ils sont donc de pauvre sélectivité et ont un effet compétitif modeste. En revanche, les inhibiteurs irréversibles sont très sélectifs, mais ont un effet compétitif prolongé. L'Ibrutinib (PCI-32765) est un exemple de ces dernières. Il se lie d'une manière irréversible et très sélective à la cystéine (Cys-481) dans le site de liaison à l'ATP de BTK. Il est documenté pour la première fois en 2007 (Pan et al. 2007), puis a été développé pour des usages cliniques.

Les mécanismes d'action de l'Ibrutinib ont été étudiés *in vivo*. Herman *et al.* ont rapporté que dans les cellules de leucémie lymphoïde chronique (LLC), l'Ibrutinib induit une diminution des marqueurs d'activation CD38, CD69 et CD86. Parallèlement, une réduction remarquable de Ki67 dans le sang périphérique et les ganglions a été observée. Cela reflète une réduction de la prolifération (Herman et al. 2012). En plus, la même équipe a démontré plus tard que l'Ibrutinib inhibe la voie NF-kB ainsi que la voie ERK (Herman et al. 2014). Ces résultats suggèrent que l'Ibrutinib réduit à la fois l'activation et la prolifération des cellules LLC par un mécanisme sur la cible. En revanche l'apoptose était difficile à détecter.

Ces observations permettent de conclure que l'Ibrutinib inhibe la signalisation BCR et ont suggéré qu'il pourrait avoir une efficacité plus importante lorsque la signalisation BTK est très fortement activée, comme dans les patients atteints de LLC avec *IGHV* non muté ou qui sont positifs pour ZAP70.

Le traitement par l'Ibrutinib est suivi très régulièrement d'une lymphocytose importante. Plus précisément et dans le cadre d'une étude clinique phase II, la persistance de lymphocytose est survenue chez 50% des patients atteints de LLC avec *IGHV* muté par rapport à 15% des non mutés ($p = 0,025$), le temps médian à la normalisation était de 6,4 mois pour les non mutés par rapport à 14,8 mois pour les mutés ($p = 0,068$). Bien que l'étiologie de cette observation soit actuellement peu claire, des explications possibles permettent de conclure que les LLC non mutés auraient une signalisation BCR plus active et donc seraient plus sensibles aux effets induisant l'apoptose par l'Ibrutinib. Ils sont donc plus sensibles à subir l'apoptose après l'inhibition de signaux de survie. En outre, les cellules LLC avec *IGHV* non muté sont dépendantes du microenvironnement (Davids et al. 2012)(Brown 2014).

Dans le LCM, l'Ibrutinib a démontré également des résultats importants *in vitro* et *in vivo*. Il a été ensuite testé dans plusieurs études cliniques. Cinar *et al* ont commencé à le tester *in vitro* et ont montré une inhibition de la phosphorylation de Btk sur la Tyrosine Tyr223. Ils montrent aussi une diminution de la viabilité cellulaire dans les lignées cellulaires Mino et jeko-1, mais aussi une induction de l'apoptose. De manière cohérente, dans cette première étude, le traitement par Ibrutinib a diminué l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 (Cinar *et al.* 2013). Les résultats de cette étude ont été encourageants, mais on remarque que les doses utilisées sont élevées: du 1 à 10 μ M. Dans d'autres études, l'Ibrutinib a été combiné à d'autres molécules, comme l'AZD2014 (un inhibiteur de mTORC1 et 2). Cette combinaison a induit une inhibition simultanée de la voie Btk ainsi que de la voie mTOR et une apoptose plus importante dans les lignées de lymphome B à grandes cellules activées (ABC). Encore une fois, l'implication de la voie NF-kB et l'inhibition de 4E-BP a été suggérée comme hypothèse. D'une manière très intéressante, cet effet synergique n'a pas été trouvé dans les lignées de lymphome B à grandes cellules de centre germinatif (GCB) (Ezell *et al.* 2014).

- **Résistance à l'Ibrutinib :**

Les données des essais cliniques ont souligné une efficacité importante de l'Ibrutinib. Pourtant, le taux de résistance primaire ou secondaire est toujours important. Seulement un tiers de patients (31%) restent sans progression après deux ans de traitement (Martin 2016). L'Ibrutinib se lie de façon irréversible à la cystéine 481 du BTK. Dans la LLC, des mécanismes de résistance secondaire ont été décrits. Il a été suggéré qu'une mutation C481S correspondant à la substitution d'une cystéine par une sérine au niveau 481 (C481S) de *BTK* pourrait induire une résistance à l'Ibrutinib en empêchant la liaison irréversible de molécule. Cette mutation C481S entraîne une diminution de l'affinité de l'ibrutinib pour le BTK (constante de dissociation 0,2 nM vs 10,4 nM), ce qui le rend moins efficace pour bloquer l'autophosphorylation du BCR et d'un de ses effecteurs, ERK, *in vitro*. Cet effet est réversible, contrairement à ce qui est observé avec la forme sauvage du récepteur pour lequel la fixation est irréversible.

- **Rôle de NF-kB dans la résistance du LCM à l'ibrutinib**

Une étude menée par Rahal *et al* en 2014 a révélé un autre mécanisme de résistance à l'Ibrutinib. Une évaluation de 10 lignées cellulaires a permis de distinguer deux types des lignées :

- 1- Les lignées LCM sensibles à l'ibrutinib présentent une activation chronique de la voie classique de Nucléaire BCR-driven facteur-kB (NF-kB),
- 2- Les lignées insensibles présentent une activation de la voie NF-kB alternative.

Les études génétiques par RNA-Seq et SNP array ont démontré des anomalies dans la voie alternative de NF- κ B dans les lignées cellulaires insensible à l'Ibrutinib incluant des mutations de TRAF2, TRAF3, régulateurs négatifs de NF- κ B.

En plus, le séquençage de 165 échantillons provenant de patients LCM résistant à l'Ibrutinib a trouvé des mutations de TRAF2, BIRC3 et MAP3K14 dans 15% de ces patients. La MAP3K14, aussi nommée NIK est un activateur de NF- κ B2 da la voie alternative de NF- κ B

Ces mutations conduisent donc à une activation de la voie alternative de NF- κ B et permet une résistance à l'Ibrutinib (Rahal et al. 2014)(Zhang et al. 2015)

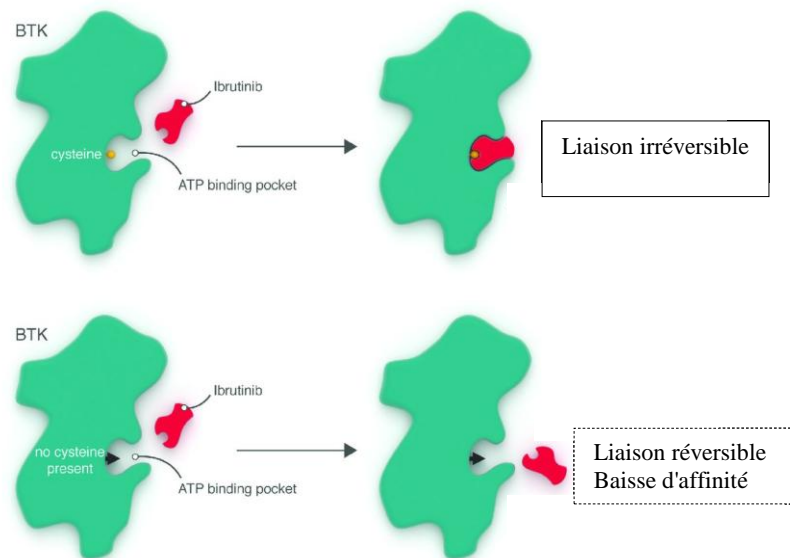


Figure 24 : illustration de mécanisme de la mutation BTK C481S. D'après (Wiestner 2015).

D'autres mutations sont aussi impliquées dans la résistance secondaire : les mutations S707Y, R665W et L845F dans PLC γ 2. Toutes ces mutations sont potentiellement des mutations gain de fonction permettant une activation du récepteur B indépendamment de Btk.

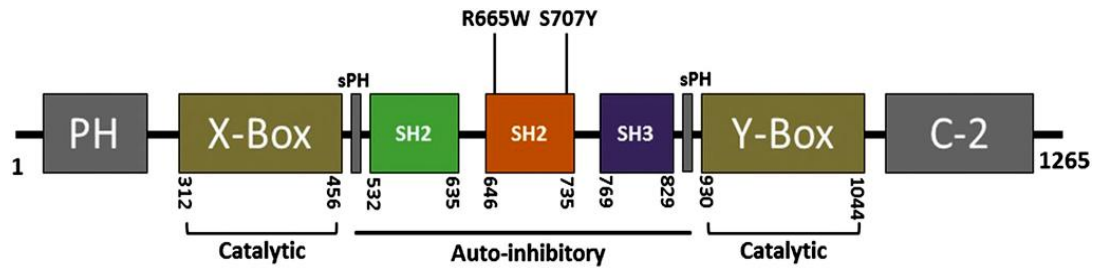


Figure 25: Les mutations du gène PLCG2 humain : R665W et S707Y identifiées dans les LLC sont dans le domaine SH2. PH, Pleckstrin homologie. C-2, le motif de liaison de calcium ; SH2 : Src 2 homologie; SH3: Src 3 homologie ; X-box phospholipase: domaine X spécifique au phosphatidylinositol ; Y -box phospholipase : domaine C spécifique du phosphatidylinositol Y

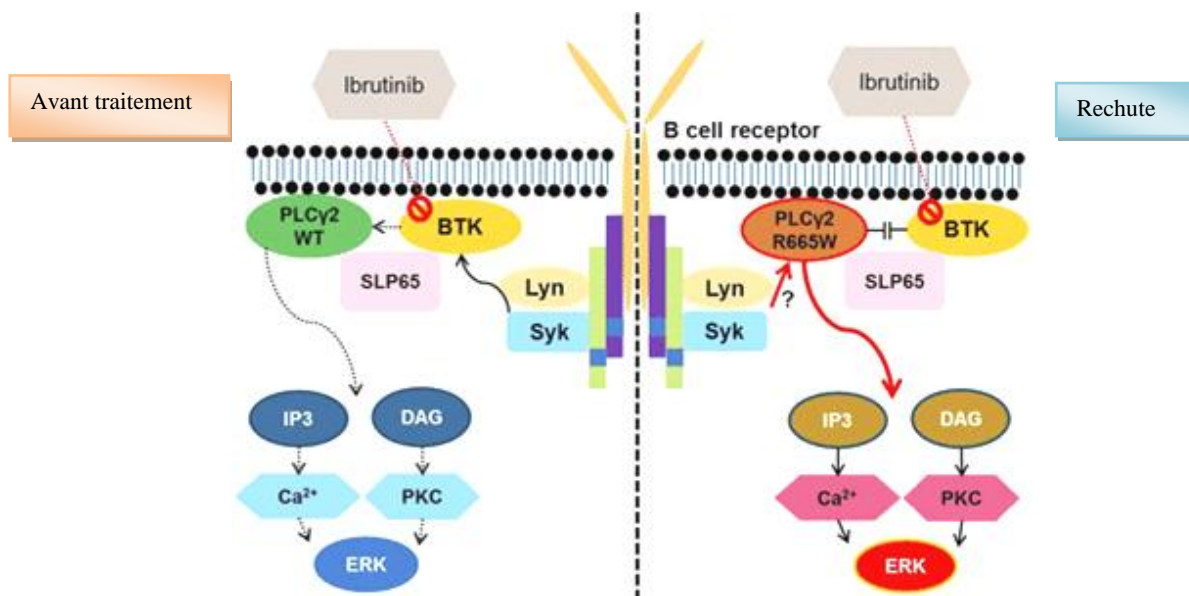


Figure 26: Illustration de la résistance à l'Ibrutinib avec la mutation (R665W) PLCγ2.

D'après (Liu et al. 2015)

Des mécanismes de résistance primaire sembleraient aussi pouvoir exister. Ces mécanismes ne sont pas liés à une inhibition inefficace de BTK, mais, en réalité, à une activation des signalisations en aval de BTK et notamment une activation de la voie PI3K-AKT (Chiron et al. 2014).

Dans le DLBCL, le phénotype ABC est fréquemment associé à des mutations MYD88L265P (39% des cas), alors qu'elles sont rares dans le phénotype CGB. Les patients présentant la mutation MYD88 en plus de la mutation CD79B sont des répondeurs à l'ibrutinib. Par contre les patients présentant la mutation MYD88 seule sont résistants à cette molécule (Wilson et al. 2015)

1.5.Mecanismes de résistances dans le LCM

1.5.1. Glutathion : synthèse, transport et catabolisme :

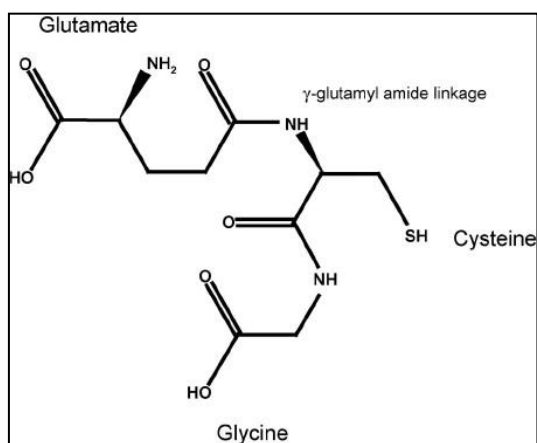


Figure 27: Structure de Glutathion réduit(GSH) D'après R.Franco, 2007 :

Le glutathion est le thiol libre le plus répandu dans les cellules (Dickinson et Forman 2002). Il est connu comme un antioxydant majeur mais il a aussi un rôle dans de nombreux mécanismes d'immunité, de cancer, de métabolisme des drogues, de vieillissement, et de protection cellulaire. Il est impliqué dans plusieurs processus biologiques tels que la synthèse des protéines et des acides nucléiques, le transport cellulaire, l'activité de plusieurs enzymes, et le métabolisme secondaire.

Un thiol est un composé organique comportant un groupement sulfhydryle -SH attaché à un atome de carbone. Les exemples les plus courants de thiols sont le coenzyme A, le glutathion et la cystéine. Deux groupements thiols peuvent se condenser pour former un pont disulfure. Les ponts disulfures jouent un rôle important dans la structure tertiaire des protéines. Les cystéines constituent des centres réactifs qui sont la cible de nombreuses drogues. Les molécules qui contiennent une cystéine comptent parmi les composés les plus facilement métabolisables, notamment via la formation de ponts disulfures.

Le glutathion intracellulaire existe sous deux formes chimiques: la forme disulfure (GSSG), minoritaire, et la forme réduite (GSH)(figure 26) qui représente 99 % du glutathion total. La fonction sulfhydryle (-SH) est à l'origine de la grande réactivité et du puissant pouvoir réducteur du GSH. La concentration intracellulaire en glutathion est considérée par certains auteurs comme un véritable marqueur de l'état de santé d'un individu ou de l'état physiologique d'une cellule.

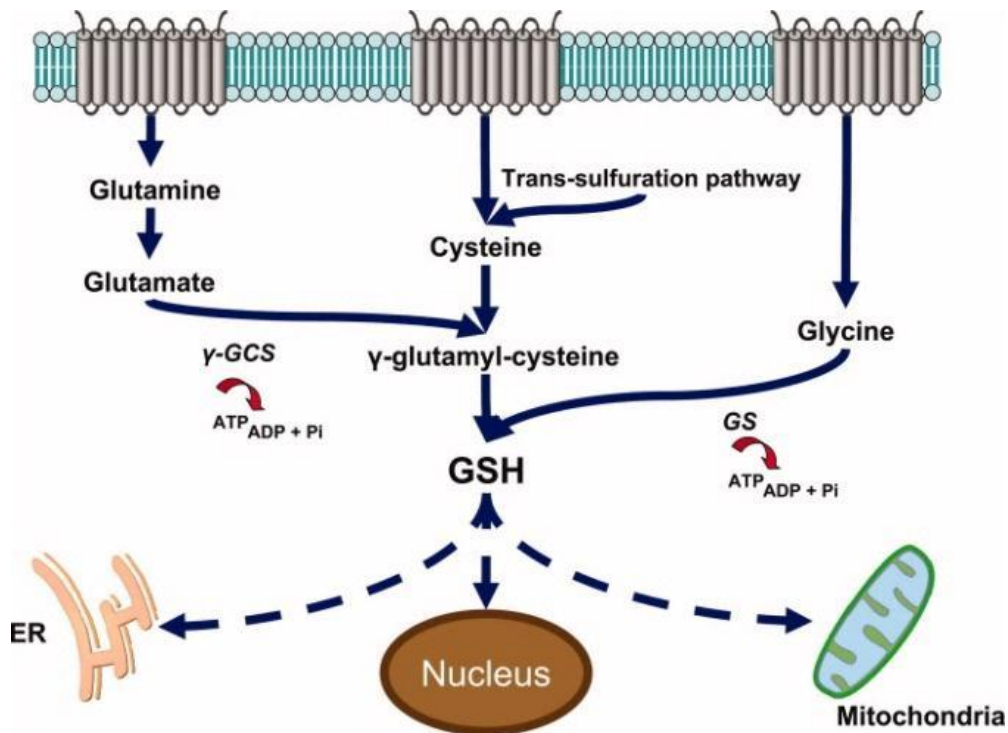


Figure 28 : Illustration de la synthèse de Glutathion *de novo* : Le GSH est un tripeptide construit de trois acides aminés: glutamate, cystéine, et glycine. La synthèse de glutathion dépend de l'activité de gamma glutamyle synthétase (gamma -GCT) et de la glutathion synthétase. D'après (franco et al 2007)

La synthèse du glutathion est liée au métabolisme des acides aminés glutamate, cystéine et glycine. Cette synthèse a lieu constitutivement dans les cellules et peut être régulée en fonction de facteurs environnementaux (Franco et al. 2007) **figure 28**. Il a été démontré que le glutathion participe au cycle γ -glutamyl qui permet l'entrée ATP-dépendante des acides aminés dans la cellule grâce à la synthèse et à la dégradation du GSH (Anderson et Meister 1983).

Certains réactifs intermédiaires se conjuguent spontanément au GSH. La majeure partie de ces réactions est catalysée par les GST (Glutathion S transférase). Enfin, des polymères constitués à partir du glutathion - les phytochélatines - servent à séquestrer des métaux lourds comme le cuivre, le cadmium, ou le zinc.**figure 29**. La réponse d'un organisme à un stress implique généralement un changement dans le contenu cellulaire en glutathion. Il est à la fois consommé dans des réactions qui éliminent des composés toxiques, et synthétisé, soit *de novo*, soit par la réduction du glutathion disulfure.

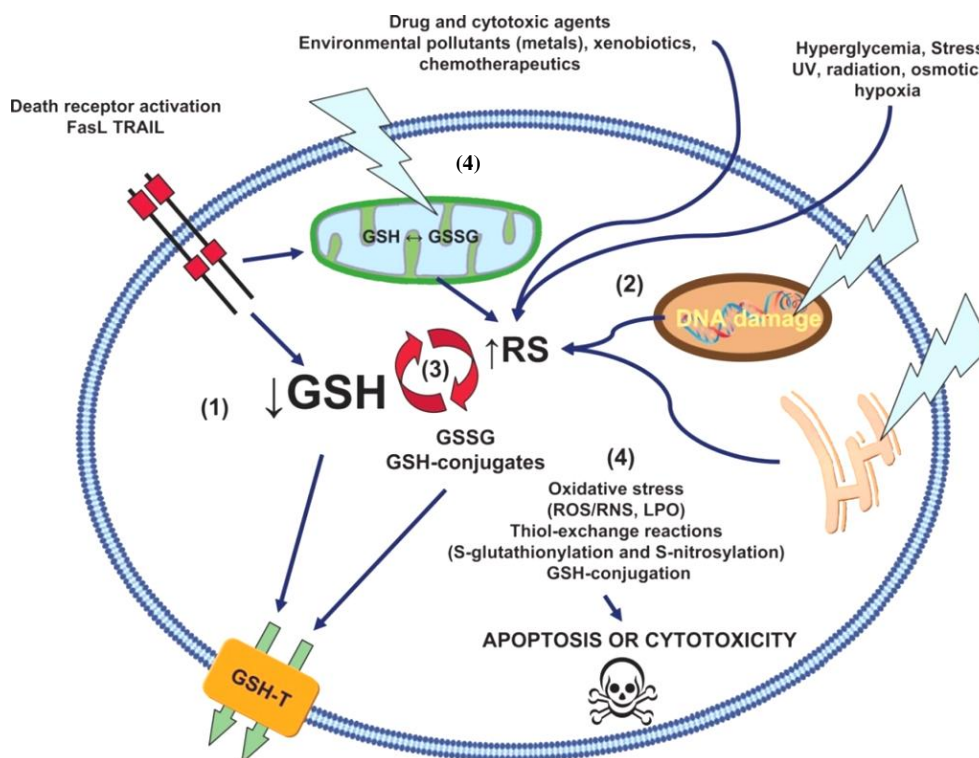


Figure 29 : D'après franco *et al* : **Rôle de GSH dans l'apoptose et la cytotoxicité** : la déplétion en glutathion est importante pour l'apoptose et la cytotoxicité, Elle peut être déplétée par des mécanismes différents :

(1). L'apoptose physiologique induite par l'activation des récepteurs de mort peut conduire à une perte de GSH par l'activation d'un export cellulaire de GSH à travers la membrane plasmique et non pas par son oxydation en GSSG. (Franco et al. 2007)

(2). Les récepteurs de la mort stimulés, les conditions de stress cellulaire tel l'hypoxie et les agents cytotoxiques peuvent générer ou augmenter les dérivés réactifs de l'oxygène(ROS) qui pourront dépleter la GSH par son oxydation (formation de GSSG) et / ou par la glutathion conjuguée.

(3).L'épuisement de GSH et la formation des ROS peuvent déclencher une cascade d'amplification qui résulte à la fois d'une augmentation des ROS et d'une déplétion de GSH.

(4). La mitochondrie agit comme un régulateur important de la mort cellulaire. Les formes oxydées de GSH (GSSG) et / ou la GSH conjuguée sont toxiques pour la cellule et doivent être éliminées par un export au niveau de la membrane plasmique.

Il est accepté aujourd'hui que le GSH a un rôle dans de nombreuses maladies telles que plusieurs cancers, des maladies neurodégénératives (l'Alzheimer, Parkinson), des déficits immunitaires (AIDS), des maladies cardiaques et hépatiques.

1.5.1.1. Glutathion S transférase pi:

Les glutathion transférases (GSTs) sont une famille d'enzymes de détoxification qui catalisent la conjugaison du glutathion aux molécules toxiques pouvant être non seulement des molécules cancérogènes, mais aussi des drogues utilisées pour le traitement des cancers comme les agents alkylants.

Cette famille contient sept isotypes de GST : A (alpha), P (pi), O (Omega), S (Sigma), T (theta), Z (Zeta) et M (mu)(Hayes, Flanagan, et Jowsey 2005). La surexpression de *GST* a été associée à la résistance aux agents alkylants et aux anthracyclines (Schisselbauer et al. 1989).

L'isotype pi 1 (*GSTP1*) est particulièrement important en cancérologie car il joue un rôle dans le métabolisme et la détoxification des drogues anticancéreuses ainsi que dans la régulation de l'apoptose et le cycle cellulaire (Tew 2016). La surexpression de *GSTP1* dans les lymphomes B à grandes cellules a été corrélée à un mauvais pronostic (Ribrag et al. 2003) et à une résistance aux agents thérapeutiques anticancéreux. Il a été démontré que la répression de *GSTP1* par transfection d'ADN antisense augmente la sensibilité de plusieurs cancers aux agents alkylants, comme par exemple, dans des lignées cellulaires du cancer de colon (Ban et al. 1996). Plus important, les inhibiteurs de *GSTpi* ont été capables d'induire l'apoptose et de sensibiliser les cellules résistantes aux agents alkylants. (Hansson et al. 1991). Dans ce sens, la combinaison entre l'acide ethacrynic (un inhibiteur de *gstpi*) et l'acide arsénique a un effet synergétique et induit l'apoptose dans les cellules de leucémie myéloïde et le lymphome. Ce traitement a produit des niveaux élevés de ROS, mais a aussi amplifié la phosphorylation de c-Jun, ainsi que la voie des caspases -3 et -9 pour induire l'apoptose. Le niveau élevé de *GSTP1* était associé à une résistance à cette combinaison thérapeutique (R. Wang et al. 2012). Le rôle de *GSTP* dans l'apoptose dépend des conditions de l'environnement cellulaire et notamment des conditions de stress oxydatif. Plusieurs études démontrent que l'interaction *GSTpi* - JNK est un mécanisme de protection contre la toxicité des agents thérapeutiques. Le rôle de *GSTpi* dans l'apoptose est illustrée dans la **figure 30**. Une étude *in vivo* indique que la suppression de *GSTP* augmente la toxicité cardiaque du cyclophosphamide chez les souris *GSTP^{-/-}* et démontre une amplification de la phosphorylation de c-Jun et p38 par rapport aux souris *GSTP* WT (Conklin et al. 2015). D'autres études ont également souligné ce rôle protecteur contre les agents alkylants, comme la doxorubicin et la cisplatine dans les ostéosarcomes (Huang, Mills, et Worth 2007). En effet, les mécanismes de localisation nucléaire de *GSTpi* sont vaguement connus mais il est démontré que le traitement par des agents alkylants augmente cette localisation de *GSTpi* et non les autres isotypes de *GST* (Goto et al. 2002).

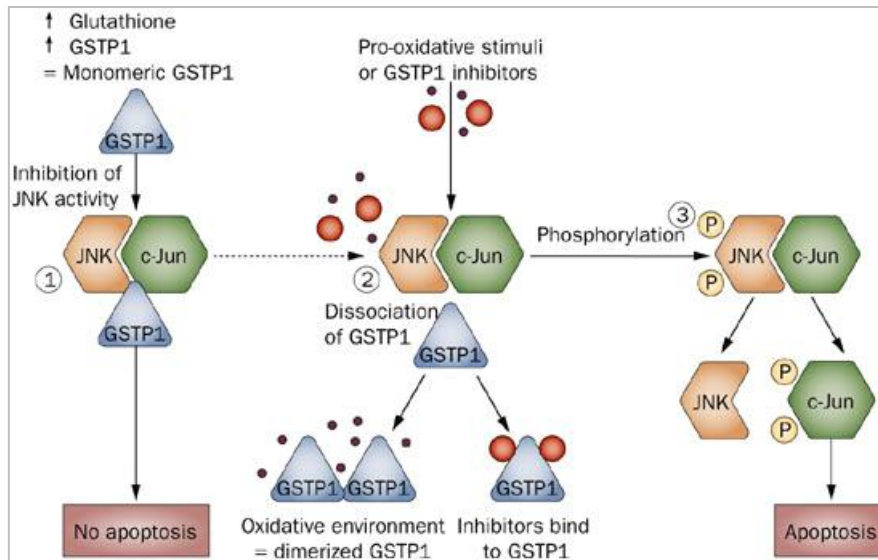


Figure 30: rôle de GSTP1 dans l'apoptose, le niveau élevé en l'absence de stress oxydatif pourrait favoriser l'existence de GSTP1 sous forme monomère. (1) ce GSTP1 monomérique se lie au complexe JNK-c-Jun, inhibant sa fonction dans l'apoptose. (2) En présence de stimuli pro-oxydants ou les inhibiteurs GSTP1, GSTP1 se libère du complexe JNK-c-Jun (3). Cette dissociation de la GSTP1 permet la phosphorylation du JNK et ensuite l'activation de c-Jun, qui à son tour, active l'apoptose. D'après (Simic et al. 2009),

1.5.1.2. Résistance de LCM aux agents anticancéreux - Rôle de GSTpi :

Les mécanismes de résistance aux médicaments classiques n'ont pas été définitivement prouvés dans LCM. La mutation du gène p53 est un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de LCM mais elle est retrouvée dans seulement 10 à 20% des cas. Bcl2 est une protéine anti-apoptotique bien connue, son expression explique un large spectre de résistance aux agents anticancéreux. L'expression de Bcl2 a été démontrée comme étant un facteur pronostic dans le LNH (O. Hermine et al. 1996). Une expression élevée de la protéine bcl2 n'est probablement pas le seul facteur impliqué dans la résistance aux médicaments dans les LCMs, car les lymphomes folliculaires qui expriment le bcl2 dans la plupart des cas ne présentent pas le même modèle de rechute précoce lorsqu'ils sont traités avec anthracycline. Ce qui suggère un mécanisme de résistance différent dans le LCM. Dans une étude réalisée sur des cellules primaires de patients atteints de DLBCLs(n= 69), LCM(n=24), LF (n=12) il a été démontré que les LCM surexpriment le GSTpi, seulement un tiers de DLBCLs et aucun folliculaire. Cette étude a démontré qu'il y avait une corrélation positive particulièrement forte entre l'expression de *CCND1* et *GSTpi* dans le LCM dans lequel ces deux gènes sont fortement exprimés, ce qui n'a pas été le cas dans tous les autres lymphomes testés. Le gène *GSTpi* est situé sur le chromosome 11q13, à proximité du gène *CCND1* ce qui pourrait expliquer cette relation entre les fortes expressions des deux gènes (Bennaceur-Griscelli et al. 2004).

A cause de son rôle dans la résistance aux agents alkylants, la surexpression de GSTpi est donc impliquée dans la résistance des LCM et peut être un facteur de mauvais pronostic.

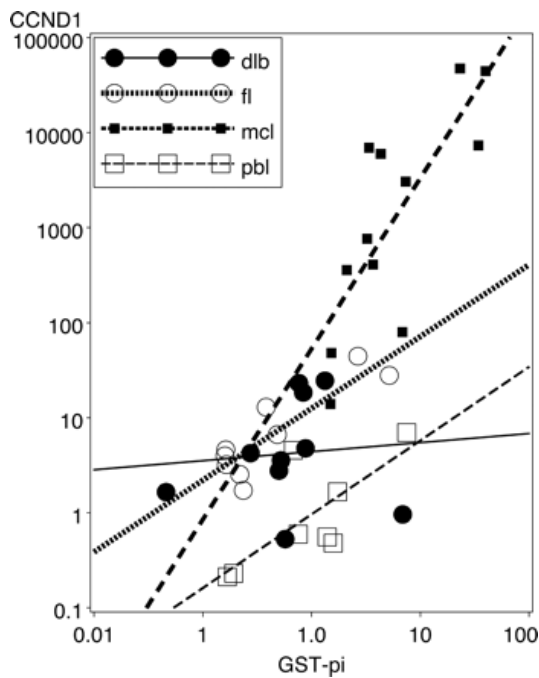


Figure 31: Relation entre l'expression de CCND1 et GSTpi : échelle logarithmique de l'expression relative d'après (Bennaceur-Griscelli et al. 2004) Les niveaux d'ARNm de *GSTpi* et *CCND1* ont été évalués par une analyse de RT-PCR.

Le rôle de GSTpi dans la résistance aux agents thérapeutiques dans le LCM a été ensuite confirmé dans une étude *in vitro*. L'inhibition du transfert nucléaire du GSTpi augmente la cytotoxicité de DOX (doxorubicine), CDDP (cisplatine), AraC (Cytarabine), GEM (gemcitabine) et bortézomib dans les lignées cellulaires Granta 519, UPN-1 et REC-1. Le traitement de ces cellules par ABL (Agaricus bisporus lectin) comme seul traitement ou en combinaison avec les autres drogues induit une toxicité plus importante et diminue l'expression nucléaire du GST-pi, alors qu'aucune modification au niveau cytoplasmique n'a été trouvée. Cette baisse de la GST-pi au niveau nucléaire pourrait contribuer à réduire la détoxification nucléaire des drogues utilisées.

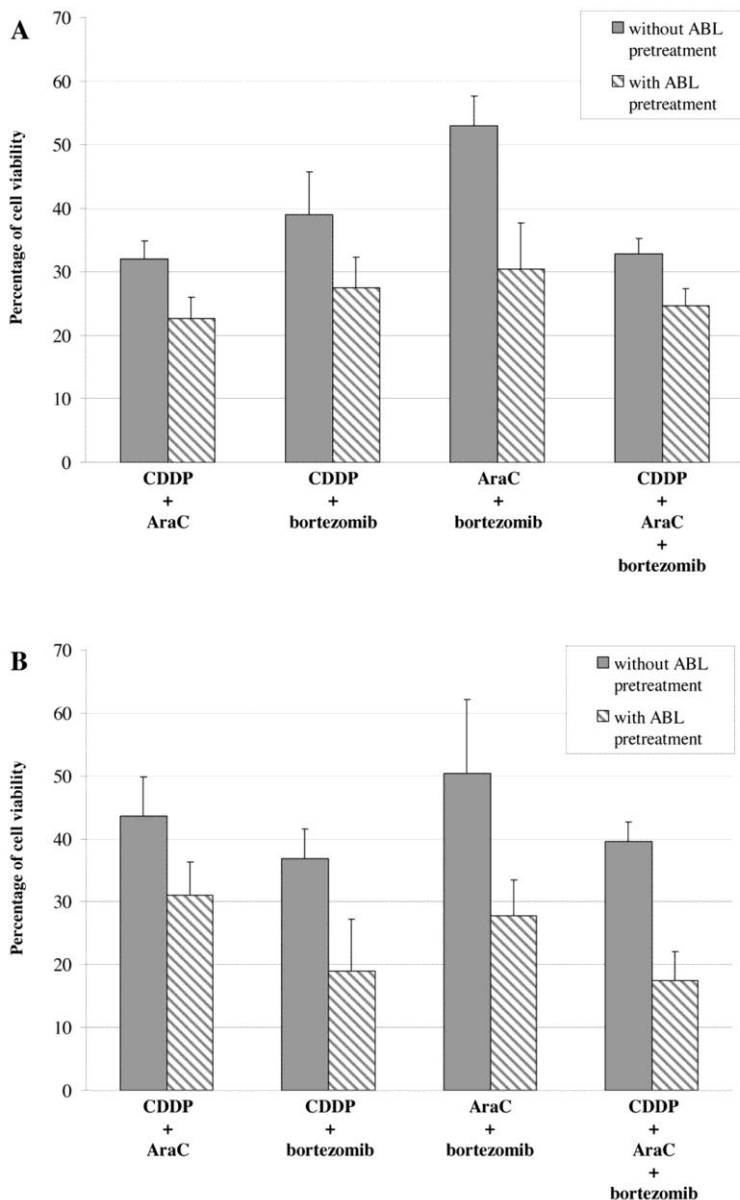


Figure 32: L'effet de l'inhibition du transfert nucléaire du GSTpi sur la viabilité cellulaire dans LCM dans les lignées cellulaires Granta -519 (A) et REC -1 (B). La combinaison des drogues indiquée est faite sans ou après le traitement par *Agaricus bisporus* lectin (ABL) à 40 µg /ml .D'après (Rolland et al. 2010)

Chaque drogue a son propre mécanisme d'action. La DOX est un anthracycline qui agit en interférant avec la topoisomérase II et le complexe d'ADN. CDDP (alkylant) forme des ponts entre les chaînes d'ADN. L'Ara-C et GEM (analogue de nucléoside) interfèrent directement avec la synthèse de novo des nucléosides et nucléotides et inhibent la polymérisation de l'ADN. Le bortézomib inhibe le protéasome. En outre, tous ces agents génèrent également des (ROS) provoquant l'oxydation cellulaire qui induit l'apoptose, comme nous l'avons expliqué ci-dessus. Goto et al. ont démontré que la GST-pi nucléaire empêche l'endommagement de l'ADN et réduit l'induction de l'apoptose. Le pré-traitement par ABL inhibe le transfert nucléaire de GST-pi et augmente la sensibilité des cellules à ce stress oxydatif (Goto et al. 2002)

1.5.2. Autophagie : définition, historique:

La cellule dispose de deux processus de dégradation afin de maintenir un équilibre entre la biosynthèse et le catabolisme de macromolécules. Ces processus sont différents en fonction des caractéristiques des éléments cellulaires à dégrader. Le premier mécanisme passe via le protéasome : La majorité des protéines dont la demi-vie est courte sont dégradées spécifiquement par le protéasome, après avoir été ubiquitinylées. En outre, les protéines dont la demi-vie est plus longue sont dégradées par une voie lysosomale et un deuxième mécanisme qui est l'autophagie (Wong et al. 2013).

L'origine du terme autophagie est grecque : auto- qui signifie « soi-même », et -phago qui signifie « manger ». L'autophagie est donc une auto-digestion des composants cellulaires. Ce terme est utilisé pour la première fois par DE DUVE dans la deuxième moitié des années soixante (Klionsky 2008) faisant suite à la découverte des lysosomes en 1955. Après avoir été négligée pendant une quarantaine d'années, cette voie de dégradation reprend au fur et à mesure sa place comme un processus important dans la réponse cellulaire à un stress environnemental comme le manque des acides-aminés, le stress du réticulum endoplasmique ou lors de certaines infections virales et bactériennes. Plus récemment, de nombreuses études s'intéressent à l'autophagie comme un mécanisme d'échappement tumoral. L'autophagie est présente dans la majorité des types cellulaires. Elle peut être fortement induite en cas de privation en nutriment, c'est donc un processus majeur de la réponse adaptative aux conditions de stress. Ainsi, le manque d'autophagie peut être fatal durant la privation en nutriment. Par contre, une autophagie excessive peut également conduire à la mort cellulaire autophagique. Il est donc primordial de réguler très strictement ce processus.

1.5.2.1. Rôle de l'autophagie dans les cancers en général :

Le premier lien spécifique entre l'autophagie et le cancer a été établi en 1999, grâce à l'étude de Beclin1. Il a été rapporté que l'allèle de Beclin1 est perdu dans 40% à 75% des cancers de la prostate, du sein ou encore des ovaires (Aita et al. 1999). Une autre étude a permis de mieux comprendre l'effet de la délétion monoallélique de Beclin1. Un modèle murin beclin-/+ a été généré.

La diminution de l'expression de Beclin1 a conduit à une diminution d'autophagie ce qui a induit une augmentation du développement de tumeurs spontanées, comme par exemple des lymphomes, des carcinomes pulmonaires, des carcinomes hépato-pulmonaires et des lésions mammaires précancéreuses (Liang et al. 1999). L'autophagie a donc été initialement caractérisée comme un mécanisme suppresseur de tumeur.

De la même façon, p53, le plus commun des gènes suppresseurs de tumeurs mutés dans les cancers humains, régule positivement l'autophagie dans les cellules qui présentent des dommages à l'ADN, probablement grâce à l'activation du complexe TSC1-TSC2 (Xu-Monette et Young 2012).

Outre ce rôle suppresseur de tumeur, l'autophagie est considérée aussi comme un mécanisme d'échappement tumoral. Elle peut être un processus de survie des cellules tumorales lors du traitement anti-tumoral et du stress cellulaire. Cela signifie que les cellules tumorales disposent d'une autre source d'énergie permettant leur survie et leur prolifération.

A l'inverse de l'apoptose, la mort autophagique commence par la dégradation des organelles au cours des stades précoces. Le cytosquelette reste intact jusqu'à ce que le processus soit très avancé. A ce moment-là, les cellules continuent vers une mort autophagique.

L'autophagie est une voie de survie des cellules en cas de stress, elle est donc considérée comme un mécanisme pro-tumoral, particulièrement dans les étapes tardives de progression tumorale. Autrement dit, cette même autophagie pourrait augmenter la survie et le potentiel tumoral des cellules souches insensibles au traitement et qui vont être responsables des rechutes. La **Figure 33** est une illustration de ces mécanismes.

Par conséquent, le rôle de l'autophagie dans les cancers est contradictoire. La suppression de l'autophagie dans ces mêmes cellules avec des inhibiteurs pharmacologiques ou siRNA, pourrait renforcer les effets des agents anticancéreux dans certaines hémopathies et en particulier dans le contexte de le LCM.

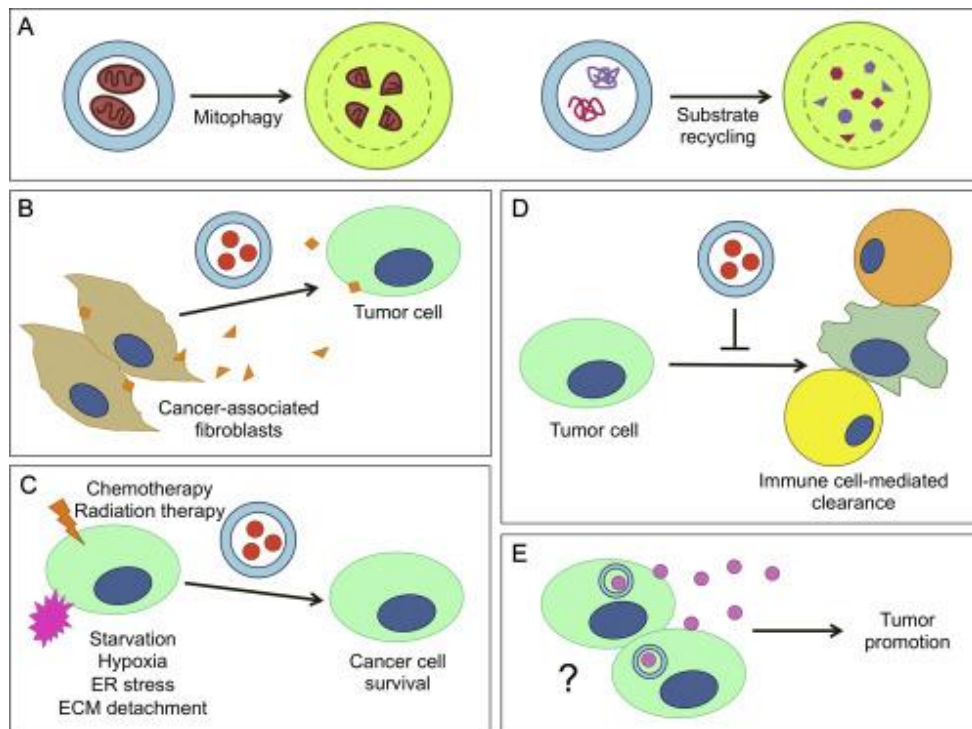


Figure 33: L'autophagie contribue à la progression tumorale : mécanismes..D'après (« Chapter One - The Evolving, Multifaceted Roles of Autophagy in Cancer » 2016):

A : maintenir le métabolisme de la cellule tumorale par le recyclage de substrats métaboliques. **B :** faciliter les interactions entre les cellules tumorales et les fibroblastes. **C :** induire des programmes de survie cellulaire en réponse à un microenvironnement de stress comme la chimiothérapie et la radiothérapie. **D :** immuno-surveillance. **E :** sécrétion des cytokines qui favorisent l'invasion tumorale et des fonctions des cellules souches.

1.5.2.2. Rôle de la voie mTOR dans la régulation d'autophagie :

Le processus d'autophagie se déroule en trois phases dans lesquelles les protéines ARG (Autophagy Related Genes) sont impliquées. La première phase est la formation de vésicules d'autophagie appelés phagophores. Ces vésicules sont ouvertes et peuvent séquestrer de façon non spécifique des constituants du cytoplasme. Lorsqu'ils sont fermés, ces phagophore s'appellent autophagosomes. Ensuite une phase d'élongation et de maturation de l'autophagosome qui vont pendant la troisième phase fusionner avec les lysosomes, conduisant à former une nouvelle variété de lysosomes : l'autolysosome. Les enzymes hydrolytiques contenus dans les lysosomes se répandent dans les vésicules et font disparaître leur membrane interne, puis tous les constituants du cytoplasme en acides aminés, nucléotides et acides gras. **Figure 34.**

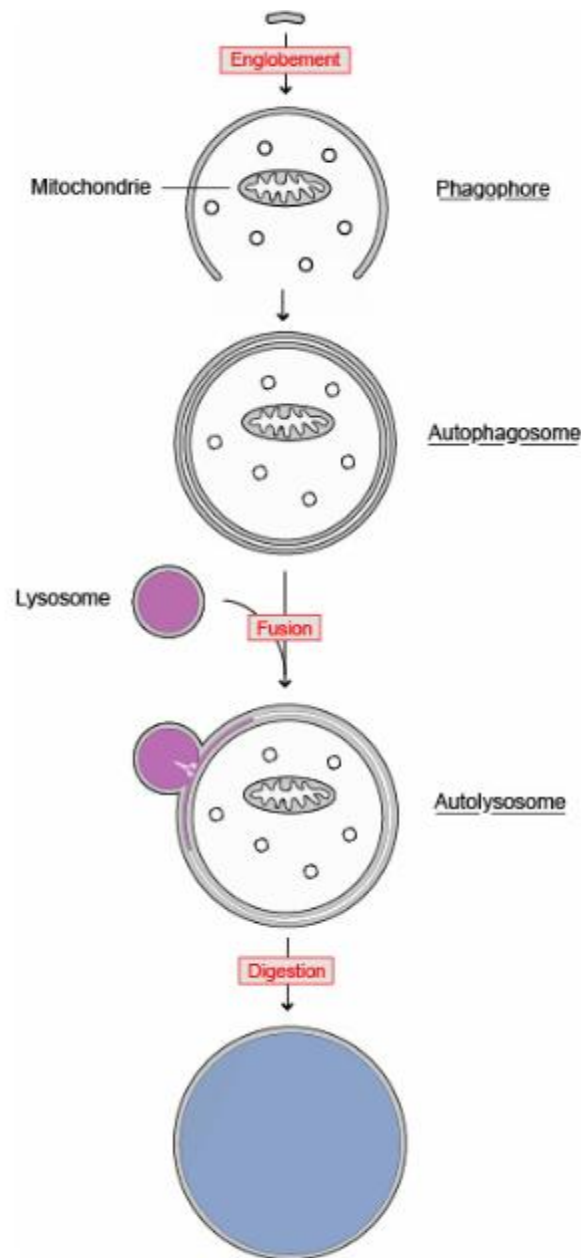


Figure 34 : Les différentes phases de l'autophagie. Modifié d'après : (Shibutani et al. 2015)

La voie mTOR est un régulateur majeur du métabolisme cellulaire. Elle joue également un rôle crucial dans la régulation de l'autophagie. Près de 20 ans après la découverte initiale de l'autophagie, il a été observé que la privation en acide aminé pourrait induire l'autophagie dans les cellules de mammifères en culture et dans le foie de rats perfusés (Mitchener et al. 1976)(Mortimore et Schworer 1977). Comme mentionné précédemment, les acides aminés ont un rôle clé dans l'activation mTORC1.

En outre, il a été démontré que la majorité des conditions induisant l'autophagie comme la privation de nutriments et les niveaux faibles d'énergie cellulaire pourraient inhiber l'activité de mTORC. Cela suggère un lien étroit entre l'induction de l'autophagie et l'inhibition de mTORC1.

Le mécanisme de régulation de l'autophagie par mTOR a été récemment élucidé (Jung et al. 2010)(Russell, Yuan, et Guan 2014). Trois mécanismes sont donc impliqués dans l'inhibition de l'autophagie par mTORC1. **Figure 35.**

1. Phosphorylation directe du complexe ULK1 (UNC-5 like autophagy activating kinase) sur la Ser758 empêchant son interaction avec AMPK.
2. Inhibition du complexe régulateur de l'autophagie AMBRA1 (autophagie/beclin 1 régulateur 1) par phosphorylation.
3. Inhibition du complexe VPS34 dont l'activité est cruciale pour la formation de l'autophagosome et l'induction de l'autophagie.

En condition de privation en nutriments, l'inhibition de mTORC1 conduit à l'accumulation de TFEB (transcription factor EB) dans le noyau et à son activation qui conduit à l'expression de gènes impliqués dans la formation d'autophagosome et la fusion des lysosomes (Settembre et al. 2011)

Les inhibiteurs de la voie PI3K-AKT-mTORC peuvent induire l'autophagie en inhibant le mTORC1. Cette autophagie est suggérée comme un mécanisme d'échappement tumoral. Le rôle de molécules inhibitrices de l'autophagie a été testé dans le but de renforcer l'effet thérapeutique de l'inhibition de mTORC1. Des molécules comme le Bafilomycine A1 et le hydroxychloroquine inhibent l'autophagie par un mécanisme mTORC1 indépendant. Ils augmentent le pH des lysosomes inhibant par conséquent la formation de l'auto lysosomes (Kim et Guan 2015).

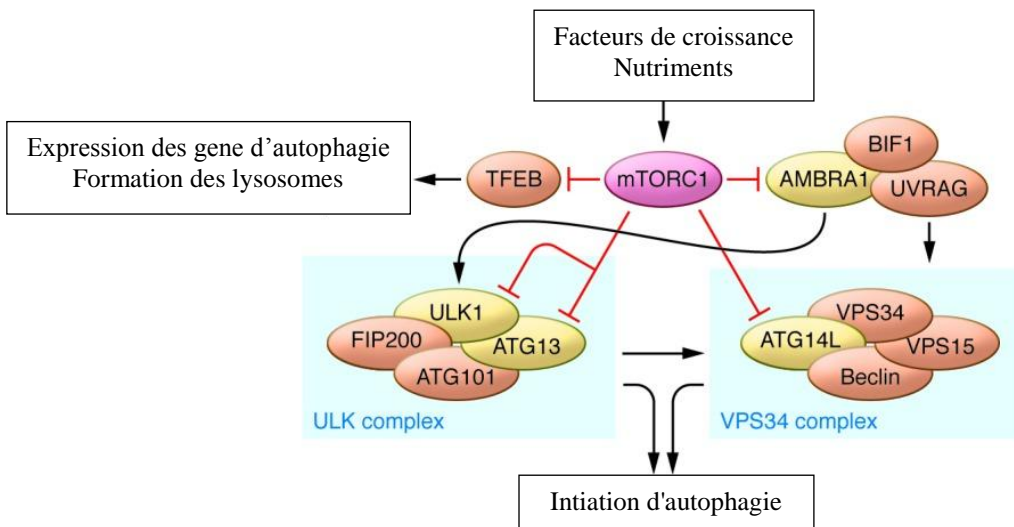


Figure 35 : Régulation d'autophagie par mTORC1 : mTORC1 activé inhibe l'autophagie par une phosphorylation directe des complexes ULK1 ; ATG13, AMBRAet ATG14L conséquent par une inhibition de la formation d'autophagosome. B) mTORC1 inhibe la localisation nucléaire de TFEB, un régulateur essentiel de l'expression des geneimpliqués dans l'autophagie (Kim et Guano 2015).

OBJECTIFS DE L'ETUDE :

Le pronostic de lymphome à cellules du Manteau reste sombre malgré les nombreuses lignes de traitement conventionnelles et ciblés actuellement utilisés. Le but de ce projet est de définir une meilleure association thérapeutique entre des molécules de différents mécanismes d'action et différents modes de résistance.

La première partie de ce projet s'agit d'une comparaison de l'effet des nouveaux inhibiteurs de la voie PI3Kinase/AKT/m-TOR, à celui du temsirolimus dans les lignées de LCM. L'effet du NVP-BEZ 235 (BEZ) et l'AZD8055 (AZD) sur la viabilité et le cycle cellulaire ainsi que l'induction de l'apoptose et de l'autophagie ont été étudiés. Ensuite, nous avons voulu associer ces trois molécules à l'aracytine, le traitement conventionnel de LCM. En partant de l'hypothèse que ce dernier a un effet sur la phosphorylation de la voie AKT-mTOR kinase et dans le but de prouver une synergie, nous avons utilisé des doses croissantes capables à induire un effet thérapeutique tout en restant peu toxiques.

Dans la deuxième partie de ce projet nous avons associé l'ibrutinib aux inhibiteurs de la voie PI3Kinase/AKT/m-TOR dans le but d'avoir un effet synergique. Nous nous sommes basés sur plusieurs hypothèses décrites dans la littérature suggérant que l'activation de PI3K pourrait être un des mécanismes de résistance à l'ibrutinib. Nous avons également combiné l'ibrutinib à l'aracytine et essayer de décortiquer les mécanismes aboutissant aux effets de cette association.

La troisième partie de cette étude à l'objectif de combiner les nouveaux inhibiteurs de la voie PI3K ainsi que l'inhibiteur de Btk à la doxorubicine. Nous avons voulu mettre en évidence un rôle de l'enzyme de détoxification Gst π . Cette enzyme est connue pour avoir un rôle important dans la résistance du LCM à l'anthracycline.

En conclusion, ces travaux sur les associations de diverses molécules *in vitro* sont une base nécessaire à de futures études cliniques pour de nouvelles approches thérapeutiques plus efficaces dans le LCM.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Matériels et Méthodes

Article:

Targeted therapies combined to referential chemotherapy for the treatment of mantle cell lymphoma -Role of GSTP1.

Sawsaneh Alkhaeir, Flavia Guillem, Morgane Cheminant, Thiago Maciel, Michaël Dussiot, Etienne Paubelle, Vincent Ribrag, Ivan Cruz Moura and Olivier Hermine

Abstract

Temsirolimus, an mTORC1 inhibitor, has gained a clinical impact in relapse mantle cell lymphoma treatment. However, it doesn't inhibit 4EBP phosphorylation and may activate a pro-survival feedback loop through PI3K-Akt. In this current study, temsirolimus is compared to NVP BEZ235 (a PI3K and mTORC1/C2 inhibitor) and AZD8055 (an mTORC1/C2 inhibitor) these new dual mTOR inhibitors are proved to have a more important effect. Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) plays also a significant role in the survival of MCL. This study also combined the BTK inhibitor ibrutinib with PI3K inhibitors and this revealed an antagonist effect. Aracytine which has been shown previously to be efficient in MCL, revealed an additive effect with mTOR inhibitors and with Ibrutinib. Immunoblot analyses identified the decrease of phosphorylated 4EBP as a possible underlying mechanism of this interaction. Doxorubicin effect is enhanced when combined to ibrutinib but not with mTOR inhibitors. We suggest that decrease in GST π expression by ibrutinib and not by dual inhibitors can explain this contrast effect.

Introduction:

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive B-lymphoid neoplasm representing nearly 6-8% of all non-Hodgkin lymphoma (NHL) in Europe and North America (1). The median age of MCL at diagnosis is 65 years with an annual incidence of 0.4 per 100000 persons in the USA and Europe(2).MCL is characterized by the t(11;14)(q13;32) chromosomal abnormality that causes overexpression of *cyclin D1*. However,a minority of MCL cases (<5%) presents a decrease on cyclin D1 expression, where it can be observed a higher expression of cyclin D2 or cyclin D3 (3). It has also been observedthat expression of SOX11(4) or glutathione S-transferase π GST π (5) is somewhat common and restricted to MCL.

In the last two decades, prognosis of younger MCL patients has improved significantly due to introduction of dose-intensified regimens containing cytarabine (6)(7). However, intensive regimens may lead to acute and late toxicity and are not suitable for elderly patients, who represent the majority of MCL patients (8). Despite the positive response rates in these intensive regimens, most of all MCL patients develop a relapse within few years of treatment. Evolving drug resistance by the tumor and cumulative toxicity of treatment make it even more difficult to treat relapsed MCL patients. Therefore,

research for effective treatments for relapsed or refractory MCL disease is of major importance in MCL research.

As in several types of cancer and lymphoproliferative disorders, including diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), in MCL, constitutive activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt, and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway may play a role in the transformation and/or in the maintenance of the tumoral clone and is known to confer drug resistance. MCL tumors either do not express the negative PI3K regulator PTEN or do express its inactive phosphorylated form (9). In addition, *PIK3CA* (PI3K p110 catalytic subunit alpha) gene amplification has also been described in MCL and contributes to the pathogenesis of this disease (10). mTOR is a multi-protein complex composed of mTORC1 and mTORC2. It regulates cell growth, survival and autophagy (11). Allosteric mTOR inhibitors, including rapamycin (sirolimus) and its analogues (temsirolimus, everolimus and ridaforolimus), mainly target mTORC1 (12). Temsirolimus is the first mTOR inhibitor that has shown clinical efficacy and was approved by the European Medicines Agency for the treatment of relapsed and refractory MCL (13). However, mTORC1-specificity of rapamycin analogues may lead to Akt hyperactivation through a feedback activation of PI3K signaling, limiting its efficacy *in vivo* (14).

In this context, small molecules were designed to inhibit the catalytic site of mTOR and in the same time to prevent the activation of the PI3K pathway. Unlike rapamycin and its analogues, these compounds inhibit mTORC1 and mTORC2, while avoiding the feedback loop mediated by overactivation of Akt (15), providing increased antitumor effects on lymphomas (16). NVP-BEZ235, an orally bioavailable imidazoquinoline derivative, is one of such compound (17). It has shown pre-clinical activity against a wide range of lymphoid malignancies (18)(19)(20) and *in vitro* it exerts antiproliferative and survival properties in MCL by downregulating Mcl-1 (21) and synergisms with conventional agents (22)(23). AZD8055 is another dual mTORC1/mTORC2 inhibitor, shown to prevent the mTORC2-mediated AKT activation seen with rapalogues (24). In a phase I clinical study in cancer, AZD8055 promoted significant anti-tumoral effects *in vitro* and *in vivo* on a broad spectrum of tumors associated with reduced levels of AKT and S6 phosphorylation (24). In a phase 1 clinical study, AZD8055 revealed a toxicity profile, including elevated transaminase levels, while no effective responses were obtained (25). However, dual mTORC1/2 inhibitors may remain a promising therapy, but modification of the dosing schedule and finding of the best combination with conventional or other targeted therapies will be critical to reveal the full potential of these drugs.

The B-cell antigen receptor (BCR) signaling is crucial for cell survival during B-cell development and is implicated in the pathogenesis of B-cell malignancies, including MCL (26) through regulation of cell proliferation, differentiation, apoptosis and migration (27)(28). Bruton's tyrosine kinase (BTK) has been identified as a key component of the BCR signaling pathway (29) by activation of cell survival pathways such as transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) (30). Ibrutinib (PCI-32765) is an orally bioavailable, irreversible and highly selective BTK inhibitor (31). It has demonstrated therapeutic efficacy in several types of B-cell

lymphoma, including MCL (26)(32)(33). However, studies have shown that up to one third of MCL patients do not respond to ibrutinib and few achieve complete remission (CR), mainly due to the development of drug resistance. The mechanisms underlying drug resistance are poorly understood but are thought to involve BTK mutations that impairs ibrutinib binding or constitutive BTK-independent cell signaling through mutations on the PLC γ 2(34)(35) or by the activating non canonical NF κ B pathway (36). Association of ibrutinib with other anti-lymphoma therapies could potentially bypass this shortcoming and thereby may improve patient prognosis.

High-dose cytarabine followed by autologous stem cell transplantation showed positive effects in young MCL patients. In a phase III trial cytarabine improved significantly the overall survival of patients (>5 years) (37)(38). Although overall results of high-dose cytarabine-containing regimens are high, refractoriness or late relapses still occur (39). Mechanismes of MCL resistance to cytarabine may involve down-regulation of deoxycytidine kinase (DCK) (40). Rituximab and conventional CHOP is still the reference chemotherapy regimen in elderly patients. However, in contrast to other B cell malignancies, high rate of relapse occurs, probably due to an overexpression of GST π (41), which inhibits directly alkylating agents activity and reactive oxygen species (ROS) induced apoptosis.

Combination of chemotherapeutic agents with non cross-resistant mechanisms of action or acting synergistically has a long history in the treatment of cancer and provides the rationale for the current study. Here we evaluated the combined effect of signal transduction targeted inhibition and other referent treatment of MCL.

Materials and Methods:

Cell Culture:

MCL cell lines JEKO-1, UPN-1 were used and were cultured in RPMI 1640 (for JEKO) and MEM-alpha (for UPN-1) supplemented with 10% to 20% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/L glutamine and 50 μ g/mL penicillin-streptomycin (Life Technologies). Cells were incubated at 37°C.

Drugs

AZD8055, NVP-BEZ235, Temsirolimus, Ibrutinib and Doxorubicin (Adriamycin) were obtained from Selleckchem (France). *For in vitro* studies, 10 mmol/L stock solutions were prepared in DMSO, stored at -20°C and diluted in culture medium at indicated concentration immediately before use. Cytarabine (Aracytin) was a gift from department of hematology at Necker hospital. BafilomycineA1 was obtained from Sigma Aldrich laboratories.

Cell Viability

MCL cells were re-suspended in medium at 2×10^5 cells/ml and added in triplicate at 2×10^4 cells (100 μ L) per well in opaque 96-well tissue culture plates. Cell viability assays were performed using quantitative ATP generated by metabolically active cells. Assays were performed using a CellTiter-Glo luminescent cell viability assay following manufacturer's instructions (Promega). The plates were incubated for indicated time, and then 100 μ l of CellTiter-Glo reagent was added to lyse the cells. After a 20-min incubation at room temperature, luminescence was recorded by a luminometer (Tecan) with an integration time of 1 sec per well. The luminescence signal for treated cells were normalized to the luminescence signal obtained for non-treated cells.

Western blot.

Cells were lysed in RIPA buffer supplemented with a phosphatase and protease inhibitor cocktail (P0044, Sigma-Aldrich) for 20 min at 4 °C and centrifuged to obtain the soluble fraction. Total protein extracts were quantified by the bicinchoninic acid method according to the manufacturer's instructions (Pierce). The concentrations were equalized, and 30 to 50 μ g of proteins were loaded on a 10 or 15% SDS-PAGE gel and transferred onto a PVDF membrane (GE Healthcare). Specific proteins were detected using antibodies against phospho and total Akt, S6, 4EBP (Cell Signaling), followed by detection using HRP-conjugated secondary antibody, and visualized by chemoluminescence with Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore). β -actin (Ab8227-50, Abcam, 1/5,000 dilution) was used as a loading control. GST π was purchased from Santa Cruz biotechnology. The images were captured using a charge-coupled device camera (LAS3000 from Fujifilm). The signal intensity was quantified using Multigauge software from Fujifilm.

Apoptosis assay

Phosphatidylserine externalization was evaluated by Annexin V (Becton Dickinson) binding and was used to quantify cell apoptosis. Cells were incubated for 15 minutes at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS), 2% FBS, and 0.1% NaN₃, with annexin V-FITC and TOPRO-3. Cells (2×10^4) were run on a FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and analysed using the FlowJo Software.

Statistical analysis

Statistical differences between controls and drug-treated cells were determined by one-way ANOVA (Sidak). P-values < 0.05 were considered statistically significant.

Results:

NVP-BEZ235 and AZD8055 exert a stronger inhibitory effect on MCL cell line viability than temsirolimus: In the first set of experiments we examined the effect of NVP-BEZ235 and AZD8055 compared to temsirolimus on cell viability in MCL cell lines (JEKO, UPN-1, MINO and Granta- 519). Figure 1 shows a significant increase of cell death (up to 70% of the control (untreated cells) ($p < 0.005$) was observed in cells cultured in the presence of NVP-BEZ235 or AZD8055, whereas only 50% of the control were dying in the presence of temsirolimus. Same results were obtained with MINO and Granta- 519 cell lines.

NVP-BEZ235 and AZD8055 but not Temsirolimus induce apoptosis in mantle lymphoma cell lines: We examined the functional effects of NVP-BEZ235 and AZD8055 on apoptosis in mantle cell lines but compared to an mTORC1 inhibitor temsirolimus. Cell lines were treated for 72 h with NVP-BEZ235, AZD8055, temsirolimus at 10 to 1000 nM concentrations. In UPN-1 cell lines. NVP-BEZ235 and AZD8055 induce significant increase ($p < 0.005$) of apoptosis in a dose–time-dependent manner but not temsirolimus, as evidenced by annexinV staining. Figure 2 (a) shows the results obtained after UPN-1 cells treatment; results represent the mean \pm sd obtained from one experiments, three data. Comparable results were obtained after Jeko-1 cells treatment. data not shown.

Inhibition of autophagy by bafilomycin A1 (BFA) enhances the effect of mTOR inhibitors: It was previously demonstrated that mTOR blockade induces autophagosome accumulation in MCL cells (42). We wanted to determine whether inhibition of autophagy can increase the effect of dual inhibitors compared to Temsirolimus. Cells were treated with the autophagy inhibitor Bafilomycin A1 (BFA; 5 and 10 nM/L) combined with NVP-BEZ235, AZD8055, Temsirolimus. BFA blocks the final steps of the autophagy process, i.e. prevents cargo degradation through neutralizing lysosomal PH and/or autophagosome : lysosome fusion(43). In JEKO cell lines, the inhibition of autophagy significantly decreases cell survival when combined with inhibition of mTOR signaling either by temsirolimus or by dual inhibitors NVP-BEZ235, AZD8055. We obtained a significant decrease in cell survival ($p < 0.05$). Figure 2(b).

mTOR inhibitors enhance the cytotoxic effect of a low dose of cytarabine which can inhibit 4EBP phosphorylation: High dose of cytarabine is known to be a treatment of reference in MCL. Cytarabine toxic effects are very important and do not allow the use of such treatment in elderly MCL patients(44). We evaluated the combination of a low dose of cytarabine with NVP-BEZ235, AZD8055 or temsirolimus. NVP-BEZ235 at (30 and 100 nM/L) enhanced the cytotoxicity triggered by a very low dose of cytarabine (10nM/L). We obtained up to 80% of decrease in UPN-1 cell lines survival and after 72 h, up to 70% of inhibition of cell survival was obtained also in JEKO cell lines but with a higher concentration (100 nM/L) of NVP-BEZ235, AZD8055 or temsirolimus figure 3.a.

By immunoblot experiment, we confirmed that new inhibitors but not temsirolimus can block Akt, S6 and 4EBP phosphorylation. We also found that cytarabine can inhibit the S6 and also 4EBP phosphorylation in UPN-1 cell lines. This may explain the enforced effect of this combination figure 3b.

Ibrutinib effect can be enhanced with a low dose of Cytarabine but not with mTOR inhibitors: although Ibrutinib is proved to be an important treatment in refractory MCL through many clinical studies, its effect still moderated as a single agent(45). We tried the treatment with ibrutinib combined with a low dose of cytarabine. In JEKO cell line, inhibition of cell survival increased from nearly 20% to 40% when using 10nM/L of cytarabine combined to 10 or 30 nM/L respectively. A more important effect (90% of cell survival inhibition) was obtained when using cytarabine at 30nM. In UPN-1 cell line, this effect was less important figure 4(b). However we obtained similar results with Mino cell lines (data not shown).

The interaction between PI3K/Akt/mTOR and Btk signaling has been demonstrated. When phosphorylated, Btk and Akt co-localized in the membrane ruffles and in the perinuclear region (46), also Btk activation has been reported to depend on PI3-K (47)(48). An additive effect was previously mentioned when combining ibrutinib to temsirolimus in ABC lymphoma cell lines (49). We combined ibrutinib respectively with AZD8055 and NVP-BEZ235. Unexpectedly, in JEKO cell lines, the combination of Ibrutinib and AZD8055 did not lead to a more important inhibition of cell survival. More importantly ibrutinib has antagonist effect with NVP-BEZ235. Figure 4 (c).

Ibrutinib has additif effect when combined with Doxorubicin and can decrease the expression of Gst π in MCL cell lines. Doxorubicin is an anthracycline and one of first line drugs used of MCL(50). A phase II study in non-Hodgkin lymphoma confirmed that the combination of ibrutinib and R-CHOP is well tolerated. But the efficacy is to be confirmed in a phase III study (51). Our results in MCL cell lines are encouraging. The combination of ibrutinib at 10, 30 nM respectively with doxorubicin at 100 nM/L led to a significant increase in cell survival inhibition (20% vs 60% in JEKO, and nearly 40% to 70% in UPN-1) figure 5a. However, mTOR inhibitors didn't achieve the same additive effect with doxorubicin. The co-treatment of JEKO cell lines with an mTOR inhibitor at 30 and 100 nM/L respectively combined with doxorubicin at 100 nM was not efficient when using BEZ235 and has unexpectedly an antagonist effect when using (AZD8055 and temsirolimus). Fig 5C. Since several data suggest that Gst π expression is elevated in MCL and can have a role in resistance to anthracycline (41) we tried by western blotting to study the effect of these drugs on Gst π expression. Interestingly Ibrutinib but not mTor inhibitors decreased Gst π expression fig 5.b and d. This may explain these final results.

Discussion:

Inhibitors of the mTOR pathway have an important clinical application in several human cancers. Recently, they gained attention in malignant hemopathies. The complexity of the mTOR pathway, highlights the need for ongoing research. In Mantle cell lymphoma, recent *in vitro*, *in vivo* and clinical studies confirmed the efficacy of temsirolimus derivative of rapamycin,. However, an important resistance is observed (52). Temsirolimus leads to an increased phosphorylated Akt by activation of PI3k feedback loop (16) Even more it doesn't blockade 4E-BP1 phosphorylation (53) and doesn't affect the cell cycle proteins cyclinD1 constitutively elevated in MCL (23). These mechanisms may explain tumor escapement to temsirolimus. Our data aligned with the other findings in mantle cell lymphoma but compare temsirolimus to two new inhibitors of mTOR pathway. We demonstrated that dual blockade of PI3K/Akt/mTORC1/C2 by two ATP competitive mTOR kinases inhibitors has a more detrimental impact on MCL cell lines survival. Unlike temsirolimus, inhibition of mTORC1 and mTORC2 by AZD8055 and of PI3K and mTORC1/2 by NVPBEZ235 resulted in apoptosis in MCL cell lines. Furthermore it can inhibit p4E-BP phosphorylation. 4E-BP1 (eIF4E Binding protein) is an important TORC1 substrate and has a very important role. It is the repressor of mRNA cap-binding protein eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E). These two factors are crucial translational regulators implicated in survival and apoptosis processes of cells. When phosphorylated by mTORC1, 4E-BP can release eIF4E and allow transcription. Even more lack of 4E-BP in lymphoma cell lines has been suggested as a mechanism of resistance to mTOR inhibitors (54). Interestingly in this study, we obtained a very important inhibition of MCL cell lines survival using a very low dose of aracytine 10 nM/L combined with very low dose of mTOR inhibitor. We also found that aracytine has an effect on mTOR pathway and can inhibit 4E-BP phosphorylation. These data allowed suggesting that the additive effect can be explained by the enforced inhibition of 4EBP phosphorylation. Aracytine has a referent treatment in MCL. Despite the important initial response, relapse still regular. Temsirolimus combination with high dose of cytarabine is currently evaluated in a phase I/II clinical study in DLBCL(55). Our results highlight the use of aracytine at a lower dose which may decrease frequent secondary effects and may allow the use of aracytine in elderly patients.

Recent advances led to the use of Ibrutinib in the treatment of NHL. Ibrutinib is a first-in-class, oral inhibitor of Bruton's Tyrosine kinase (BTK), which induce an irreversible inhibition of the downstream signaling of B cell receptor BCR (56). Clinical trials in relapsed or refractory MCL patients resulted in a moderated efficacy when using ibrutinib as a single agent. Relapse still considerable and only one third of patients remain progression-free at 24 months (57). In this project we have also obtained a moderated inhibition of cell survival when using ibrutinib alone, there for, we tried to combine it to other drugs. Our data are encouraging. Combined to Ibrutinib in JEKO cell lines, aracytine had significantly increased cell death. So far we obtained by immunoblotting that ibrutinib

can reduce 4E-BP phosphorylation. These results can explain the important inhibition of cell survival obtained when treating jeko cell lines with (ibrutinib and aracytine). These results may have a very important clinical application in MCL relapse. In contrast we obtained an unexpected antagonist effect with mTOR inhibitors. AZD8055 didn't increase cell death when combined to ibrutinb. Furthermore, NVPBEZ235 has led to an antagonist effect increasing cell line survival. In a previous data ibrutinib has showed an additive effect when combined with temsirolimus in ABC and GCB lymphoma cell lines (49). The mechanism of this antagonism remain not clear. In literature it was demonstrated that the phosphorylation of PI3K is crucial to induce the phosphorylation and recruiting of BTK (46). It is possible that BTK regulates translation and cell survival by regulating other kinases making another feedback effect on PI3K.

Finally, we have also combined doxorubicin to ibrutinib with an important additive effect in MCL cell lines. We didn't found the same effect when using mTOR inhibitors with doxorubicin. Trying to explain these data we studied the effect of these drugs on GST π expression. The interesting results of immunoblotting demonstrated that ibrutinib can reduce GST π which is implicated in anthracycline detoxification and MCL resistance to doxorubicine (41). More importantly, mTOR inhibitors didn't changed GST π expression and did not led to a sufficient effectiveness with anthracycline. These data could support the idea that ibrutinib but not mTOR inhibitors can allow – combined to anthracyclin- to treat refractory MCL.

Conclusion:

In conclusion, we have demonstrated a better efficacy of NVP-BEZ235 a dual inhibitor of PI3k/mTORC1/2 and AZD8055 mTORC1/C2 inhibitor in comparison to Temsirolimus in treatment of MCL cell lines, Furthermore, a low dose of NVP-BEZ235 and AZD8055 showed a clear additive effect in combination with a very low dose of cytarabine highlighting a potential utility in MCL. We also found that cytarabine can block the phosphorylation of 4EBP. We supposed that this may explain the effect of combination. Unexpectedly, NVP-BEZ235 and AZD8055 are antagonists with Ibrutinib. However, we demonstrated that Ibrutinb can also block 4EBP phosphorylation and has an additive effect with a low dose of cytarabine. Finally, ibrutinib decreased the expression of GST π in JEKO cell lines and increased the efficacy of doxorubicin wherever m-TOR inhibitors didn't change the expression of GST π and had no synergy with doxorubicin. The role of GST π is to be confirmed as an important element of the non-synergic effect between m-TOR inhibitors and anthracycline (Temsirolimus – Doxorubicin) in mantle cell lymphoma.

Figure legends:

Fig1. New m-TOR inhibitors AZD8055, NVPBEZ235 decrease cell survival compared to Temsirolimus. A) UPN-1, JEKO, cell lines were treated with increasing concentrations of m-TOR inhibitors. At 72 hours of treatment, cell viability was determined with cell titor Glo (promega). Cell viability is presented as percentage of cell survival inhibition (death cells), and non-treated cells were used as control. The Data \pm SEM are representative of three independent experiments performed in triplicate; $p < 0.05$.

Fig2.a) AZD 8055 and NVP BEZ 235 induce apoptosis in JEKO and UPN-1: cell lines were treated with increasing concentrations of m-TOR inhibitors AZD8055, NVPBEZ235, and with Temsirolimus, for 72 h. Apoptosis was determined by incorporation of Annexin V and Topro3. Apoptotic cells are presented as the percentage of AV positive and Topro3 negative. The Data \pm SD are the representation of three independent experiments performed in triplicate; $p < 0.05$. **b) Inhibition of autophagy in JEKO cell line decreases cell survival when combined with mTOR inhibitors.** JEKO cell lines were treated with bafilomycine at 5 and 10 nM combined with 30 and 100 nM of AZD8055 in BEZ235 and Temsirolimus respectively. Cell viability was determined with cell titor Glo. Cell viability is presented as percentage of cell survival inhibition (death cells), and non-treated cells were used as control. The mean \pm SEM are the representation of one experiment performed in triplicate.

Fig 3.a) Aracytine has an additive effect when used with mTOR inhibitors and can block S6 and 4EBP phosphorylation: a) UPN and JEKO cell lines were co-treated with an mTOR inhibitor : AZD8055, NVP BEZ 235, and temsirolimus at 30, and 100 nM respectively and aracytine at 10 nM for 72 h. Cell viability was determined with cell titor Glo. Cell viability is presented as percentage of cell survival inhibition, and non-treated cells were used as control. The mean \pm SEM are representative of one experiment performed in triplicate ($p < 0.05$). **b) MCL cell lines UPN-1** were treated for 4 h with AZD8055, NVPBEZ235 and Temsirolimus at 10, 100, and 1000 nM respectively. Whole cell lysates were then migrated on SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane. Specific proteins were detected using antibodies that recognize the indicated antigens. UPN-1 cell lines were treated with Aracytine at 0.1 and 1 μ M respectively for 4 hours. Phosphorylation of S6 and 4EBP was determined by immunoblot

Fig 4. Ibrutinib has an additive effect when used with Aracytine but an antagonist effect with mTOR inhibitors: a) JEKO and UPN-1, cell lines were treated with increasing concentrations of ibrutinib (10 to 1000 nM) for 72 h. Cell viability was determined with cell titor Glo. Cell viability is presented as percentage of cell survival inhibition (death cells), and non-treated cells were used as

control. The mean \pm SEM are the representation of one experiment performed in triplicate ($p < 0.05$). **b)** JEKO and UPN-1 cell lines were treated with Ibrutinib at 10, and 30 nM, with respectively 10 and 30 nM of Aracytine. At 72h, cell viability was determined. The mean \pm SEM are the representation of one experiment performed in triplicate. **c)** JEKO cell lines were treated with Ibrutinib at 30 and 100 nM respectively with 10, 30 and 100 nM of AZD8055, NVPBEZ235 respectively. Cell viability was determined and the mean \pm SEM are the representation of one experiment performed in triplicate.

Fig5. mTOR inhibitors have an antagonist effect when combined with Doxorubicin, and have no effect on the expression of GST π while Ibrutinib increases the effect of doxorubicin and decreases the expression of GST π . **a)** JEKO and UPN-1 cell lines were co-treated with 100 nM of Doxorubicin and Ibrutinib at 10 and 30 nM respectively. Cell viability was determined with cell titor Glo. Cell viability is presented as percentage of cell survival inhibition, and non-treated cells where used as control. The mean \pm SEM are the representation of one experiment performed in triplicate. **b)** JEKO cell lines were treated with Aracytine 0.1 and 1 μ M, Ibrutinb (0.3 and 1 μ M) and Temsirolimus (0.1 and 1 μ M) for 4 hours. GST π expression was determined by immunoblot. **c)** JEKO cell lines were co-treated with 100 nM of Doxorubicin, 30 and 100 nM of AZD8055, NVPBEZ235 and Temsirolimus respectively for 48 hours. Results is presented as percentage of cell survival inhibition, and non-treated cells where used as control. The mean \pm SEM are the representation of one experiment performed in triplicate. **d)** JEKO cell lines are treated with 0.1 and 1 μ M of AZD8055, NVPBEZ235 and Temsirolimus respectively for 24 hours. GST π expression was determined by immunoblot.

Figures:

Fig: 1

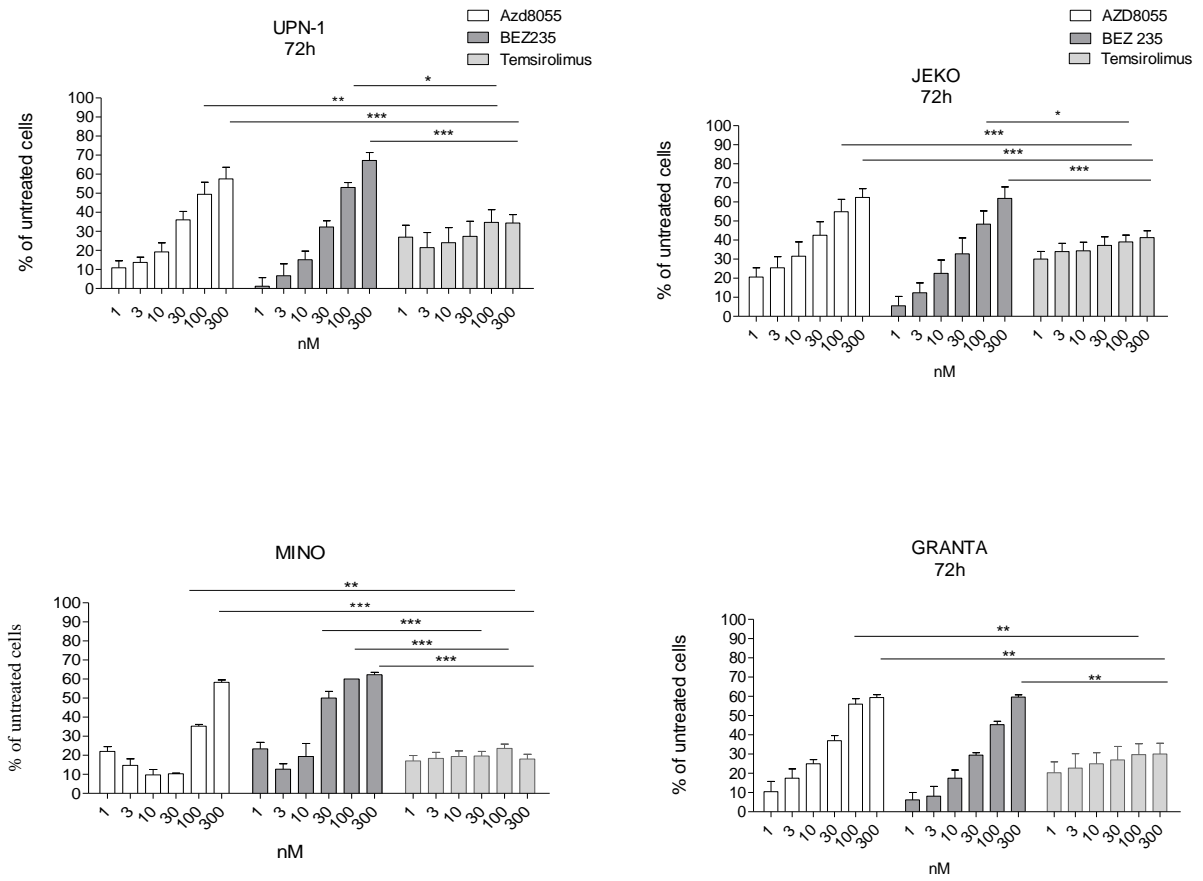
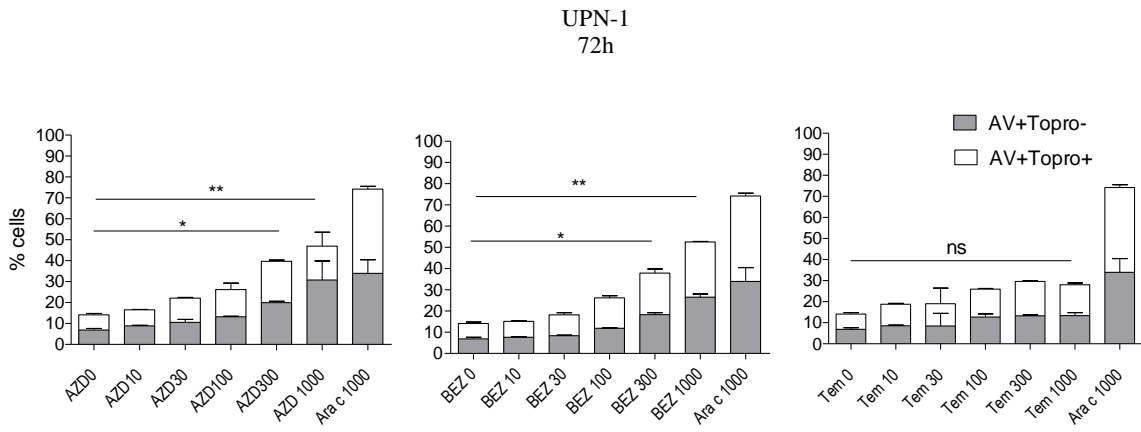


Fig: 2

a)



b)

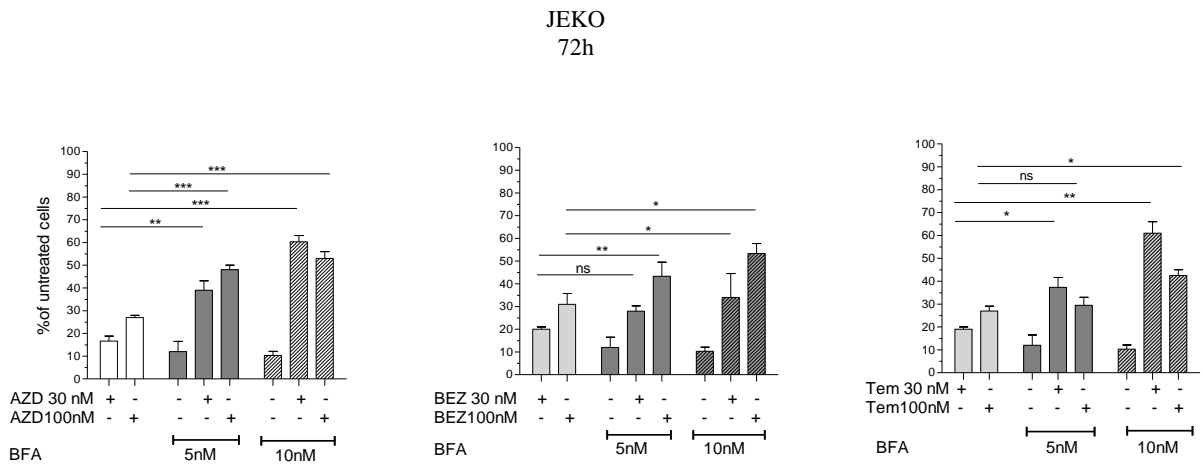
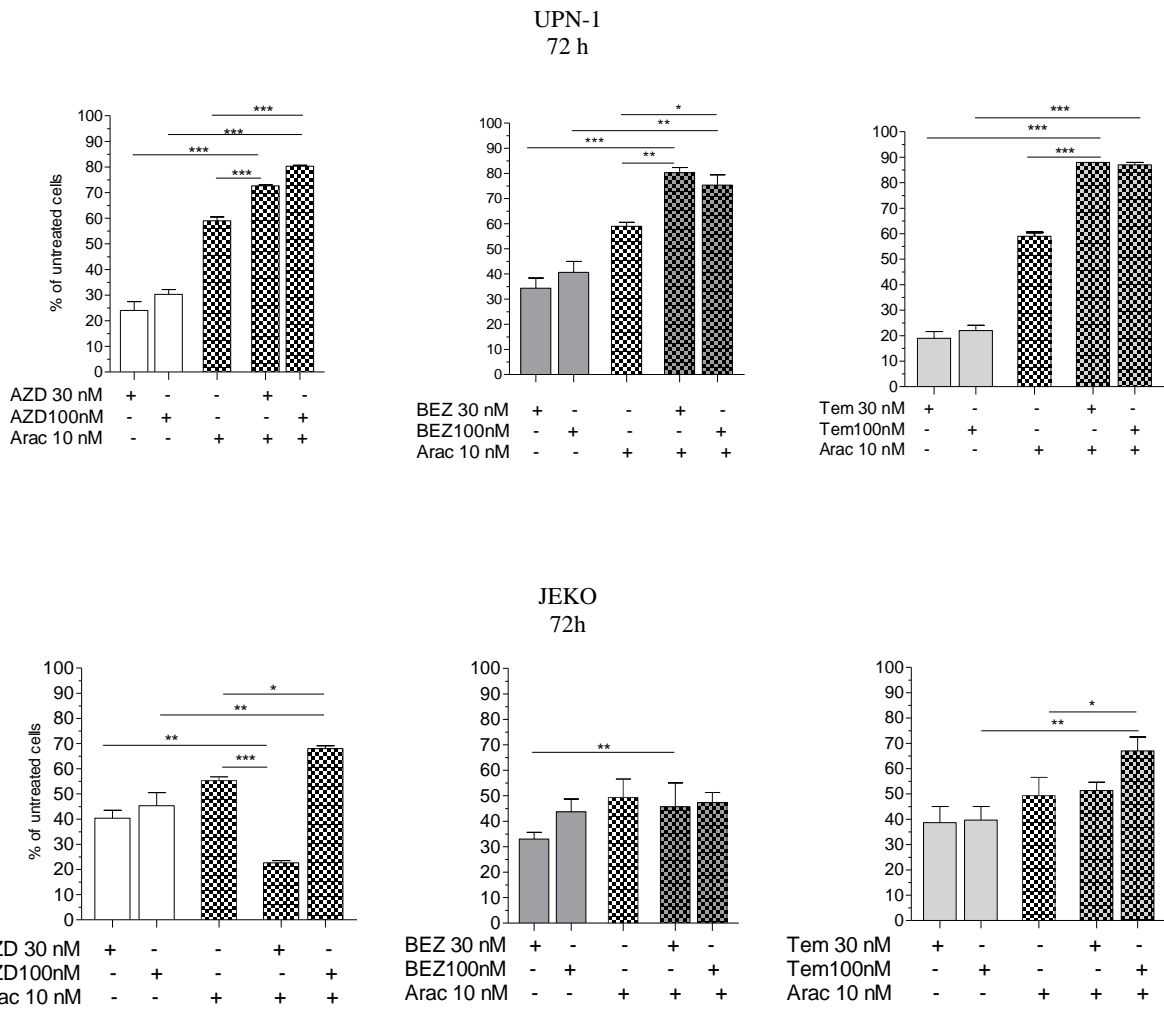


Fig.3.

a)



b)

UPN-1 4h

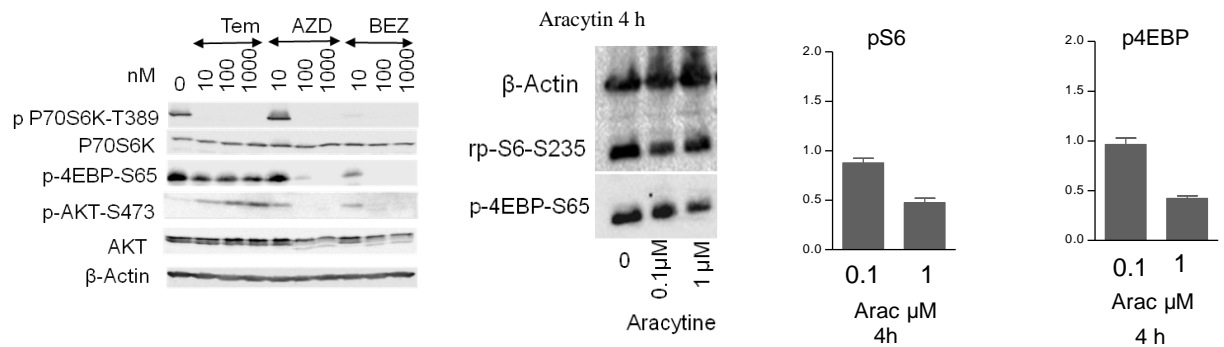
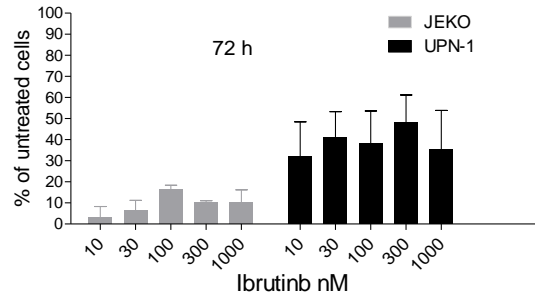
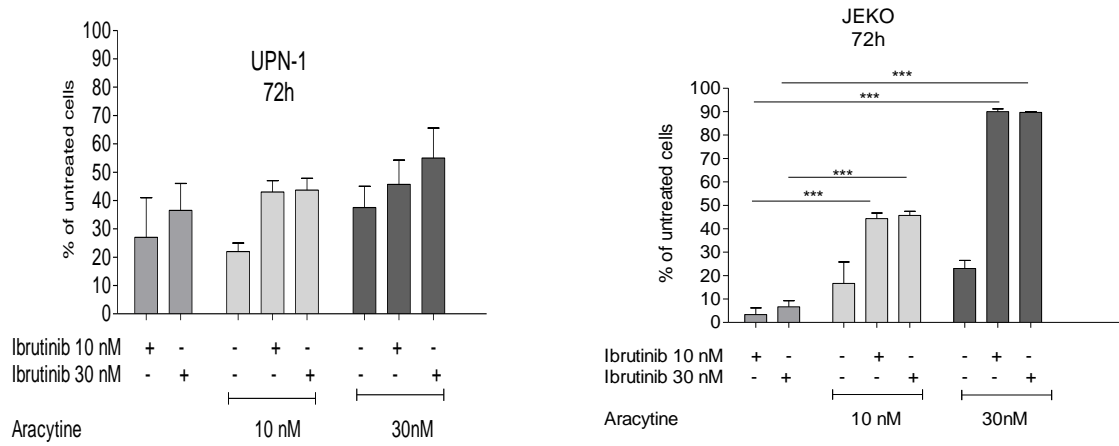


Fig.4.

a)



b)



c)

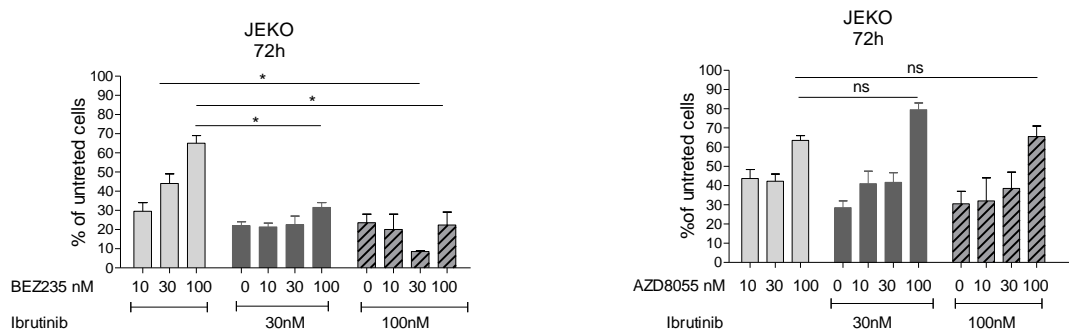
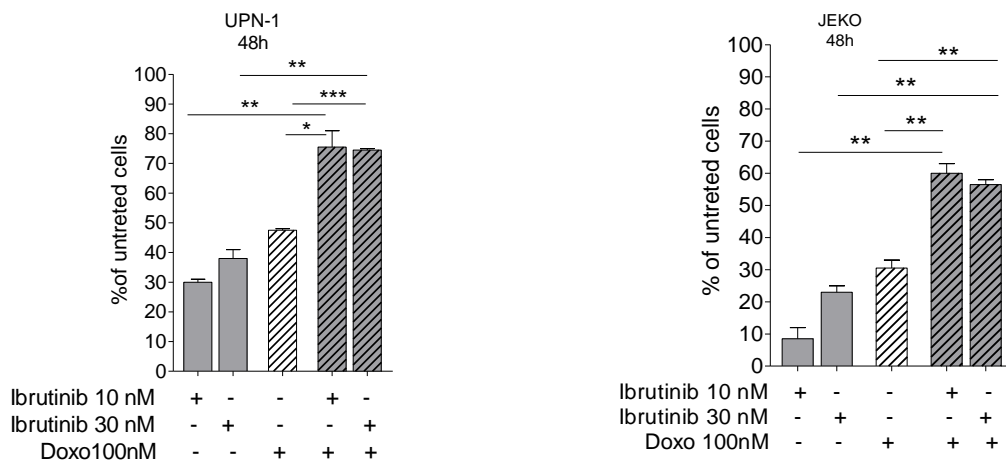
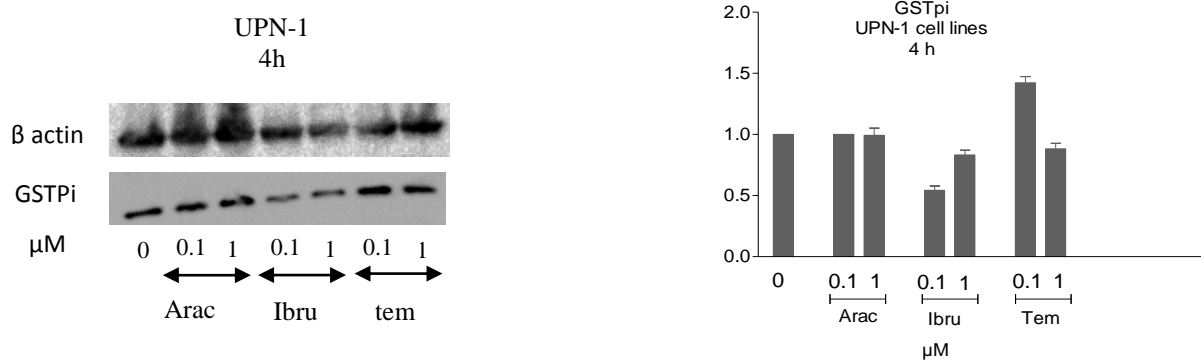


Fig 5.

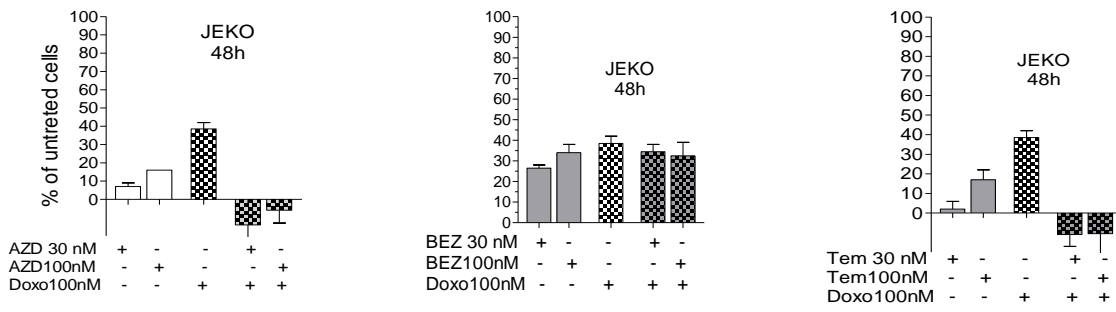
a)



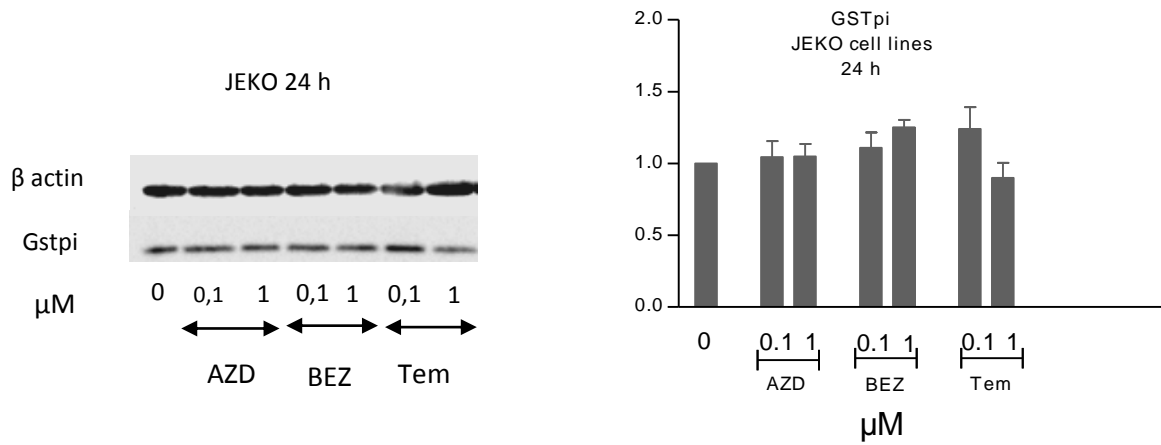
b)



C)



d)



Bibliography:

1. Dreyling M, Jurczak W, Jerkeman M, Silva RS, Rusconi C, Trneny M, et al. Ibrutinib versus t1. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008 [cited 2016 Sep 13]. Available from: <http://books.google.com/books?id=WqsTAQAAMAAJ>
2. Dreyling M, Jurczak W, Jerkeman M, Silva RS, Rusconi C, Trneny M, et al. Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 2016 Feb 26;387(10020):770–8.
3. Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V, Van Roosbroeck K, Pospíšilová H, Minnei F, et al. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5683–90.
4. Mozos A, Royo C, Hartmann E, De Jong D, Baró C, Valera A, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*. 2009 Nov;94(11):1555–62.
5. Thieblemont C, Rolland D, Baseggio L, Felman P, Gazzo S, Callet-Bauchu E, et al. Comprehensive analysis of GST-pi expression in B-cell lymphomas: Correlation with histological subtypes and survival. *Leuk Lymphoma*. 2008 Jul;49(7):1403–6.
6. Cheminant M, Robinson S, Ribrag V, Le Gouill S, Suarez F, Delarue R, et al. Prognosis and outcome of stem cell transplantation for mantle cell lymphoma. *Expert Rev Hematol*. 2015 Aug;8(4):493–504.
7. Hermine O, Hoster E, Walewski J, Bosly A, Stilgenbauer S, Thieblemont C, et al. Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Lancet Lond Engl*. 2016 Jun 13;
8. Vignon M, Venon M-D, Hermine O, Delarue R. Management of mantle cell lymphoma in the elderly: current and potential strategies. *Drugs Aging*. 2013 Dec;30(12):979–86.
9. Dal Col J, Zancai P, Terrin L, Guidoboni M, Ponzoni M, Pavan A, et al. Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008 May 15;111(10):5142–51.
10. Psyrris A, Papageorgiou S, Liakata E, Scorilas A, Rontogianni D, Kontos CK, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Sep 15;15(18):5724–32.
11. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007 Jul;12(1):9–22.
12. Fasolo A, Sessa C. mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 Nov 1;17(11):1717–34.
13. Fasolo A, Sessa C. Current and future directions in mammalian target of rapamycin inhibitors development. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011 Mar;20(3):381–94.
14. O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*. 2006 Feb 1;66(3):1500–8.
15. Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Mar;10(3):143–53.
16. Bhatt AP, Bhende PM, Sin S-H, Roy D, Dittmer DP, Damania B. Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas. *Blood*. 2010 Jun 3;115(22):4455–63.
17. Maira S-M, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther*. 2008 Jul;7(7):1851–63.

18. Shortt J, Martin BP, Newbold A, Hannan KM, Devlin JR, Baker AJ, et al. Combined inhibition of PI3K-related DNA damage response kinases and mTORC1 induces apoptosis in MYC-driven B-cell lymphomas. *Blood*. 2013 Apr 11;121(15):2964–74.
19. Bhende PM, Park SI, Lim MS, Dittmer DP, Damania B. The dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, is efficacious against follicular lymphoma. *Leukemia*. 2010 Oct;24(10):1781–4.
20. Chiarini F, Grimaldi C, Ricci F, Tazzari PL, Evangelisti C, Ognibene A, et al. Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2010 Oct 15;70(20):8097–107.
21. Müller A, Zang C, Chumduri C, Dörken B, Daniel PT, Scholz CW. Concurrent inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 overcomes resistance to rapamycin induced apoptosis by down-regulation of Mcl-1 in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2013 Oct 15;133(8):1813–24.
22. Kim A, Park S, Lee J-E, Jang W-S, Lee S-J, Kang HJ, et al. The dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 exhibits anti-proliferative activity and overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma cells. *Leuk Res*. 2012 Jul;36(7):912–20.
23. Civallero M, Cosenza M, Marcheselli L, Pozzi S, Sacchi S. NVP-BEZ235 alone and in combination in mantle cell lymphoma: an effective therapeutic strategy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012 Nov;21(11):1597–606.
24. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res*. 2010 Jan 1;70(1):288–98.
25. Naing A, Aghajanian C, Raymond E, Olmos D, Schwartz G, Oelmann E, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD8055 in advanced solid tumours and lymphoma. *Br J Cancer*. 2012 Sep 25;107(7):1093–9.
26. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Jan 1;31(1):88–94.
27. Buggy JJ, Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *Int Rev Immunol*. 2012 Apr;31(2):119–32.
28. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010 Jan 7;463(7277):88–92.
29. Satterthwaite AB, Witte ON. The role of Bruton's tyrosine kinase in B-cell development and function: a genetic perspective. *Immunol Rev*. 2000 Jun;175:120–7.
30. Cinar M, Hamedani F, Mo Z, Cinar B, Amin HM, Alkan S. Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis. *Leuk Res*. 2013 Oct;37(10):1271–7.
31. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 20;107(29):13075–80.
32. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013 Aug 8;369(6):507–16.
33. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R, et al. Ibrutinib in previously treated Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2015 Apr 9;372(15):1430–40.
34. Woyach JA, Furman RR, Liu T-M, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014 Jun 12;370(24):2286–94.
35. Chiron D, Di Liberto M, Martin P, Huang X, Sharman J, Bleuca P, et al. Cell Cycle Reprogramming for PI3K Inhibition Overrides Relapse-Specific C481S BTK Mutation Revealed by Longitudinal Functional Genomics in Mantle Cell Lymphoma. *Cancer Discov*. 2014 Sep;4(9):1022–35.

36. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. 2015 Aug;21(8):922–6.
37. Lefrère F, Delmer A, Suzan F, Levy V, Belanger C, Djabbari M, et al. Sequential chemotherapy by CHOP and DHAP regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation induces a high rate of complete response and improves event-free survival in mantle cell lymphoma: a prospective study. *Leukemia*. 2002 Apr;16(4):587–93.
38. Delarue R, Haioun C, Ribrag V, Brice P, Delmer A, Tilly H, et al. CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2013 Jan 3;121(1):48–53.
39. Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Jerkeman M, Rätty R, Andersen NS, et al. Nordic MCL2 trial update: six-year follow-up after intensive immunochemotherapy for untreated mantle cell lymphoma followed by BEAM or BEAC + autologous stem-cell support: still very long survival but late relapses do occur. *Br J Haematol*. 2012 Aug;158(3):355–62.
40. Klanova M, Lorkova L, Vit O, Maswabi B, Molinsky J, Pospisilova J, et al. Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents. *Mol Cancer*. 2014;13:159.
41. Bennaceur-Griscelli A, Bosq J, Koscielny S, Lefrère F, Turhan A, Brousse N, et al. High level of glutathione-S-transferase pi expression in mantle cell lymphomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 May 1;10(9):3029–34.
42. Rosich L, Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Campo E, Colomer D, Roué G. Counteracting autophagy overcomes resistance to everolimus in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Oct 1;18(19):5278–89.
43. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008 Feb;4(2):151–75.
44. Delfau-Larue M-H, W, Berger F, Jardin F, Briere J, Salles G, et al. High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2015 Jul 30;126(5):604–11.
45. Martin P. Ibrutinib—a new standard treatment for relapsed mantle cell lymphoma? *The Lancet*. 2016 Feb 26;387(10020):728–9.
46. Lindvall J, Islam TC. Interaction of Btk and Akt in B cell signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 24;293(5):1319–26.
47. Nore BF, Vargas L, Mohamed AJ, Brandén LJ, Bäckesjö CM, Islam TC, et al. Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur J Immunol*. 2000 Jan;30(1):145–54.
48. Várnai P, Rother KI, Balla T. Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Membrane Association of the Bruton's Tyrosine Kinase Pleckstrin Homology Domain Visualized in Single Living Cells. *J Biol Chem*. 1999 Apr 16;274(16):10983–9.
49. Zoellner A-K, Bayerl S, Hutter G, Zimmermann Y, Hiddemann W, Dreyling M. Temsirolimus inhibits cell growth in combination with inhibitors of the B-cell receptor pathway. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(12):3393–400.
50. Dreyling M, Kluijn-Nelemans HC, Beà S, Klapper W, Vogt N, Delfau-Larue M-H, et al. Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 11th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Leuk Lymphoma*. 2013 Apr;54(4):699–707.
51. Younes A, Thieblemont C, Morschhauser F, Flinn I, Friedberg JW, Amorim S, et al. Combination of ibrutinib with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) for treatment-naïve patients with CD20-positive B-cell non-Hodgkin lymphoma: a non-randomised, phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2014 Aug;15(9):1019–26.
52. Coiffier B. Clinical efficacy and management of temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013 Aug;13(4):351–9.

53. Willems L, Tamburini J, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep*. 2012 Apr;14(2):129–38.
54. Mallya S, Fitch BA, Lee JS, So L, Janes MR, Fruman DA. Resistance to mTOR kinase inhibitors in lymphoma cells lacking 4EBP1. *PloS One*. 2014;9(2):e88865.
55. Witzens-Harig M, Memmer ML, Dreyling M, Hess G. A phase I/II trial to evaluate the safety, feasibility and activity of salvage therapy consisting of the mTOR inhibitor Temsirolimus added to standard therapy of Rituximab and DHAP for the treatment of patients with relapsed or refractory diffuse large cell B-Cell lymphoma - the STORM trial. *BMC Cancer*. 2013;13:308.
56. Martin P, Maddocks K, Leonard JP, Ruan J, Goy A, Wagner-Johnston N, et al. Post-ibrutinib outcomes in patients with mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016 Jan 1;blood-2015-10-673145.
57. Wang ML, Blum KA, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Long-term follow-up of MCL patients treated with single-agent ibrutinib: updated safety and efficacy results. *Blood*. 2015 Aug 6;126(6):739–45.

Data supplémentaires

Matériels et Méthodes

Cultures des cellules primaires: Les cellules primaires sont obtenues de l'ascite de patients atteints de LCM. Les lymphocytes sont isolés par un Ficoll, triés par FACS Aria II Sorp (>80% de cellules LCMCD19⁺CD5⁺) (figure 35, data supplémentaire a) puis congelés à moins 80°C en SVF10% DMSO jusqu'à utilisation.

Pour la culture les cellules sont mises en culture dans un milieu conditionné : 300ml alpha MEMsupplémenté avec 50 ml du sérum de cheval, 50 ml du sérum de veau, 400µl d'Inositol à 0.2 M, 800 µl de 2 ME (mercapto ethanol) à 50 mM et 4ml de L-glutamine à 200mM.

Des plaques opaques de 96 puits ont été traitées par 50 µl/puits de milieu conditionné avec CD40L (R&D System ref: AF632) à 1µl/ml (2h à 37°C). Les cellules primaires sont suspendues à 1X10⁶ cellules/ml et distribuées à 100 µl/puits. Après une incubation d'une semaine, un test de viabilité cellulaire Glo est réalisé. Différentes conditions de culture des cellules primaires (IL-4-CD40L-, IL-4+CD40L-, IL-4-CD40L+, IL-4+CD40L+) ont été testées en présence de l'AZD8055 pour une semaine. L'IL-4 est ajoutée à 2 nM/ml. Nous avons finalement choisi la culture avec du CD40L sans IL4 afin de comparer l'effet des différents inhibiteurs sur les cellules primaires. (**figure 36** data supplémentaire b et c).

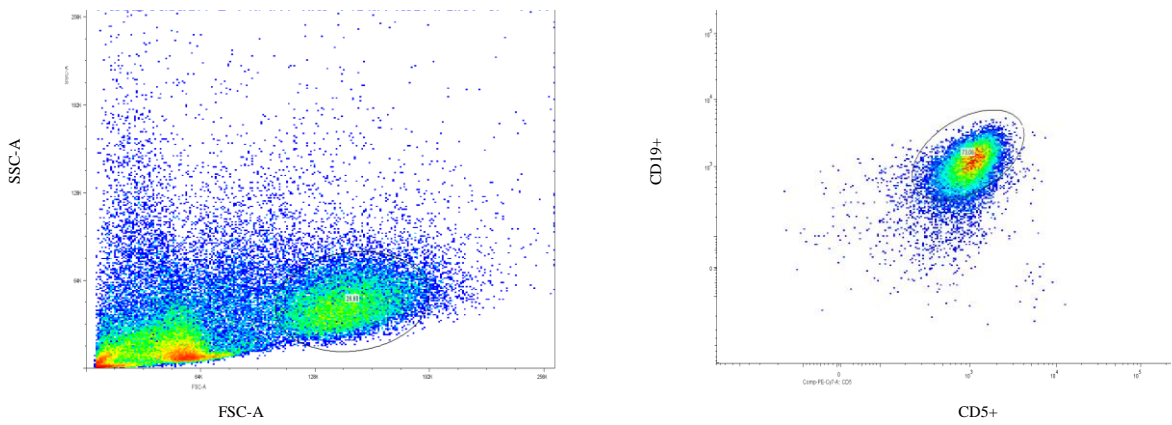
Test BrdU pour le cycle cellulaire :

BrdU (Bromdeoxyuridine) analogue de la thymidine est capable de s'incorporer dans l'ADN nouvellement synthétisé. Les cellules incorporant le BrdU sont détectées par un anticorps anti-BrdU et analysés par FACS. Dans ce projet nous avons utilisé le kit APC BrdU flow kit (BD Biosciences). Les cellules sont également marquées avec du 7AAD. Ce double marquage permet de caractériser les phases du cycle cellulaire : G0/1, S, G2/M.

Analyses statistiques : les analyses sont effectuées par le logiciel GraphPad Prism. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Les *Student's t-test* sont exploités pour comparer 2 groupes entre eux. Les différences sont considérées significatives quand la valeur du p est inférieure à 0.05 (*), 0.01 (**) ou 0.001 (***).

Résultats supplémentaires :

a)



b)

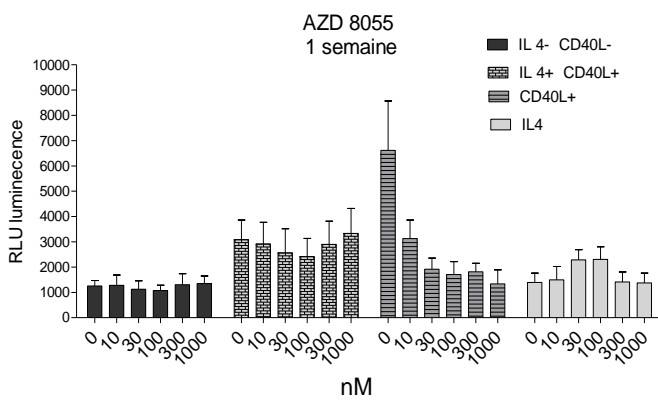
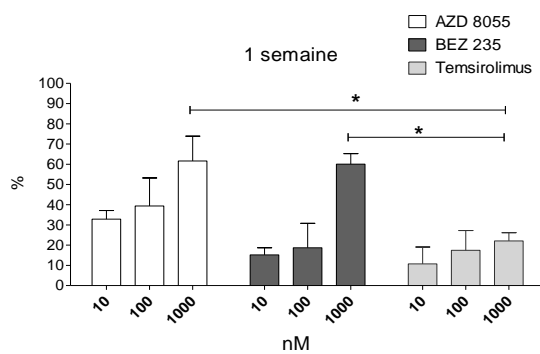


Figure 36 :tester les nouveaux inhibiteurs de mTORdans des cellules primaires LCM

a) Tri des cellules primaires LCM CD5⁺ CD19⁺

b) Culture des cellules primaire à (1x10⁶/ml) dans différente condition (± IL4, CD40). Les cellules triées sont traitées par des doses croissantes d'AZD8055 pour une semaine

c)



c) Les cellules primaires à (1x10⁶/ml) sont traitées pour une semaine par des concentrations croissantes de temsirolimus, AZD8055, NVPBEZ235 dans le milieu conditionné et en présence de CD40L.

DISCUSSION :

L'efficacité du temsirolimus comme traitement de rechute dans le lymphome à cellules du manteau s'est révélée limitée dans de nombreuses études cliniques avec une rechute constante. Cela a conduit à poursuivre les études précliniques et cliniques afin d'évaluer d'autres molécules. Dans ce projet, nous avons d'abord comparé l'effet du temsirolimus à celui de deux nouvelles molécules inhibitrices de la voie PI3K-Akt-mTOR. Notre projet a permis de confirmer une inhibition renforcée de la voie PI3k-Akt-mTOR en utilisant :

- AZD8055, un torkinib inhibiteur de deux complexes mTORC1 et 2.
- NVP-BEZ235 un dual inhibiteur de PI3K et mTORC1 et 2.

Nos résultats démontrent un avantage de l'effet cytotoxique de ces nouveaux inhibiteurs dans quatre lignées cellulaires (UPN-1, JEKO, GRANTA, MINO). Nous avons obtenu une inhibition jusqu'à 70% de la survie cellulaire à la dose de 300nM d'AZD8055 et de NVP-BEZ235 ($p < 0.05$). Cette inhibition est plus faible avec le temsirolimus (50%).

Nous avons démontré que les nouveaux inhibiteurs induisent l'apoptose d'une manière dose dépendante contrairement au temsirolimus. Ce dernier n'induit pas l'apoptose dans la lignée UPN-1 et son effet est peu significatif dans la lignée JEKO. Ces résultats s'accordent avec les données précédemment rapportées. Le temsirolimus a plutôt un effet cytostatique et non pas un effet cytotoxique (Wang et al. 2010).

Dans l'ensemble des résultats obtenus nous avons constaté des variations entre les réponses des différentes lignées cellulaires. Par exemple l'induction d'apoptose n'est pas significativement dose dépendante dans la lignée JEKO. Cette lignée est aussi moins sensible à l'association (Arac- inhibiteur PI3K/AKT/mor) et également à l'ibrutinib. Pour répondre à cette problématique j'ai essayé de résumer les caractéristiques majeures de ces lignées dans le tableau suivant. **Tableau 3.** (Thieblemont et al. 2008)(Beà et al. 2013)(Camps et al. 2006)(Amin et al. 2003)(M'kacher et al. 2003)

	Jeko	Mino	Granta	UPN-1
Morphologie			Ammas cellulaire	
EBV	-	-	+	-
Temps de doublement	24-72h	24-72h	24-72h	
Expression de CCND1	+	+	+	+
T(11 ;14)	+	+	+	+
SOX11	+	+	+	ND
<i>IGHV</i>	Nun muté (beà et al)	Nun muté (beà et al)	ND	
<i>TP53</i>	Del/muté (campus et al)	Muté en exon5 (amin et al)	Del/WT (campus et al)	muté
<i>ATM</i>	NM (beà et al) ou amplifié (campus et al)	Nun muté	Nun muté (campus et al)	Non muté
<i>C-MYC</i>	+ (amin et al)	+ (amin et al)	- (amin et al)	+ (M'kacher et al)
<i>P16^{INK4}</i>	+	+	-	ND

Tableau 3 : comparaison de caractéristiques majeures des lignées du LCM

Concernant l'effet de nouveaux inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR sur le cycle cellulaire, des résultats contradictoires ont été rapportés. De nombreuses études ont démontré l'absence d'effet de temsirolimus sur le cycle cellulaire (Hipp et al. 2005). Cependant, Wang *et al* ont étudié son effet sur l'expression de la cycline D1 ainsi que sur le cycle cellulaire dans des échantillons de patients atteints de LCM réfractaire. La comparaison des échantillons avant et après traitement par temsirolimus démontre que ce dernier bloque le cycle cellulaire en phase G0-G1 (Wang et al. 2010). Dans notre projet et dans la lignée cellulaire UPN-1 nous avons révélé que les nouveaux inhibiteurs NVP-BEZ235 et AZD8055 bloquent le passage en phase S du cycle cellulaire d'une manière plus importante que le temsirolimus. Ensuite, nous avons testé par western blot l'effet de ces trois drogues sur l'expression des protéines du cycle cellulaire. Les nouveaux inhibiteurs diminuent l'expression de la cycline D1 surexprimée dans 90% des LCM. Plus important encore, nous avons obtenu une amplification de l'expression de p27 en traitant les cellules JEKO pendant 24h par le NVP-BEZ235. Cette protéine est connue pour provoquer l'arrêt du cycle cellulaire en G1. Elle est normalement dissociée et dégradée dans les LCM. **figure 37.**

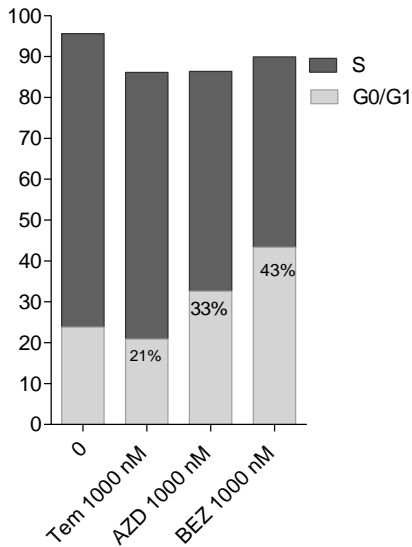
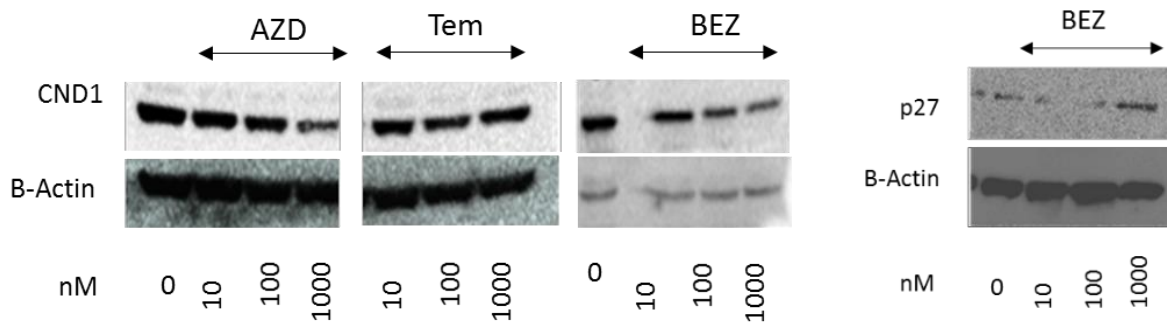


Figure 37: comparer l'effet d'AZD8055, NVP-BEZ235 et temsirolimus sur le cycle cellulaire

a) BrdU (Bromdeoxyuridine) analogue de thymidine est capable de s'incorporer dans l'ADN nouveau synthétisé. Les cellules incorporées par BrdU sont détectées par un anticorps anti BrdU. Les cellules UPN-1 stimulées par le Temsirolimus (tem), AZD8055 (AZD) et NVP-BEZ235 (BEZ) à la dose de 1 μ M pendant 24h, ensuite marquées par APC BrdU et 7AAD et analysée par FACS. Les résultats représentent le pourcentage de cellules en phases G0/1, S (résultats d'une seule expérience)



b) **Immunoblot des protéines de cycle cellulaire** : Le lysat cellulaire des cellules JEKO traitées à la dose indiquée pendant 24 h est utilisé en western blot.

Il est important de confirmer les résultats dans d'autres lignées de LCM et d'étudier l'effet des drogues (NVP-BEZ235 et l'AZD8055) sur les autres protéines jouant un rôle dans le cycle cellulaire comme les protéines p15 et p21.

Cette efficacité d'une inhibition renforcée de la voie PI3K et de ces substrats est démontrée dans plusieurs pathologies malignes, notamment dans les lymphomes en général et dans le lymphome à cellules du manteau en particulier. En 2013, OSI-27, un inhibiteur de mTORC1 et 2, a été comparé à la rapamycine dans la lignée JEKO. Il a été démontré que OSI-27 peut induire l'apoptose par l'activation la transcription des gènes PUMA et Bim. Il diminue aussi la prolifération des lignées cellulaires JEKO. Cette molécule a aussi abouti à une régression de xénogreffes sous-cutané des cellules JEKO dans des souris nu/nu (Gupta et al. 2012).

Le NVP-BEZ235 s'est révélé également capable d'induire l'apoptose et d'arrêter le cycle cellulaire en phase G1(Kim et al. 2012)(Civallero et al. 2012).

Dans notre étude, nous avons comparé ces trois familles d'inhibiteurs dans des lignées cellulaires mais aussi dans les cellules primaires de LCM (data supplémentaires).

La culture des cellules primaires de LCM reste compliquée à l'heure actuelle. De nombreuses conditions de culture cellulaire ont été testées mais la cellule de LCM est un lymphocyte différencié, difficile à amplifier et à garder en culture de manière durable. L'interaction CD40/CD40Ligand (CD40L) a un rôle important dans la prolifération et la survie des lymphocytes B(Andersen et al. 2000).En stimulant les cellules primaires par le CD40L soluble, nous avons obtenu des résultats encourageants d'une culture d'une semaine en utilisant des cellules primaires issues de l'ascite d'un patient atteint d'un LCM réfractaire.

Ensuite, nous nous sommes interrogés sur les limites potentielles de ces inhibiteurs. Plusieurs voies de signalisation pourraient compenser l'inhibition de la voie PI3K. Les doses d'inhibiteurs de la voie mTOR utilisées dans ce projet (dans l'ordre de nM) sont capables d'inhiber la signalisation mTOR mais aussi d'induire l'autophagie dont le rôle est crucial dans l'échappement tumoral.

J'ai donc associé ces inhibiteurs de mTOR à la bafilomycine A1, un inhibiteur de l'étape retardée de l'autophagie. J'ai obtenu une inhibition plus importante de la survie cellulaire. Ces résultats s'accordent avec des données déjà documentés. Les trois inhibiteurs de la voie PI3K /AKT/mTOR induisent l'autophagie de la même façon. Actuellement il est fortement suggéré que l'induction d'autophagie est liée à l'inhibition de la voie mTOR. Plusieurs études *in vitro* l'ont confirmé(Jung et al. 2010). D'un autre point de vue, l'autophagie persistante pourrait induire la mort autophagique (Sini et al. 2010) . C'est donc un mécanisme compliqué qui mérite des études plus approfondies.

Dans la deuxième partie de ce projet, j'ai démontré que la combinaison (mTOR –Aracytine) pourrait être d'un grand bénéfice dans le LCM. Le rôle de l'aracytine dans le traitement des lymphomes est connu. De plus, une étude clinique réalisée récemment propose cette combinaison comme un traitement de rechute dans le lymphome B à grandes cellules(Witzens-Harig et al. 2013). J'ai pu confirmer l'effet additif de l'aracytine combiné avec le temsirolimus dans les lignées cellulaires de LCM. Les doses utilisées dans ce projet sont dans l'ordre de 10 nM pour l'aracytine en association à des doses dans l'ordre de 30 et 100nM des inhibiteurs de mTOR kinase. Cela suggère une application clinique en utilisant des doses moins toxiques d'aracytine afin de diminuer les effets secondaires de cette chimiothérapie très lourde. Enfin, pour expliquer cet effet additif, j'ai démontré que l'aracytine inhibe la phosphorylation de 4EBP.

Cette inhibition renforcée de ce dernier peut être le mécanisme de l'effet additif de l'association de deux drogues. L'aracytine à 1 μM est capable de diminuer l'expression de p4EBP jusqu'à 50%. Dans ce contexte, étant donné l'importance de l'autophagie dans l'échappement tumoral et/ou la mort autophagique, il serait intéressant d'explorer le rôle de l'aracytine dans l'induction d'autophagie via une inhibition de la voie mTOR.

Dans la troisième partie de ce projet, j'ai abordé l'inhibition de la voie Btk, une autre voie de signalisation dont le rôle est crucial dans la pathogénèse du LCM ainsi que dans d'autres maladies lymphoïdes. Associé à l'aracytine, l'ibrutinib a un effet thérapeutique plus important. J'ai pu démontrer que l'ibrutinib inhibe aussi la phosphorylation des protéines de la voie mTOR notamment la 4EBP dans la lignée UPN-1. Ce dernier résultat pourrait expliquer l'effet additif de la combinaison (Aracytine –Ibrutinib). **figure 38.**

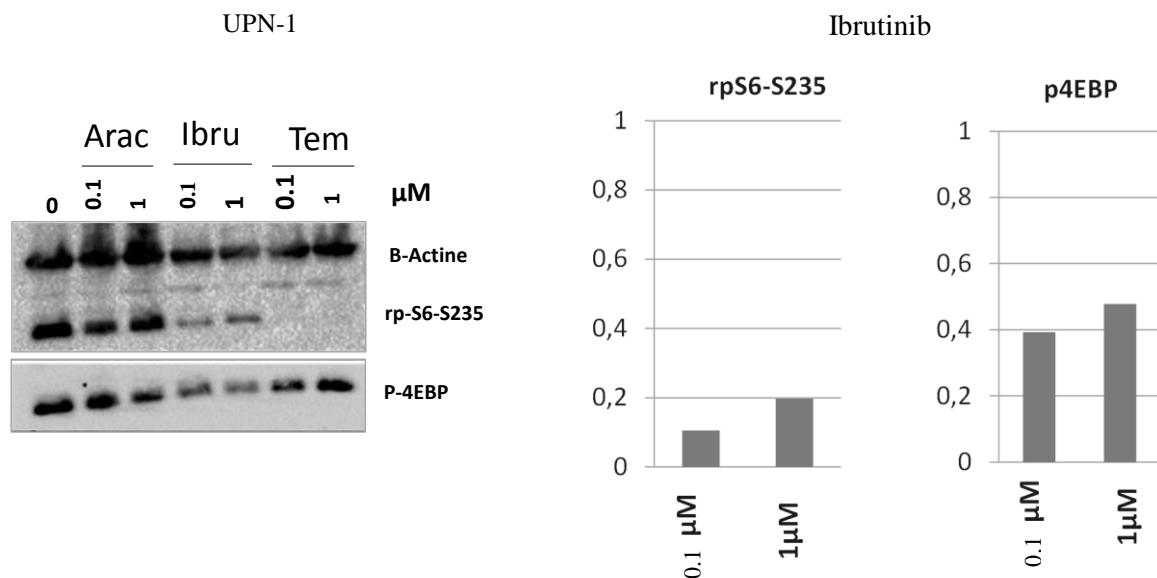


Figure 38 : L'ibrutinib inhibe la phosphorylation de substrats de mTOR kinase Le lysat cellulaire des cellules UPN-1 traitées à la dose indiquée pour 4h est utilisé en western blot.

Contrairement à ce que nous nous attendions, l'ibrutinib n'a pas d'effet synergique avec les inhibiteurs de la voie PI3k-Akt-mTOR testés dans ce projet. Nous n'avons pas encore d'explication à cette observation. L'interaction entre les voies de signalisation pourrait avoir un rôle en activant d'autres voies alternatives et en diminuant l'effet cytotoxique des deux molécules. Nos résultats méritent d'être complétés afin d'identifier les voies impliquées.

Dans la dernière partie de ce projet, nous avons testé l'effet de l'association de doxorubicine étant donné sa large utilisation pour le traitement des maladies lymphoïdes. Nous avons pu démontrer dans deux lignées cellulaires de LCM (UPN-1 et JEKO) un effet additif de la combinaison entre la doxorubicine et l'ibrutinib. Ces résultats concordent avec les études cliniques menées actuellement. Afin de décortiquer ces résultats nous avons étudié l'effet de l'ibrutinib sur l'expression de l'enzyme GST π surexprimé dans le LCM. Nos résultats ont révélé que l'ibrutinib pouvait sensibiliser les LCM réfractaires résistants aux anthracyclines en diminuant l'expression de l'enzyme de détoxification GST π . Il est crucial de compléter cette étude par une mesure de l'activité enzymatique de GST π dans ce contexte.

CONCLUSION:

Dans ce projet nous avons pu mettre en évidence l'efficacité de plusieurs associations de nouvelles molécules dans le LCM. Nous avons montré que l'aracytine présente un effet additif avec inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR et que cet effet pourrait être lié à l'inhibition de la phosphorylation de 4EBP. Dans un deuxième temps nous avons démontré que l'Ibrutinib a également un effet additif en combinaison avec l'aracytine mais qu'il existe un antagonisme avec les inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR. Enfin, l'ibrutinib diminue l'expression de GST π contrairement aux inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR, il peut alors sensibiliser les cellules du LCM au traitement par l'anthracycline. Cette étude pourrait constituer une base préclinique dans le cadre de l'utilisation de ces drogues en association dans le LCM.

Bibliographie

- Aita, V. M., X. H. Liang, V. V. Murty, D. L. Pincus, W. Yu, E. Cayanis, S. Kalachikov, T. C. Gilliam, et B. Levine. 1999. « Cloning and Genomic Organization of Beclin 1, a Candidate Tumor Suppressor Gene on Chromosome 17q21 ». *Genomics* 59 (1): 59- 65.
doi:10.1006/geno.1999.5851.
- Alain, Tommy, Masahiro Morita, Bruno D. Fonseca, Akiko Yanagiya, Nadeem Siddiqui, Mamatha Bhat, Domenick Zammit, et al. 2012. « eIF4E/4E-BP Ratio Predicts the Efficacy of mTOR Targeted Therapies ». *Cancer Research* 72 (24): 6468- 76. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2395.
- Amin, Hesham M., Timothy J. McDonnell, L. Jeffrey Medeiros, Georgios Z. Rassidakis, Vasiliki Leventaki, Sean L. O'Connor, Michael J. Keating, et Raymond Lai. 2003. « Characterization of 4 Mantle Cell Lymphoma Cell Lines ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 127 (4): 424-31. doi:10.1043/0003-9985(2003)127<0424:COMCLC>2.0.CO;2.
- Anderson, M. E., et A. Meister. 1983. « Transport and Direct Utilization of Gamma-Glutamylcyst(e)ine for Glutathione Synthesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (3): 707- 11.
- Andersen, N. S., J. K. Larsen, J. Christiansen, L. B. Pedersen, N. S. Christophersen, C. H. Geisler, et J. Jurlander. 2000. « Soluble CD40 Ligand Induces Selective Proliferation of Lymphoma Cells in Primary Mantle Cell Lymphoma Cell Cultures ». *Blood* 96 (6): 2219-25.
- Argatoff, L. H., J. M. Connors, R. J. Klasa, D. E. Horsman, et R. D. Gascoyne. 1997. « Mantle Cell Lymphoma: A Clinicopathologic Study of 80 Cases ». *Blood* 89 (6): 2067- 78.
- Armand, Philippe, Robert Redd, Jad Bsai, Sangeetha Mayuram, Angela Giardino, David C. Fisher, Ann S. LaCasce, et al. 2016. « A Phase 2 Study of Rituximab-Bendamustine and Rituximab-Cytarabine for Transplant-Eligible Patients with Mantle Cell Lymphoma ». *British Journal of Haematology*, janvier. doi:10.1111/bjh.13929.
- Ban, N., Y. Takahashi, T. Takayama, T. Kura, T. Katahira, S. Sakamaki, et Y. Niitsu. 1996. « Transfection of Glutathione S-Transferase (GST)-Pi Antisense Complementary DNA Increases the Sensitivity of a Colon Cancer Cell Line to Adriamycin, Cisplatin, Melphalan, and Etoposide ». *Cancer Research* 56 (15): 3577- 82.
- Banks, P. M., J. Chan, M. L. Cleary, G. Delsol, C. De Wolf-Peeters, K. Gatter, T. M. Grogan, N. L. Harris, P. G. Isaacson, et E. S. Jaffe. 1992. « Mantle Cell Lymphoma. A Proposal for Unification of Morphologic, Immunologic, and Molecular Data ». *The American Journal of Surgical Pathology* 16 (7): 637- 40.
- Barista, I., J. E. Romaguera, et F. Cabanillas. 2001. « Mantle-Cell Lymphoma ». *The Lancet.Oncology* 2 (3): 141- 48. doi:10.1016/S1470-2045(00)00255-2.
- Beà, Sílvia, Rafael Valdés-Mas, Alba Navarro, Itziar Salaverria, David Martín-Garcia, Pedro Jares, Eva Giné, et al. 2013. « Landscape of Somatic Mutations and Clonal Evolution in Mantle Cell Lymphoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (45): 18250- 55.
doi:10.1073/pnas.1314608110.
- Bennaceur-Griscelli, Annelise, Jacques Bosq, Serge Koscielny, François Lefrère, Ali Turhan, Nicole Brousse, Olivier Hermine, et Vincent Ribrag. 2004. « High Level of Glutathione-S-Transferase Pi Expression in Mantle Cell Lymphomas ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (9): 3029- 34.
- Bernard, M., R. Gressin, F. Lefrère, B. Drénou, B. Branger, S. Caulet-Maugendre, P. Tass, et al. 2001. « Blastic Variant of Mantle Cell Lymphoma: A Rare but Highly Aggressive Subtype ». *Leukemia* 15 (11): 1785- 91.
- Binder, Mascha, Barbara Léchenne, Ramesh Ummanni, Christan Scharf, Stefan Balabanov, Maria Trusch, Hartmut Schlüter, Ingke Braren, Edzard Spillner, et Martin Trepel. 2010. « Stereotypical Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cell Receptors Recognize Survival Promoting Antigens on Stromal Cells ». *PloS One* 5 (12): e15992.
doi:10.1371/journal.pone.0015992.

- Blagden, Sarah P., et Anne E. Willis. 2011. « The Biological and Therapeutic Relevance of mRNA Translation in Cancer ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 8 (5): 280- 91. doi:10.1038/nrclinonc.2011.16.
- Bosch, F., P. Jares, E. Campo, A. Lopez-Guillermo, M. A. Piris, N. Villamor, D. Tassies, E. S. Jaffe, E. Montserrat, et C. Rozman. 1994. « PRAD-1/Cyclin D1 Gene Overexpression in Chronic Lymphoproliferative Disorders: A Highly Specific Marker of Mantle Cell Lymphoma ». *Blood* 84 (8): 2726- 32.
- Brittinger, G., H. Bartels, H. Common, E. Dühmke, H. H. Fülle, U. Gunzer, T. Gyenes, R. Heinz, E. König, et P. Meusers. 1984. « Clinical and Prognostic Relevance of the Kiel Classification of Non-Hodgkin Lymphomas Results of a Prospective Multicenter Study by the Kiel Lymphoma Study Group ». *Hematological Oncology* 2 (3): 269- 306.
- Brown, Jennifer R. 2014. « Ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia and B cell malignancies ». *Leukemia & Lymphoma* 55 (2): 263- 69. doi:10.3109/10428194.2013.803226.
- Buckley, Rebecca H. 1998. « Agammaglobulinemia, by Col. Ogden C. Bruton, MC, USA, Pediatrics, 1952;9:722–728 ». *Pediatrics* 102 (Supplement 1): 213- 15.
- Burger, Jan A., et Emili Montserrat. 2013. « Coming Full Circle: 70 Years of Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Redistribution, from Glucocorticoids to Inhibitors of B-Cell Receptor Signaling ». *Blood* 121 (9): 1501- 9. doi:10.1182/blood-2012-08-452607.
- Burger, Jan A., et Richard J. Ford. 2011. « The Microenvironment in Mantle Cell Lymphoma: Cellular and Molecular Pathways and Emerging Targeted Therapies ». *Seminars in Cancer Biology* 21 (5): 308- 12. doi:10.1016/j.semcancer.2011.09.006.
- Camacho, Francisca I., Patrocinio Algara, Antonia Rodríguez, Elena Ruíz-Ballesteros, Manuela Mollejo, Nerea Martínez, José A. Martínez-Climent, et al. 2003. « Molecular Heterogeneity in MCL Defined by the Use of Specific VH Genes and the Frequency of Somatic Mutations ». *Blood* 101 (10): 4042- 46. doi:10.1182/blood-2002-11-3456.
- Camicia, Rosalba, Hans C. Winkler, et Paul O. Hassa. 2015. « Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review ». *Molecular Cancer* 14 (décembre). doi:10.1186/s12943-015-0474-2.
- Campo, Elias, Steven H. Swerdlow, Nancy L. Harris, Stefano Pileri, Harald Stein, et Elaine S. Jaffe. 2011. « The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications ». *Blood* 117 (19): 5019- 32. doi:10.1182/blood-2011-01-293050.
- Camps, Jordi, Itziar Salaverria, Maria J. Garcia, Esther Prat, Sílvia Beà, Jessica C. Pole, Lluís Hernández, et al. 2006. « Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines ». *Leukemia Research* 30 (8): 923- 34. doi:10.1016/j.leukres.2005.11.013.
- Capizzi, R. L., J. C. White, B. L. Powell, et F. Perrino. 1991. « Effect of Dose on the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects of Cytarabine ». *Seminars in Hematology* 28 (3 Suppl 4): 54- 69.
- Carracedo, A., et P. P. Pandolfi. 2008. « The PTEN-PI3K Pathway: Of Feedbacks and Cross-Talks ». *Oncogene* 27 (41): 5527- 41. doi:10.1038/onc.2008.247.
- Carvajal-Cuenca, Alejandra, Luz F. Sua, Nhora M. Silva, Stefania Pittaluga, Cristina Royo, Joo Y. Song, Rachel L. Sargent, et al. 2012. « In Situ Mantle Cell Lymphoma: Clinical Implications of an Incidental Finding with Indolent Clinical Behavior ». *Haematologica* 97 (2): 270- 78. doi:10.3324/haematol.2011.052621.
- Castillo, Jorge J., Steven P. Treon, et Matthew S. Davids. 2016. « Inhibition of the Bruton Tyrosine Kinase Pathway in B-Cell Lymphoproliferative Disorders ». *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* 22 (1): 34- 39. doi:10.1097/PPO.0000000000000170.
- Chapuis, Nicolas, Sophie Park, Laurent Leotoing, Jerome Tamburini, Frederique Verdier, Valerie Bardet, Alexa S. Green, et al. 2010. « IκB Kinase Overcomes PI3K/Akt and ERK/MAPK to Control FOXO3a Activity in Acute Myeloid Leukemia ». *Blood* 116 (20): 4240- 50. doi:10.1182/blood-2009-12-260711.
- Chiron, David, Maurizio Di Liberto, Peter Martin, Xiangao Huang, Jeff Sharman, Pedro Blecua, Susan Mathew, et al. 2014. « Cell-Cycle Reprogramming for PI3K Inhibition Overrides a Relapse-Specific C481S BTK Mutation Revealed by Longitudinal Functional Genomics in Mantle Cell Lymphoma ». *Cancer Discovery* 4 (9): 1022- 35. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0098.
- Chresta, Christine M., Barry R. Davies, Ian Hickson, Tom Harding, Sabina Cosulich, Susan E. Critchlow, John P. Vincent, et al. 2010. « AZD8055 Is a Potent, Selective, and Orally

- Bioavailable ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with in Vitro and in Vivo Antitumor Activity ». *Cancer Research* 70 (1): 288- 98. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1751.
- Cinar, Munevver, FaridSaei Hamedani, Zhicheng Mo, Bekir Cinar, Hesham M. Amin, et Serhan Alkan. 2013. « Bruton Tyrosine Kinase Is Commonly Overexpressed in Mantle Cell Lymphoma and Its Attenuation by Ibrutinib Induces Apoptosis ». *Leukemia Research* 37 (10): 1271- 77. doi:10.1016/j.leukres.2013.07.028.
- Clarke, Marilyn L., Vijaya L. Damaraju, Jing Zhang, Delores Mowles, Tracey Tackaberry, Thach Lang, Kyla M. Smith, James D. Young, Blake Tomkinson, et Carol E. Cass. 2006. « The Role of Human Nucleoside Transporters in Cellular Uptake of 4'-thio-Beta-D-Arabinofuranosylcytosine and Beta-D-Arabinosylcytosine ». *Molecular Pharmacology* 70 (1): 303- 10. doi:10.1124/mol.105.021543.
- Cogliatti, Sergio B., Francesco Bertoni, Dieter R. Zimmermann, Samuel Henz, Tim C. Diss, Michele Ghielmini, et Ulrich Schmid. 2005. « IgV H Mutations in Blastoid Mantle Cell Lymphoma Characterize a Subgroup with a Tendency to More Favourable Clinical Outcome ». *The Journal of Pathology* 206 (3): 320- 27. doi:10.1002/path.1781.
- Cohen, Brenda, Mamiko Shimizu, Julia Izrailit, Nancy F. L. Ng, Yuri Buchman, James G. Pan, Judy Dering, et Michael Reedijk. 2010. « Cyclin D1 Is a Direct Target of JAG1-Mediated Notch Signaling in Breast Cancer ». *Breast Cancer Research and Treatment* 123 (1): 113- 24. doi:10.1007/s10549-009-0621-9.
- Conklin, Daniel J., Petra Haberzettl, Ganapathy Jagatheesan, Shahid Baba, Michael L. Merchant, Russell A. Prough, Jessica D. Williams, Sumanth D. Prabhu, et Aruni Bhatnagar. 2015. « Glutathione S-transferase P protects against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in mice ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 285 (2): 136- 48. doi:10.1016/j.taap.2015.03.029.
- Czuczman, Myron S., A. Goy, D. Lamonica, D. A. Graf, M. C. Munteanu, et R. H. van der Jagt. 2015. « Phase II Study of Bendamustine Combined with Rituximab in Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma: Efficacy, Tolerability, and Safety Findings ». *Annals of Hematology* 94 (12): 2025- 32. doi:10.1007/s00277-015-2478-9.
- Davids, Matthew S., Jing Deng, Adrian Wiestner, Brian J. Lannutti, Lili Wang, Catherine J. Wu, Wyndham H. Wilson, Jennifer R. Brown, et Anthony Letai. 2012. « Decreased Mitochondrial Apoptotic Priming Underlies Stroma-Mediated Treatment Resistance in Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Blood* 120 (17): 3501- 9. doi:10.1182/blood-2012-02-414060.
- Davis, R. Eric, Vu N. Ngo, Georg Lenz, Pavel Tolar, Ryan M. Young, Paul B. Romesser, Holger Kohlhammer, et al. 2010. « Chronic Active B-Cell-Receptor Signalling in Diffuse Large B-Cell Lymphoma ». *Nature* 463 (7277): 88- 92. doi:10.1038/nature08638.
- de Boer, C. J., E. Schuurings, E. Dreef, G. Peters, J. Bartek, P. M. Kluin, et J. H. van Krieken. 1995. « Cyclin D1 Protein Analysis in the Diagnosis of Mantle Cell Lymphoma ». *Blood* 86 (7): 2715- 23.
- Del Giudice, Iliaria, Monica Messina, Sabina Chiaretti, Simona Santangelo, Simona Tavolaro, Maria Stefania De Propriis, Mauro Nanni, et al. 2012. « Behind the Scenes of Non-Nodal MCL: Downmodulation of Genes Involved in Actin Cytoskeleton Organization, Cell Projection, Cell Adhesion, Tumour Invasion, TP53 Pathway and Mutated Status of Immunoglobulin Heavy Chain Genes ». *British Journal of Haematology* 156 (5): 601- 11. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08962.x.
- Delarue, Richard, Corinne Haioun, Vincent Ribrag, Pauline Brice, Alain Delmer, Herve Tilly, Gilles Salles, et al. 2013. « CHOP and DHAP plus Rituximab Followed by Autologous Stem Cell Transplantation in Mantle Cell Lymphoma: A Phase 2 Study from the Groupe d'Etude Des Lymphomes de l'Adulte ». *Blood* 121 (1): 48- 53. doi:10.1182/blood-2011-09-370320.
- Delfau-Larue, Marie-Hélène, Wolfram Klapper, Françoise Berger, Fabrice Jardin, Josette Briere, Gilles Salles, Olivier Casasnovas, et al. 2015. « High-Dose Cytarabine Does Not Overcome the Adverse Prognostic Value of CDKN2A and TP53 Deletions in Mantle Cell Lymphoma ». *Blood* 126 (5): 604- 11. doi:10.1182/blood-2015-02-628792.

- Dickinson, Dale A., et Henry Jay Forman. 2002. « Cellular glutathione and thiols metabolism ». *Biochemical Pharmacology, Cell Signaling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets*, 64 (5–6): 1019- 26. doi:10.1016/S0006-2952(02)01172-3.
- Dreyling, Martin, et European Mantle Cell Lymphoma Network. 2014. « Mantle Cell Lymphoma: Biology, Clinical Presentation, and Therapeutic Approaches ». *American Society of Clinical Oncology Educational Book / ASCO.American Society of Clinical Oncology.Meeting*, 191- 98. doi:10.14694/EdBook_AM.2014.34.191.
- Dreyling, Martin, Georg Lenz, Eva Hoster, Achiel Van Hoof, Christian Gisselbrecht, Rudolf Schmits, Bernd Metzner, et al. 2005. « Early Consolidation by Myeloablative Radiochemotherapy Followed by Autologous Stem Cell Transplantation in First Remission Significantly Prolongs Progression-Free Survival in Mantle-Cell Lymphoma: Results of a Prospective Randomized Trial of the European MCL Network ». *Blood* 105 (7): 2677- 84. doi:10.1182/blood-2004-10-3883.
- Dreyling, Martin, Hanneke C. Kluin-Nelemans, Sílvia Beà, Wolfram Klapper, Niclas Vogt, Marie-Helene Delfau-Larue, Grit Hutter, et al. 2013. « Update on the Molecular Pathogenesis and Clinical Treatment of Mantle Cell Lymphoma: Report of the 11th Annual Conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network ». *Leukemia & Lymphoma* 54 (4): 699- 707. doi:10.3109/10428194.2012.733882.
- Evans, Erica K., Richland Tester, Sharon Aslanian, Russell Karp, Michael Sheets, Matthew T. Labenski, Steven R. Witowski, et al. 2013. « Inhibition of Btk with CC-292 Provides Early Pharmacodynamic Assessment of Activity in Mice and Humans ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 346 (2): 219- 28. doi:10.1124/jpet.113.203489.
- Eyre, Toby A., Graham P. Collins, Anthony H. Goldstone, et Kate Cwynarski. 2014. « Time Now to TORC the TORC? New Developments in mTOR Pathway Inhibition in Lymphoid Malignancies ». *British Journal of Haematology* 166 (3): 336- 51. doi:10.1111/bjh.12945.
- Ezell, Scott A., Michele Mayo, Teeru Bihani, Suprawee Tepsuporn, Suping Wang, Melissa Passino, Shaun E. Grosskurth, et al. 2014. « Synergistic induction of apoptosis by combination of BTK and dual mTORC1/2 inhibitors in diffuse large B cell lymphoma ». *Oncotarget* 5 (13): 4990- 5001.
- Fasolo, Angelica, et Cristiana Sessa. 2008. « mTOR inhibitors in the treatment of cancer ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 17 (11): 1717- 34. doi:10.1517/13543784.17.11.1717.
- Feldman, Morris E., et Kevan M. Shokat. 2010. « New Inhibitors of the PI3K-Akt-mTOR Pathway: Insights into mTOR Signaling from a New Generation of Tor Kinase Domain Inhibitors (TORKinibs) ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 347: 241- 62. doi:10.1007/82_2010_64.
- Fernández, Veronica, Elena Hartmann, German Ott, Elias Campo, et Andreas Rosenwald. 2005. « Pathogenesis of Mantle-Cell Lymphoma: All Oncogenic Roads Lead to Dysregulation of Cell Cycle and DNA Damage Response Pathways ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (26): 6364- 69. doi:10.1200/JCO.2005.05.019.
- Fernández, Verònica, Olga Salamero, Blanca Espinet, Francesc Solé, Cristina Royo, Alba Navarro, Francisca Camacho, et al. 2010. « Genomic and Gene Expression Profiling Defines Indolent Forms of Mantle Cell Lymphoma ». *Cancer Research* 70 (4): 1408- 18. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3419.
- Ferrer, A., F. Bosch, N. Villamor, M. Rozman, F. Graus, G. Gutiérrez, S. Mercadal, et al. 2008.« Central Nervous System Involvement in Mantle Cell Lymphoma ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 19 (1): 135- 41. doi:10.1093/annonc/mdm447.
- Fingar, Diane C., Celeste J. Richardson, Andrew R. Tee, Lynn Cheatham, Christina Tsou, et John Blenis. 2004. « mTOR Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (1): 200- 216.
- Finkelstein, Lisa D., et Pamela L. Schwartzberg. 2004. « Tec Kinases: Shaping T-Cell Activation through Actin ». *Trends in Cell Biology* 14 (8): 443- 51. doi:10.1016/j.tcb.2003.07.001.

- Fisher, Richard I., Steven H. Bernstein, Brad S. Kahl, Benjamin Djulbegovic, Michael J. Robertson, Sven de Vos, Elliot Epner, et al. 2006. « Multicenter Phase II Study of Bortezomib in Patients with Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (30): 4867- 74. doi:10.1200/JCO.2006.07.9665.
- Franco, R., O. J. Schoneveld, A. Pappa, et M. I. Panayiotidis. 2007. « The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases ». *Archives of Physiology and Biochemistry* 113 (4- 5): 234- 58. doi:10.1080/13813450701661198.
- Fugmann, Sebastian D. 2010. « The Origins of the Rag Genes--from Transposition to V(D)J Recombination ». *Seminars in Immunology* 22 (1): 10- 16. doi:10.1016/j.smim.2009.11.004.
- Gallagher, E. J., Y. Fierz, A. Vijayakumar, N. Haddad, S. Yakar, et D. LeRoith. 2012. « Inhibiting PI3K Reduces Mammary Tumor Growth and Induces Hyperglycemia in a Mouse Model of Insulin Resistance and Hyperinsulinemia ». *Oncogene* 31 (27): 3213- 22. doi:10.1038/onc.2011.495.
- Geisler, Christian H., Arne Kolstad, Anna Laurell, Mats Jerkeman, Riikka Rätty, Niels S. Andersen, Lone B. Pedersen, et al. 2012. « Nordic MCL2 Trial Update: Six-Year Follow-up after Intensive Immunochemotherapy for Untreated Mantle Cell Lymphoma Followed by BEAM or BEAC + Autologous Stem-Cell Support: Still Very Long Survival but Late Relapses Do Occur ». *British Journal of Haematology* 158 (3): 355- 62. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09174.x.
- Geisler, Christian H., Arne Kolstad, Anna Laurell, Niels S. Andersen, Lone B. Pedersen, Mats Jerkeman, Mikael Eriksson, et al. 2008. « Long-Term Progression-Free Survival of Mantle Cell Lymphoma after Intensive Front-Line Immunochemotherapy with in Vivo-Purged Stem Cell Rescue: A Nonrandomized Phase 2 Multicenter Study by the Nordic Lymphoma Group ». *Blood* 112 (7): 2687- 93. doi:10.1182/blood-2008-03-147025.
- Gesk, Stefan, Wolfram Klapper, José I. Martín-Subero, Inga Nagel, Lana Harder, Kai Fu, Heinz-Wolfram Bernd, Dennis D. Weisenburger, Reza Parwaresch, et Reiner Siebert. 2006. « A Chromosomal Translocation in Cyclin D1-Negative/Cyclin D2-Positive Mantle Cell Lymphoma Fuses the CCND2 Gene to the IGK Locus ». *Blood* 108 (3): 1109- 10. doi:10.1182/blood-2006-01-0015.
- Goto, Shinji, Kensaku Kamada, Yoko Soh, Yoshito Ihara, et Takahito Kondo. 2002. « Significance of Nuclear Glutathione S-Transferase Pi in Resistance to Anti-Cancer Drugs ». *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 93 (9): 1047- 56.
- Goto, Shinji, Kensaku Kamada, Yoko Soh, Yoshito Ihara, et Takahito Kondo. 2002. « Significance of Nuclear Glutathione S-Transferase Pi in Resistance to Anti-Cancer Drugs ». *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 93 (9): 1047-56.
- Goto, Shinji, Kensaku Kamada, Yoko Soh, Yoshito Ihara, et Takahito Kondo. 2002. « Significance of Nuclear Glutathione S-Transferase Pi in Resistance to Anti-Cancer Drugs ». *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 93 (9): 1047-56.
- Guertin, David A., Deanna M. Stevens, Carson C. Thoreen, Aurora A. Burds, Nada Y. Kalaany, Jason Moffat, Michael Brown, Kevin J. Fitzgerald, et David M. Sabatini. 2006. « Ablation in Mice of the mTORC Components Raptor, Rictor, or mLST8 Reveals That mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1 ». *Developmental Cell* 11 (6): 859- 71. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.007.
- Guo, Dongmei, Jingjing Ye, Jianjian Dai, Lizhen Li, Feng Chen, Daoxin Ma, et Chunyan Ji. 2009. « Notch-1 Regulates Akt Signaling Pathway and the Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins Cyclin D1, CDK2 and p21 in T-ALL Cell Lines ». *Leukemia Research* 33 (5): 678- 85. doi:10.1016/j.leukres.2008.10.026.
- Habermann, Thomas M., Izidore S. Lossos, Glen Justice, Julie M. Vose, Peter H. Wiernik, Kyle McBride, Kenton Wride, et al. 2009. « Lenalidomide Oral Monotherapy Produces a High Response Rate in Patients with Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma ». *British Journal of Haematology* 145 (3): 344- 49. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07626.x.
- Hadzidimitriou, Anastasia, Andreas Agathangelidis, Nikos Darzentas, Fiona Murray, Marie-Helene Delfau-Larue, Lone Bredo Pedersen, Alba Navarro Lopez, et al. 2011. « Is There a Role for

- Antigen Selection in Mantle Cell Lymphoma? Immunogenetic Support from a Series of 807 Cases ». *Blood* 118 (11): 3088- 95. doi:10.1182/blood-2011-03-343434.
- Hansson, J., K. Berhane, V. M. Castro, U. Jungnelius, B. Mannervik, et U. Ringborg. 1991. « Sensitization of Human Melanoma Cells to the Cytotoxic Effect of Melphalan by the Glutathione Transferase Inhibitor Ethacrynic Acid ». *Cancer Research* 51 (1): 94- 98.
- Hara, Kenta, Yoshiko Maruki, Xiaomeng Long, Ken-ichi Yoshino, Noriko Oshiro, Sujuti Hidayat, Chiharu Tokunaga, Joseph Avruch, et Kazuyoshi Yonezawa. 2002. « Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action ». *Cell* 110 (2): 177- 89.
- Harel, Stéphanie, Richard Delarue, Vincent Ribrag, Martin Dreyling, et Olivier Hermine. 2011. « Treatment of Younger Patients with Mantle Cell Lymphoma ». *Seminars in Hematology* 48 (3): 194- 207. doi:10.1053/j.seminhematol.2011.06.002.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, H. Stein, P. M. Banks, J. K. Chan, M. L. Cleary, G. Delsol, C. De Wolf-Peeters, B. Falini, et K. C. Gatter. 1994. « A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal from the International Lymphoma Study Group [See Comments] ». *Blood* 84 (5): 1361- 92.
- Hayes, John D., Jack U. Flanagan, et Ian R. Jowsey. 2005. « Glutathione Transferases ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45 (1): 51- 88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
- Herman, Sarah E. M., Mohammed Farooqui, Rahel Bezabhie, Georg Aue, et Adrian Wiestner. 2012. « In Vivo Effects of Ibrutinib On BCR Signaling, Tumor Cell Activation and Proliferation in Blood and Tissue-Resident Cells of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients ». *Blood* 120 (21).
- Herman, Sarah E. M., Rashida Z. Mustafa, Jennifer A. Gyamfi, Stefania Pittaluga, Stella Chang, Betty Chang, Mohammed Farooqui, et Adrian Wiestner. 2014. « Ibrutinib Inhibits BCR and NF-κB Signaling and Reduces Tumor Proliferation in Tissue-Resident Cells of Patients with CLL ». *Blood* 123 (21): 3286- 95. doi:10.1182/blood-2014-02-548610.
- Hermine, O., C. Haioun, E. Lepage, M. F. d'Agay, J. Briere, C. Lavignac, G. Fillet, et al. 1996. « Prognostic Significance of Bcl-2 Protein Expression in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. Groupe d'Etude Des Lymphomes de l'Adulte (GELA) ». *Blood* 87 (1): 265- 72.
- Hermine, Olivier, Eva Hoster, Jan Walewski, André Bosly, Stephan Stilgenbauer, Catherine Thieblemont, Michal Szymczyk, et al. 2016. « Addition of High-Dose Cytarabine to Immunochemotherapy before Autologous Stem-Cell Transplantation in Patients Aged 65 Years or Younger with Mantle Cell Lymphoma (MCL Younger): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network ». *Lancet (London, England)*, juin. doi:10.1016/S0140-6736(16)00739-X.
- Hess, Georg, Bertrand Coiffier, Michael Crump, Christian Gisselbrecht, Fritz Offner, Jorge Romaguera, Lisa Kang, et Pádraig J. Moran. 2015. « Effect of Prognostic Classification on Temozolomide Efficacy and Safety in Patients with Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma: A Retrospective Analysis ». *Experimental Hematology & Oncology* 4: 11. doi:10.1186/s40164-015-0006-1.
- Hipp, S., I. Ringshausen, M. Oelsner, C. Bogner, C. Peschel, et T. Decker. 2005. « Inhibition of the Mammalian Target of Rapamycin and the Induction of Cell Cycle Arrest in Mantle Cell Lymphoma Cells ». *Haematologica* 90 (10): 1433- 34.
- Hirt, Carsten, Frank Schüler, Lars Dölken, Christian A. Schmidt, et Gottfried Dölken. 2004. « Low Prevalence of Circulating t(11;14)(q13;q32)-Positive Cells in the Peripheral Blood of Healthy Individuals as Detected by Real-Time Quantitative PCR ». *Blood* 104 (3): 904- 5. doi:10.1182/blood-2004-02-0738.
- Hoster, Eva, Andreas Rosenwald, Françoise Berger, Heinz-Wolfram Bernd, Sylvia Hartmann, Christoph Loddenkemper, Thomas F. E. Barth, et al. 2016. « Prognostic Value of Ki-67 Index, Cytology, and Growth Pattern in Mantle-Cell Lymphoma: Results From Randomized Trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, février. doi:10.1200/JCO.2015.63.8387.
- Hoster, Eva, Martin Dreyling, Wolfram Klapper, Christian Gisselbrecht, Achiel van Hoof, Hanneke C. Kluin-Nelemans, Michael Pfreundschuh, et al. 2008. « A New Prognostic Index (MIPI) for

- Patients with Advanced-Stage Mantle Cell Lymphoma ». *Blood* 111 (2): 558- 65. doi:10.1182/blood-2007-06-095331.
- Hooster, Eva, Wolfram Klapper, Olivier Hermine, Hanneke C. Kluin-Nelemans, Jan Walewski, Achiel van Hoof, Marek Trnety, et al. 2014. « Confirmation of the Mantle-Cell Lymphoma International Prognostic Index in Randomized Trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (13): 1338- 46. doi:10.1200/JCO.2013.52.2466.
- Hsu, Peihong, Tianyu Yang, Silvat Sheikh-Fayyaz, Judith Brody, Jela Bandovic, Sarma Roy, Jordan Laser, Jonathan E. Kolitz, Craig Devoe, et Xinmin Zhang. 2014. « Mantle Cell Lymphoma with in Situ or Mantle Zone Growth Pattern: A Study of Five Cases and Review of Literature ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7 (3): 1042- 50.
- Huang, Gangxiong, Lisa Mills, et Laura L. Worth. 2007. « Expression of Human Glutathione S-Transferase P1 Mediates the Chemosensitivity of Osteosarcoma Cells ». *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (5): 1610- 19. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0580.
- Jares, Pedro, Dolores Colomer, et Elias Campo. 2007. « Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics ». *Nature Reviews Cancer* 7 (10): 750-62. doi:10.1038/nrc2230.
- Jazirehi, Ali R., Mario I. Vega, Devasis Chatterjee, Lee Goodglick, et Benjamin Bonavida. 2004. « Inhibition of the Raf–MEK1/2–ERK1/2 Signaling Pathway, Bcl-xL Down-Regulation, and Chemosensitization of Non-Hodgkin’s Lymphoma B Cells by Rituximab ». *Cancer Research* 64 (19): 7117- 26. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3500.
- Jung, Chang Hwa, Seung-Hyun Ro, Jing Cao, Neil Michael Otto, et Do-Hyung Kim. 2010. « mTOR Regulation of Autophagy ». *FEBS Letters* 584 (7): 1287- 95. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017.
- Jung, Chang Hwa, Seung-Hyun Ro, Jing Cao, Neil Michael Otto, et Do-Hyung Kim. 2010. « mTOR Regulation of Autophagy ». *FEBS Letters* 584 (7): 1287-95. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017.
- Jung, Chang Hwa, Seung-Hyun Ro, Jing Cao, Neil Michael Otto, et Do-Hyung Kim. 2010. « mTOR Regulation of Autophagy ». *FEBS Letters* 584 (7): 1287-95. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017.
- Katz, Samuel G., James L. Labelle, Hailong Meng, Regina P. Valeriano, Jill K. Fisher, Heather Sun, Scott J. Rodig, Steven H. Kleinstein, et Loren D. Walensky. 2014. « Mantle Cell Lymphoma in Cyclin D1 Transgenic Mice with Bim-Deficient B Cells ». *Blood* 123 (6): 884- 93. doi:10.1182/blood-2013-04-499079.
- Khamzina, Leila, Alain Veilleux, Sébastien Bergeron, et André Marette. 2005. « Increased Activation of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Liver and Skeletal Muscle of Obese Rats: Possible Involvement in Obesity-Linked Insulin Resistance ». *Endocrinology* 146 (3): 1473- 81. doi:10.1210/en.2004-0921.
- Kiaii, Shahryar, Andrew J. Clear, Alan G. Ramsay, Derek Davies, Ajanthah Sangaralingam, Abigail Lee, Maria Calaminici, Donna S. Neuberg, et John G. Gribben. 2013. « Follicular Lymphoma Cells Induce Changes in T-Cell Gene Expression and Function: Potential Impact on Survival and Risk of Transformation ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (21): 2654- 61. doi:10.1200/JCO.2012.44.2137.
- Kil, Laurens P., Marjolein J. W. de Bruijn, Menno van Nimwegen, Odilia B. J. Corneth, Jan Piet van Hamburg, Gemma M. Dingjan, Friedrich Thaiss, et al. 2012. « Btk Levels Set the Threshold for B-Cell Activation and Negative Selection of Autoreactive B Cells in Mice ». *Blood* 119 (16): 3744- 56. doi:10.1182/blood-2011-12-397919.
- Kim, Young Chul, et Kun-Liang Guan. 2015. « mTOR: A Pharmacologic Target for Autophagy Regulation ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (1): 25- 32. doi:10.1172/JCI73939.
- Kirschbaum, Mark, Paul Frankel, Leslie Popplewell, Jasmine Zain, Maria Delioukina, Vinod Pullarkat, Deron Matsuoka, et al. 2011. « Phase II Study of Vorinostat for Treatment of Relapsed or Refractory Indolent Non-Hodgkin’s Lymphoma and Mantle Cell Lymphoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (9): 1198- 1203. doi:10.1200/JCO.2010.32.1398.

- Kirschev, Sebastian, Susanne Wagner, et Georg Hess. 2012. « Relapsed And/Or Refractory Mantle Cell Lymphoma: What Role for Temsirolimus? » *Clinical Medicine Insights. Oncology* 6: 153- 64. doi:10.4137/CMO.S7327.
- Klanova, Magdalena, Lucie Lorkova, Ondrej Vit, Bokang Maswabi, Jan Molinsky, Jana Pospisilova, Petra Vockova, et al. 2014. « Downregulation of Deoxycytidine Kinase in Cytarabine-Resistant Mantle Cell Lymphoma Cells Confers Cross-Resistance to Nucleoside Analogs Gemcitabine, Fludarabine and Cladribine, but Not to Other Classes of Anti-Lymphoma Agents ». *Molecular Cancer* 13: 159. doi:10.1186/1476-4598-13-159.
- Klapper, Wolfram, Eva Hoster, Olaf Determann, Ilse Oschlies, Jeroen van der Laak, Françoise Berger, Heinz Wolfram Bernd, et al. 2009. « Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma—consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network ». *Journal of Hematopathology* 2 (2): 103- 11. doi:10.1007/s12308-009-0036-x.
- Kleinert, Maximilian, Lykke Sylow, Daniel J. Fazakerley, James R. Krycer, Kristen C. Thomas, Anne-Julie Oxbøll, Andreas B. Jordy, et al. 2014. « Acute mTOR Inhibition Induces Insulin Resistance and Alters Substrate Utilization in Vivo ». *Molecular Metabolism* 3 (6): 630- 41. doi:10.1016/j.molmet.2014.06.004.
- Klionsky, Daniel J. 2008. « Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve ». *Autophagy* 4 (6): 740- 43. doi:10.4161/auto.6398.
- Kluin-Nelemans, H. C., E. Hoster, O. Hermine, J. Walewski, M. Trneny, C. H. Geisler, S. Stilgenbauer, et al. 2012. « Treatment of Older Patients with Mantle-Cell Lymphoma ». *The New England Journal of Medicine* 367 (6): 520- 31. doi:10.1056/NEJMoa1200920.
- Kotwal, Jyoti, Ajay Malik, Vibha Dutta, Vikram Singh, Sandeep Kumar Dahiya, Velu Nair, et Rajan Kapoor. 2015. « A rare case of leukemic presentation of blastoid variant of mantle cell lymphoma with isolated splenic involvement: Flowcytometric revelation ». *Medical Journal Armed Forces India* 71, Supplement 1 (juillet): S145- 47. doi:10.1016/j.mjafi.2013.09.014.
- Kridel, Robert, Barbara Meissner, Sanja Rogic, Merrill Boyle, Adele Telenius, Bruce Woolcock, Jay Gunawardana, et al. 2012. « Whole Transcriptome Sequencing Reveals Recurrent NOTCH1 Mutations in Mantle Cell Lymphoma ». *Blood* 119 (9): 1963- 71. doi:10.1182/blood-2011-11-391474.
- Kurtova, Antonina V., Archito T. Tamayo, Richard J. Ford, et Jan A. Burger. 2009. « Mantle Cell Lymphoma Cells Express High Levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): Importance for Interactions with the Stromal Microenvironment and Specific Targeting ». *Blood* 113 (19): 4604- 13. doi:10.1182/blood-2008-10-185827.
- Lamba, Jatinder K. 2009. « Genetic Factors Influencing Cytarabine Therapy ». *Pharmacogenomics* 10 (10): 1657- 74. doi:10.2217/pgs.09.118.
- Laplante, Mathieu, et David M. Sabatini. 2012. « mTOR Signaling in Growth Control and Disease ». *Cell* 149 (2): 274- 93. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
- Lawrence, Michael S., Petar Stojanov, Paz Polak, Gregory V. Kryukov, Kristian Cibulskis, Andrey Sivachenko, Scott L. Carter, et al. 2013. « Mutational Heterogeneity in Cancer and the Search for New Cancer-Associated Genes ». *Nature* 499 (7457): 214- 18. doi:10.1038/nature12213.
- Lenz, Georg, Martin Dreyling, Eva Hoster, Bernhard Wörmann, Ulrich Dührsen, Bernd Metzner, Hartmut Eimermacher, et al. 2005. « Immunochemotherapy with Rituximab and Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Significantly Improves Response and Time to Treatment Failure, but Not Long-Term Outcome in Patients with Previously Untreated Mantle Cell Lymphoma: Results of a Prospective Randomized Trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG) ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (9): 1984- 92. doi:10.1200/JCO.2005.08.133.
- Leux, Christophe, Marc Maynadié, Xavier Troussard, Quentin Cabrera, Aurélie Herry, Sandra Le Guyader-Peyrou, Steven Le Gouill, et Alain Monnereau. 2014. « Mantle Cell Lymphoma Epidemiology: A Population-Based Study in France ». *Annals of Hematology* 93 (8): 1327- 33. doi:10.1007/s00277-014-2049-5.
- Levine, M. H., A. M. Haberman, D. B. Sant'Angelo, L. G. Hannum, M. P. Cancro, C. A. Janeway, et M. J. Shlomchik. 2000. « A B-Cell Receptor-Specific Selection Step Governs Immature to

- Mature B Cell Differentiation ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97 (6): 2743- 48. doi:10.1073/pnas.050552997.
- Liang, X. H., S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, et B. Levine. 1999. « Induction of Autophagy and Inhibition of Tumorigenesis by Beclin 1 ». *Nature* 402 (6762): 672- 76. doi:10.1038/45257.
- Lindvall, Jessica, et Tahmina C. Islam. 2002. « Interaction of Btk and Akt in B Cell Signaling ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (5): 1319- 26. doi:10.1016/S0006-291X(02)00382-0.
- Liu, Ta-Ming, Jennifer A. Woyach, Yiming Zhong, Arletta Lozanski, Gerard Lozanski, Shuai Dong, Ethan Strattan, et al. 2015. « Hypermorphic Mutation of Phospholipase C, γ 2 Acquired in Ibrutinib-Resistant CLL Confers BTK Independency upon B-Cell Receptor Activation ». *Blood* 126 (1): 61- 68. doi:10.1182/blood-2015-02-626846.
- Lovec, H., A. Grzeschiczek, M. B. Kowalski, et T. Möröy. 1994. « Cyclin D1/Bcl-1 Cooperates with Myc Genes in the Generation of B-Cell Lymphoma in Transgenic Mice ». *The EMBO Journal* 13 (15): 3487- 95.
- Ma, Xiaojun Max, et John Blenis. 2009. « Molecular Mechanisms of mTOR-Mediated Translational Control ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (5): 307- 18. doi:10.1038/nrm2672.
- Maira, Sauveur-Michel, Frédéric Stauffer, Josef Brueggen, Pascal Furet, Christian Schnell, Christine Fritsch, Saskia Brachmann, et al. 2008. « Identification and Characterization of NVP-BEZ235, a New Orally Available Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor with Potent in Vivo Antitumor Activity ». *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (7): 1851- 63. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0017.
- Mallya, Sharmila, Briana A. Fitch, J. Scott Lee, Lomon So, Matthew R. Janes, et David A. Fruman. 2014. « Resistance to mTOR Kinase Inhibitors in Lymphoma Cells Lacking 4EBP1 ». *PloS One* 9 (2): e88865. doi:10.1371/journal.pone.0088865.
- Martin, Peter. 2015. « High-Dose Cytarabine in Mantle Cell Lymphoma ». *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O* 13 (10): 646- 49.
- Martinez-Climent, Jose A., Lorena Fontan, Randy D. Gascoyne, Reiner Siebert, et Felipe Prosper. 2010. « Lymphoma Stem Cells: Enough Evidence to Support Their Existence? ». *Haematologica* 95 (2): 293- 302. doi:10.3324/haematol.2009.013318.
- Michaux, L., I. Wlodarska, I. Theate, M. Stul, J.-M. Scheiff, V. Deneys, A. Ferrant, et A. Hagemeijer. 2004. « Coexistence of BCL1/CCND1 and CMYC Aberrations in Blastoid Mantle Cell Lymphoma: A Rare Finding Associated with Very Poor Outcome ». *Annals of Hematology* 83 (9): 578- 83. doi:10.1007/s00277-004-0879-2.
- Mitchener, J. S., J. D. Shelburne, W. D. Bradford, et H. K. Hawkins. 1976. « Cellular Autophagocytosis Induced by Deprivation of Serum and Amino Acids in HeLa Cells ». *The American Journal of Pathology* 83 (3): 485- 92.
- M'kacher, R, F Farace, A Bennaceur-Griscelli, D Violot, B Clause, J Dossou, A Valent, et al. 2003. « Blastoid mantle cell lymphoma: evidence for nonrandom cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) and generation of a mouse model ». *Cancer Genetics and Cytogenetics* 143 (1): 32-38. doi:10.1016/S0165-4608(02)00823-3.
- Morelon, Emmanuel, Marie-France Mamzer - Bruneel, Marie-Noëlle Peraldi, et Henri Kreis. 2001. « Sirolimus: A New Promising Immunosuppressive Drug. Towards a Rationale for Its Use in Renal Transplantation ». *Nephrology Dialysis Transplantation* 16 (1): 18- 20. doi:10.1093/ndt/16.1.18.
- Mortimore, G. E., et C. M. Schworer. 1977. « Induction of Autophagy by Amino-Acid Deprivation in Perfused Rat Liver ». *Nature* 270 (5633): 174- 76.
- Müller, Anja, Chuanbing Zang, Cindrilla Chumduri, Bernd Dörken, Peter T. Daniel, et Christian W. Scholz. 2013. « Concurrent Inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 Overcomes Resistance to Rapamycin Induced Apoptosis by down-Regulation of Mcl-1 in Mantle Cell Lymphoma ». *International Journal of Cancer* 133 (8): 1813- 24. doi:10.1002/ijc.28206.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, et T. Honjo. 2000. « Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme ». *Cell* 102 (5): 553- 63.

- Naing, A, C Aghajanian, E Raymond, D Olmos, G Schwartz, E Oelmann, L Grinsted, et al. 2012. « Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD8055 in advanced solid tumours and lymphoma ». *British Journal of Cancer* 107 (7): 1093- 99. doi:10.1038/bjc.2012.368.
- Navarro, Alba, Guillem Clot, Cristina Royo, Pedro Jares, Anastasia Hadzidimitriou, Andreas Agathangelidis, Vasilis Bikos, et al. 2012. « Molecular Subsets of Mantle Cell Lymphoma Defined by the IGHV Mutational Status and SOX11 Expression Have Distinct Biologic and Clinical Features ». *Cancer Research* 72 (20): 5307- 16. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1615.
- Nodit, Laurentia, David W. Bahler, Samuel A. Jacobs, Joseph Locker, et Steven H. Swerdlow. 2003. « Indolent Mantle Cell Lymphoma with Nodal Involvement and Mutated Immunoglobulin Heavy Chain Genes ». *Human Pathology* 34 (10): 1030- 34.
- Nordström, Lena, Sandra Sernbo, Patrik Eden, Kirsten Grønbaek, Arne Kolstad, Riikka Rätty, Marja-Liisa Karjalainen, et al. 2014. « SOX11 and TP53 Add Prognostic Information to MIPI in a Homogenously Treated Cohort of Mantle Cell Lymphoma--a Nordic Lymphoma Group Study ». *British Journal of Haematology* 166 (1): 98-108. doi:10.1111/bjh.12854.
- Nordström, Lena, Sandra Sernbo, Patrik Eden, Kirsten Grønbaek, Arne Kolstad, Riikka Rätty, Marja-Liisa Karjalainen, et al. 2014. « SOX11 and TP53 Add Prognostic Information to MIPI in a Homogenously Treated Cohort of Mantle Cell Lymphoma--a Nordic Lymphoma Group Study ». *British Journal of Haematology* 166 (1): 98-108. doi:10.1111/bjh.12854.
- Norton, A. J., J. Matthews, V. Pappa, J. Shamash, S. Love, A. Z. Rohatiner, et T. A. Lister. 1995. « Mantle Cell Lymphoma: Natural History Defined in a Serially Biopsied Population over a 20-Year Period ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 6 (3): 249- 56.
- Nygren, Lina, Stefanie Baumgartner Wennerholm, Monika Klimkowska, Birger Christensson, Eva Kimby, et Birgitta Sander. 2012. « Prognostic Role of SOX11 in a Population-Based Cohort of Mantle Cell Lymphoma ». *Blood* 119 (18): 4215-23. doi:10.1182/blood-2011-12-400580.
- Ogasawara, Toshie, Masako Yasuyama, et Kiyotaka Kawauchi. 2003. « Constitutive Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in B-Cell Lymphoproliferative Disorders ». *International Journal of Hematology* 77 (4): 364- 70.
- Ondrejka, Sarah L., Raymond Lai, Stephen D. Smith, et Eric D. Hsi. 2011. « Indolent Mantle Cell Leukemia: A Clinicopathological Variant Characterized by Isolated Lymphocytosis, Interstitial Bone Marrow Involvement, Kappa Light Chain Restriction, and Good Prognosis ». *Haematologica* 96 (8): 1121- 27. doi:10.3324/haematol.2010.036277.
- Oshiro, Noriko, Ken-ichi Yoshino, Sujuti Hidayat, Chiharu Tokunaga, Kenta Hara, Satoshi Eguchi, Joseph Avruch, et Kazuyoshi Yonezawa. 2004. « Dissociation of Raptor from mTOR Is a Mechanism of Rapamycin-Induced Inhibition of mTOR Function ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 9 (4): 359- 66. doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00727.x.
- Pan, Zhengying, Heleen Scheerens, Shyr-Jiann Li, Brian E. Schultz, Paul A. Sprengeler, L. Chuck Burrill, Rohan V. Mendonca, et al. 2007. « Discovery of Selective Irreversible Inhibitors for Bruton's Tyrosine Kinase ». *ChemMedChem* 2 (1): 58- 61. doi:10.1002/cmdc.200600221.
- Peponi, Evangelia, Elias Drakos, Guadalupe Reyes, Vasiliki Leventaki, George Z. Rassidakis, et L. Jeffrey Medeiros. 2006. « Activation of Mammalian Target of Rapamycin Signaling Promotes Cell Cycle Progression and Protects Cells from Apoptosis in Mantle Cell Lymphoma ». *The American Journal of Pathology* 169 (6): 2171- 80. doi:10.2353/ajpath.2006.051078.
- Pervez, Shahid, Saroona Haroon, et Dreema Awan. 2015. « Ki-67 Labeling Indices in "Classic" versus "Blastoid" Mantle Cell Lymphomas--Proposed Cutoff Values for Routine Diagnostic Workup ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 16 (15): 6591- 94.
- Pighi, Chiara, Ting-Lei Gu, Irene Dalai, Stefano Barbi, Claudia Parolini, Anna Bertolaso, Serena Pedron, et al. 2011. « Phospho-Proteomic Analysis of Mantle Cell Lymphoma Cells Suggests a pro-Survival Role of B-Cell Receptor Signaling ». *Cellular Oncology (Dordrecht)* 34 (2): 141- 53. doi:10.1007/s13402-011-0019-7.
- Ponader, Sabine, et Jan A. Burger. 2014. « Bruton's Tyrosine Kinase: From X-Linked Agammaglobulinemia toward Targeted Therapy for B-Cell Malignancies ». *Journal of*

- Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 32 (17): 1830- 39. doi:10.1200/JCO.2013.53.1046.
- Qu, Fu-Lian, Bing Xia, Su-Xia Li, Chen Tian, Hong-Liang Yang, Qian Li, Ya-Fei Wang, Yong Yu, et Yi-Zhuo Zhang. 2015. « Synergistic Suppression of the PI3K Inhibitor CAL-101 with Bortezomib on Mantle Cell Lymphoma Growth ». *Cancer Biology & Medicine* 12 (4): 401- 8. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0013.
- Raedler, Lisa. 2015. « Velcade (Bortezomib) Receives 2 New FDA Indications: For Retreatment of Patients with Multiple Myeloma and for First-Line Treatment of Patients with Mantle-Cell Lymphoma ». *American Health & Drug Benefits* 8 (Spec Feature): 135- 40.
- Rahal, Rami, Mareike Frick, Rodrigo Romero, Joshua M. Korn, Robert Kridel, Fong Chun Chan, Barbara Meissner, et al. 2014. « Pharmacological and Genomic Profiling Identifies NF- κ B-Targeted Treatment Strategies for Mantle Cell Lymphoma ». *Nature Medicine* 20 (1): 87-92. doi:10.1038/nm.3435.
- Ribrag, V., S. Koscielny, I. Carpiuc, C. Cebotaru, H. Vande Walle, M. Talbot, P. Fenaux, et J. Bosq. 2003. « Prognostic Value of GST-Pi Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphomas ». *Leukemia* 17 (5): 972- 77. doi:10.1038/sj.leu.2402930.
- Richard, P., J. Vassallo, S. Valmary, R. Missouri, G. Delsol, et P. Brousset. 2006. « “In Situ-Like” mantle Cell Lymphoma: A Report of Two Cases ». *Journal of Clinical Pathology* 59 (9): 995- 96. doi:10.1136/jcp.2005.030783.
- Rikova, Klarisa, Ailan Guo, Qingfu Zeng, Anthony Possemato, Jian Yu, Herbert Haack, Julie Nardone, et al. 2007. « Global Survey of Phosphotyrosine Signaling Identifies Oncogenic Kinases in Lung Cancer ». *Cell* 131 (6): 1190- 1203. doi:10.1016/j.cell.2007.11.025.
- Rolland, D., M. Raharijaona, A. Barbarat, R. Houlgatte, et C. Thieblemont. 2010. « Inhibition of GST-Pi Nuclear Transfer Increases Mantle Cell Lymphoma Sensitivity to Cisplatin, Cytarabine, Gemcitabine, Bortezomib and Doxorubicin ». *Anticancer Research* 30 (10): 3951- 57.
- Romaguera, Jorge E., Luis Fayad, Maria A. Rodriguez, Kristine R. Broglio, Frederick B. Hagemeister, Barbara Pro, Peter McLaughlin, et al. 2005. « High Rate of Durable Remissions after Treatment of Newly Diagnosed Aggressive Mantle-Cell Lymphoma with Rituximab plus Hyper-CVAD Alternating with Rituximab plus High-Dose Methotrexate and Cytarabine ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (28): 7013- 23. doi:10.1200/JCO.2005.01.1825.
- Rosenwald, I. B., R. Kaspar, D. Rousseau, L. Gehrke, P. Leboulch, J. J. Chen, E. V. Schmidt, N. Sonenberg, et I. M. London. 1995. « Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Regulates Expression of Cyclin D1 at Transcriptional and Post-Transcriptional Levels ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (36): 21176- 80.
- Rosich, Laia, Sílvia Xargay-Torrent, Mónica López-Guerra, Elías Campo, Dolors Colomer, et Gaël Roué. 2012. « Counteracting Autophagy Overcomes Resistance to Everolimus in Mantle Cell Lymphoma ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (19): 5278-89. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0351.
- Rummel, Mathias, Ulrich Kaiser, Christina Balser, Martina Stauch, Wolfram Brugger, Manfred Welslau, Norbert Niederle, et al. 2016. « Bendamustine plus rituximab versus fludarabine plus rituximab for patients with relapsed indolent and mantle-cell lymphomas: a multicentre, randomised, open-label, non-inferiority phase 3 trial ». *The Lancet Oncology* 17 (1): 57- 66. doi:10.1016/S1470-2045(15)00447-7.
- Russell, Ryan C., Hai-Xin Yuan, et Kun-Liang Guan. 2014. « Autophagy Regulation by Nutrient Signaling ». *Cell Research* 24 (1): 42- 57. doi:10.1038/cr.2013.166.
- Sánchez-Aguilera, Abel, Carlos Montalbán, Paloma de la Cueva, Lydia Sánchez-Verde, Manuel M. Morente, Mónica García-Cosío, José García-Laraña, et al. 2006. « Tumor Microenvironment and Mitotic Checkpoint Are Key Factors in the Outcome of Classic Hodgkin Lymphoma ». *Blood* 108 (2): 662- 68. doi:10.1182/blood-2005-12-5125.
- Sander, Birgitta, Leticia Quintanilla-Martinez, German Ott, Luc Xerri, Isinsu Kuzu, John K. C. Chan, Steven H. Swerdlow, et Elias Campo. 2015. « Mantle Cell Lymphoma-a Spectrum from Indolent to Aggressive Disease ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, août. doi:10.1007/s00428-015-1840-6.

- Sarbassov, Dos D., Siraj M. Ali, Do-Hyung Kim, David A. Guertin, Robert R. Latek, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, et David M. Sabatini. 2004. « Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway That Regulates the Cytoskeleton ». *Current Biology* 14 (14): 1296- 1302. doi:10.1016/j.cub.2004.06.054.
- Sarbassov, Dos D., Siraj M. Ali, Shomit Sengupta, Joon-Ho Sheen, Peggy P. Hsu, Alex F. Bagley, Andrew L. Markhard, et David M. Sabatini. 2006. « Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB ». *Molecular Cell* 22 (2): 159- 68. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029.
- Schisselbauer, J. C., M. Crescimanno, N. D'Alessandro, M. Clapper, S. Toulmond, H. Tapiero, et K. D. Tew. 1989. « Glutathione, Glutathione S-Transferases, and Related Redox Enzymes in Adriamycin-Resistant Cell Lines with a Multidrug Resistant Phenotype ». *Cancer Communications* 1 (2): 133- 39.
- Schmitz, Roland, Ryan M. Young, Michele Ceribelli, Sameer Jhavar, Wenming Xiao, Meili Zhang, George Wright, et al. 2012. « Burkitt Lymphoma Pathogenesis and Therapeutic Targets from Structural and Functional Genomics ». *Nature* 490 (7418): 116- 20. doi:10.1038/nature11378.
- Schulz, Holger, Julia F. Bohlius, Sven Trelle, Nicole Skoetz, Marcel Reiser, Thilo Kober, Guido Schwarzer, et al. 2007. « Immunochemotherapy with Rituximab and Overall Survival in Patients with Indolent or Mantle Cell Lymphoma: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of the National Cancer Institute* 99 (9): 706- 14. doi:10.1093/jnci/djk152.
- Sehgal, S. N., H. Baker, et C. Vézina. 1975. « Rapamycin (AY-22,989), a New Antifungal Antibiotic. II. Fermentation, Isolation and Characterization ». *The Journal of Antibiotics* 28 (10): 727- 32.
- Settembre, Carmine, Chiara Di Malta, Vinicia Assunta Polito, Moises Garcia Arencibia, Francesco Vetrini, Serkan Erdin, Serpil Uckac Erdin, et al. 2011. « TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 332 (6036): 1429- 33. doi:10.1126/science.1204592.
- Shibutani, Shusaku T., Tatsuya Saitoh, Heike Nowag, Christian Münz, et Tamotsu Yoshimori. 2015. « Autophagy and Autophagy-Related Proteins in the Immune System ». *Nature Immunology* 16 (10): 1014- 24. doi:10.1038/ni.3273.
- Shigeyama, Yutaka, Toshiyuki Kobayashi, Yoshiaki Kido, Naoko Hashimoto, Shun-ichiro Asahara, Tomokazu Matsuda, Akihiko Takeda, et al. 2008. « Biphasic Response of Pancreatic β -Cell Mass to Ablation of Tuberous Sclerosis Complex 2 in Mice ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (9): 2971- 79. doi:10.1128/MCB.01695-07.
- Shinohara, Masahiro, Takako Koga, Kazuo Okamoto, Shinya Sakaguchi, Kimiko Arai, Hisataka Yasuda, Toshiyuki Takai, et al. 2008. « Tyrosine Kinases Btk and Tec Regulate Osteoclast Differentiation by Linking RANK and ITAM Signals ». *Cell* 132 (5): 794- 806. doi:10.1016/j.cell.2007.12.037.
- Simic, Tatjana, Ana Savic-Radojevic, Marija Pljesa-Ercegovac, Marija Matic, et Jasmina Mimic-Oka. 2009. « Glutathione S-Transferases in Kidney and Urinary Bladder Tumors ». *Nature Reviews Urology* 6 (5): 281- 89. doi:10.1038/nrurol.2009.49.
- Sin, Sang-Hoon, Debasmita Roy, Ling Wang, Michelle R. Staudt, Farnaz D. Fakhari, Dhavalkumar D. Patel, David Henry, William J. Harrington, Blossom A. Damania, et Dirk P. Dittmer. 2007. « Rapamycin Is Efficacious against Primary Effusion Lymphoma (PEL) Cell Lines in Vivo by Inhibiting Autocrine Signaling ». *Blood* 109 (5): 2165- 73. doi:10.1182/blood-2006-06-028092.
- Sini, Patrizia, Dominic James, Christine Chresta, et Sylvie Guichard. 2010. « Simultaneous inhibition of mTORC1 and mTORC2 by mTOR kinase inhibitor AZD8055 induces autophagy and cell death in cancer cells ». *Autophagy* 6 (4): 553-54. doi:10.4161/auto.6.4.11671.
- Stevens, S., J. Ong, U. Kim, L. A. Eckhardt, et R. G. Roeder. 2000. « Role of OCA-B in 3'-IgH Enhancer Function ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (10): 5306- 12.
- Swerdlow, Steven H., et Michael E. Williams. 2002. « From Centrocytic to Mantle Cell Lymphoma: A Clinicopathologic and Molecular Review of 3 Decades ». *Human Pathology* 33 (1): 7- 20.
- Swerdlow, Steven H., Elias Campo, Stefano A. Pileri, Nancy Lee Harris, Harald Stein, Reiner Siebert, Ranjana Advani, et al. 2016. « The 2016 Revision of the World Health Organization (WHO)

- Classification of Lymphoid Neoplasms ». *Blood*, janvier, blood-2016-01-643569. doi:10.1182/blood-2016-01-643569.
- Tamburini, Jerome, Nicolas Chapuis, Valérie Bardet, Sophie Park, Pierre Sujobert, Lise Willems, Norbert Ifrah, et al. 2008. « Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibition Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt by up-Regulating Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Signaling in Acute Myeloid Leukemia: Rationale for Therapeutic Inhibition of Both Pathways ». *Blood* 111 (1): 379- 82. doi:10.1182/blood-2007-03-080796.
- Tew, Kenneth D. 2016. « Glutathione-Associated Enzymes In Anticancer Drug Resistance ». *Cancer Research* 76 (1): 7- 9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3143.
- Thomas, J. D., P. Sideras, C. I. Smith, I. Vorechovsky, V. Chapman, et W. E. Paul. 1993. « Colocalization of X-Linked Agammaglobulinemia and X-Linked Immunodeficiency Genes ». *Science* 261 (5119): 355-58. doi:10.1126/science.8332900.
- Thieblemont, Catherine, Delphine Rolland, Lucile Baseggio, Pascale Felman, Sophie Gazzo, Evelyne Callet-Bauchu, Alexandra Traverse-Glehen, et al. 2008. « Comprehensive Analysis of GST-Pi Expression in B-Cell Lymphomas: Correlation with Histological Subtypes and Survival ». *Leukemia & Lymphoma* 49 (7): 1403-6. doi:10.1080/10428190802094245.
- Trněný, Marek, Thierry Lamy, Jan Walewski, David Belada, Jiri Mayer, John Radford, Wojciech Jurczak, et al. 2016. « Lenalidomide versus Investigator's Choice in Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma (MCL-002; SPRINT): A Phase 2, Randomised, Multicentre Trial ». *The Lancet. Oncology* 17 (3): 319- 31. doi:10.1016/S1470-2045(15)00559-8.
- Um, Sung Hee, Francesca Frigerio, Mitsuhiro Watanabe, Frédéric Picard, Manel Joaquin, Melanie Sticker, Stefano Fumagalli, et al. 2004. « Absence of S6K1 Protects against Age- and Diet-Induced Obesity While Enhancing Insulin Sensitivity ». *Nature* 431 (7005): 200- 205. doi:10.1038/nature02866.
- Vergès, Bruno, et Bertrand Cariou. 2015. « mTOR Inhibitors and Diabetes ». *Diabetes Research and Clinical Practice* 110 (2): 101- 8. doi:10.1016/j.diabres.2015.09.014.
- Vetro, Calogero, Giacomo Bonanno, Giorgio Giulietti, Alessandra Romano, Concetta Conticello, Annalisa Chiarenza, Paolo Spina, Francesco Coppolino, Rosario Cunsolo, et Francesco Di Raimondo. 2015. « Rare gastrointestinal lymphomas: The endoscopic investigation ». *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy* 7 (10): 928- 49. doi:10.4253/wjge.v7.i10.928.
- Visco, Carlo, Silvia Finotto, Renato Zambello, Rossella Paolini, Andrea Menin, Roberta Zanotti, Francesco Zaja, et al. 2013. « Combination of Rituximab, Bendamustine, and Cytarabine for Patients With Mantle-Cell Non-Hodgkin Lymphoma Ineligible for Intensive Regimens or Autologous Transplantation ». *Journal of Clinical Oncology* 31 (11): 1442- 49. doi:10.1200/JCO.2012.45.9842.
- Vose, Julie M. 2015. « Mantle Cell Lymphoma: 2015 Update on Diagnosis, Risk-Stratification, and Clinical Management ». *American Journal of Hematology* 90 (8): 739- 45. doi:10.1002/ajh.24094.
- Wang, Lijuan, Jianfei Qian, Yong Lu, Haiyan Li, Hanying Bao, Donghua He, Zhiqiang Liu, et al. 2013. « Immune Evasion of Mantle Cell Lymphoma: Expression of B7-H1 Leads to Inhibited T-Cell Response to and Killing of Tumor Cells ». *Haematologica* 98 (9): 1458- 66. doi:10.3324/haematol.2012.071340.
- Wang, Rui, Changda Liu, Lijuan Xia, Guisen Zhao, Janice Gabrilove, Samuel Waxman, et Yongkui Jing. 2012. « Ethacrynic Acid and a Derivative Enhance Apoptosis in Arsenic Trioxide-Treated Myeloid Leukemia and Lymphoma Cells: The Role of Glutathione S-Transferase p1-1 ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (24): 6690- 6701. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0770.
- Wang, Xiao, A. Charlotta Asplund, Anna Porwit, Jenny Flygare, C. I. Edvard Smith, Birger Christensson, et Birgitta Sander. 2008. « The Subcellular Sox11 Distribution Pattern Identifies Subsets of Mantle Cell Lymphoma: Correlation to Overall Survival ». *British Journal of Haematology* 143 (2): 248- 52. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07329.x.
- Wanner, Kathrin, Susanne Hipp, Madlene Oelsner, Ingo Ringshausen, Christian Bogner, Christian Peschel, et Thomas Decker. 2006. « Mammalian Target of Rapamycin Inhibition Induces Cell Cycle Arrest in Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) Cells and Sensitises DLBCL Cells

- to Rituximab ». *British Journal of Haematology* 134 (5): 475- 84. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06210.x.
- Wehkamp, Ulrike, Christiane Pott, Michael Unterhalt, Karoline Koch, Michael Weichenthal, Wolfram Klapper, et Ilske Oschlies. 2015. « Skin Involvement of Mantle Cell Lymphoma May Mimic Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type ». *The American Journal of Surgical Pathology* 39 (8): 1093- 1101. doi:10.1097/PAS.0000000000000445.
- Weisenburger, D. D., H. Kim, et H. Rappaport. 1982. « Mantle-Zone Lymphoma: A Follicular Variant of Intermediate Lymphocytic Lymphoma ». *Cancer* 49 (7): 1429- 38.
- Wiestner, A. 2015.« The Role of B-Cell Receptor Inhibitors in the Treatment of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Haematologica* 100 (12): 1495- 1507. doi:10.3324/haematol.2014.119123.
- Willems, Lise, Jerome Tamburini, Nicolas Chapuis, Catherine Lacombe, Patrick Mayeux, et Didier Bouscary. 2012. « PI3K and mTOR Signaling Pathways in Cancer: New Data on Targeted Therapies ». *Current Oncology Reports* 14 (2): 129- 38. doi:10.1007/s11912-012-0227-y.
- Wilson, Wyndham H., Ryan M. Young, Roland Schmitz, Yandan Yang, Stefania Pittaluga, George Wright, Chih-Jian Lih, et al. 2015. « Targeting B Cell Receptor Signaling with Ibrutinib in Diffuse Large B Cell Lymphoma ». *Nature Medicine* 21 (8): 922- 26. doi:10.1038/nm.3884.
- Witzens-Harig, Mathias, Marie Luise Memmer, Martin Dreyling, et Georg Hess. 2013. « A Phase I/II Trial to Evaluate the Safety, Feasibility and Activity of Salvage Therapy Consisting of the mTOR Inhibitor Temsirolimus Added to Standard Therapy of Rituximab and DHAP for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Diffuse Large Cell B-Cell Lymphoma - the STORM Trial ». *BMC Cancer* 13: 308. doi:10.1186/1471-2407-13-308.
- Wlodarska, Iwona, Daan Dierickx, Vera Vanhentenrijk, Katrien Van Roosbroeck, Helena Pospíšilová, Francesca Minnei, Gregor Verhoef, José Thomas, Peter Vandenberghe, et Chris De Wolf-Peeters. 2008. « Translocations Targeting CCND2, CCND3, and MYCN Do Occur in t(11;14)-Negative Mantle Cell Lymphomas ». *Blood* 111 (12): 5683- 90. doi:10.1182/blood-2007-10-118794.
- Wong, Pui-Mun, Cindy Puente, Ian G. Ganley, et Xuejun Jiang. 2013. « The ULK1 Complex: Sensing Nutrient Signals for Autophagy Activation ». *Autophagy* 9 (2): 124- 37. doi:10.4161/auto.23323.
- Xu-Monette, Zijun Y., et Ken H. Young. 2012. « The TP53 tumor suppressor and autophagy in malignant lymphoma ». *Autophagy* 8 (5): 842- 45. doi:10.4161/auto.19703.
- Yang, Zhi-Zhang, Anne J. Novak, Mary J. Stenson, Thomas E. Witzig, et Stephen M. Ansell. 2006. « Intratumoral CD4+CD25+ Regulatory T-Cell-Mediated Suppression of Infiltrating CD4+ T Cells in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma ». *Blood* 107 (9): 3639-46. doi:10.1182/blood-2005-08-3376.
- Yin, C. Cameron, et Rajyalakshmi Luthra. 2013. « Molecular Detection of t(11;14)(q13;q32) in Mantle Cell Lymphoma ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 999: 211- 16. doi:10.1007/978-1-62703-357-2_14.
- Yuan, T. L., et L. C. Cantley. 2008. « PI3K Pathway Alterations in Cancer: Variations on a Theme ». *Oncogene* 27 (41): 5497- 5510. doi:10.1038/onc.2008.245.
- Zhang, H. S., M. Gavin, A. Dahiya, A. A. Postigo, D. Ma, R. X. Luo, J. W. Harbour, et D. C. Dean. 2000. « Exit from G1 and S Phase of the Cell Cycle Is Regulated by Repressor Complexes Containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF ». *Cell* 101 (1): 79- 89. doi:10.1016/S0092-8674(00)80625-X.
- Zhang, Liang, Jing Yang, Jianfei Qian, Haiyan Li, Jorge E. Romaguera, Larry W. Kwak, Michael Wang, et Qing Yi. 2012. « Role of the Microenvironment in Mantle Cell Lymphoma: IL-6 Is an Important Survival Factor for the Tumor Cells ». *Blood* 120 (18): 3783- 92. doi:10.1182/blood-2012-04-424630.
- Zhang, Shuang Q., Sonali M. Smith, Shuang Y. Zhang, et Yue Lynn Wang. 2015. « Mechanisms of Ibrutinib Resistance in Chronic Lymphocytic Leukaemia and Non-Hodgkin Lymphoma ». *British Journal of Haematology* 170 (4): 445-56. doi:10.1111/bjh.13427.
- Zhu, Bo, et Yi-Qun Huang. 2015. « [Effects of Silencing AKT Gene by shRNA on Proliferation, Apoptosis and Notch1 Signal Pathway in Jeko-1 Cells] ». *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za*

- Zhi / Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui = Journal of Experimental Hematology / Chinese Association of Pathophysiology 23 (3): 679- 83.
- « Chapter One - The Evolving, Multifaceted Roles of Autophagy in Cancer ». 2016. Consulté le mai 30. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065230X16300057>.
- « High-Dose Cytarabine in Mantle Cell Lymphoma ».2016.Consulté le mars 27. <http://www.hematologyandoncology.net/index.php/archives/october-2015/high-dose-cytarabine-in-mantle-cell-lymphoma/>.
- « Rituximab, bendamustine, and cytarabine (RBAC500) as induction therapy in elderly patients with mantle cell lymphoma: a phase II study | New Evidence ». 2016. Consulté le mars 27. <http://www.newevidence.com/oncology/rituximab-bendamustine-and-cytarabine-rbac500-as-induction-therapy-in-elderly-patients-with-mantle-cell-lymphoma-a-phase-ii-study/>.
- « WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition - WHO - OMS - ».2016a. Consulté le novembre 3.<http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4002>.

Titre : Etude comparative de nouvelles approches thérapeutiques dans le lymphome à cellules du Manteau : Utilisation des inhibiteurs de mTOR kinase et BTK

Mots clés : Lymphome à cellules du Manteau (LCM), PI3K/Akt/mTOR, BTK, GSTP1, Aracytine

Résumé : La voie PI3Kinase/AKT/mTOR, est une cible thérapeutique du temsirolimus, un inhibiteur de mTORC1. Dans le but d'obtenir une inhibition plus importante de cette voie j'utilise dans ce projet deux nouvelles molécules:

- Le NVP-BEZ 235 (BEZ) qui inhibe à la fois mTORC1 et la PI3kinase
- l'AZD8055 (AZD), un inhibiteur des complexes mTORC1 et mTORC2.

En utilisant différentes lignées de LCM, j'ai démontré que l'effet de ces nouveaux inhibiteurs sur la survie cellulaire est plus important que celui du Temsirolimus. Cela est probablement dû à l'inhibition de la phosphorylation de l'AKT et la 4EBP.

La deuxième partie de ce projet étudie la synergie entre les inhibiteurs de m-TOR kinase et l'aracytine. Un effet additif important a été démontré. J'ai trouvé en western blot que l'aracytine inhibe la phosphorylation des substrats de la voie Akt –mTOR notamment le 4EBP.

L'ibrutinib (un inhibiteur de la voie Btk) a un effet modeste mais j'ai pu démontrer qu'il est capable à induire une inhibition plus importante de la survie cellulaire lorsqu'il est associé à l'aracytine. Cependant il s'est révélé antagoniste aux inhibiteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR, cela reste difficile à décortiquer.

Enfin, j'ai trouvé un effet additif de l'ibrutinib en combinaison avec la doxorubicine. Cependant les inhibiteurs de m-TOR n'ont pas le même effet. Afin d'expliquer ces résultats, j'ai étudié l'effet de ces molécules sur l'expression de GSTP1, enzyme de détoxification connue pour avoir un rôle important dans la résistance de LCM à l'anthracycline.

J'ai mis en évidence une diminution de l'expression de cet enzyme par l'ibrutinib. En revanche, les inhibiteurs de mTOR n'ont pas un effet sur l'expression de GSTP1.

L'ibrutinib pourrait donc sensibiliser le LCM à l'anthracycline en diminuant l'expression de GSTP1.

Title : Comparative study of new therapeutic approaches in Mantle Cell Lymphoma : Use of mTOR and BTK inhibitors.

Keywords : Mantle cell lymphoma (MCL), PI3k/Akt/mTOR, BTK, GSTP1, Aracytine

Abstract : The PI3K / AKT / mTOR pathway is the target of temsirolimus. However, important resistance is observed. We tried to obtain a more important inhibition of PI3K / AKT pathway using two new molecules:

- NVP-BEZ 235 (BEZ) which inhibits both mTORC1 and PI3K
- AZD8055 (AZD) an inhibitor of mTORC1 and mTORC2 complexes.

Using different cell lines of MCL, we have shown that the effect of these new inhibitors on cell survival was more important than that of Temsirolimus. This is probably because contrary to temsirolimus, the two new molecules can inhibit AKT and 4EBP phosphorylation.

In the second part of this project we studied the synergy between the m-TOR kinase inhibitors and aracytine (conventional treatment of MCL). We revealed a significant additive effect in MCL cell lines.

We demonstrated by Western blot analysis that aracytine inhibits S6 and 4EBP phosphorylation. This may explain the results obtained from this drug association.

We then showed that Ibrutinib (an inhibitor of Btk pathway) can induce a significant inhibition of cell survival when combined with aracytine. In this study, Ibrutinib proved antagonist effect to PI3K-AKT-mTOR inhibitors. The mechanisms of these results remain unclear.

Finally, we demonstrated an additive effect of Ibrutinib in combination with doxorubicin. We did not obtain the same results when we combined m-TOR inhibitors with doxorubicin. To explain these data, we studied the effect of these drugs on the expression of GSTP1 by western blot. This enzyme is known to have an important role in MCL resistance to anthracycline. Importantly, Ibrutinib induced a decrease in the expression of GSTP1 but AZD8055, Temsirolimus and NVP-BEZ235 had no effect.