



HAL
open science

Résistances/sensibilisations aux anti-CD20 (rituximab) dans les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL)

Hafidha Bentayeb

► **To cite this version:**

Hafidha Bentayeb. Résistances/sensibilisations aux anti-CD20 (rituximab) dans les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL). Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0072 . tel-01957664

HAL Id: tel-01957664

<https://theses.hal.science/tel-01957664v1>

Submitted on 17 Dec 2018

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.

Université de Limoges
École Doctorale Bio-Santé (ED 524)
EA3842 HOMEOSTASIE CELLULAIRE ET PATHOLOGIE

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Discipline : Biologie-Santé Option : Immunologie-Oncologie

Présentée et soutenue par
Hafidha Bentayeb

Le 15 décembre 2016

***Résistances/sensibilisations aux anti-CD20 (rituximab) dans les
lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL)***

Thèse co-dirigée par : **Pr Troutaud Danielle et Dr Kim Heang Ly**

JURY :

Président du jury

Pr Marie-Odile Jauberteau, PU-PH, EA3842 « Homéostasie Cellulaire & Pathologies »,
Faculté de Médecine, Université de Limoges

Rapporteurs

Pr Robert-Alain TOILLON, INSERM U908- Cell Plasticity and Cancer
Université Lille 1

Pr Hervé Ghesquières PU-PH Hématologie UFR de médecine Lyon Sud de l'université
Lyon-I

Examineurs

Dr Laurent Désaubry Directeur de Recherche au CNRS Laboratoire d'Innovation
Thérapeutique (UMR 7200) Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg
Pr Dominique Bordessoule PU-PH, UMR CNRS7276, Hématologie Clinique et Thérapie
Cellulaire, CHU de Limoges



*Le vrai héros n'est pas celui qui est né pour les hauts faits,
mais celui qui a su au moyen de petites choses construire
un bouclier de loyauté autour de lui*

Paulo Coelho



« Cela semble toujours impossible, jusqu'à ce qu'on le fasse. »

Nelson Mandela



Remerciements

«La reconnaissance est la mémoire du cœur» Hans Christian Andersen

Tant de personnes ont rendu possible la réussite de ce travail de thèse qu'il m'est aujourd'hui difficile de n'en oublier aucune. Je présente donc toutes mes excuses par avance en cas d'oublis éventuels.

Au terme de ces années de doctorat, j'éprouve une sincère gratitude envers tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail et je tiens ici à les remercier.

Je voudrais tout d'abord remercier les deux rapporteurs de cette thèse, M. le Professeur Robert-Alain Toillon et M. le Professeur Hervé Ghesquières pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Mes remerciements vont également à Mme le Professeur Dominique Bordessoule et à M. le Docteur Laurent Désaubry qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier infiniment Mme le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU m'ayant permis d'effectuer ce travail au sein du laboratoire et pour le temps accordé à son évaluation en tant que présidente du jury. Pour ses encouragements et son soutien durant ma thèse, pour toutes ses qualités professionnelles et surtout ses qualités humaines, j'exprime ici ma grande reconnaissance.

Je tiens à adresser mes plus chaleureux remerciements à ma directrice de thèse, le Professeur **Danielle TROUDAUD**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ma thèse sous sa direction, et de m'avoir ensuite guidée tout au long de mon activité. En étant toujours disponible, elle a su m'apporter un soutien constant, une écoute, des conseils précieux et avisés. Elle m'a accordé la confiance et la liberté d'appliquer mes idées tout en restant derrière moi pour m'orienter, permettant ainsi la maturation de mes réflexions. Le côté détendu de nos discussions a permis, en général, à mes idées de se clarifier rapidement. Aussi, je la remercie pour son optimisme et sa « positive attitude » qui m'ont toujours poussé vers l'avant et qui m'ont donné la force de réaliser tout ce que je voulais faire pendant ma thèse. Je la remercie infiniment pour le travail de correction qu'elle a apporté à ce manuscrit avec un très grand soin. Je voudrais également lui dire à quel point j'ai apprécié ses qualités humaines et son côté maternel qui m'ont toujours fait sentir que j'ai « une seconde mère » ici en France, et que j'ai de la chance de l'avoir comme directrice de thèse. Je garderai dans mon cœur sa générosité, sa compréhension et son efficacité. Pour tout ce qu'elle m'a donné, je la remercie très sincèrement.

J'adresse également mes remerciements sincères à mon co-directeur de thèse, le Dr Kim Heang Ly, pour sa gentillesse et son optimisme et surtout pour sa bonne humeur permanente. C'est vrai que le temps est passé très vite et que nous n'avons pas pu faire tout ce que nous avons souhaité sur les patients mais nous allons pouvoir le faire après la thèse... Merci pour tout.



Je tiens à remercier les services d'Hématologie Clinique et d'Anatomo-Pathologie pour leur collaboration essentielle à l'étude menée sur les biopsies de patients.

Un grand merci aux patients qui ont accepté que leurs tumeurs nous soient confiées pour les analyses et sans l'accord desquels ce travail n'aurait pu se faire. Nous espérons que nos résultats seront d'utilité pour améliorer la vie d'autres patients dans l'avenir. Une grande pensée à toutes les personnes qui sont au combat contre la maladie.

Je remercie également les membres de l'équipe de M. le Professeur Jean Feuillard pour leur collaboration et leur aide durant ma thèse, et particulièrement Ossama qui m'a toujours dépanné quand j'avais besoin de cellules. Je tiens à remercier également Robin pour les nombreuses relectures et corrections de l'anglais des articles mais aussi pour ses commentaires et ses corrections scientifiques.

Je remercie infiniment Sylvie Desforges, pour sa gentillesse et son efficacité d'être toujours prête à me donner des souris pour mes expériences et pour les nombreuses fois où elle m'a aidé.

Je remercie beaucoup **Sofiane** qui a su me soutenir, me supporter, m'encourager... pendant toute la durée de ma thèse plus particulièrement durant les moments difficiles de stress. Même l'océan ne l'a pas empêché de m'apporter son soutien moral. Merci pour tes aides pour les manip et pour les discussions scientifiques très riches en informations et en idées pour les expériences. Cette thèse et moi te devons beaucoup.... Mille mercis.

Je tiens à adresser des chaleureux remerciements à Amandine pour m'avoir aidé durant la thèse. Merci pour les nombreuses fois où nous sommes parties complètement à l'aventure pour faire des expériences improvisées... la production de l'anticorps magique pour la microscopie électronique et les expériences sur les embryons de poulets resteront pour moi des bons souvenirs. Merci d'être prête à tout moment pour m'aider quand j'ai besoin sans aucune hésitation. Merci pour tous les bons moments que nous avons partagé ensemble en dehors du travailmerciiii pour tout.

Je remercie tous les thésards de l'EA3842 Hugo, Sophie, Sabrina, Clément, Elise, Safae, Niki, Amazigh et Hussein... Je vous le dis : vous êtes les meilleurs, vous n'êtes pas seulement des collègues vous êtes une famille. Je remercie Hussein pour ta gentillesse et ton amitié, merci à Amazigh avec qui j'ai partagé plein de choses depuis qu'on est arrivé à l'EA3842, stagiaires de M1 puis M2 et puis thésards. Particulièrement je remercie Hugo, Sophie et Sabrina pour l'excellente ambiance, et l'humour permanent, les pauses « À TAAAAABLE » resteront de bons moments qu'on a partagés ensemble... Merci pour tout : vos aides, votre gentillesse, soutien moral et merci beaucoup d'être là. Merci à Hugo pour les discussions scientifiques prolongées dans le bureau.

Je remercie tous les statutaires de l'EA3842 : Fabrice pour ses aides surtout pour la rédaction, merci de m'avoir aidé à obtenir l'ordinateur sur lequel j'ai rédigé ma thèse, Mireille pour sa gentillesse ; Barbara et Serge pour les discussion enrichissantes sur tous les sujets à table, entre midi et deux, et pour leur encouragements ; Aurélie Lacroix pour sa gentillesse et ses encouragements, Aurélie Perraud pour sa sympathie, son efficacité et le temps qu'elle passe pour faire les commandes ; Thomas pour ses aides et ses réponses à mes questions sur les protocoles. Je remercie également François, Marie-Hélène, Gaëlle et Philippe.



Je voudrais remercier particulièrement Aurélien pour sa sympathie et son efficacité dans la résolution des problèmes informatiques, et pour m'avoir prêté l'ordinateur sur lequel j'ai pu rédiger ma thèse.

Je remercie les stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler, l'ambiance de travail a été excellente et nous avons pu ainsi allier bons moments et séances de travail. Je remercie particulièrement Maud pour son passage et pour sa volonté et son efficacité, pour les nombreuses fois où tu es restée avec moi, tard au labo. Marine, contente que tu sois revenue, je suis sûre que nous allons réaliser de bonnes expériences ensemble.

Je remercie chaleureusement les deux thésardes du cinquième, mes copines très proches avec qui j'ai partagé de bons souvenirs. Je les remercie pour leur soutien moral pour leur amitié sincère et pour leur amour. Merci pour toutes les pauses café et discussions longues... JOSIANE et LAMA merci pour tous mes chères copines libanaises. Je remercie également Iman et Zeinab, sœurs Dalloul pour les bons moments que nous avons passés ensemble. Je remercie Tahani pour ses encouragements et ses appels pendant les mois de rédaction. Je souhaite également remercier toutes les autres copines : Fatima, Batoul et Nour pour leur bonne humeur... Merci à vous toutes.

Mes plus profonds remerciements vont à mes parents. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Malgré tous les obstacles et les conditions difficiles de notre pays, ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Leur courage et leur force m'ont appris beaucoup et ils me font penser souvent à la citation de Mario Puzo : « Les grands hommes ne naissent pas dans la grandeur, ils grandissent ». Pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, je leur présente ma plus affectueuse gratitude. Je tiens à remercier mes sœurs, et mon frère pour leur soutien et pour leur amour. Je remercie chaleureusement mon seul grand véritable amour, pour son soutien moral et pour ses encouragements, et son écoute surtout durant la période de rédaction. Je le remercie pour son grand amour sincère.



RESUME

Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) sont la forme de lymphomes non-Hodgkiniens agressifs la plus fréquente chez l'adulte, et sont très hétérogènes à la fois sur le plan biologique et clinique. Bien que plus de la moitié des patients peuvent être guéris avec le traitement standard R-CHOP (combinant la polychimiothérapie CHOP aux anti-CD20 comme le rituximab) 30 à 40 % des patients échappent ou sont réfractaires au traitement, déterminant des morbidités et mortalités importantes liées au nombre limité d'alternatives thérapeutiques. L'objectif des travaux de cette thèse était centré sur les mécanismes de résistance thérapeutique dans ces lymphomes, et plus particulièrement les résistances au rituximab. Dans une première partie de la thèse, nous avons étudié le rôle de facteurs endogènes neuropeptidiques, les neurotrophines (NTs), et l'implication de leur signalisation dans la survie des cellules tumorales et leur sensibilité à l'apoptose induite par le rituximab. Nous avons montré dans un premier temps que les cellules B tumorales des patients présentaient des taux parfois élevés de neurotrophines (NGF, BDNF) et de leurs récepteurs de haute (Trk) et de basse affinité p75^{NTR}. Puis les résultats obtenus *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines de DLBCL et *in vivo* (xénogreffes tumorales) ont mis en évidence l'existence d'un axe de survie BDNF/TrkB/p75^{NTR} pouvant interférer avec l'efficacité de l'immunothérapie. Cet axe contribue à la survie des cellules tumorales et pourrait aussi participer à la résistance thérapeutique aux anti-CD20 en modulant l'expression du CD20 à la surface des exosomes. En effet ces microvésicules, sécrétées en grande quantité par les cellules B tumorales, expriment le CD20 à leur surface et seraient à ce titre impliquées dans l'échappement thérapeutique en réalisant des « récepteurs –leures » vis-à-vis des anticorps thérapeutiques. Dans une 2^e partie de cette thèse, nous avons évalué dans les DLBCL le rôle potentiel de nouvelles cibles émergentes en oncologie, les prohibitines (PHBs) et le facteur d'initiation de la traduction eIF4A. Pour cela, nous avons utilisé un ligand de ces acteurs cellulaires de la famille des flavaglines, le FL3. Nous avons montré que le FL3 présente un effet apoptotique très important *in vitro* sur les lignées cellulaires de DLBCL et *in vivo* sur les tumeurs induites chez la souris. Nos travaux ont permis d'en préciser les mécanismes moléculaires, mettant en évidence le rôle des PHBs en lien notamment avec l'activation d'Erk1/2, et la formation et l'activité du complexe eIF4F dans la survie des cellules de DLBCL. Les données préliminaires obtenues à partir des biopsies de patients montrent, de plus, que la forte expression de PHB1 pourrait avoir une valeur pronostique dans ces lymphomes.

L'ensemble de nos travaux ont permis de mettre en évidence de nouvelles voies de survie et d'échappement thérapeutique dans les DLBCL, qui pourraient permettre d'identifier aussi de nouveaux marqueurs biologiques à valeur diagnostique et/ou pronostique pour le choix de thérapies ciblées.



Abstract

Diffuse large B cell Lymphomas (DLBCL) are the most aggressive and heterogeneous biological and clinical form of non-Hodgkin lymphomas in adults. Although more than 50% of patients can be cured with standard therapy R-CHOP (combining the CHOP chemotherapy to the anti-CD20 as rituximab) 30 to 40% of patients exhibit primary refractory disease or relapse after initial response to therapy, determining morbidities and significant mortality related to the limited number of treatment options. The aim of this thesis was focussed on therapeutic resistances of these lymphomas, notably those of rituximab. In the first part of this thesis, we have evaluated the role of endogenous factor signaling, the neurotrophins (NTs), in DLBCL cell survival and sensitivity to the cytotoxicity of rituximab. We showed first that a high expression of neurotrophines (NGF, BDNF) and their high (Trk) and low (p75^{NTR}) affinity receptors was often found in tumor B cells of DLBCL patients. Results obtained *in vitro*, on human cell lines of DLBCL, but also *in vivo* (xenografts) showed evidence of a survival BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis that can interfere with the efficacy of immunotherapy. This axis promotes survival of tumor cells and may also participate in rituximab resistance in regulating CD20 expression at the surface of exosomes. Indeed, these microvesicles, secreted in large amounts by the tumoral B cells, express the CD20 and would be involved in the therapeutic escape acting as decoy receptors upon rituximab exposure. In the second part of the thesis, we evaluated in DLBCL the potential role of new oncogenic targets, PHBs proteins and the initiation factor of translation eIF4A. To this end, we used one of their ligands, a synthetic flavagline named FL3. We showed that FL3 determines a strong apoptosis *in vitro* on DLBCL cell lines and *in vivo* on tumors induced in mice (xenografts). Our works have clarified the molecular mechanisms, demonstrating involvement of PHBs, in correlation with ERK1/2 activation, and eIF4F complex formation and activity. Preliminary data obtained in patient biopsies showed a high expression of PHB1 in tumor B cells that may be decisive for cell survival and patient outcome lymphomas.

Overall, present results show evidence of new survival and rituximab escape mechanisms in DLBCL, that should allow to identify new diagnostic and prognostic biomarkers for alternative therapeutic options.



Table des matières

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Préambule

INTRODUCTION

1	Les lymphomes non hodgkiniens	1
2	Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL)	2
2.1	Présentation générale	2
2.2	Origine et classification des DLBCL.....	3
2.2.1	Sous-type GCB versus sous-type ABC	6
2.2.1.1	Le sous-groupe GCB « Germinal center B cell like ».....	8
2.2.1.2	Le sous-groupe ABC « Activated B-cell like »	9
2.2.2	Facteurs pronostiques.....	12
2.3	Place de l'immunothérapie dans le traitement standard	14
2.3.1	Le CD20, cible de l'immunothérapie	15
2.3.1.1	Structure de la protéine	15
2.3.1.2	Le gène du CD20 : MS4A1	17
2.3.1.3	La régulation de l'expression du CD20	17
2.3.1.4	Le Rôle biologique du CD20.....	19
2.3.2	Le rituximab et ses mécanismes d'action : déplétion des cellules B.....	19
2.3.2.1	La cytotoxicité dépendante de l'activation du complément (CDC).....	21
2.3.2.2	La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC).....	22
2.3.2.3	La mort cellulaire programmée : apoptose (PCD).....	23
2.3.3	Résistances au rituximab	26
2.3.3.1	Les mécanismes liés à l'anticorps (Rituximab)	26
2.3.3.2	Les facteurs de résistance à la CDC et à l'ADCC	27
2.3.3.3	Les résistances relatives à la signalisation apoptotique.....	28
2.3.3.4	Les résistances liées à l'expression cellulaire du CD20	30
2.3.3.5	Expression du CD20 à la surface des exosomes	31
2.3.4	Evolution de l'immunothérapie et nouvelles thérapies ciblées	32



3	Les neurotrophines.....	35
3.1	Des gènes aux protéines	35
3.2	Les récepteurs Trk	37
3.2.1	Structure des Trk	37
3.2.2	Isoformes des récepteurs Trk.....	39
3.2.2.1	Isoformes de TrkA	39
3.2.2.2	Isoformes de TrkB.....	39
3.2.2.3	Isoformes de Trk C.....	40
3.2.3	Voies de signalisation des récepteurs Trks.....	41
3.3	Le récepteur p75 ^{NTR}	43
3.3.1	Du gène à la protéine p75 ^{NTR}	44
3.3.2	Les différentes formes du récepteur p75 ^{NTR}	46
3.3.3	Voies de signalisation du récepteur p75 ^{NTR}	48
3.3.3.1	Voies de signalisation conduisant à l'apoptose.....	48
3.3.3.2	Voies de signalisation conduisant à la survie cellulaire.....	49
3.3.3.3	Interaction de p75 ^{NTR} avec son corécepteur : la sortiline.....	50
3.3.3.4	Interaction de p75 ^{NTR} avec les récepteurs Trk.....	52
3.4	Les récepteurs des neurotrophines comme cibles thérapeutiques.....	54
3.5	Neurotrophines et lymphocytes B	57
3.5.1	En conditions physiologiques	57
3.5.2	Neurotrophines, lymphomes B et DLBCL	60
	Résultats.....	62
	Article 1: Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas	64
	Article 2: Préambule.....	98
	Rappel sur les exosomes	98
	La biogenèse des exosomes	98
	Rôle des exosomes dans le processus tumoral	102
	Exosomes et résistance thérapeutique	104
	Article 2: DLBCL-derived exosomes: a new link between TrkB and rituximab sensitivity?.....	106
	Article 3: Préambule.....	123
	Emergence en oncologie du rôle des prohibitines et des facteurs d'initiation de la traduction protéique : évaluation d'un nouvel outil thérapeutique pour les DLBCL, les flavaglines.	123



Article 3: Evidence for the biological and therapeutic relevance of the prohibitin and EIF4A ligand, FL3, in non-Hodgkin B cell lymphoma..... 126

DISCUSSION, CONCLUSION, PERSPECTIVES..... 153

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 158



Abréviations

A

ABC: Activated B cell
ADAM: A disintegrin and metalloprotease
ADCC: Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity
ADN: Acide désoxyribonucléique
Ag : Antigène
ARMS: ankyrin repeat-rich membrane-spanning
ARN: Acide ribonucléique

B

Bad: BCL2-Associated agonist of cell death
Bcl-2/6/10 : B-cell lymphoma protein 2/6 ou 10
BCR : B-cell receptor
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

C

CARD: Caspase Recruiting Domain
CARD11: Caspase recruitment domain-containing protein 11
CBM: CARD11-BCL10-MALT1
CBP: CREB-binding protein
CDCC: complement-dependent cell cytotoxicity
CG: centre germinatif
CHO: Chinese Hamster Ovary
CHOP: Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
COO: Cell of origin
CRD: Cystein rich domain
CREB: cAMP Response Element Binding
CRT1: Complement Receptor type 1
Csk: c-src tyrosine kinase
CTF: C-terminal fragment

D

DAF: Decay accelerating factor
DAG: diacylglycérol
DD: Death domain
DLBCL: Diffuse Large B-Cell Lymphoma

E

EBV: Epstein-Barr virus
EEF1A1: Eukaryotic translation elongation factor 1 Alpha 1
eIF: Eukaryotic initiation factor
Erk: Extracellular signal-regulated kinase
ESCRT: Endosomal sorting complexes required for transport
EZH2: Enhancer of zeste homolog 2

F

FAIM: Fas apoptosis inhibitor molecule
FDA: Food and Drug Administration
FL: Full-length
FRET: fluorescence resonance energy transfer
FoxP1: Forkhead Box P1

G

GCB: Germinal Center B cell
GELA : Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte
GEP: Gene-expression profiling
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Grb2: growth factor receptor bound protein 2

I

ICD: Intracellular domain
IFN α/γ : Interferon alpha/gamma
Ig: Immunoglobuline
I κ B: Inhibitor of kappa B
IL: interleukin
IPI: Index Pronostique International
IRF4: Interferon regulatory factor 4
IRS1: Insulin-Receptor Substrate 1
ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

J

JNK: c-jun N-terminal kinase

K

KO: Knock out



L

LDH: lactate déshydrogénase
LLC: leucémies lymphoïdes chroniques
LNH: lymphomes non hodgkiniens

M

MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MDM2 : murine double minute 2
MEC: Matrice extra-cellulaire
MMPs: Matrix métalloprotéases
MnK: Mitogen-activated protein kinase (MAPK) interacting protein kinase
MS4A1: membrane-spanning 4-domain, group A, member 1
mTor: mammalian target of rapamycine
MUM1: Multiple myeloma 1

N

NADE: NT-associated cell death receptor
NF- κ B: Nuclear factor kappa B
NGF: Nerf growth factor
NGFR: Nerf growth factor receptor
NK: Natural killer
NOS: Not otherwise specified
NRAGE: NT-receptor interacting MAGE homolog
NRIF: NT-receptor interacting factor
NT: Neurotrophin
NTSR3 : Neurotensin receptor 3

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OS : overall survival

P

p53 : Protéine 53
p75^{NTR}: p75 neurotrophin receptor
PAG: phosphoprotein associated with GEMs
PDZ: Post-synaptic disc-large zona
PFS: Progression Free Survival
PHB-1/2: Prohibitine /2
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PKC: Protein kinase C
PLC: Phospholipase C
PMA: phorbol myristate acetate
PTEN: phosphatase and tensin homolog

R

R-CHOP: addition du rituximab à la chimiothérapie CHOP
RE: Réticulum endoplasmique
RIP: Regulated intramembrane proteolysis
Rsk: Ribosomal protein s6 kinase

S

Shc: Src homology 2 domain-containing protein
SOC: Store-operated cation
SorCS: Sortilin-related receptor CNS expressed
SorLA: Sortilin-related receptor L(DLR class) A
SOS: Son of sevenless
SH2/3: Src homology 2/3
SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
STAT: Signal transducer and activator of transcription

T

TK: Tyrosin kinase
TLR: Toll like receptor
TNF: Tumor necrosis factor
TP53: Tumor protein p53
TRADD: TNFR1 associated death domain protein
Trk: Tropomyosin receptor kinase
TRAF: TNF receptor-associated factor

V

VEGF: Vascular endothelial growth factor
Vps10p: Vacuolar protein sorting 10 protein

W

WHO: World Health Organization



Liste des figures

Figure 1 : Courbes de survie en fonction du groupe moléculaire de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL).-----	5
Figure 2 : Algorithme de Hans permettant de classifier les DLBCL selon les sous types GCB et non-GCB. -----	6
Figure 3 : Différents variants et sous-types de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL).-----	7
Figure 4 : Schéma des voies oncogéniques des sous-types GCB et ABC. -----	10
Figure 5 : Structure de l'antigène CD20 et des sites de liaison de 2 anti-CD20 utilisés dans l'immunothérapie des patients atteints de DLBCL (le rituximab et l'ofatumumab) -----	16
Figure 6 : Structure d'une immunoglobuline G kappa (d'après Cartron G., 2007) -----	20
Figure 7 : Mécanismes d'action du Rituximab-----	23
Figure 8 : Les mécanismes potentiels de résistance à la cytotoxicité dépendante du système du complément-----	27
Figure 9 : Mécanismes potentiels de résistance à l'apoptose induite par le Rituximab -----	30
Figure 10 : Schéma des domaines constituant les neurotrophines. -----	36
Figure 11: Schéma de la structure des récepteurs Trk. -----	38
Figure 12: Représentation des voies de signalisations induites par l'activation des récepteurs Trk. -----	43
Figure 13: Représentation schématique de p75NTR.-----	46
Figure 14: Les différentes formes du récepteur p75NTR. -----	47
Figure 15: Représentation schématique des voies de signalisation de p75NTR. -----	50
Figure 16: Interaction du récepteur p75NTR avec les récepteurs Trk et la sortiline -----	54
Figure 17: Différentes vésicules sécrétées par les cellules et principales molécules retrouvées dans les exosomes -----	101
Figure 18: Rôle des exosomes dans la tumorigenèse -----	103

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques génomiques des neurotrophines humaines.-----	35
---	----



Préambule

Le Lymphome Diffus à Grandes Cellules B (DLBCL) est une tumeur maligne des lymphocytes B au pronostic défavorable, dont la prise en charge thérapeutique reste encore difficile. C'est en réalité un groupe de lymphomes car cette maladie présente une très grande hétérogénéité sur le plan biologique et clinique. Cependant, deux principaux sous-types sur le plan pronostique ont été identifiés, le type GCB (Germinal center B-cell) et le type ABC (Activated B-cell); les patients de type GCB ayant une survie globale significativement meilleure que les patients de type ABC. Malgré cette forte hétérogénéité, la majorité des patients sont traités de façon uniforme, même si certaines thérapies ciblées se sont développées ces dernières années. Dès le début des années 2000, une immunothérapie a été proposée aux patients ciblant le CD20 qui est un marqueur membranaire des lymphocytes B. La combinaison de ces anticorps thérapeutiques anti-CD20, dont le rituximab, à la polychimiothérapie conventionnelle CHOP (immunochimiothérapie R-CHOP) s'est avérée plus efficace que la chimiothérapie seule, permettant d'obtenir jusqu'à 50% de survie à 5 ans. Cependant certains malades échappent à ce traitement et les résistances au rituximab sont devenues un problème considérable en clinique. Plusieurs mécanismes ont été suggérés mais leur signification chez les patients reste souvent imprécise. Cependant, la régulation négative de l'expression membranaire du CD20, observée chez des patients en rechute ou réfractaires à l'immunochimiothérapie, est considérée comme un des facteurs déterminants de cette résistance. De plus, des travaux récents ont montré que l'échappement thérapeutique pouvait être aussi en lien avec la sécrétion par les cellules B tumorales de microvésicules appelées exosomes. En effet, les exosomes présentent le CD20 à leur surface et se comportent à ce titre comme des « récepteurs leurres » vis-à-vis des anti-CD20 thérapeutiques. Ainsi, le ciblage du niveau d'expression membranaire du CD20, facteur déterminant de l'efficacité des anti-CD20, représente un nouveau défi thérapeutique en association avec l'immunothérapie dans ces cancers des cellules B.

C'est dans ce contexte que s'est situé notre sujet de thèse. Plus précisément l'objectif de cette thèse était d'identifier de nouvelles voies de survie des cellules tumorales de DLBCL pouvant être impliquées dans certaines résistances thérapeutiques aux anti-CD20. La connaissance de ces mécanismes devrait permettre des thérapies plus ciblées et le



développement de nouveaux procédés de sensibilisation aux traitements. Ainsi, pour aborder cet objectif, notre travail de thèse s'est organisé selon 2 axes:

Dans le premier axe, nous avons étudié le rôle de facteurs de croissance atypiques produits par les cellules lymphomateuses, **les neurotrophines (NTs)**, dans la survie des cellules tumorales de DLBCL et les résistances au rituximab. Cet axe principal de la thèse concerne la thématique centrale de notre équipe d'accueil (EA3842 - Homéostasie cellulaire et pathologies). L'ensemble de ces travaux nous ont permis d'être co-premier auteur d'un premier article publié en septembre 2015 dans *British Journal of Cancer*. Par la suite, nous avons choisi de nous concentrer surtout sur les résistances au rituximab liées à la régulation de l'expression du CD20 à la surface des cellules et au niveau des exosomes. Nous avons alors recherché le rôle joué par une de ces NTs, le BDNF suite à l'activation de son récepteur de survie, TrkB, sur ce processus. Les premiers résultats indiquent que la voie BDNF/TrkB pourrait participer, en plus de son effet pro-survie sur les cellules tumorales, à l'échappement thérapeutique notamment en régulant positivement l'expression du CD20 exosomal. L'ensemble de ces travaux ont constitué la base de la rédaction d'une seconde publication. Ils ont déjà fait l'objet d'une communication (poster) au congrès international « ASH Meeting on Lymphoma Biology » qui a eu lieu en juin 2016 à Colorado Springs.

Dans le deuxième axe, nous avons recherché le rôle d'acteurs moléculaires de signalisation de survie peu ou pas étudiés dans ces lymphomes en utilisant un « candidat médicament » identifié comme un de leur ligand. Ainsi nous avons évalué le potentiel anti-tumoral et thérapeutique **de flavaglines** de synthèse dans les DLBCL. L'intérêt pour ces composés venait du fait que les flavaglines exercent leurs effets anti-cancéreux en se liant à des molécules récemment identifiées comme des cibles émergentes en oncologie : **les prohibitines (PHBs) et le facteur d'initiation de la traduction eIF4A**. Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche transversal et collaboratif avec l'UMR 7200 (Université de Strasbourg – CNRS, Dr Laurent Désaubry) qui réalise la synthèse des flavaglines, dont le composé FL3. Cette thématique constituait déjà le sujet de notre stage de M2R, réalisé aussi dans cette équipe sous la direction du Pr Troutaud. Nos travaux ont démontré *in vitro* et *in vivo* les mécanismes anti-tumoraux du FL3 et suggèrent, pour la première fois dans ces lymphomes, la valeur pronostique d'une de leurs cibles moléculaires, les PHBs. Ces résultats ont fait l'objet d'un article actuellement soumis au journal *Blood*.



Avant de détailler l'ensemble de ces résultats nous allons définir dans la première partie de notre introduction bibliographique le contexte physiopathologique et clinique sur lequel nous avons travaillé, les lymphomes diffus à grandes cellules B. Puis dans une deuxième partie, nous présenterons les neurotrophines et leurs signalisations dans un cadre général et plus spécifiquement ensuite les données qui existaient, au démarrage de notre thèse, sur le rôle de ces facteurs de croissance au niveau des lymphocytes B. Concernant les résultats obtenus sur l'axe 1, nous avons choisi de présenter les données bibliographiques sur les exosomes et leurs fonctions biologiques, notamment dans le cadre d'un processus tumoral, juste avant le 2e article où nous avons abordé des études sur ces microvésicules cellulaires. Nous aborderons ensuite les résultats de l'axe 2 par une présentation succincte des flavaglines, molécules ayant fait l'objet du travail réalisé. Finalement, nous ferons un bilan et discuterons de l'ensemble des données expérimentales obtenues sur les 2 axes, et prolongerons ces réflexions en envisageant les perspectives et retombées potentielles de ce travail.



INTRODUCTION

1 Les lymphomes non hodgkiniens

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) font partie des syndromes lymphoprolifératifs et constituent un groupe très hétérogène de maladies, sachant que chaque entité possède une épidémiologie, une présentation clinique, un profil évolutif, un traitement et un pronostic qui lui est propre. D'un point de vue clinique, ces affections s'expriment par le développement de tumeurs au sein du tissu lymphoïde, notamment les ganglions lymphatiques. En raison de l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules lymphoïdes et de leur répartition anatomique ubiquitaire, ces affections peuvent se développer au sein de n'importe quel organe, voire tissu de l'organisme. La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou WHO – World Health Organization) revue en 2008 (Swerdlow et al, 2008) répartit ces cancers d'origine lymphoïde sur la base des origines cellulaires qui peuvent être B, T ou NK, mais aussi en fonction de leur stade de développement qu'ils s'agissent de précurseurs ou de cellules matures (dites « périphériques »).

La première description d'un lymphome fut effectuée par Thomas Hodgkin en 1832 qui lui donna d'ailleurs son nom : maladie de Hodgkin, puis lymphome de Hodgkin. L'identification et la description de la cellule de Reed-Sternberg, à l'origine du lymphome de Hodgkin, comme une entité cellulaire à part des autres types de lymphomes a conduit à regrouper les autres lymphomes sous le terme de lymphomes non hodgkiniens (LNH).

Avec environ 12 500 nouveaux cas¹ par an en France (soit 15 à 20 nouveaux cas/100 000 habitants/an) les LNH ne représentent que 3 à 4 % des cancers incidents mais se situent au 6^e rang par leur fréquence (Monnereau et al., 2013). L'incidence augmente par ailleurs avec l'âge, ainsi l'âge moyen au moment du diagnostic se situe autour de 65 ans, même si certains types de LNH sont observés plus spécifiquement chez des sujets plus jeunes (Alexander et al., 2007)

¹ Chiffre pour 2012, source InVS et Fondation ARC Pour la Recherche sur le Cancer

La répartition géographique des différents types de LNH est très variable dans le monde. Cependant, aux Etats-Unis comme en Europe, 85 à 90% des LNH ont comme origine des cellules B parmi lesquels les Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B (DLBCL : Diffuse Large B-Cell Lymphoma) constituent le groupe le plus important (31%) (Drouet et al., 2010). L'agressivité clinique des LNH est corrélée au diagnostic histologique. Pour les LNH agressifs (d'évolution rapide) qui constituent la très grande majorité des LNH, la forme histologique la plus fréquente est le DLBCL (environ 60 % des formes agressives) alors que pour les LNH indolents (d'évolution lente) c'est le lymphome folliculaire de type B (environ 80 % des formes indolentes) (Alexander et coll., 2007). *Notre étude ayant porté sur les DLBCL, nous allons uniquement développer, dans la suite de cette présentation générale des LN, les caractéristiques biologiques et cliniques de ces lymphomes.*

2 Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL)

2.1 Présentation générale

Les DLBCL sont les plus fréquents des LNH, avec au sein de l'Union Européenne, 3-4/100 000 cas par an. En France, on a estimé à 4096 le nombre de nouveaux cas en 2012. Ce sont des lymphomes agressifs et malgré, comme le verra ensuite, les progrès très importants réalisés dans la mise en place des traitements, 40% des patients mourront ou seront réfractaires au traitement ou en échec thérapeutique. La fréquence de cette maladie et l'agressivité augmente avec l'âge. Ainsi, elle est de 0,3/100 000 cas par an pour les personnes âgées de 35 à 39 ans et de 26,6/100 000/ an pour les personnes âgées de 80 à 84 ans (Morgan et al., 1997, Tilly et al., 2012). Au moment du diagnostic, l'âge moyen des patients se situe entre 60 et 70 ans, et les hommes sont légèrement plus touchés que les femmes (Campo et al., 2011, Martelli et al., 2013). Les causes de ces lymphomes demeurent inconnues dans la grande majorité des cas mais différents facteurs de risque susceptibles de favoriser la survenue de cette maladie ont été identifiés: il s'agit par exemple des infections par certains virus, comme le virus du SIDA (HIV), le virus de l'hépatite C (HCV) ou l'Epstein-Barr virus (EBV, responsable également de la mononucléose). Des facteurs environnementaux (exposition à des pesticides notamment) sont également évoqués. Enfin, les déficits de l'immunité faisant suite à une greffe d'organe

favorisent également l'apparition de ce type de lymphome (Alexander et al., 2007, Martelli et al., 2013).

Le DLBCL peut être *de novo*, c'est-à-dire qu'il est détecté sur la biopsie ganglionnaire d'une personne n'ayant pas d'antécédent de lymphome, ou secondaire, dans le cas où il survient au cours de l'évolution ou la progression d'un autre lymphome (De Paepe et al., 2005, Martelli et al., 2013).

2.2 Origine et classification des DLBCL

Le lymphome diffus à grandes cellules B se définit, selon la WHO classification revue en 2008, comme une prolifération diffuse de larges cellules lymphoïdes néoplasiques de la lignée B, dont la taille du noyau est égale ou supérieure à celui d'un macrophage normal ou à plus de deux fois celui d'un lymphocyte normal. Différentes études morphologiques, biologiques et cliniques ont permis la subdivision des DLBCL en variants morphologiques, sous-types moléculaires et immunophénotypiques et en entités cliniques distinctes.

Sur le plan **morphologique**, ils sont caractérisés par 3 sous-types : centroblastique (le plus fréquent), immunoblastique et anaplasique. Cependant, cette classification basée sur la taille des cellules, la coloration du cytoplasme et la morphologie du noyau n'est pas fiable du fait de la difficulté de reproductibilité entre observateurs (Campo et al., 2011).

L'immunophénotypage indique communément les marqueurs des lymphocytes B comme le CD19, le CD20, le CD22, le CD79a mais aussi le CD10 (30 à 60%), Bcl-6 (B cell lymphoma 6 protein) (60 à 90%) et MUM1 (Multiple Myeloma 1) (35 à 65%). Dans la plupart des cas (50 à 75%), ces cellules expriment également une immunoglobuline de surface (Harris et al., 1994).

Sur le plan cytogénétique, les oncogènes communément dérégulés dans les DLBCL sont : *MYC*, *BCL2* et *BCL6*. L'altération génétique la plus fréquemment décrite est le réarrangement du gène *BCL6* (30% des cas) suite à une translocation chromosomique, suivie du réarrangement du gène *BCL2* (B-cell lymphoma protein 2) dû à la translocation t(14 ;18) dans 20 à 30% des tumeurs, et du réarrangement du gène *MYC* dans 10% des cas avec un gène des immunoglobuline (Ig) comme partenaire dans 60% des cas. Ces évènements génétiques seraient liés notamment aux processus (hypermutations somatiques, commutation de classe) se déroulant lors de la maturation des cellules B suite à leur activation dans les organes lymphoïdes

périphériques (Pasqualucci et al., 2006, Takizawa et al., 2008). Ces réarrangements aboutissent à la sur-expression des protéines correspondantes impliquées notamment dans la prolifération, la protection contre l'apoptose, ce qui concourt à la transformation néoplasique (Hummel et al., 2006, Gatter and Pezzella, 2010).

De manière générale et quand cela est possible, les lymphomes sont classés par rapport à leur équivalent non tumoral. En effet, la plupart du temps, les lymphomes B proviennent de cellules B qui subissent un évènement oncogénique suite à leur activation en périphérie par l'antigène (Ag). Plus précisément, ces évènements ont lieu au cours de la maturation des cellules B, qui fait suite à leur activation dans les organes lymphoïdes périphériques, au niveau d'une zone spécialisée des follicules lymphoïdes appelée : centre germinatif (CG). Dans les CG, les cellules B activées vont subir des modifications géniques (hypermutations somatiques, commutation de classe) pour finalement se différencier soit en plasmocytes sécréteurs d'Ac de haute affinité pour l'Ag, soit en cellules B mémoires (Klein and Dalla-Favera, 2008).

Ainsi **une classification basée sur la cellule d'origine (COO – Cell Of origin)** a aussi été très rapidement proposée. Les études des profils d'expression génique (GEP) ont permis de définir différentes entités cliniques de DLBCL, et 2 sous-groupes ont été ainsi caractérisés en fonction de leur réponse aux traitements utilisant une chimiothérapie à base d'anthracycline : le sous-type GCB (Germinal Center B cell like, 45-50%) provenant de cellules du centre germinatif, et le sous-type ABC (Activated B Cell like) dont les signatures transcriptionnelles étaient respectivement comparables à celles des lymphocytes B des centres germinatifs (CD10, Bcl-6...) et aux lymphocytes B activés périphériques (MUM1/IRF4, Foxp-1, Bcl-2...). Ces études ont montré que les patients du groupe GCB présentaient une survie significativement augmentée (60% à 5 ans) par rapport aux patients du groupe ABC associé à un mauvais pronostic (35% à 5 ans). Par la suite, un troisième type de DLBCL a été décrit sous l'appellation « DLBCL de type 3 » (ou « unclassifiable group ») car ce groupe ne présentait aucune signature spécifique et des profils non semblables aux deux premiers, suggérant qu'il s'agissait encore d'un mélange de plusieurs entités cliniques. Les patients du type 3 par ailleurs présentaient une réponse aux traitements intermédiaire entre celle du groupe GCB et ABC (39% de survie à 5 ans) (Alizadeh et al., 2000, Rosenwald et al., 2002). Les sous-groupes ABC et les lymphomes DLBCL de type 3 sont généralement regroupés sous le terme « non-GC » (Figure 1).

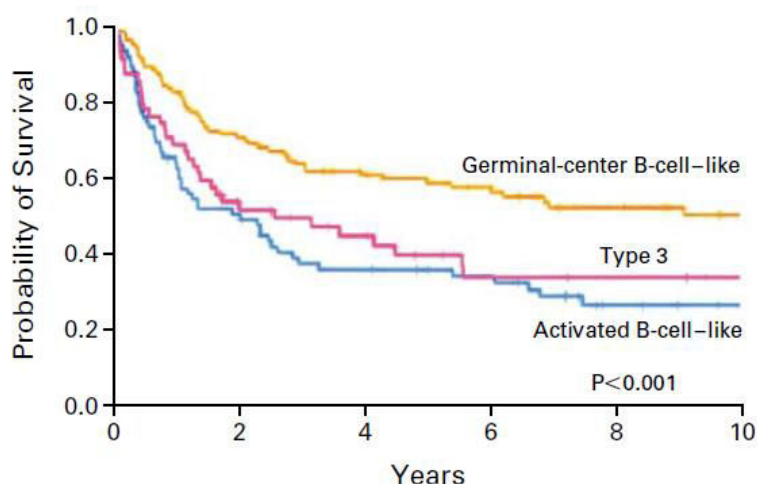


Figure 1 : Courbes de survie en fonction du groupe moléculaire de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL). Les patients atteints d'un DLBCL de type ABC (Activated B-cell like) ou d'un DLBCL de type 3 ont une probabilité de survie globale moins élevée que celle des patients atteints d'un DLBCL de type GCB (Germinal center B-cell like) (Rosenwald et al., 2002).

Des études plus récentes menées sur des patients et sur des lignées cellulaires ont mis en évidence la présence de très nombreux gènes mutés de manière récurrente dans les deux types de DLBCL (ABC et GCB). Ces mutations somatiques communes sont des mutations « inactivatrices » de *TP53* et des mutations de gènes impliqués dans l'immuno-surveillance (*B2M*, *CD58*), les régulations épigénétiques (*CREBBP/EP300*, *KMT2D/C*, *MEF2B*) et l'activation de l'oncogène *BCL6*. Certaines mutations sont différemment retrouvées dans les 2 sous-types GCB et ABC; par exemple, le sous-type GCB présente fréquemment des mutations du gène codant pour une histone méthyltransférase (*EZH2*) alors que le type ABC a des mutations dans des gènes (*CD79A*, *MYD88*, *CARD11*, *TNFAIP3*) impliqués dans l'activation du BCR ou des Toll-like récepteurs ou encore de la voie NF- κ B (Zhang et al., 2013, Swerdlow et al., 2016).

Toutes ces études montrent l'hétérogénéité génétique impliquée dans la mise en place des différents types de DLBCL et mettent en évidence la nécessité d'élaborer des traitements plus spécifiques et personnalisés à chaque patient. Cependant, l'analyse des profils génétiques n'est pas encore réalisable sur des tissus fixés au formol, inclus dans la paraffine mais seulement sur des tissus frais congelés et son application en pratique courante reste encore très limitée et n'est pour l'instant pas décisionnelle. Du fait de l'impact de la classification GCB/non-GCB sur le pronostic, plusieurs profils immunohistochimiques ont été proposés comme prédictors

du profil génétique. Bien que leurs correspondances avec le profil d'expression génique ne soient pas toujours exactes, une corrélation pronostique se dessine au même titre que l'expression génique (Hans et al., 2004, Muris et al., 2006, Natkunam et al., 2008, Choi et al., 2009). Bien qu'imparfait (environ 10 à 15% de tumeurs non reconnues), l'algorithme de Hans est le plus fréquemment utilisé et propose de classer les tumeurs en fonction de l'expression protéique de Bcl-6, CD10 et MUM1 (Figure 2).

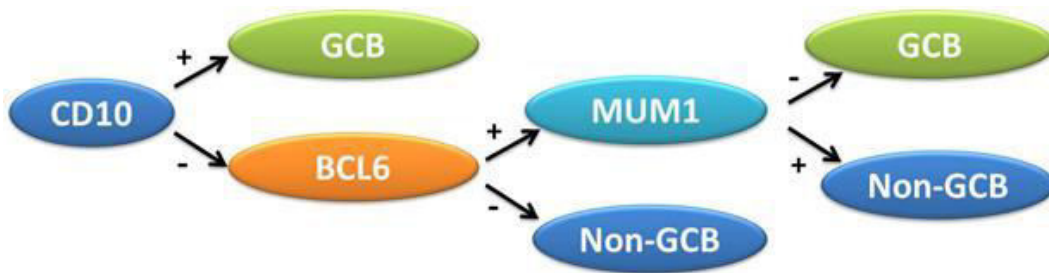


Figure 2 : Algorithme de Hans permettant de classer les DLBCL selon les sous types GCB et non-GCB.
Cet algorithme utilise trois marqueurs : CD10, Bcl-6 et MUM1/IRF4 (Hans et al., 2004).

2.2.1 Sous-type GCB versus sous-type ABC

La classification de WHO revue en 2008 et réactualisée en 2016 (Swerdlow et al, 2008, Swerdlow et al., 2016) a pris en compte la forte hétérogénéité des DLBCL en reconnaissant l'existence d'entités anatomo-cliniques bien définies et individualisées, correspondant à toute une série de sous-types de DLBCL (DLBCL subtypes et « Other DLBCL subtypes ») comme les formes cutanées (Primary cutaneous DLBCL), cérébrales (Primary DLBCL of CNS) ou médiastinales (Primary mediastinal large B-cell lymphoma) (Figure 3). A noter l'existence d'un sous-type de DLBCL inclassable, présentant des caractéristiques laissant penser à des formes intermédiaires entre les DLBCL et d'autres lymphomes comme le lymphome de Hodgkin ou le lymphome de Burkitt, rassemblés dans une catégorie appelée « Borderlines ». Tous ces sous-types sont cependant minoritaires et le plus grand nombre de DLBCL se retrouvent en réalité dans un sous-type encore très hétérogène sur le plan morphologique, immunohistochimie et moléculaire, appelé pour cette raison NOS (Not Otherwise Specified).

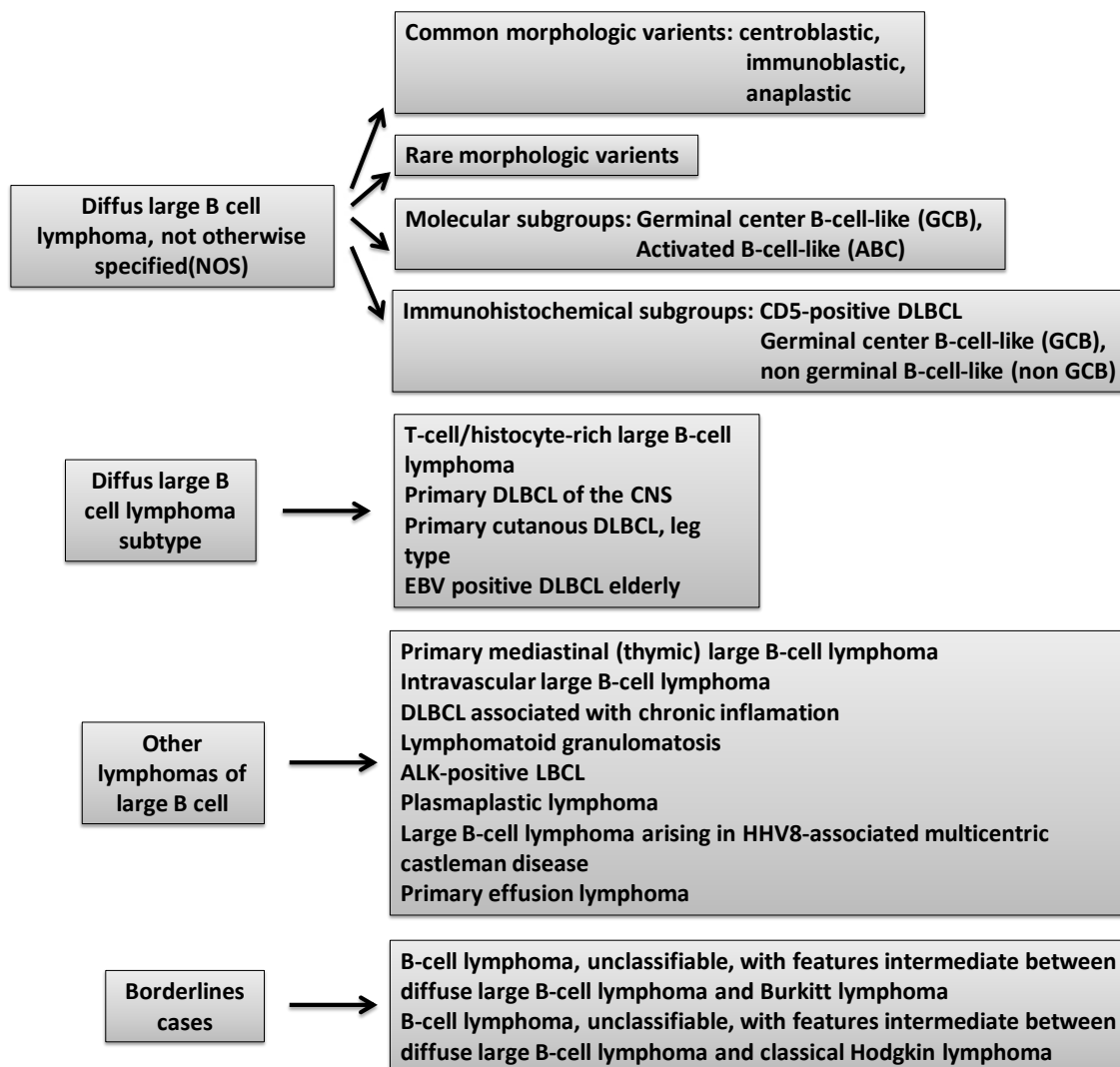


Figure 3 : Différents variants et sous-types de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL). D’après « Non-Hodgkin Lymphomas, second edition » de James O. Armitage, Peter M. Mauch, Nancy Lee Harris, Bertrand Coiffier, Riccardo Dalla-Favera (2009).

Parmi les DLBCL du groupe NOS, 2 groupes principaux ont été mis en évidence comme on l’a vu à partir des études des profils d’expression génique : le type GCB et le type ABC. Cependant, plusieurs milliers de gènes différencient ces 2 types qui sont aussi associés à des altérations génétiques distinctes, l’activation spécifique de certaines voies de signalisations moléculaires et des réponses thérapeutiques différenciées, suggérant des mécanismes oncogéniques différents (Rosenwald et al., 2002, De Paepe and De Wolf-Peeters, 2007). *Nous allons détailler maintenant un peu plus les caractéristiques majeures de chacun de ces sous-types, qui correspondent aussi à la classification utilisée pour analyser les résultats que nous avons*

obtenus à partir des biopsies de patients. De même, la distinction GCB/ABC est à la base aussi du choix des lignées humaines de DLBCL que nous avons utilisées comme modèles cellulaires dans nos études *in vitro*.

2.2.1.1 Le sous-groupe GCB « Germinal center B cell like »

Le groupe GCB est caractérisé par une signature transcriptomique comparable à celle des cellules B du centre germinatif avec l'expression des gènes *CD10* et *BCL6* (Hans et al., 2004). Le gène *BCL6* code pour un facteur de transcription du même nom, qui est essentiel au processus de maturation des cellules B du centre germinatif (Ye et al., 1997) (Figure 4). Les lésions génétiques spécifiques des DLBCL de type GCB sont la translocation t(14;18) impliquant le gène *BCL2*, la délétion du suppresseur de tumeur *PTEN* conduisant à l'activation constitutive de la voie anti-apoptotique PI3K/Akt, l'amplification d'un cluster de micro-ARN miR-17-92 impliqué dans la régulation négative de *PTEN*, *TP53*, *BIM* et *E2F1* et l'amplification du locus *REL* (Lenz et al., 2008a). Environ 10% des cas sont également caractérisés par une amplification du gène *MDM2*, régulateur négatif du gène suppresseur de tumeur *TP53* (Lenz et al., 2008a). Notons que les altérations touchant le gène *TP53* sont associées à un mauvais pronostic dans ce groupe de tumeurs (Young et al., 2008). Enfin, une étude a également montré l'existence de mutations somatiques avec « gain de fonction » au niveau de l'oncogène *EZH2* codant une histone méthyltransférase dans 21,7% des cas de DLBCL de type GCB (Morin et al., 2010).

Les translocations chromosomales sur le locus 3q27 du gène *BCL6* sont les plus caractéristiques et communes des anomalies génétiques détectées dans les DLBCL (30 à 40%), avec une proportion plus importante observée pour le type ABC (Lossos, 2005). Les partenaires les plus souvent impliqués sont les gènes des Ig sur les régions chromosomiques 14q32, 2p12 et 22q11 mais plus d'une vingtaine d'autres *loci* alternatifs peuvent jouer un rôle. L'hyperexpression de la protéine Bcl-6 produit alors un blocage de la différenciation et allonge la survie des cellules ayant subi un événement oncogénique, favorisant l'émergence d'un clone tumoral.

La surexpression du gène *BCL2*, codant pour une protéine anti-apoptotique, est retrouvée dans 47 à 58% des DLBCL. Elle peut être due à la translocation t(14 ;18)(q32 ;q21) qui permet donc sa surexpression dans environ 20% des cas. Elle peut également être due à l'amplification du gène *BCL2* indépendamment de la t(14 ;18) dans 10% des cas de DLBCL de type GCB mais aussi 34% des types ABC. L'hyperexpression de la protéine Bcl-2 conduit à un

effet anti-apoptotique non contrôlé donnant un avantage de survie pour le clone porteur de la translocation. (Gascoyne, 1997, Steinhardt and Gartenhaus, 2012)

Une étude récente réalisée à partir de 248 tumeurs primaires de patients a montré une perte d'expression de la protéine PTEN dans 55 % des tumeurs GCB contre seulement 14% des tumeurs non-GCB. Plusieurs mécanismes moléculaires contribuent à cette perte d'expression et notamment, en plus des délétions, un certain nombre de mutations qui aboutissent à une réduction de la stabilité de la protéine. De plus, dans les tumeurs et les lignées cellulaires de type GCB, le statut d'expression de PTEN est inversement corrélé avec l'activation de la voie oncogénique PI3K/Akt. Ainsi, la perte d'expression de PTEN fournit une explication à l'expression constitutive de la voie PI3K/Akt déterminant ensuite une forte expression de MYC dans un grand nombre de DLBCL, ce qui finalement favorise la prolifération et la survie des cellules tumorales (Pfeifer et al., 2013).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le sous-groupe GCB est aussi caractérisé (environ 20% des patients) par des mutations sur le gène *EZH2* aboutissant à une augmentation de l'activité de cette histone méthyltransférase et par conséquent des niveaux de H3K27me3. L'expression de *EZH2* est en fait décisive pour les étapes liées à la formation du centre germinatif, et sa répression aux stades tardifs est nécessaire pour permettre la sortie du CG et la poursuite du processus de différenciation des cellules B activées (Heyn and Esteller, 2013). Les formes mutées hyperactives de *EZH2* favorise la formation de CG contenant des cellules B avec une forte activité de prolifération ; cependant les travaux montrent que des évènements oncogéniques supplémentaires (comme la sur-expression de Bcl-2) sont nécessaires pour déclencher un lymphome (Béguelin et al., 2013). Ces découvertes assez récentes ont permis d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques et des essais cliniques utilisant des inhibiteurs de *EZH2* sont actuellement en cours (Pasqualucci et al., 2006).

2.2.1.2 Le sous-groupe ABC « Activated B-cell like »

Le groupe ABC présente une signature comparable à celle des lymphocytes B activés au stade post centre germinatif ; plus précisément ils seraient issus de cellules B au stade plasmoblaste juste avant la sortie des GC, ce qui explique que les cellules B de ce groupe expriment des gènes fréquemment exprimés par les plasmocytes matures (Sehn and Gascoyne, 2015) (Figure 4). Effectivement, les DLBCL de type ABC présentent fréquemment des inactivations du gène *BLIMP1* causées par des délétions ou des mutations ayant pour effet le blocage de la différenciation en plasmocyte, suggérant que l'inhibition de la différenciation

terminale pourrait être un mécanisme de la pathogenèse de ces DLBCL (Tam et al., 2006, Pasqualucci et al., 2006, Mandelbaum et al., 2010). Ces lymphomes présentent de fortes quantités d'AID et les gènes de leur IgH sont fortement mutés. Néanmoins, la plupart des lymphomes de type ABC n'ont pas réalisé la commutation isotypique, contrairement aux lymphomes de type GCB, et les cellules B tumorales expriment l'IgM à leur surface (Wright et al., 2003, Lenz and Staudt, 2010).

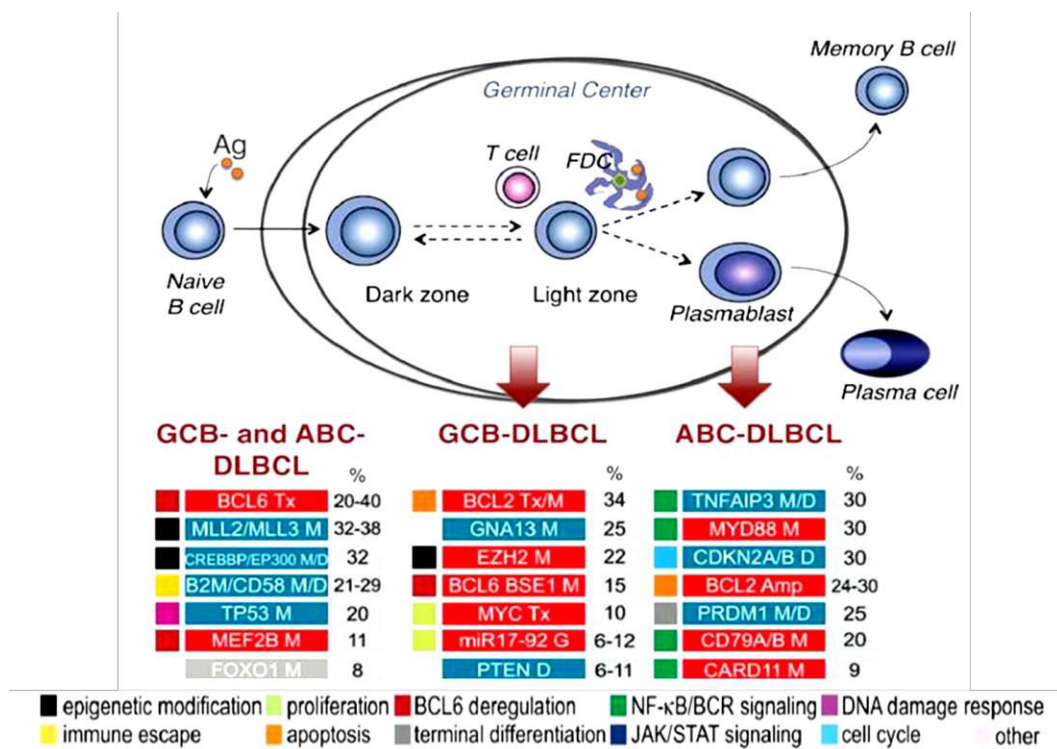


Figure 4 : Schéma des voies oncogéniques des sous-types GCB et ABC. Les lymphomes peuvent survenir à différents stades du développement des lymphocytes B normaux et notamment au cours de leur activation par l'antigène (Ag) dans les centres germinatifs (Germinal Center, GC). Un grand nombre de facteurs de transcription sont nécessaires à l'établissement et au maintien de l'identité et à la fonction des cellules du GC. Sur ce schéma sont indiquées les possibles altérations génétiques communes ou spécifiques aux sous-types du DLBCL, avec les voies biologiques impliquées et les types de mutations. En bleu : perte de fonction ; en rouge : gain de fonction (Camicia et al., 2015).

La caractéristique majeure du sous-type ABC est sa « signature NF-κB » avec l'activation constitutive de ce facteur de transcription, déterminant la survie cellulaire, la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. En effet, parmi les gènes surexprimés dans les ABC, plusieurs gènes sont des cibles du facteur de transcription NF-κB tels ceux codant IRF4, CFLAR/c-Flip, Bcl-2, Cycline D2, CCR7, et IκB (Davis et al., 2001, Hans et al., 2004, Lenz et al., 2008). L'inhibition de la voie NF-κB conduit à la mort des lignées cellulaires de type ABC sans affecter les cellules de type GCB, démontrant la dépendance du sous-type ABC à

cette voie de signalisation (Lam et al., 2005). Ainsi, l'activation de la voie NF- κ B induit notamment la surexpression de *BCL2* ce qui explique, avec les amplifications de ce gène, que la plupart des DLBCL de type ABC présentent une forte expression de Bcl-2 contribuant au mauvais pronostic associé à ce type (Viatour et al., 2003, Lenz et al., 2008a). Cette activation constitutive de NF- κ B est dûe principalement à l'activation constitutive du complexe de signalisation CBM formé par CARD11, Bcl-10 et MALT1 et qui est nécessaire à l'activation de la voie NF- κ B en aval de la signalisation du récepteur des cellules à l'Ag (BCR) (Krappmann, 2012, Fontán and Melnick, 2013). Dans les DLBCL ABC l'activation constitutive du complexe CBM peut-être due à différents évènements génétiques : comme les mutations activatrices de *CARD11* (env 10%), ou l'activation chronique de la signalisation du BCR elle-même induite suite à des mutations des chaînes du co-récepteur CD79A ou CD79B, ou suite à l'activation constitutive de kinases en aval du BCR (comme Syk, PI3K, BTK ou la PKC β) (Sehn and Gascoyne, 2015) (Figure 4).

Le gène *IRF4/MUM1* a été utilisé par Hans dans son algorithme pour différencier les sous-types de DLBCL. L'activation constitutive de la voie NF- κ B, qui est comme on vient de le voir une caractéristique majeure du sous-type ABC, est responsable de l'expression d'IRF4 ce qui tend à pousser les cellules tumorales B vers la différenciation en plasmocytes. Cependant, comme on l'a mentionné au début de ce paragraphe, d'autres mécanismes génétiques vont interférer avec cette différenciation comme l'inactivation de *BLIMP-1*. (Davis et al., 2001, Staudt, 2010). Il est aussi intéressant de rappeler que des mutations récurrentes du gène *MYD88* impliqué dans la signalisation des Toll-like récepteurs sont observées dans plus de 30 % des patients du type ABC, ce qui détermine une régulation positive supplémentaire de la voie NF- κ B en plus de la signalisation JAK/STAT (Sehn and Gascoyne, 2015, Swerdlow et al., 2016). En effet, parmi les nombreux effets de la signalisation de NF- κ B dans les cellules tumorales du groupe ABC il faut noter la production de cytokines IL-6 et IL-10 qui agissent, via les kinases JAK et le facteur de transcription STAT3, en déterminant des signaux autocrines de survie (Lam et al., 2008). Les tumeurs ABC présentent ainsi une forte signature des gènes cibles de STAT3 associée à des taux importants de STAT3 et de STAT3 phosphorylée au noyau, ce qui n'est pas le cas des tumeurs GCB. Cette forte expression de STAT3 a été corrélée à un mauvais pronostic (Ding et al., 2008). Des expériences d'inhibition de STAT3 par shRNA dans des lignées de DLBCL de type ABC conduisent à la mort des cellules suggérant que STAT3 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante dans ce type de lymphomes (Scuto et al., 2011).

Finalement STAT3, interagissant physiquement avec NF- κ B, réalise une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ce facteur (Staudt, 2010).

Parmi les autres altérations géniques fréquemment associées aux DLBCL de type ABC il faut citer la délétion du locus *INK4-ARF* (24 à 30% des cas) qui code pour 3 suppresseurs de tumeur (CDKN2B, ARF et CDKN2A), et dont l'inactivation est très fréquemment retrouvée dans beaucoup de cancers chez l'homme. Les protéines CDKN2A et CDKN2B sont impliquées sélectivement dans l'inhibition des CdkD aboutissant à un blocage du cycle cellulaire en phase G1/S, et l'ARF intervient dans la stabilisation de TP53. La perte de ces suppresseurs de tumeur bloque l'action des agents chimiothérapeutiques, ce qui pourrait contribuer au mauvais pronostic de ce sous-type (Lenz et al., 2008, Testoni et al., 2015).

2.2.2 Facteurs pronostiques

L'Index Pronostique International (IPI) est l'un des scores pronostiques cliniques les plus puissants et permet de répartir les patients en différents sous-groupes de risque (faible, intermédiaire faible, intermédiaire haut et haut) à partir de cinq critères: le taux de LDH circulant (lactate déshydrogénase), l'âge, le stade clinique selon la classification d'Ann Arbor, l'étude de la performance (Performance Status, PS) et le nombre de sites extra-ganglionnaires atteints. Le taux de rémission complète et la survie à 5 ans sont clairement différents en fonction de ce score. Les patients âgés de plus et de moins de 60 ans présentant des survies différentes, un index pronostique spécifique aux patients âgés de moins de 60 ans a été introduit (aaIPI, age adjusted IPI), calculé sur 3 points uniquement (PS, taux de LDH et stade clinique). C'est cet IPI adapté à l'âge qui est le plus fréquemment utilisé (Martelli et al., 2013). Cependant, parmi chacun de ces sous-groupes, des différences considérables en termes de survie sont constatées suggérant qu'il existe d'autres marqueurs pronostiques non pris en compte par les critères de l'IPI. De plus, avec l'arrivée de l'immunothérapie associée à la chimiothérapie, qui a permis d'augmenter sensiblement la survie des patients, il est devenu difficile d'identifier les patients à haut risque avec cet index.

Plusieurs marqueurs immunohistochimiques ont été rapportés comme ayant un impact pronostique indépendant de l'IPI. L'expression protéique de Bcl-2, de CD5, de FOXP1 (*Forkhead box protein P1*) ou encore de p53 serait associée à un pronostic défavorable. Cependant les résultats obtenus dans les différentes études sont souvent contradictoires et leur

interprétation est actuellement controversée, en particulier depuis l'arrivée du rituximab (Lenz et al., 2008a, Young et al., 2008, Choi et al., 2009, Iqbal et al., 2011).

En cytogénétique, l'impact pronostique des translocations impliquant les oncogènes *MYC*, *BCL2* et *BCL6* a été rapporté dans plusieurs études et bien que le rôle des translocations de *BCL2* et de *BCL6* reste encore discuté (Martelli et al., 2013, Swerdlow et al., 2016), la translocation du gène *MYC* est de manière consensuelle associée à un mauvais pronostic des patients (Rosenwald et al., 2002, Shipp et al., 2002). Le gène *MYC* code pour un proto-oncogène, la protéine c-Myc qui est un régulateur positif de la prolifération cellulaire ; une fois activé, ce facteur de transcription régule notamment la transition G0-G1 du cycle cellulaire, la différenciation, la synthèse protéique ou encore l'apoptose. Comme on l'a évoqué précédemment, une surexpression de c-Myc peut être observée dans certains cas de DLBCL suite au réarrangement de son gène en particulier par translocation avec les gènes des Ig (environ 10% des patients) (Sehn and Gascoyne, 2015). Dans certaines tumeurs une translocation du gène *MYC* peut être associée à une translocation des gènes *BCL2* ou *BCL6*. Ces cas de DLBCL sont alors nommés « double-hit » (DH) ou « triple-hit » (TH) si le réarrangement de *MYC* est associé simultanément à celui des 2 autres gènes (*BCL2* et *BCL6*). Ce sont des lymphomes très agressifs. Bien que plus rares (environ 5% des DLBCL, ces cas de DLBCL représentent cependant un sous-groupe réfractaire aux traitements avec une survie moyenne d'environ 8 mois. Cependant peu d'études ont comparé la survie des patients présentant une double translocation par rapport à ceux porteurs d'une simple translocation. Enfin, il faut noter que la co-expression des protéines c-Myc et Bcl-2, via des mécanismes indépendants des translocations chromosomiques, est plus souvent mesurée par immunohistochimie que le double réarrangement de leurs gènes. Les patients surexprimant les 2 protéines (25% environ des DLBCL) présentent un pronostic plus défavorable que ceux présentant une surexpression d'une seule des protéines, ou que ceux n'en surexprimant aucune. De façon intéressante la surexpression des 2 protéines semble être plus fréquente dans le sous-type ABC et contribuerait largement à son plus mauvais pronostic (Hu et al., 2013). Ainsi il est proposé de rechercher la dérégulation conjointe de *MYC* et *BCL2* au moment du diagnostic afin d'explorer d'autres alternatives thérapeutiques pour ce sous-groupe de patients à très haut risque (Sehn and Gascoyne, 2015). Dans ce contexte la révision en 2016 de la classification de WHO des DLBCL propose que la double expression de Myc et Bcl2 soit considérée comme un nouvel indicateur pronostique dans les DLBCL du groupe NOS (Swerdlow et al., 2016).

2.3 Place de l'immunothérapie dans le traitement standard

Les premiers succès de thérapies sur des stades avancés de DLBCL ont été rapportés en 1972. La stratégie du traitement reposait sur l'association de plusieurs drogues comme le cyclophosphamide, la doxorubicine, la vincristine et la prednisone ou polychimiothérapie **CHOP**. Le **cyclophosphamide** est un agent alkylant de l'ADN. L'**(Hydroxy)doxorubicine** est une anthracycline qui inhibe la topoisomérase II. Elle induit également la production de radicaux libres et est un chélateur du fer capable de se lier à l'ADN pour induire l'apoptose. Elle inhibe également la synthèse d'ARN et d'ADN en s'intercalant entre les paires de bases et en créant un encombrement stérique. L'**oncovine** (ou vincristine) est un poison du fuseau mitotique qui, en interagissant avec la tubuline, cause l'arrêt du cycle cellulaire. La **prednisone** est quant à elle un agoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes. Sa fixation induit une diminution de la réponse inflammatoire par inhibition de la fonction de certaines cellules telles que les macrophages.

Le développement de cette thérapie a par la suite donné lieu à des protocoles dits de 2ème et de 3ème génération en augmentant le nombre de médicaments associés. Bien que plus complexes, ils présentent des résultats supérieurs à ceux du CHOP, avec une augmentation d'efficacité de 55 à 65% sur les patients. Les traitements standards associent actuellement une immunothérapie à la polychimiothérapie CHOP ; il s'agit d'anticorps anti-CD20 qui se sont révélés particulièrement bénéfiques pour les patients en association avec le traitement CHOP (Coiffier, 2005, Cultrera and Dalia, 2012).

Le rituximab a été le premier anti-CD20 autorisé par la FDA (Food and Drug Administration) en 1997 pour le traitement des lymphomes folliculaires et cette immunothérapie a été très vite appliquée avec succès aux DLBCL et aux autres lymphomes B non-hodgkiniens (Flowers et al., 2010). L'addition du rituximab à la chimiothérapie CHOP (R-CHOP) a permis d'augmenter de façon très significative la survie des patients, et a marqué la fin des années 90 par le bénéfice important qu'a apporté cette nouvelle thérapie dans la prise en charge des patients. L'efficacité du protocole R-CHOP a été démontrée la première fois par le groupe GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte) qui a fait une étude prospective de l'efficacité de la chimiothérapie (CHOP) plus rituximab comparativement à la chimiothérapie seule chez des patients âgés (≥ 60 ans) (Coiffier et al., 2002). Cette étude a été suivie pendant 7 ans et les résultats ont montré que le bénéfice en terme de survie globale est toujours hautement significatif après 7 ans en faveur du R-CHOP (OS 53 % versus 36 % ; $p = 0,0004$)

(Feugier et al., 2005, Coiffier et al., 2007). Plusieurs études cliniques issues d'autres groupes de chercheurs, notamment américains et allemands, ont confirmé ces résultats, y compris chez des patients plus jeunes, montrant clairement que les traitements de type R-CHOP augmentaient significativement la survie des patients quel que soit leur âge (Coiffier et al., 2002, Feugier et al., 2005, Habermann et al., 2006, Pfreundschuh et al., 2006). La combinaison du rituximab à la chimiothérapie CHOP est alors devenue le traitement standard pour les patients atteints de DLBCL, y compris jusqu'à nos jours (Camicia et al., 2015) Sehn and Gascoyne, 2015).

Dans le cadre de notre thèse, nous avons choisi d'étudier les résistances et la sensibilisation au rituximab. C'est pourquoi nous allons nous concentrer sur cette immunothérapie dans la suite de ce paragraphe, et nous ne traiterons pas non plus des autres résistances thérapeutiques, liées à la chimiothérapie.

2.3.1 Le CD20, cible de l'immunothérapie

Le CD20 est exprimé à haute densité à la surface des lymphocytes pré-B, des lymphocytes B matures et des lymphocytes B mémoires. En revanche, il n'est pas exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques, des cellules pro-B, ni de la grande majorité des plasmocytes (Tedder and Engel, 1994). L'administration de rituximab n'affecte donc pas les cellules souches ou le développement des précurseurs des cellules B. Ceci permet aux cellules B saines de se régénérer après le traitement, et de revenir à un niveau normal après un délai de quelques mois (9 à 12 mois). Cela permet également de maintenir un taux d'immunoglobulines stables et d'éviter certaines infections.

2.3.1.1 Structure de la protéine

Le CD20 ou MS4A1 (membrane-spanning 4-domain, group A, member 1) est une phosphoprotéine non glycosylée de 297 acides aminés. Elle est composée de 4 domaines transmembranaires et les queues amino- et carboxy-terminales sont localisées dans la partie intracytoplasmique (Figure 5). Ces queues intracellulaires sont riches en résidus thréonine et sérine contenus dans des sites consensus de phosphorylation, ce qui fait que la protéine CD20 des lymphocytes B possède trois isoformes. La forme prédominante a une masse moléculaire de 33 kDa et les deux autres formes (35 et 37 kDa) sont moins répandues et ne représentent qu'une petite fraction des protéines CD20 totales ; ces 2 formes résulteraient de la phosphorylation différentielle de la forme la moins « lourde » (Bubien et al., 1993). La phosphorylation du CD20 est augmentée lors de la prolifération cellulaire induite par

l'activation du BCR, ou lors de la fixation des anti-CD20. Cette partie intracellulaire du CD20 est en effet associée à des protéines kinases appartenant à la famille des Src kinases (Lyn, Fyn, Lck) impliquées notamment dans la signalisation du BCR (Deans et al., 2002).

La partie extracellulaire du CD20 présente une grande boucle constituée de 43 aa localisée entre le 3ème et le 4ème segment transmembranaire et une probable plus petite boucle localisée entre les domaines transmembranaires 1 et 2 (Einfeld et al., 1988) (Cang et al., 2012). Ceci n'est qu'une structure prédictive car aucune caractérisation cristallographique de la protéine n'existe, mais de nombreux travaux notamment de clivage protéolytique, confirment cette structure. La grande boucle semble contenir les épitopes reconnus par une grande partie des anti-CD20 produits (Teeling et al., 2006, Nabhan and Kay, 2011). Cette structure assure un ancrage solide du CD20 dans la membrane. Malgré cet ancrage, on observe des formes solubles du CD20 dans certains cas comme chez des patients atteints de LLC (Manshouri et al., 2003) .

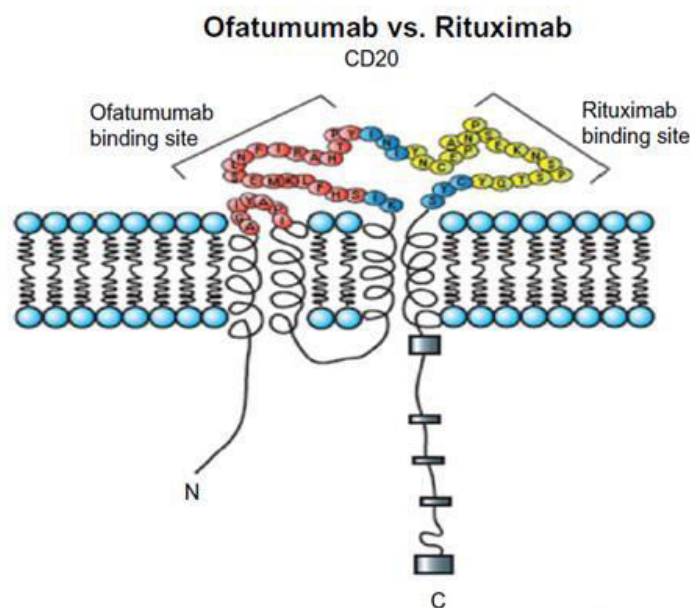


Figure 5 : Structure de l'antigène CD20 et des sites de liaison de 2 anti-CD20 utilisés dans l'immunothérapie des patients atteints de DLBCL (le rituximab et l'oftumumab) (D'après Nabhan et E. Kay, 2011).

Différentes techniques ont permis de montrer que le CD20 était présent à la surface des cellules B sous forme d'un homo-multimère et probablement un tétramère (Polyak et al., 2008). De plus la microscopie électronique et confocale a permis de montrer que près de 90% de la molécule CD20 était constitutivement associée aux radeaux lipidiques et à des microvillus, plis minuscules de la membrane plasmique (Li et al., 2004). Enfin des techniques d'immunoprécipitation et de FRET ont montré une association du CD20 avec de nombreuses

autres molécules, elles-mêmes en lien avec les radeaux lipidiques, telles que les molécules du CMH, CD40 et surtout avec le BCR (Léveillé et al., 1999, Petrie and Deans, 2002, Walshe et al., 2008).

2.3.1.2 Le gène du CD20 : *MS4A1*

Le gène codant pour la protéine CD20 est localisé sur le chromosome 11q12-13, il est composé de 8 exons. Il appartient à une famille de 26 gènes : la famille MS4A (pour Membrane Spanning 4A). Les gènes de cette famille forment des complexes oligomériques de surface impliqués dans la transduction de signaux (Ishibashi et al., 2001). Le premier exon contient plusieurs sites d'initiation de transcription potentiels conduisant à des pré-ARNm de tailles différentes. Trois ARNm matures ont été observés. L'ARNm majoritaire d'une taille de 2.8 Kb est composé des exons I, II et III, en totalité. Deux ARNm alternatifs résultant de la présence de différents sites d'épissage en 5' ont été décrits: l'un de 2.6 Kb formé de l'exon I et de la seconde partie de l'exon III, et un de 3.4 Kb contenant en plus des exons I, II et III une large portion de l'extrémité 5' du gène. Ces différents variants alternatifs du CD20 codent tous pour la même protéine puisque la région codante commence au sein de l'exon III qui est présente de manière identique dans les 3 transcrits (Tedder et al., 1989).

Ce gène est exprimé à partir du stade stade pré-B et tout au long de la maturation des lymphocytes B, puis « s'éteint » durant la différenciation plasmocytaire. Cette expression sélective du CD20 à des stades précis de la différenciation permet le ciblage thérapeutique des maladies qui affectent le lymphocyte B à ces stades (Nadler et al., 1984, Kehrl et al., 1994).

2.3.1.3 La régulation de l'expression du CD20

La transcription du gène *MS4A1* est régulée par les facteurs de transcription comme Oct-2, Pax5 ou le couple PU.1/Pip. De plus, il a été récemment montré que d'autres facteurs interviennent dans la régulation du gène *MS4A1* comme des modifications épigénétiques ou des mutations somatiques qui affectent aussi les taux d'expression du CD20 (Słabicki et al., 2016). La perte de l'expression de la protéine CD20 après un traitement au rituximab est l'un des mécanismes de résistance dans le lymphome non hodgkinien. Récemment il a été démontré que la 5-azacytidine, qui inhibe la méthylation de l'ADN, ou la trichostatine A qui module l'acétylation des histones, restaurent l'expression de l'ARNm et de la protéine CD20 chez les patients traités au rituximab (Rahmé et al., 2013, Tsutsumi et al., 2016).

En dehors des régulations épigénétiques, au niveau transcriptionnel quelques travaux récents ont mis en évidence le rôle de certaines signalisations cellulaires. La bryostatine-1 (activateur de la PKC) augmente l'expression des ARNm et de la protéine CD20 sans altérer la stabilité de l'ARNm CD20. Le prétraitement des cellules de LNH avec la bryostatine-1 augmente ainsi leur sensibilité à l'effet pro-apoptotique des anti-CD20. L'effet de la bryostatine-1 sur l'expression du CD20 semble être assuré par la voie ERK1/2. Les données suggèrent que la phosphorylation d'ERK1/2 semble être impliquée dans la régulation de l'expression du gène du CD20 dans des lymphomes B (Wojciechowski et al., 2005).

Dans le cas de plusieurs types de LNH, l'incubation des cellules tumorales avec des inhibiteurs des Src kinases induit une forte diminution de l'expression du gène *MS4A1*. Cette régulation négative transcriptionnelle du gène du CD20 conduit à un échappement aux anti-CD20 lié à la baisse de la quantité du CD20 à la surface des cellules, et donc à une résistance accrue des cellules tumorales à l'immunothérapie. Cette inhibition d'expression du CD20 semble être en relation avec la voie de signalisation PI3K/Akt car l'activation de l'Akt restaure considérablement l'expression du CD20 après le traitement par des inhibiteurs des Src kinases. Suite au traitement par ces inhibiteurs, la cytotoxicité induite par le rituximab est fortement altérée suite à un défaut d'activité des cellules NK. Cet effet a été associé *in vivo* à une forte diminution de l'activité anti-tumorale du rituximab (Winiarska et al., 2014).

Au niveau post-transcriptionnel, le traitement des cellules B avec l'activateur des protéines kinases PKCs, le PMA (phorbol myristate acétate), augmente la phosphorylation du CD20 et sa mobilité de la membrane vers l'espace intracellulaire, diminuant donc son expression à la surface des cellules (Valentine et al., 1987). Le CD20 est aussi régulé par ubiquitination. Il a été démontré que le traitement des lignées cellulaires de NHL avec l'inhibiteur du protéasome, le bortézomib, induit une augmentation du niveau d'expression du CD20 (Bil et al., 2010). Cela suggère que la régulation du taux du CD20 au niveau cellulaire est aussi liée aux processus de sa dégradation.

Bien que le mécanisme d'action soit inconnu, l'expression du CD20 peut être régulée par des cytokines comme le GM-CSF, l'IL-4 ou le TNF- α dans des cellules lymphomateuses *in vitro* (Venugopal et al., 2000).

2.3.1.4 Le Rôle biologique du CD20

La structure du CD20 ne présente pas les caractéristiques classiques d'un récepteur ce qui explique l'absence d'un ligand connu pour ce récepteur. Ainsi, sa stimulation est toujours obtenue artificiellement par des anticorps capables de se fixer au niveau de son domaine extracellulaire. La fonction biologique du CD20 a longtemps été débattue. Il intervient dans la l'activation et la différenciation des cellules B notamment en régulant le cycle cellulaire. Ainsi, alors que cette molécule n'est pas phosphorylée dans les cellules B au repos, elle le devient fortement après stimulation par un mitogène. Nous savons désormais que son rôle principal serait d'amplifier le signal calcique généré par la signalisation du BCR (Li et al., 2003). En effet, les souris déficientes en CD20 présentent un défaut du flux calcique après stimulation du CD19 ou de l'IgM membranaire. De plus, ces souris présentent une diminution du niveau d'expression de l'IgM sans pour autant avoir un défaut de signalisation en aval du BCR (Uchida et al., 2004). L'équipe de JP. Deans a démontré que l'expression ectopique du CD20 associée aux radeaux lipidiques dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), induit un flux calcique spectaculaire, attestant que le CD20 est une composante de la voie calcique (Li et al., 2003). Dans les cellules B, l'entrée du calcium induite par la stimulation du BCR est altérée par les siRNA du CD20. La même équipe a aussi démontré que le CD20 est constitutivement localisé dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique (Polyak et al., 1998). Différentes études suggèrent que le CD20 interagit avec le BCR. Ainsi le CD20 est redistribué avec le BCR dans les radeaux lipidiques où on les retrouve co-localisés suite à la stimulation des cellules B, puis le BCR se dissocie du CD20 dans des radeaux lipidiques différents, avant d'être internalisé dans la cellule (Petrie and Deans, 2002). Lors de cette association avec le BCR dans les radeaux lipidiques, les molécules de CD20 sous forme d'oligomères multimériques constitueraient des canaux calciques de type SOC (Store-operated cation). Ces canaux sont directement liés au flux de calcium engendré par l'activation du BCR (Li et al., 2003).

2.3.2 Le rituximab et ses mécanismes d'action : déplétion des cellules B

Le rituximab (Mabthera® en France, Rituxan® aux Etats-Unis et au Canada) est un anticorps monoclonal murin humanisé (anticorps chimérique), dirigé spécifiquement contre le CD20. La construction d'un anticorps chimérique consiste à isoler l'ADN codant pour le domaine VH et le domaine VL d'un anticorps monoclonal de souris et à le lier à l'ADN codant pour les domaines constants H et L d'une immunoglobuline humaine. Une telle construction

génétique permet de produire un anticorps hybride dont la partie constante, humaine, n'est pas immunogène chez l'Homme (de StGroth and Scheidegger, 1980).

Le rituximab est constitué donc de 2 parties (voir figure 6):

- Une partie d'origine murine au niveau des régions variables (Fab) des chaînes lourdes et légères ; c'est la partie qui se lie spécifiquement au CD20 des cellules B.

- Une partie d'origine humaine au niveau des régions constantes (Fc). C'est la partie qui sera responsable, comme on va le détailler ensuite, des fonctions « cytotoxiques » de cet anticorps par le recrutement de divers effecteurs du système immunitaire (activation du complément et des cellules cytotoxiques) (Cartron et al., 2004).

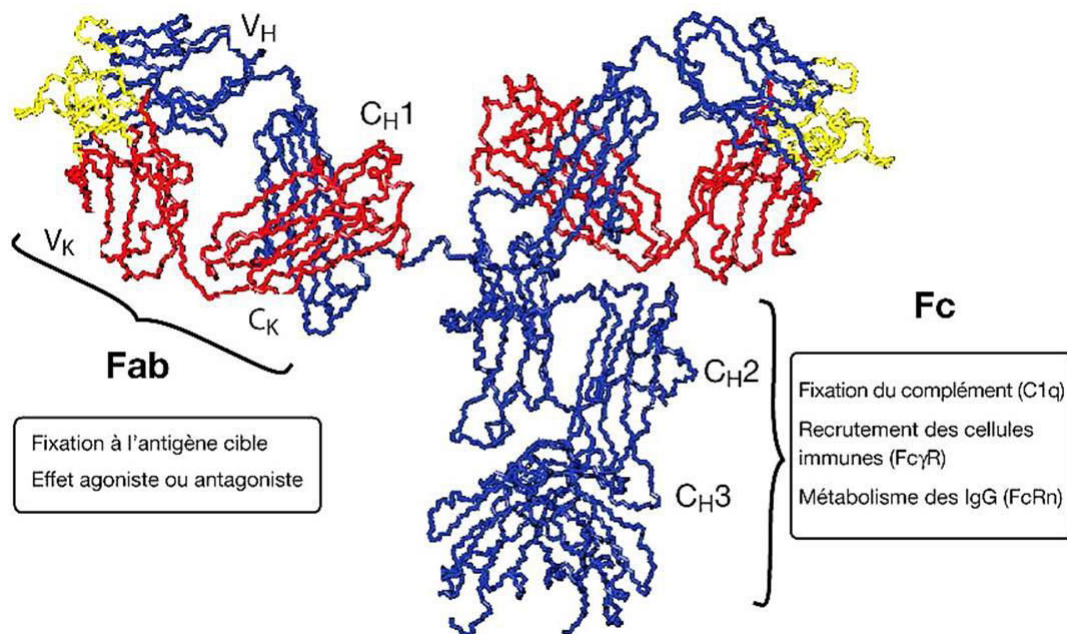


Figure 6 : Structure d'une immunoglobuline G kappa (d'après Cartron G., 2007)

De tels anticorps sont humains à environ 66 % et moins immunogéniques que les anticorps de souris car les épitopes immunodominants interspèces de l'IgG sont principalement localisés dans les domaines CH2 et CH3. Dans la plupart des cas, la spécificité et l'affinité des anticorps chimériques restent identiques à celles des anticorps murins d'origine. Des vecteurs d'expression eucaryotes ont été construits pour la production industrielle d'anticorps chimériques (Siberil et al., 2005).

Les premiers essais thérapeutiques avec cet anticorps datent de 1993, mais il a fallu attendre 1997 pour que la « Food and Drug Administration » autorise la mise sur marché du rituximab en oncologie, relayée en France en 1998 par l'« Agence française du médicament »

(Maloney et al., 1997). Comme on l'a vu précédemment, par la suite l'addition de rituximab à la chimiothérapie CHOP est rapidement devenue, par le bénéfice apporté sur la survie des malades, le traitement standard pour les patients atteints de DLBCL (Lim and Levy, 2014). Ses indications ont initialement été limitées aux lymphomes B, puis étendues aux maladies auto-immunes. Toutefois, son efficacité varie en fonction du degré de maturité et de la localisation des cellules B cibles, de la nature des cellules effectrices, de données pharmacocinétiques, du retard à la déplétion et du temps nécessaire aux lymphocytes B pour se reconstituer. Cela explique l'existence de variations appréciables entre les malades, et chez un même malade entre ses différentes cures (Renaudineau et al., 2009).

La liaison du rituximab au CD20 détermine la déplétion des cellules B normales et cancéreuses. Au moins 3 mécanismes majeurs ont été proposés pour expliquer les effets cytotoxiques du rituximab. Ces 3 mécanismes sont mobilisés *in vivo*, mais leurs contributions relatives aux effets cliniques du rituximab restent imprécises (Rezvani and Maloney, 2011, Bonavida, 2014) (Figure 7).

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

La fixation du rituximab à sa cible (CD20) entraîne la redistribution du CD20 au sein des radeaux lipidiques de la membrane cytoplasmique, ce qui favoriserait la liaison du facteur C1q du complément à la partie Fc du rituximab (Cragg et al., 2003). Cela induit l'activation de la voie classique du complément selon une cascade protéolytique qui détermine notamment la libération de quantité importante du facteur C3b du complément. La molécule de C3b agit par opsonisation en se fixant à la surface des cellules, mais se lie aussi à la C3 convertase pour former la C5 convertase, ce qui induit la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) qui provoque la lyse de la cellule cible (Figure 7). Le dépôt de C3b à la surface des cellules (opsonisation) peut aussi recruter des cellules effectrices comme les granulocytes, les macrophages ou les NK qui possèdent le récepteur au C3b et induire une lyse cellulaire ou une phagocytose. Ce phénomène s'appelle la cytotoxicité cellulaire dépendante du complément médiée par les cellules effectrices (CDCC). Ceci rend encore plus complexe l'étude de la participation du complément dans l'effet thérapeutique indépendamment des autres mécanismes de déplétion (Cartron et al., 2004).

L'activation du système du complément par le rituximab est évidente dans des lignées cellulaires humaines de lymphomes B et dans des cultures primaires de lymphomes issues de

patients (Golay et al., 2001, Bellosillo et al., 2001). La sensibilité des cellules à la CDC est dépendante du niveau d'expression du CD20 (Golay et al., 2001), et peut être différente en fonction du type de lymphome. Cependant, l'activation du complément serait aussi responsable de certains effets secondaires indésirables et toxiques du rituximab, comme par exemple ceux liés à la libération des anaphylatoxines telles que C3a, C4a et C5a déterminant des processus inflammatoires. L'augmentation des produits d'activation du complément après le traitement au rituximab et la corrélation de cette activation avec l'apparition des effets secondaires confirme que le complément est activé par le rituximab chez les patients (van der Kolk et al., 2001). Les données issues des modèles murins de déficience en activité complémentaire (notamment déficience en C1q) sont cependant contradictoires, montrant à la fois l'inefficacité du traitement au rituximab chez ces animaux comme son efficacité. Chez les patients, les données expérimentales et cliniques semblent indiquer que ce mécanisme ne serait pas essentiel pour l'efficacité du rituximab dans les LNH (Rezvani and Maloney, 2011). En résumé, des données supplémentaires sont requises pour prouver la relation entre l'activation du complément et l'efficacité thérapeutique du rituximab.

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

L'ADCC est un mécanisme impliquant la liaison de la portion Fc de l'anticorps (ici anti-CD20) au récepteur Fc γ R exprimé à la surface de cellules immunitaires cytotoxiques, telles que les cellules NK (natural killer), les monocytes/macrophages et les granulocytes. Une fois recrutées et activées au contact des cellules B, ces cellules vont déterminer la mort des lymphocytes B soit par la libération de granules cytotoxiques contenus dans les cellules immunitaires, soit par phagocytose (Oflazoglu and Audoly, 2010) (Figure 7). L'ensemble des données montre l'importance des cellules NK dans l'ADCC mais ne permet pas de déterminer si elles possèdent une action directe ou indirecte dans ce phénomène. En effet, *in vitro*, les cellules NK activées par liaison au rituximab produisent de l'IFN γ . Or, celui-ci est connu pour réguler positivement l'expression des Fc γ R des granulocytes (CD64) ce qui pourrait augmenter leur capacité à médier l'ADCC (Weiner et al., 2010).

Les modèles murins supportent l'hypothèse du rôle *in vivo* de l'ADCC dans l'efficacité du rituximab. Chez les patients la découverte de l'impact clinique du polymorphisme du récepteur Fc γ R, associé à une plus faible réponse au traitement par le rituximab, suggère son rôle important en tant que mécanisme effecteur des anti-CD20 dans les LNH (Rezvani and Maloney, 2011).

Comme on l'a évoqué précédemment, il existe un lien entre le mécanisme d'ADCC et la CDC. Des études menées chez la souris montrent que l'activation des cellules effectrices de l'ADCC peut aussi être la conséquence du déclenchement de la cascade du complément lors du traitement au rituximab. En effet, le dépôt de facteurs opsonisants comme C3b et C4b à la surface des cellules cibles détermine le recrutement et l'activation de phagocytes ou de cellules NK qui possèdent les récepteurs correspondants. Ce processus peut être amplifié par les effets chimiotactiques et activateurs des anaphylatoxines produites lors de l'activation du complément, telles que C5a et C3a, dont les récepteurs sont aussi retrouvés sur les cellules phagocytaires (Zhou et al., 2008).

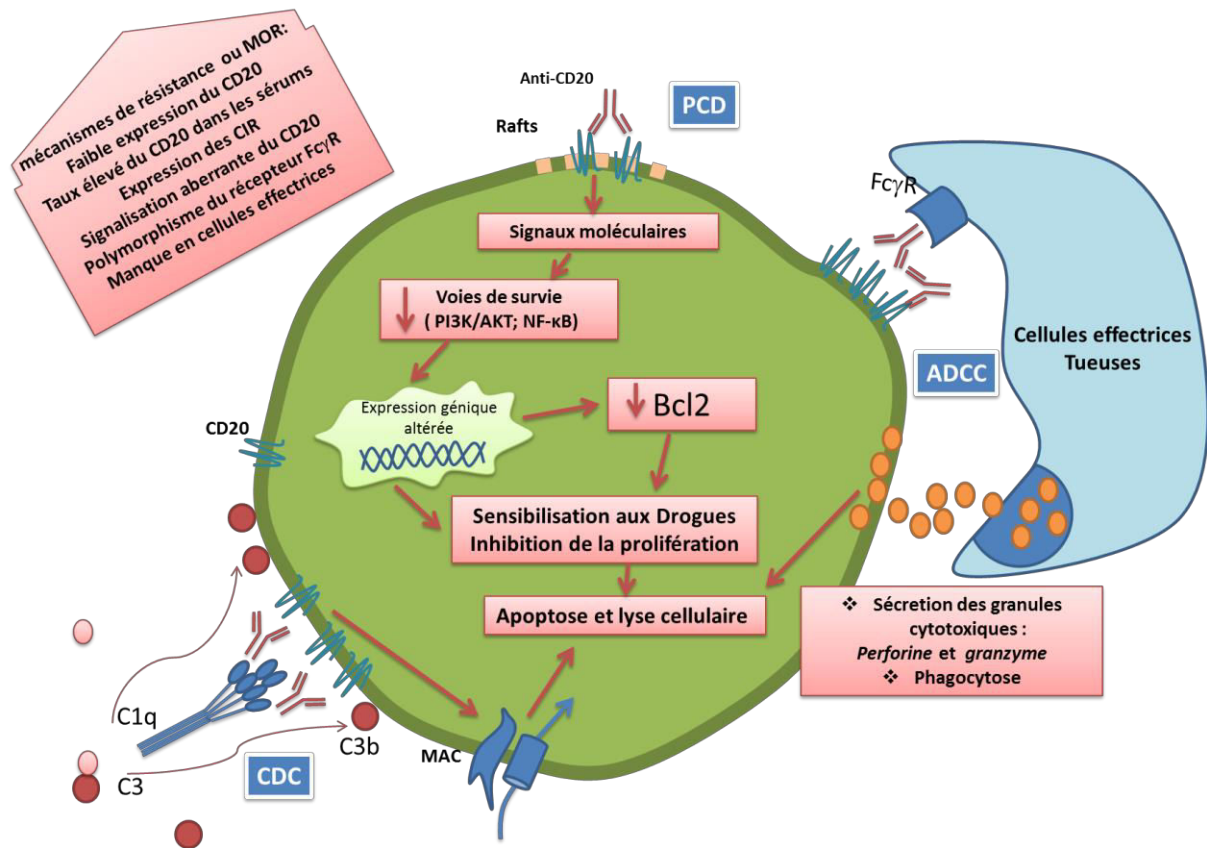


Figure 7 : Mécanismes d'action du Rituximab. (Oflazoglu and Audoly, 2010). Le rituximab peut induire la mort cellulaire par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. CDC: La liaison du rituximab au CD20 active la cascade du complément et génère des complexes d'attaque membranaire (MAC) responsables de la mort cellulaire. ADCC : Le rituximab recrute des cellules effectrices immunitaires par la liaison à leurs récepteurs FcγR ce qui déclenche une mort cellulaire ciblée soit par phagocytose, soit par la libération de protéases (système granzyme-perforine). PCD : La fixation du rituximab au CD20 peut déclencher la voie intrinsèque de la mort cellulaire programmée (PCD) via la régulation des protéines de la famille Bcl-2. CIR: récepteurs inhibiteurs du complément.

2.3.2.3 La mort cellulaire programmée : apoptose (PCD)

Un troisième mécanisme a été proposé à côté de l'ADCC et du CDC suite à des travaux réalisés à partir de lignées cellulaires de DLBCL. En effet, le traitement des cellules avec du

rituximab s'accompagnait de leur mort par apoptose (ou mort cellulaire programmée, PCD) de façon donc indépendante de la présence de complément ou de cellules effectrices. Cependant on observe que la sensibilité des cellules tumorales à l'effet apoptotique du rituximab varie en fonction du type de tumeur, et certaines lignées cellulaires comme les lignées du sous-type ABC des DLBCL sont plus résistantes. Ce mécanisme est probablement moins important que les 2 autres, mais il est supposé significatif malgré les difficultés à le mettre en évidence de façon expérimentale *in vivo* (Rezvani and Maloney, 2011). *Au cours de notre thèse, nous avons choisi d'étudier l'apoptose induite par le rituximab car elle représente aussi, comme nous allons le voir, un mécanisme de sensibilisation aux effets cytotoxiques d'autres traitements et notamment de la chimiothérapie.*

Bien que les mécanismes responsables de l'effet apoptotique des anti-CD20 restent encore à préciser, plusieurs travaux ont montré que le CD20 était associé à des kinases cellulaires de la famille Src (Lyn, Fyn et Lck), qui sont impliquées dans l'apoptose induite par le rituximab. Il ne s'agit pas d'une liaison covalente, c'est la liaison de l'anticorps anti-CD20 au CD20 qui déclenche leur activation (Deans et al., 2002, Zhou et al., 2008). Dans la membrane, le CD20 est associé avec la molécule PAG (phosphoprotein associated with GEMs appelée aussi Cbp : Csk-binding protein), une protéine adaptatrice exclusivement localisée dans les radeaux lipidiques. PAG recrute la kinase Csk aux radeaux lipidiques pour maintenir les kinases de la famille Src dans un état inactif. L'engagement du CD20 par le rituximab détermine la translocation du CD20 dans les radeaux lipidiques, redistribue ces radeaux lipidiques et permet l'activation des protéines kinases Src. Cela initie finalement des signalisations en aval menant notamment à l'activation de la PLC γ . La PLC γ hydrolyse les phosphatidylinositol 4,5-biphosphate membranaires produisant de l'inositol-1,4,5-triphosphate, qui favorise la libération de Ca²⁺ depuis le réticulum endoplasmique, et du diacylglycérol qui active la PKC (Shan et al., 2000). En parallèle, la fixation du rituximab au CD20 entraîne un changement de conformation de la molécule CD20 suite à sa phosphorylation, conduisant à une augmentation du flux calcique vers la cellule, déterminant ainsi une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium. Cette dernière serait en partie responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase S (Smith, 2003). La composition lipidique de la membrane semble donc être importante pour l'effet du rituximab. En effet, en plus de la translocation du CD20 et de l'agrégation des radeaux lipidiques, la présence du cholestérol dans les membranes conditionne la mobilisation du calcium et l'apoptose induite par le rituximab (Unruh et al., 2005). L'activation des kinases Src et le flux calcique semblent ainsi jouer un rôle majeur dans la signalisation induite par le CD20

suite à sa liaison au rituximab, puisque le traitement avec des inhibiteurs des Src kinases ou des chélateurs de calcium empêche l'effet apoptotique du rituximab (Hofmeister et al., 2000). La redistribution des radeaux lipidiques induite par la fixation des anti-CD20 au CD20 serait à l'origine de la diminution d'activité d'un certain nombre de signalisations cellulaires, parmi lesquelles p38 MAPK, ERK-1/2, NF- κ B, et l'Akt. Cela aboutit à l'inhibition de la transcription et de l'expression de gènes, codant notamment pour des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, XIAP...) rendant les lymphocytes B plus susceptibles vis-à-vis de l'apoptose (Zhou et al., 2008). Ainsi, l'inhibition par le rituximab de la voie PI3K/Akt, voie constitutivement activée dans les cellules tumorales de la plupart des lymphomes B et notamment de DLBCL, a été associée à l'inhibition de l'expression et de l'activation de Bcl-X_L. Effectivement, l'apoptose induite par le rituximab met principalement en jeu la voie intrinsèque ou mitochondriale régulée par les molécules de la famille Bcl-2, la voie extrinsèque des récepteurs de mort, avec notamment la signalisation de Fas, ne semblant pas nécessaire (Zhou et al., 2008). Les mécanismes sont à la fois caspase-dépendants et caspase-indépendants, ce qui a un intérêt clinique. En effet, la plupart des agents cytotoxiques de la chimiothérapie déterminent l'apoptose via des mécanismes caspases-dépendants et la majorité des résistances thérapeutiques sont aussi en lien avec ces processus. Ainsi la capacité d'un traitement à induire la mort cellulaire sans mettre en jeu le rôle des caspases permettrait d'échapper à un grand nombre de résistances. De la même façon, la surexpression de Bcl-2 est fréquemment retrouvée dans les lymphomes B non-hodgkiniens comme on l'a vu précédemment pour les DLBCL ; elle est associée au caractère agressif de ces lymphomes, leur résistance à la chimiothérapie et par conséquent à un pronostic très défavorable des patients. Le rituximab, associé à la chimiothérapie, est capable de lever cette résistance en diminuant l'expression de ces protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Shan et al., 2000, Rezvani and Maloney, 2011) (Figure 7).

Comme on vient de l'évoquer, l'effet le plus probant du rituximab réside sûrement dans sa capacité à potentialiser l'effet des drogues cytotoxiques. *In vitro*, les études montrent qu'en diminuant la signalisation des voies de survie constitutivement activées dans les LNH (p38 MAPK, PI3K/Akt, ERK-1/2, NF- κ B) cela permet de sensibiliser les cellules tumorales à la mort par apoptose induite par la chimiothérapie. Cet effet chimio-sensibilisateur du rituximab est observé dans les lignées résistantes comme les lignées sensibles au traitement par la chimiothérapie (Suzuki et al., 2007, Weiner, 2010). Finalement l'étude de l'ajout du rituximab à la chimiothérapie sur des modèles animaux a montré une potentialisation des deux traitements

et a permis la mise en place du protocole clinique utilisé à l'heure actuelle (Mohammad et al., 2002, Schliemann et al., 2009).

Le rituximab, en association avec la polychimiothérapie CHOP, a prouvé son efficacité dans les LNH à cellules B CD20 positifs. Cependant, et concernant les DLBCL, environ 10 à 15% des patients sont réfractaires au traitement et 20 à 25% rechutent après une réponse initiale. De plus beaucoup de patients âgés ne sont pas éligibles aux traitements intensifs utilisant de fortes concentrations de drogues chimiothérapeutiques, et le pronostic de ces patients pour lesquels le traitement R-CHOP échoue est très défavorable (Coiffier, 2007, Sehn, 2012). Ainsi, plusieurs mécanismes de résistance ont été par la suite identifiés (Figure 7) et nous verrons à la fin de cette partie que de nouveaux anti-CD20 de 2^e et maintenant de 3^e génération ont été notamment élaborés pour tenter de palier à certaines formes de résistance.

2.3.3 Résistances au rituximab

Des mécanismes à l'origine de ces résistances ont été décrits pour chaque effet anti-tumoral du rituximab (CDC, ADCC, signalisation apoptotique et sensibilisation à la chimiothérapie). La compréhension complète de ces mécanismes permettra de mettre en place de nouveaux traitements plus efficaces.

2.3.3.1 Les mécanismes liés à l'anticorps (Rituximab)

La pharmacocinétique et la biodisponibilité des anticorps monoclonaux est déterminée d'une part par les caractéristiques de la molécule (en particulier sa nature chimérique et les spécificités de sa portion Fc), mais d'autre part par les caractéristiques de sa cible antigénique (CD20). Des anticorps antichimériques ont été détectés dans les sérums de patients traités par le rituximab ce qui pourrait, en théorie, réduire son efficacité. Dans l'état actuel des connaissances, dans les syndromes lymphoprolifératifs leur prévalence est rare (< 10 % des cas) et ils n'ont pas de signification clinique, mais c'est un point qui devra être particulièrement analysé au cours des maladies traitées par le rituximab. Un anticorps monoclonal peut diffuser dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes, mais la diffusion dans des sites, comme le cerveau, est moins bien connu. Dans l'état actuel des connaissances, un seul travail a été consacré à ce point. Seuls des taux très faibles de rituximab ont été détectés dans le liquide céphalorachidien d'un patient atteint d'un lymphome à localisation cérébrale. Ainsi, il apparaît

qu'une barrière hémato-encéphalique intacte limite l'entrée du rituximab dans le système nerveux central (Harjunpää et al., 2001).

2.3.3.2 Les facteurs de résistance à la CDC et à l'ADCC

Les protéines régulatrices du complément (CD35 ou Complement Receptor type 1, CD46 ou Membrane Cofactor Protein, CD55 ou Decay Accelerating Factor et CD59) sont des protéines capables de bloquer l'activation du complément ou d'interférer avec la formation du complexe d'attaque membranaire (Figure 8). Elles sont exprimées par un grand nombre de cellules cancéreuses et pourraient leur conférer une protection contre la lyse du complément (Beers et al., 2010). CD35 intervient dans la fixation et l'inhibition du C3b et C4b, CD55 accélère la dissociation des convertases C3 et C5, CD59 se fixe à C8 et C9 et empêche la formation de pores par les complexes d'attaque membranaire, l'étape finale de la CDC (Smith, 2003). Ainsi, les cellules Ramos devenues résistantes au rituximab surexpriment les molécules CD55 et CD59. *In vitro*, la neutralisation de ces régulateurs par des anticorps permet d'augmenter l'efficacité du rituximab. Leur utilisation *in vivo* pose cependant quelques problèmes puisque les anticorps neutralisant ne différencient pas les cellules tumorales des cellules saines. Or, les cellules saines ont besoin de ces régulateurs pour se protéger de la lyse du complément, d'où la difficulté d'élaborer de tels traitements (Golay et al., 2001, Macor et al., 2007).

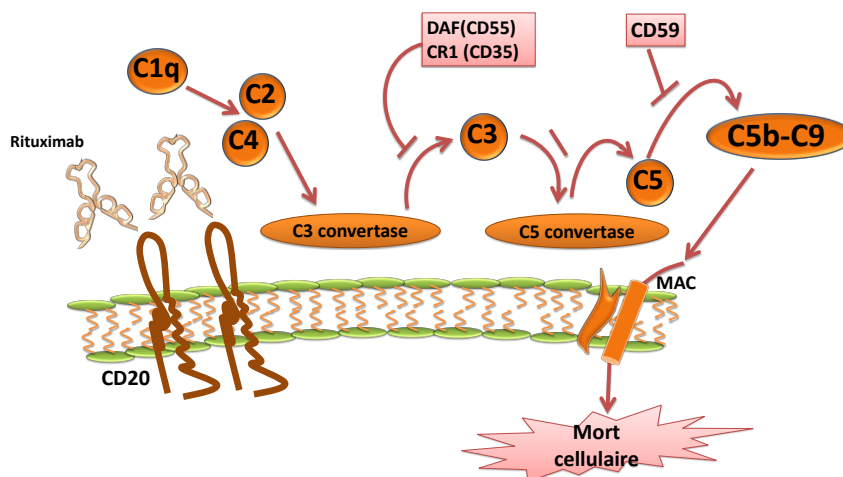


Figure 8 : Les mécanismes potentiels de résistance à la cytotoxicité dépendante du système du complément. (Smith, 2003). Le DAF (Membrane-associated decay accelerating factor, ou CD55) et le CR1 (complement receptor 1 ou CD35) sont impliqués dans l'inhibition des C3 et C5 convertases. La formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) est inhibée par CD59.

Il existe trois types de récepteurs FcγR: FcγRI ou CD64, FcγRII ou CD32 et FcγRIII ou CD16. Ils comprennent des récepteurs activateurs tels que les isoformes FcγRI, FcγRIIa, et

Fc γ RIIIa qui portent un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) contenant des résidus tyrosine. Ce motif est phosphorylé lors de la liaison à l'anticorps (anti-CD20), déterminant une signalisation dans les cellules effectrices amenant à l'ADCC par phagocytose, ou l'exocytose de granules toxiques. Il existe également des récepteurs inhibiteurs tels que Fc γ RIIb qui contiennent des motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Ces récepteurs engendrent une signalisation opposée aux précédents et immunosuppressive vis-à-vis des macrophages, monocytes, cellules dendritiques et cellules B (Sondermann and Szymkowski, 2016). Les souris déficientes en récepteur inhibiteur Fc γ RIIb semblent être hypersensibles au mécanisme d'ADCC, tandis que ce mécanisme d'ADCC ne semble pas être activé chez des souris déficientes en récepteurs activateurs Fc γ RI et Fc γ RIIIa, qui s'avèrent incapables de stopper la progression tumorale *in vivo*. Ces résultats démontrent que l'ADCC est dépendante des récepteurs Fc γ R et que, pour atteindre une efficacité optimale, l'anticorps doit se lier de préférence aux récepteurs activateurs (Clynes et al., 2000).

Concernant les résistances en lien avec l'ADCC, il existe un polymorphisme pour le récepteur Fc γ RIIIa (CD16) qui a été décrit en 1997 par Koene *et al*, susceptible de modifier son affinité de liaison à la portion Fc de l'anticorps anti-CD20. Il entraîne la substitution d'une phénylalanine (F) en une valine (V) en position 158. Un tel polymorphisme serait susceptible de modifier la réponse de l'ADCC déclenchée par le rituximab et pourrait ainsi influencer la réponse au traitement (Koene et al., 1997). Les patients hétérozygotes ont un récepteur CD16 de moins bonne affinité et présentent une réponse de type ADCC moins efficace que les patients homozygotes (Cartron et al., 2002). De plus, les cytokines comme l'IL-2, l'IL-12, l'IFN α et le GM-CSF sont connues pour améliorer l'ADCC et la phagocytose en stimulant l'activité ou l'expansion des cellules NK et des macrophages (Wing et al., 1989, Trinchieri, 2003). La prolifération des cellules NK médiée par l'IL-2 corrèle avec l'activité du rituximab chez les patients atteints de LNH (Gluck et al., 2004). Ainsi, certaines de ces cytokines utilisées en combinaison avec le rituximab améliorent le traitement, ce qui suggère que leur absence intrinsèque peut constituer un obstacle à l'effet du rituximab.

2.3.3.3 Les résistances relatives à la signalisation apoptotique

L'exposition répétée au rituximab conduit de façon inattendue à une hyperactivation constitutive des voies de survie, une surexpression des facteurs de résistance, et une augmentation du seuil de réponse à l'apoptose. Le développement de lignées cellulaires

résistantes au rituximab et à la chimiothérapie a montré que la résistance n'était pas toujours due à une régulation de l'expression du CD20, mais à une modification des voies de signalisation de survie. La balance survie/apoptose se fait par la modulation de l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bak ou anti-apoptotiques comme Bcl-2. Les études réalisées sur des lignées cellulaires résistantes au rituximab ont mis en évidence des modifications des acteurs pro et anti-apoptotiques. Ainsi, suite à une exposition prolongée au rituximab, on observe la régulation négative des régulateurs pro-apoptotiques (Bax, Bak) rendant les cellules résistantes à l'apoptose (Jazirehi et al., 2007, Jazirehi and Bonavida, 2011, (Rezvani and Maloney, 2011).

L'expression des protéines Bcl-2 serait aussi associée selon Park *et al* à l'interleukine 10 (IL-10) qui agit comme un facteur protecteur, favorisant la croissance cellulaire. En effet, l'inhibition de la boucle autocrine/paracrine réalisée par l'IL-10 (via STAT3) chez des patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules diminue l'expression de Bcl-2 et sensibilise les cellules tumorales à l'activité cytotoxique des chimiothérapies. Des travaux récents ont montré une très forte expression des gènes associés à la signalisation de l'IL-10 (*IL10*, *IL10RA* et *IL10RB*) dans les DLBCL des sous-types GCB et ABC (Béguelin et al, 2015). Ces données suggèrent que l'interaction entre le facteur de croissance IL-10 et l'expression de Bcl-2 peut être une des causes de résistance aux chimiothérapies et pourrait être une cible pour le développement de nouveaux traitements (Figure 9) (Park et al., 2009, Béguelin et al., 2015).

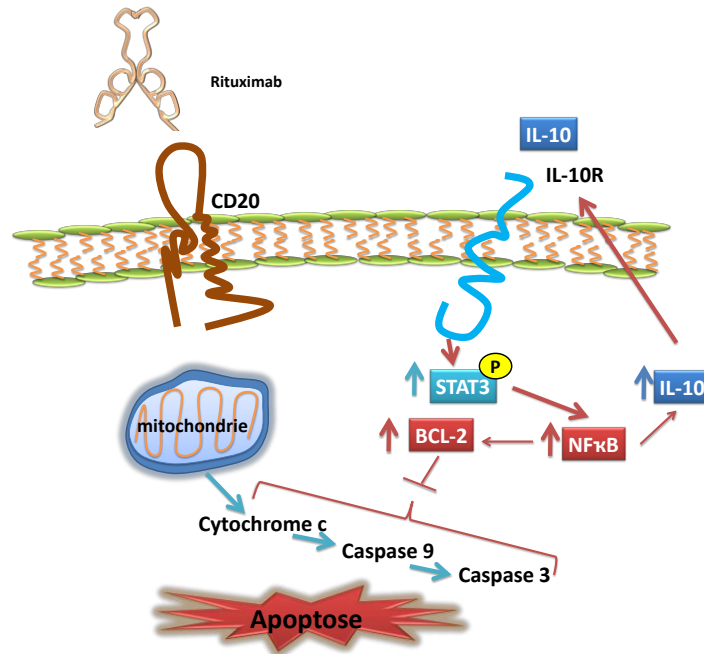


Figure 9 : Mécanismes potentiels de résistance à l'apoptose induite par le Rituximab (Smith, 2003). L'activation de la boucle autocrine réalisée par l'IL-10, en se liant à son récepteur, active le facteur de transcription STAT3 conduisant à l'augmentation d'expression de Bcl-2 s'opposant à l'effet apoptotique du rituximab. Notamment, dans le cas des lymphomes de type ABC présentant une activation constitutive de la voie NF-κB, l'IL10 réaliserait une boucle d'amplification de la surexpression de Bcl-2 inhibant fortement l'apoptose induite par les anti-CD20.

2.3.3.4 Les résistances liées à l'expression cellulaire du CD20

La réponse au traitement peut être influencée par le taux initial du CD20 membranaire qui est différent entre les différentes maladies lymphoprolifératives. En effet, les cellules de leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) par exemple expriment faiblement le CD20 en comparaison avec celles du lymphome du manteau ou du DLBCL. *In vitro* l'acquisition de la résistance au rituximab a été corrélée dans certains cas à une baisse de l'expression du gène et de la protéine CD20. Il ne s'agit pas simplement d'un « masquage » du CD20 par le rituximab, mais d'une réduction d'expression transitoire de son ARN messager (Jilani et al., 2003). H. Junji et al. ont aussi montré que le niveau de l'ARNm codant pour le CD20 ainsi que le niveau de la protéine diminuent fortement chez des patients atteints de LNH traités par R-CHOP. Un certain nombre de travaux sur des lignées humaines de DLBCL, ou sur des patients, ont montré que le traitement au rituximab diminuait cette expression allant jusqu'à la transformation des cellules vers un phénotype CD20 négatif. Ainsi, NA. Johnson et al. ont analysé le niveau du CD20 chez des patients atteints de DLBCL et ils ont montré que, contrairement à l'immunohistochimie, la cytométrie en flux permet de détecter une baisse du niveau du CD20,

corrélée à une survie inférieure des patients (Johnson et al., 2009). Cet effet du rituximab serait dû, au moins partiellement, à des mécanismes épigénétiques de régulation du gène du CD20 (Czuczman et al., 2008, Hiraga et al., 2009, Miyoshi et al., 2012). En effet, le traitement de ces cellules notamment avec la 5-azacytidine restaure l'expression du CD20 (Hiraga et al., 2009). D'autres études montrent que le recrutement de l'histone désacétylase HDAC1, sur le promoteur du gène codant le CD20 (*MS4A1*), est aussi impliqué dans l'établissement du phénotype CD20 négatif des cellules tumorales B après traitement au rituximab (Sugimoto et al., 2009).

Plus récemment, la présence d'une isoforme tronquée du CD20, issue d'un épissage alternatif, a été mise en évidence dans des cellules B de patients atteints notamment de DLBCL. Cette isoforme, absente dans les cellules B du sang périphérique des donneurs sains, est intracellulaire et serait impliquée dans la réduction d'expression de la forme sauvage. De plus, sa présence a été corrélée avec la résistance des patients au rituximab (Henry et al., 2010).

Ainsi, alors que les connaissances scientifiques sur la régulation de l'expression du CD20 restent parcellaires, le ciblage de son expression membranaire, facteur déterminant de l'efficacité des anti-CD20, représente un nouveau défi thérapeutique en association avec l'immunothérapie dans les cancers des cellules B. *C'est pourquoi, dans la seconde partie de nos travaux de thèse sur le rôle des neurotrophines dans les résistances thérapeutiques des DLBCL, nous avons démarré une étude sur l'analyse de l'expression de cette cible thérapeutique.*

2.3.3.5 Expression du CD20 à la surface des exosomes

De façon intéressante, des études récentes *in vitro* et *in vivo* ont montré que les exosomes, microvésicules sécrétées par les cellules tumorales de lymphomes B agressifs, présentent le CD20 à leur surface et se comportent à ce titre comme des « récepteurs leurres » vis-à-vis des anti-CD20 thérapeutiques, comme le rituximab. Ainsi, ce processus permettrait aux cellules tumorales d'échapper à l'immunothérapie (Aung et al., 2011). La sécrétion des exosomes est réalisée en conditions physiologiques par les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les précurseurs érythroblastiques au cours de leur maturation et également par beaucoup de cellules cancéreuses qui en sécrètent des quantités plus importantes que les cellules normales (Record et al., 2014). De plus, leur composition reflétant la cellule d'origine, les exosomes pourraient servir de marqueurs de diagnostic. Les exosomes issus de cellules

cancéreuses pourraient jouer un rôle important dans le développement et la progression des cancers, en modulant la communication intercellulaire avec les cellules du micro-environnement (cellules endothéliales, immunitaires, stromales...). La sécrétion d'exosomes par les cellules tumorales, permettant le transfert de protéines (protéines de signalisation ou cytokines angiogéniques) et d'informations génétiques (miR) (Hannafon and Ding, 2013), constitue un mécanisme de survie, de dissémination et de résistance thérapeutique (Thompson et al., 2013). Cependant, peu de données rapportent la fonction potentiellement déterminante de la sécrétion d'exosomes dans des formes agressives de DLBCL (Aung et al., 2011). Ainsi la compréhension des mécanismes de régulation du processus de biogenèse et de sécrétion des exosomes dans le cas des DLBCL reste très incomplète notamment suite à l'exposition au rituximab, et peut présenter un réel intérêt clinique et thérapeutique. *C'est pourquoi nous avons décidé, dans notre démarche expérimentale, de rechercher aussi l'impact des différents traitements (voies de signalisation des neurotrophines, flavaglines) et leur association avec le rituximab sur l'expression du CD20 au niveau exosomal. A cette occasion et en préambule de nos résultats sur les exosomes (article 2 en préparation), nous développerons plus en détails la structure, le processus de sécrétion et le rôle de ces microvésicules cellulaires et plus particulièrement leur fonction dans le processus tumoral.*

2.3.4 Evolution de l'immunothérapie et nouvelles thérapies ciblées

Comme nous l'avons vu, de nombreux mécanismes de résistance au rituximab ont été identifiés. La compréhension de ces mécanismes a permis dans un premier temps de synthétiser de nouveaux anti-CD20 (anti-CD20 de 2^e puis de 3^e génération) présentant une meilleure tolérance (anticorps humanisés ou entièrement humains) et/ou efficacité que le rituximab. Les anticorps anti-CD20 de 2^e génération incluent l'ocrelizumab, le veltuzumab and l'ofatumumab. L'ocrelizumab et le veltuzumab sont des anti-CD20 humanisés alors que l'ofatumumab est un anti-CD20 entièrement humain. **L'ocrelizumab** présente une affinité de liaison plus importante que le rituximab aux variants de faible affinité du récepteur FcγRIIIa et a montré son efficacité chez des patients réfractaires ou en rechute après le traitement au rituximab. **Le veltuzumab** est un anticorps anti-CD20 humanisé très proche du rituximab, et dont la modification structurale augmente ses capacités de liaison lui permettant une meilleure activation du mécanisme CDC en comparaison avec le rituximab. **L'ofatumumab** est un anticorps entièrement humain approuvé par la FDA, en cours de développement clinique, qui reconnaît

spécifiquement un épitope englobant à la fois la petite et la grande boucle extracellulaires du CD20 (Figure 5), permettant une augmentation de l'activation du complément. Cet anticorps a démontré sa capacité à provoquer la lyse cellulaire, aussi bien dans les cellules à expression élevée et basse de CD20 que dans les cellules résistantes au rituximab. Cet anti-CD20 est celui le plus avancé dans le développement clinique. Il pourrait avoir encore une meilleure efficacité lors de son association avec la chimiothérapie, ce qui est testé actuellement dans les essais cliniques notamment sur les DLBCL. Des anticorps anti-CD20 de 3^e génération sont en cours de validation ; contrairement à ceux de 2^e génération c'est ici la région Fc de l'anti-CD20 qui est modifiée. L'objectif principal de ces nouveaux anti-CD20 est d'augmenter l'efficacité thérapeutique chez tous les patients, et notamment ceux qui présentent des variants de faible affinité des récepteurs FcR sur les cellules effectrices immunitaires responsables de l'ADCC (Singh et al., 2015).

Bien que les anti-CD20 aient un grand avenir dans le traitement des LNH, la grande diversité des mécanismes moléculaires impliqués dans ces pathologies et la stabilisation des taux de survie à des taux d'environ 60% à 5 ans nécessitent la mise en place d'autres formes de traitements. En effet, malgré l'extrême hétérogénéité de ces lymphomes, la base du traitement standard est la même (R-CHOP) ce qui oriente progressivement les recherches vers des thérapies de plus en plus ciblées, voir même personnalisées.

Dans le cas du DLBCL, plusieurs cibles moléculaires ont été identifiées parmi lesquelles celles en lien avec les régulateurs de l'activation des cellules B ou T. Parmi les stratégies, on trouve notamment des anticorps monoclonaux dirigés contre divers récepteurs membranaires impliqués dans l'activation des lymphocytes B comme le CD22 (epratuzumab), le CD40 (dacetuzumab), des anticorps capables d'interférer avec l'inhibition des lymphocytes T (ipilimumab, anti-CTLA4), ou des anticorps bi-spécifiques capables d'activer les lymphocytes T au contact des cellules B tumorales (blinatumomab, anti-CD3/CD19). Ces anticorps thérapeutiques sont pour la plupart testés en association avec le rituximab et sont en cours d'essais cliniques.

En parallèle, les connaissances acquises sur les voies de signalisation dans les DLBCL ont permis le développement des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant notamment la signalisation du BCR, qui est constitutivement activée dans ces lymphomes amenant à l'activation constitutive des voies de survie en aval. Ainsi, ces dernières années plusieurs inhibiteurs pharmacologiques sont entrés en clinique pour traiter les patients avec par exemple :

des inhibiteurs de kinases de la voie de signalisation de BCR telles que Syk (fostamatinib), Btk (Ibrutinib) et PI3K/mTOR (Idélalisib et NVP-BKM120 /évérolimus et temsirolimus), des inhibiteurs directs et indirects de la voie NF- κ B (Bortézomib, Z-PVRPR-FMK/lénalidomide), ou des inhibiteurs de kinases associées à la voie des TLR (ND-2158). Ces molécules pharmacologiques sont pour la majorité en cours d'essais cliniques ; elles n'ont pas, la plupart du temps, d'influence significative sur la survie des patients lorsqu'on les administre seules, mais pourraient apporter un bénéfice en association avec le rituximab ou le traitement R-CHOP (Camicia et al., 2015). Cependant, si certaines molécules associées au rituximab ont permis d'améliorer sensiblement la survie des patients (ex : association lénalidomide/ rituximab dans le cas de patients atteints de DLBCL en rechute ou réfractaire), certains protocoles se sont avérés avoir un effet antagoniste du rituximab comme les inhibiteurs des voies Btk ou PI3K/Akt/mTor. En effet, comme on l'a évoqué à propos des mécanismes de régulation de l'expression du CD20, certaines signalisations cellulaires seraient impliquées dans l'augmentation de l'expression membranaire du CD20. En inhibant ces signalisations, on déclencherait une diminution de l'expression du CD20 contre carrant les effets cytotoxiques du rituximab (Winiarska et al., 2014, Kohrt et al., 2014, Camicia et al., 2015). Ces résultats montrent que le développement de nouveaux traitements, basés sur des combinaisons avec des inhibiteurs de signalisation notamment kinasiques et des anti-CD20 devra être précédé d'une évaluation préclinique détaillée de leurs effets sur les cellules cibles, afin d'identifier d'éventuelles interférences entre les traitements.

Du fait de l'extrême hétérogénéité de ces lymphomes au niveau des tumeurs et entre les différents patients, et la faible efficacité observée des monothérapies, il est devenu évident que les nouvelles stratégies devront associer plusieurs drogues en plus des traitements standards. L'objectif serait de cibler les voies de signalisations fortement activées, et de façon spécifique à chaque patient, pour aller vers des traitements plus personnalisés. Ces traitements devront être précédés d'études visant à identifier les patients pouvant bénéficier de telle ou telle thérapie ciblée, et prendre en compte aussi les divers types moléculaires déjà identifiés pour ces DLBCL. Cela sous-entend d'avoir accès à la signature génétique et moléculaire de chaque patient et/ou de biomarqueurs cliniques hautement spécifiques de chaque sous-type moléculaire. *C'est dans ce contexte que se situe notre travail de thèse au laboratoire. Notre objectif a été d'analyser les conditions de sensibilisation aux anti-CD20 (rituximab) en recherchant de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans l'échappement thérapeutique, et pouvant être utilisées comme des biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques de ces pathologies.*

3 Les neurotrophines

Les neurotrophines constituent une famille de facteurs de croissance, hautement conservés phylogénétiquement (90% d'homologie entre la protéine NGF humaine et murine), structurellement liés, et qui ont été découverts initialement dans les années 50 pour leur rôle dans la différenciation, la survie et la prolifération des cellules nerveuses (Lee et al., 2001). Le premier membre appelé NGF (nerve growth factor) a été isolé et identifié en 1954 par l'équipe de Rita Levi-Montalcini (Cohen et al., 1954). Les autres membres incluent chez les mammifères le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) découvert en 1982 (Barde et al., 1982, Leibrock et al., 1989), puis dans les années 1990 la neurotrophine 3 (NT-3) (Hohn et al., 1990, Jones and Reichardt, 1990, Maisonpierre et al., 1990) et la neurotrophine 4/5 (NT-4/5) (Hallböök et al., 1991).

3.1 Des gènes aux protéines

Les gènes des neurotrophines sont très conservés chez les vertébrés et l'organisation des segments génomiques adjacents à ces gènes est aussi très similaire. Les études menées sur des poissons à mâchoires ont permis de montrer qu'ils sont issus de duplications successives du génome d'un chordé ancestral. Elles supposent également que les gènes *ngf/nt3* et *bdnf/nt4/5* ont évolué selon des événements de duplication séparés. Ces duplications ont induit la formation de 4 neurotrophines chez l'homme où chacune d'entre elles assure des fonctions spécifiques. Cette multiplicité de molécules est en corrélation avec la complexité accrue du système nerveux des vertébrés acquise au cours de l'évolution (Hallböök, 1999). Les gènes codant le NGF, le BDNF, la NT-3 et la NT-4/5 chez l'homme sont localisés respectivement sur les chromosomes 1, 11, 12 et 19 (Tableau 1).

Tableau 1: Caractéristiques génomiques des neurotrophines humaines.

Neurotrophine	Localisation chromosomique	Taille de l'ARNm (pb)	N° d'accension NCBI
NGF	1p13,	1052	NM_0025006
BDNF	11p13	4659	NM_170735
NT-3	12p13	1204	NM_002527
NT-4/5	19q13, 3	1021	NM_006179

Les produits des gènes des neurotrophines aboutissent à des précurseurs protéiques présentant une forte homologie de séquence et des poids moléculaires très proches. Toutes les neurotrophines sont synthétisées via le même processus de maturation (Figure 10). En effet, les

transcrits sont d'abord traduits en précurseurs protéiques ou pré-pro-neurotrophines d'environ 250 acides aminés, qui sont acheminés au sein du réticulum endoplasmique (RE) via leur peptide signal. Ces formes immatures sont séparées de leur peptide signal dans le RE donnant les pro-neurotrophines (proNTs, 30-35 kDa). Puis ces proNTs sont clivées par des protéases intracellulaires telles que la furine ou des proconvertases (Bresnahan et al., 1990, Seidah et al., 1996), ou par des protéases extracellulaires après sécrétion comme la plasmine et certaines métalloprotéases (MMP-3 et MMP-7), ce qui permet de libérer les formes matures de 12 à 14 kDa (Pang et al., 2004). Les neurotrophines matures s'homodimérisent de façon non covalente en complexes de 28 kDa. Ainsi, les différentes étapes de protéolyse intra et extracellulaire donnent naissance à de nombreuses isoformes des NTs dont les masses moléculaires vont de 12 kDa à 35 kDa (Lee et al., 2001).

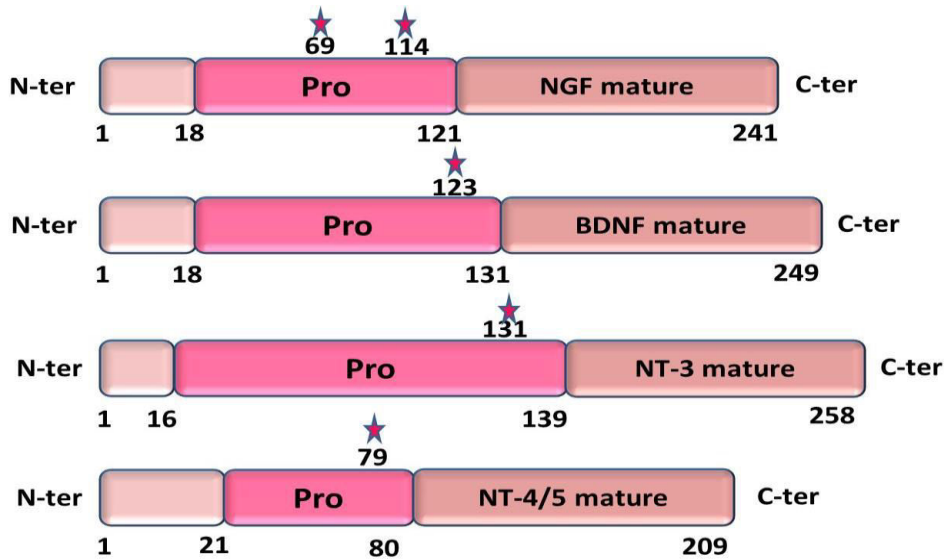


Figure 10 : Schéma des domaines constituant les neurotrophines. Le peptide signal (18 à 21 acides aminés) est représenté en rose pâle, le pro-domaine en rose foncé et le domaine de la neurotrophine mature en rouge clair. Les étoiles symbolisent les sites potentiels de N-glycosylation. Schéma adapté d'après (Lessmann et al., 2003).

Les NTs et les proNTs sont biologiquement actives et interagissent avec des récepteurs présents à la membrane plasmique. Les NTs possèdent une forte affinité pour les récepteurs Trk alors que les proNTs possèdent une forte affinité pour le récepteur p75^{NTR} (Chao and Bothwell, 2002).

3.2 Les récepteurs Trk

La découverte des récepteurs Trk a commencé en 1986 lors du clonage d'un gène transformant dans une biopsie de carcinome du côlon humain. Ce nouvel oncogène était activé par réarrangement entre des séquences codantes pour les domaines transmembranaire et tyrosine kinase de TrkA et des séquences du gène de la tropomyosine. Ce nouveau proto-oncogène nommé *NTRK1* (Neurotrophin Receptor Kinase 1) code pour une protéine transmembranaire appelée tropomyosin-related kinase A (Trk A) de 790 acides aminés qui possède les caractéristiques des récepteurs tyrosine kinase (Martin-Zanca et al., 1986). En 1989, un autre récepteur hautement similaire à TrkA nommé TrkB a été purifié (Klein et al., 1989). L'identification du NGF comme ligand de haute affinité de TrkA a été découverte beaucoup plus tard (Klein et al., 1991). Dans la même année, le BDNF a été identifié comme le ligand de haute affinité de TrkB (Klein et al., 1991b), et la NT-3 a été attribuée au récepteur TrkC (Lamballe et al., 1991). En 1994, il a été démontré que la NT-3 peut aussi se lier à TrkA et TrkB mais avec une affinité réduite (Brodeur et al., 2009).

3.2.1 Structure des Trk

Les récepteurs Trk ont tous une structure commune et font partie de la famille des récepteurs TK (tyrosine kinase). Ce sont des récepteurs transmembranaires glycosylés d'environ 800 acides aminés avec un poids moléculaire de 145 kDa. Les homologies de séquence peptidique entre ces récepteurs sont : 49% entre TrkA et TrkB, 51% entre TrkA et TrkC et 55% entre TrkB et TrkC (Nakagawara et al., 1995, Brodeur et al., 2009). Ces récepteurs sont constitués de trois domaines distincts représentés sur la figure 11.

Le **domaine extracellulaire** d'environ 400 acides aminés, ne présente aucune analogie avec celui des autres récepteurs de facteur de croissance. Ce domaine possède une succession de motifs qui incluent une région riche en résidus leucine entourées de 2 régions riches résidus cystéine, suivie de deux domaines de type immunoglobuline C2 (Ig-C2) responsables de

l'interaction avec le ligand. Enfin, la partie extracellulaire du récepteur est très fortement glycosylée (Chao and Hempstead, 1995). Ces glycosylations semblent essentielles à la localisation transmembranaire des récepteurs Trk et à leur signalisation.

Le domaine transmembranaire est composé d'une courte hélice α .

Le domaine intracellulaire est composé d'un large domaine tyrosine kinase dont la séquence est conservée entre les espèces, et présente plus de 75% d'homologie avec celle des autres récepteurs à tyrosine kinase. La particularité du domaine intracellulaire est de présenter de nombreuses tyrosines phosphorylables permettant notamment le recrutement d'effecteurs de la signalisation des Trk. Ainsi on retrouve 3 tyrosines au sein du domaine TK responsables de la trans-autophosphorylation du récepteur (pour TrkA, Y670/Y674/Y675). De même la tyrosine de la partie juxtamembranaire (Y490 de TrkA) est associée au recrutement de protéines Shc (Src Homology-2 Containing protein) et la tyrosine en C-terminale (Y785 pour TrkA) au recrutement de la PLC γ (PhosphoLipase C γ) (Figure 11 et 12).

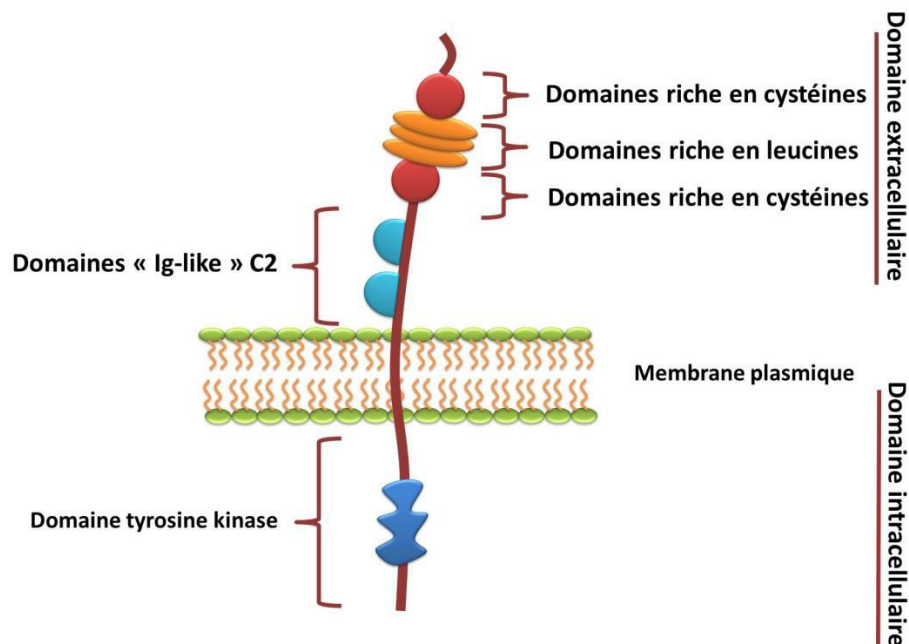


Figure 11: Schéma de la structure des récepteurs Trk. Les récepteurs TrkA, B et C possèdent une structure commune composée d'un domaine extracellulaire comprenant des régions riches en cystéines, leucines et deux domaines « Ig-like C2 », un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine intracellulaire doté d'une activité tyrosine kinase. La liaison des NTs à ces récepteurs de haute affinité et leur dimérisation s'effectuent au niveau des domaines « Ig-like ».

3.2.2 Isoformes des récepteurs Trk

Les transcrits des gènes des Trk sont soumis à un épissage alternatif conduisant à plusieurs isoformes dont les fonctions biologiques sont diverses.

3.2.2.1 Isoformes de TrkA

Le gène *NTRK1* codant pour le récepteur TrkA est situé chez l'homme sur le chromosome 1 et plus précisément en 1q21, et 17 exons ont été caractérisés (Valent et al., 1997). A l'heure actuelle, trois isoformes du récepteur TrkA ont été découvertes. Elles sont nommées TrkA-I, TrkA-II et TrkA-III (Brodeur et al., 2009). L'isoforme TrkA-I est produite suite à un épissage alternatif de l'exon 9 codant pour 6 acides aminés de la région extracellulaire proches du domaine transmembranaire de la protéine. Cependant cela n'altère pas la liaison de NGF et l'activation du récepteur. TrkA-II est l'isoforme la plus commune, non épissée et la plus longue. Elle présente un insert de 6 acides aminés dans le domaine extracellulaire qui n'affecte ni l'affinité de liaison du ligand ni la transduction du signal (Barker et al., 1993). En revanche, elle semble participer à la sélectivité du récepteur TrkA pour la NT-3, puisque la NT-3 ne se lie pas à la forme TrkA-I. TrkA-I est exprimée préférentiellement dans les tissus non-neuronaux alors que TrkA-II est retrouvée dans les tissus neuronaux ; cette expression différentielle pourrait être la source de la diversité des fonctions biologiques de ces deux isoformes (Clary and Reichardt, 1994). TrkA-III a été découvert en condition d'hypoxie comme un variant épissé des exons 6, 7 et 9 ce qui lui enlève le premier domaine Ig-like et plusieurs sites de N-glycosylations. Cette isoforme, surexprimée en conditions d'hypoxie, présente un pouvoir oncogénique. TrkA-III est, en effet, capable d'induire une signalisation indépendante du ligand NGF et de promouvoir un comportement tumorigène de cellules de neuroblastome (Tacconelli et al., 2004). Très récemment de nouveaux variants de TrkA ont été détectés par 5' RACE et PCR quantitative dans des tissus humains, ce qui montre l'existence de nouvelles isoformes dont l'extrémité N-terminale et le domaine extracellulaire sont tronqués. TRKAζII, est une glycoprotéine résidante dans des compartiments intracellulaires similaire à l'isoforme TRK III. TRKAκ est une isoforme qui a été détectée dans le noyau et le cytoplasme (Luberg et al., 2015).

3.2.2.2 Isoformes de TrkB

Le gène *NTRK2* codant pour le récepteur TrkB chez l'homme est situé sur le chromosome 9 (9q22), mesure 350 kb et contient 24 exons (Stoilov et al., 2002). Plus de 100 ARNm de 0.7 à 9 kb sont issus de la transcription du gène *NTRK2* et au moins 36 isoformes protéiques de la protéine TrkB sont traduites à partir de ces transcrits (Middlemas et al., 1991,

Luberg et al., 2010). Il existe trois protéines principales décrites chez l'Homme. **TrkB entier** (Full Length, FL) résulte de l'épissage des exons 16 et 19 et garde son domaine TK intact. **TrkB-T1 (ou TrkB-TK ou TrkB95)** contient un codon stop dans l'exon 16 et constitue l'isoforme la plus courte. Cette isoforme tronquée, retrouvée dans de nombreux tissus, possède le domaine extracellulaire permettant la liaison de BDNF et de NT-4/5 ainsi que la partie transmembranaire. Ce récepteur est en revanche dépourvu du domaine C terminal intracellulaire et ne possède donc pas d'activité tyrosine kinase (TK⁻). **TrkB-T-Shc**, identifié uniquement dans le cerveau, est épissé de l'exon 16 et se termine dans l'exon 19 juste après le site d'interaction avec la protéine Shc. Ce récepteur partage 100% d'homologie du domaine extracellulaire avec TrkB-T1, car tronqué aussi du domaine kinasique C terminal, mais diffère par sa partie intracellulaire possédant un domaine de liaison aux protéines Shc. Il ne peut être phosphorylé, ce qui suggère un rôle inhibiteur, mais son activité biologique reste à préciser (Stoilov et al., 2002, Wong and Garner, 2012, Fenner, 2012). De façon générale, bien que des travaux suggèrent un rôle signalisateur, à la fois TrkB-T1 et TrkB-T-Shc pourraient agir comme des « récepteurs dominants négatifs » du TrkB-FL en interférant avec la liaison du ligand (Brodeur et al. 2009, Luberg et al., 2010). Enfin il faut signaler que des isoformes nouvelles et tronquées de TrkB ont été identifiées ces dernières années dans le système nerveux central. Ces isoformes sont les équivalents, mais tronqués dans leur domaine extra-cellulaire N-terminal, des 3 protéines majeures précédemment décrites. Ces isoformes appelées TrkB-N-FL, TrkB-N-T1 et TrkB-N-T-Shc étant dépourvues de l'extrémité N-terminale, il est peu probable qu'elles soient transportées à la membrane plasmique et seraient donc principalement cytoplasmiques (Luberg et al., 2010).

3.2.2.3 Isoformes de Trk C

Le récepteur TrkC est codé par le gène *NTRK3* situé chez l'homme sur le chromosome 15, en position 15q25, et contient 20 exons (Valent et al., 1997). Comme les 2 autres récepteurs, le transcrit de TrkC subit différents épissages alternatifs aboutissant à 4 isoformes chez l'homme: TrkC-A, TrkC-B, TrkC-C, et TrkC-D. **TrkC-C** est l'isoforme majoritaire et la séquence de référence pour les différentes isoformes de TrkC. Comparée à celle-ci, **TrkC-A** contient une insertion de 14 acides aminés localisée dans le domaine TK (McGregor et al., 1999). Cela modifierait la spécificité de substrat de l'activité kinase de TrkC et pourrait altérer la réponse cellulaire en empêchant la fixation des protéines adaptatrices Shc et PLC γ (Guiton et al., 1995). **TrkC-B** est exprimée suite à une large délétion de la région cytoplasmique, emportant notamment le domaine tyrosine kinase dans son intégralité (Shelton et al., 1995).

Cette isoforme pourrait avoir un effet « dominant négatif » sur TrkC-C (Palko et al., 1999). Enfin, **TrkC-D** subit un épissage de l'exon 9 et, tout comme TrkC-A, une insertion de 14 acides aminés qui empêche la fixation des protéines partenaires Shc et PLC γ . Cependant, la délétion de l'exon 9 codant pour 9 acides aminés, situés dans la partie juxtamembranaire du récepteur, pourrait avoir des conséquences sur la spécificité de liaison ligand/récepteur (Shelton et al., 1995).

3.2.3 Voies de signalisation des récepteurs Trks

Nous avons choisi d'étudier le rôle des NTs dans le cas d'une maladie lymphoproliférative et plus précisément d'un lymphome provenant des lymphocytes B. Aussi, nous ne présenterons dans ce paragraphe, comme dans celui sur p75^{NTR}, que les signalisations liées à la fonction « facteur de croissance ». Nous n'aborderons donc pas celles plus spécifiques au système nerveux, comme la différenciation ou la plasticité neuronale, ni la signalisation particulière suite à l'internalisation et au transport rétrograde des récepteurs activés dans des endosomes du neurone.

En présence de leurs ligands (neurotrophines dimériques) les Trks s'homodimérisent et s'activent par autophosphorylation des 3 tyrosines du domaine kinasique. La phosphorylation des autres résidus tyrosine, comme Y490 et Y785 de TrkA chez l'Homme, permet de créer des sites de liaison pour des protéines adaptatrices intracellulaires contenant des domaines de liaison aux tyrosines phosphorylées ou domaines SH2 (Src-homology 2) (Arévalo and Wu, 2006, Reichardt, 2006). Les 3 voies de signalisation majeures activées par les 3 récepteurs tyrosine kinase Trk sont la voie des MAP kinases, de la PI3 kinase/Akt et de la PLC γ . Ces signalisations rendent compte du rôle important des Trk dans la croissance cellulaire, la survie et la différenciation des neurones. Mais elles sont aussi impliquées dans la survie, prolifération et invasion de divers types de cellules tumorales incluant les cancers du sein, poumon, le cancer colo-rectal, les neuroblasomes, ou ceux d'origine lymphoïde comme on le verra ensuite (Descamps et al., 2001, Brodeur et al., 2009, Zhang et al., 2010, Yang et al., 2013, Hillis et al., 2016).

La fixation de la protéine Shc via son domaine SH2 sur une des tyrosines phosphorylées de Trk (ex Y490 pour TrkA) induit sa phosphorylation, puis, le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2 (Rozakis-Adcock et al., 1992) qui interagit avec la protéine SOS (un facteur activateur de la petite protéine G Ras) via ses domaines SH3 (domaine d'interaction protéique reconnaissant des motifs riches en proline). L'activation de Ras initie notamment

l'activation en cascade de c-Raf-MEK1/2-ERK1/2 (Moodie et al., 1993). Finalement ce sont les kinases activées par ces MAPK, notamment Rsk (Ribosomal protein s6 kinase) et MSK1 (Mitogen and Stress-activated protein Kinase 1), qui vont à leur tour phosphoryler et activer des facteurs de transcription comme CREB (cAMP Response Element Binding) ou Elk-1 (membre de la famille ETS). Ces derniers activent la transcription de gènes essentiels pour la prolifération et la différenciation cellulaire (Janknecht et al., 1993, Riccio et al., 1999, Reichardt, 2006) (Figure 12).

La voie de la PI3K est engagée de façon Ras dépendante ou de façon indépendante par l'intermédiaire des protéines adaptatrices GAB, elles même recrutées par le complexe protéique Shc-Grb2 lié aux Trk (Holgado-Madruga et al., 1997, Vaillant et al., 1999). Il est également décrit que l'activation des Trk par le BDNF permet la phosphorylation de IRS1 (Insulin-Receptor Substrate) et le recrutement ainsi que l'activation de la PI3K (Yamada et al., 1997). La PI3K induit la formation de phosphatidyl inositol 3,4-biphosphate et active, en collaboration avec des PDK (phosphoinositide-dependent kinase), la protéine Akt. Akt est au cœur de la régulation par phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la survie cellulaire (Dudek et al., 1997), soit via la transcription de gènes soit via un effet direct sur des protéines de la cascade apoptotique. En effet, Akt entraîne la transcription de gènes décrits pour leur implication dans la survie cellulaire par l'intermédiaire notamment de NF- κ B. NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par I κ B (Inhibitor kappaB) et la phosphorylation d'I κ B par Akt provoque sa dégradation, libérant NF- κ B qui peut alors agir sur la transcription de gènes de survie. D'autres voies de survie seraient activées par l'intermédiaire de la PKC ζ atypique (Wooten et al., 1994). Finalement, la survie est engagée grâce au contrôle d'effecteurs directement impliqués dans la cascade apoptotique tels que Bad (Bcl-2-associated death protein) ou encore la caspase 9. Bad est un membre proapoptotique de la famille Bcl2 qui est inhibé lorsqu'il est phosphorylé par l'Akt.

La PLC γ est recrutée sur le résidu phosphorylé Y785 de TrkA et sur les résidus correspondants de TrkB et de TrkC, et devient active suite à sa phosphorylation par l'activité kinasique des Trk (Figure 12). Une fois activée, elle hydrolyse les phosphatidylinositol 4,5-biphosphates en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'IP3, en provoquant le relargage du calcium, augmente la concentration du calcium intracellulaire et active les enzymes dépendantes du calcium (kinases dépendantes de Ca²⁺/calmoduline, PKC...), et le DAG stimule les isoformes de la protéine kinase C (PKC) (Berninger et al., 1993). Ces voies conduisent à l'activation de la cascade des MAPK et notamment d'Erk1/2 ce qui va, comme on

l'a vu précédemment, déterminer l'activité transcriptionnelle de CREB. De façon générale, l'ensemble de ces signalisations contrôlent l'expression et ou l'activité d'un grand nombre de protéines, parmi lesquelles des canaux ioniques et des facteurs de transcription (Corbit et al., 1999, Reichardt, 2006).

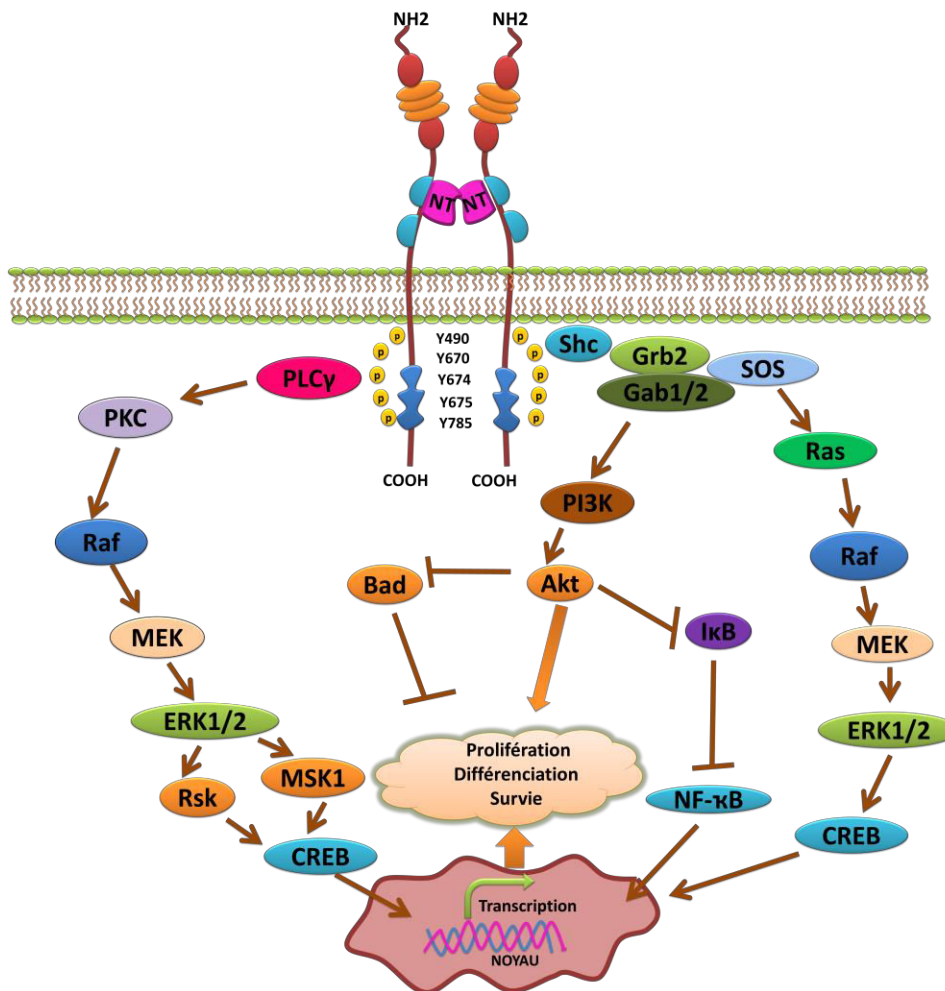


Figure 12: Représentation des voies de signalisations induites par l'activation des récepteurs Trk. La liaison des dimères de NTs à leurs récepteurs Trk respectifs entraîne l'activation de ces derniers par dimérisation et autophosphorylation des tyrosines Y490, Y670, Y674, Y675 et Y785 (cas de TrkA). Les récepteurs Trk engendrent alors diverses signalisations suite au recrutement de protéines adaptatrices comme Shc ou Grb2 ou Gab. Ces signalisations parmi lesquelles les voies Ras/Raf /MEK/ERK1/2, PI3K/Akt et la phospholipase C γ (PLC γ) convergent sur la régulation de facteurs de transcription comme CREB et NF- κ B contrôlant la survie, la prolifération et/ou la différenciation cellulaire. Schéma adapté d'après Arévalo & Wu, 2006.

3.3 Le récepteur p75^{NTR}

En 1973 p75^{NTR} a été identifié comme étant le récepteur du NGF et il a été appelé NGFR (NGF Receptor) (Herrup and Shooter, 1973). En 1986, son clonage et des expériences de transfection ont révélé que ce récepteur se liait à NGF avec une faible affinité, il a été alors

renommé, récepteur de faible affinité du NGF (low affinity NGF receptor) (Chao et al., 1986, Johnson et al., 1986, Radeke et al., 1987). Avec la découverte des autres membres de la famille des neurotrophines, il est apparu que toutes les neurotrophines se liaient au p75^{NTR} avec la même affinité dans tous les types cellulaires, d'où le nom p75^{NTR} pour Neurotrophin Receptor (Rodríguez-Tébar et al., 1990, Glass et al., 1991, Rodríguez-Tébar et al., 1992).

3.3.1 Du gène à la protéine p75^{NTR}

Le gène du récepteur commun aux neurotrophines d'environ 23 kb, situé sur la région q21-q22 du chromosome 17 chez l'homme, contient 6 exons. Le promoteur du gène ne possède pas de séquence consensus TATA ou CAAT (Sehgal et al., 1988), mais des séquences conservées riches en GC proches du site d'initiation de la transcription ont été identifiées et représentent un élément de réponse pour le facteur de transcription SP1 (Specificity Protein 1). D'autres éléments de réponse, telle que les E-box, sont présents sur le promoteur du gène *NGFR*. Certaines permettent la liaison avec des activateurs transcriptionnels comme NeuroD ou bHLH, alors que d'autres recrutent des répresseurs de la transcription comme ME1, réprimant ainsi l'expression de p75^{NTR} (Chiarangelo et al., 1995). Enfin des séquences de réponse à différents récepteurs nucléaires ont été répertoriées dans le promoteur de *NGFR* comme le récepteur à l'acide rétinoïque (activation transcriptionnelle), celui de la vitamine D3 et de la testostérone (répresseurs) (Metsis et al., 1992, Naveilhan et al., 1996).

La structure du récepteur p75^{NTR} est bien conservée entre les espèces. Le récepteur p75^{NTR} humain est une protéine glycosylée de 399 acides aminés répartis dans trois domaines : le domaine extracellulaire (222 aa), le domaine transmembranaire (22 aa), et le domaine intracellulaire (155 aa) (Roux and Barker, 2002) (Figure 13).

Le domaine extracellulaire présente des caractéristiques des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs du TNF (Yan and Chao, 1991). Cette partie extracellulaire du récepteur est composée de 4 domaines riches en cystéine appelés CRD (« Cystein-rich domain») et numérotés de 1 à 4 à partir de l'extrémité N-terminale. Chacun contient trois ponts disulfure intra-chaînes, entraînant une conformation spécifique à chaque domaine CRD et permettant la liaison des ligands (Banner et al., 1993, Holden et al., 1997). Enfin cette partie extracellulaire du récepteur présente un site de N-glycosylation et une région riche en O-glycosylations dans la partie juxta-membranaire, impliqués notamment dans l'adressage du récepteur à la membrane (Breuza et al., 2002).

Le domaine transmembranaire du récepteur p75^{NTR} est constitué d'une hélice transmembranaire unique et sa séquence en acides aminés est hautement conservée quelle que soit l'espèce animale considérée (Chao and Hempstead, 1995). Différents travaux ont montré que ce domaine transmembranaire était essentiel à la dimérisation du récepteur. En effet, la présence d'une cystéine très conservée, C257, permet d'établir un pont disulfure entre deux monomères de p75^{NTR} de manière indépendante de la présence du ligand (Nadezhdin et al., 2016).

Le domaine intracellulaire du récepteur p75^{NTR} est phosphorylé sur des résidus sérine et thréonine (Grob et al., 1985, Taniuchi et al., 1986), et palmitoylé sur la cystéine 279 (Kahle et al., 1994). Le rôle de ces modifications post-traductionnelles ne sont pas toutes connues, mais elles pourraient participer notamment à des interactions de type protéine-protéine, à la bonne maturation intracellulaire du récepteur ou à la localisation intracellulaire du récepteur. La phosphorylation du récepteur p75^{NTR} pourrait également être impliquée dans la multimérisation du récepteur (Grob et al., 1985). La présence dans la partie intracytoplasmique du récepteur d'un domaine de mort « Death Domain (DD) » est une caractéristique des protéines de la famille des récepteurs au TNF dont fait partie p75^{NTR}. Il s'agit d'un DD de type 2 composé de 80 aa qui permet à p75^{NTR} de recruter des protéines spécifiques et empêche une multimérisation (Liepinsh et al., 1997, Roux and Barker, 2002). Le domaine juxtamembranaire (JM, également appelé « Chopper domain») constitué de 29 acides aminés permet le recrutement des protéines adaptatrices conduisant à l'activation des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose cellulaire (Coulson et al., 2000). Le récepteur p75^{NTR} contient également un site de liaison à des protéines à domaines PDZ (« Post-synaptic disc-large zona») par un motif SPV (Sérine-Proline-Valine) situé à l'extrémité C-terminale du récepteur. Cela favorise le recrutement de protéines à domaines PDZ comme des molécules adaptatrices permettant la formation de plateformes de signalisation intracellulaire (Doyle et al., 1996, Sheng and Sala, 2001). Enfin, la partie juxtamembranaire contient également la cystéine 279 qui permet la palmitoylation du récepteur (Barker and Shooter, 1994). Cette modification post-traductionnelle serait impliquée dans les fonctions biologiques de ce récepteur comme le clivage de ce récepteur par la γ -secrétase (cf paragraphe suivant) (Underwood et al., 2008) ou l'interaction de p75^{NTR} avec TrkA (Mirnics et al., 2005).

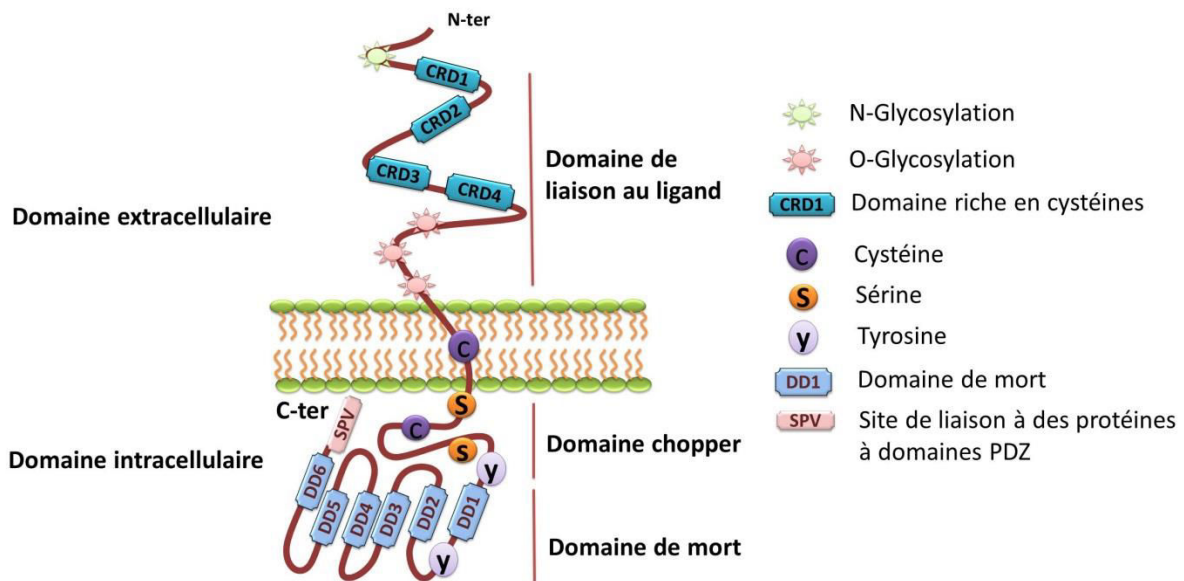


Figure 13: Représentation schématique de p75^{NTR}. Le récepteur p75^{NTR} est composé d'un domaine extracellulaire qui contient 4 domaines riches en cystéines (CRD), d'un domaine transmembranaire contenant la cystéine C257 importante pour la dimérisation du récepteur, et d'une région cytoplasmique constituée d'un domaine chopper juxtamembranaire, d'un domaine de mort et de plusieurs sites de phosphorylation (Roux and Barker, 2002).

p75^{NTR} peut former des homodimères par des liaisons covalentes ou non covalentes, et cette homodimérisation est nécessaire pour le recrutement et l'activation des adaptateurs intracellulaires (Vilar et al., 2009). Il a été démontré très récemment que p75^{NTR} existe principalement sous forme d'un trimère, semblable à d'autres protéines de la famille des TNFR. Les monomères et les trimères coexistent à la surface cellulaire, mais la formation de trimères n'est pas nécessaire pour l'activation du p75^{NTR} (Anastasia et al., 2015).

3.3.2 Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}

En plus de la forme complète du récepteur p75^{NTR}, des formes tronquées ont été identifiées et sont le résultat soit d'un épissage alternatif, soit d'un processus de protéolyse (Figure 14).

Des isoformes du récepteur p75^{NTR} peuvent être le résultat d'un épissage alternatif éliminant l'exon 3, ce qui entraîne la délétion des domaines riches en cystéines 2, 3 et 4. Ce variant ne contient pas de site de fixation du ligand (Dechant and Barde, 1997, von Schack et al., 2001), et sa fonction précise n'est pas connue. Cependant, une inhibition de son expression, associée à un KO (Knock Out) de la forme complète de p75^{NTR} entraîne des malformations du

système nerveux de la souris plus importantes que l'inhibition de l'expression de la forme complète uniquement.

Comme d'autres récepteurs transmembranaires, p75^{NTR} peut subir un processus de protéolyse de type RIP (« Regulated intramembrane proteolysis») (Brown et al., 2000). Ce processus consiste en la succession de deux clivages, un premier clivage du domaine extracellulaire générant un domaine extracellulaire soluble nommé **p75-ECD** (ou ectodomaine) par des α -sécrétases extracellulaires telles que ADAM 10 et ADAM 17/TACE (TNF Alpha Converting Enzyme). Ce fragment est capable de se lier aux neurotrophines. Le reste du récepteur reste lié à la membrane et correspond au fragment C-terminal ou p75-CTF comprenant les domaines transmembranaire et intracellulaire (ICD) de la protéine (Zupan et al., 1989, Barker et al., 1991, Alderson et al., 2000). Ce premier clivage est suivi par un second réalisé sur le CTF par un complexe protéique γ -sécrétase intracellulaire (« presenilin dependent γ -secretase »), qui génère un fragment intracellulaire **p75-ICD** avec une séquence signal de translocation dans le noyau. Ce fragment est alors dirigé vers le noyau, où il se comporte comme un facteur de transcription (Brown et al., 2000, Skeldal et al., 2011). Les parties transmembranaire et cytoplasmique de p75^{NTR} prennent alors le nom de **p75NTR-CTF** (C-Terminal Fragment). Le rôle des différentes formes tronquées de p75^{NTR} reste mal connu. Cependant, il est désormais admis qu'elles participent également à la signalisation du récepteur après stimulation par les (pro) neurotrophines.

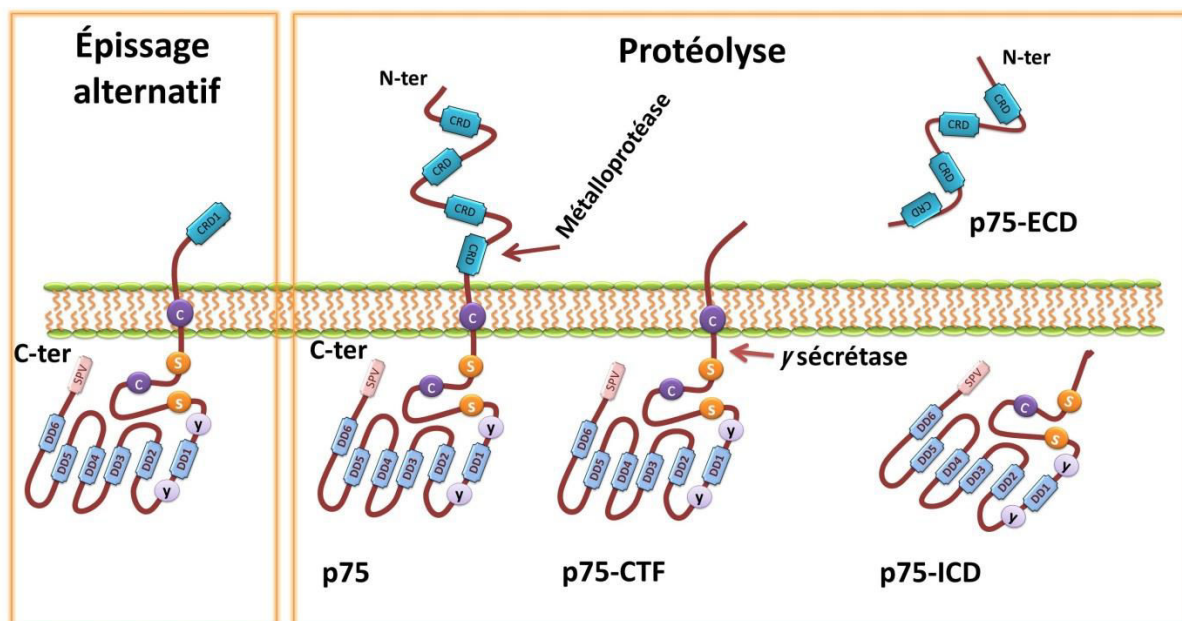


Figure 14: Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}. Les isoformes de p75^{NTR} sont générées par épissage alternatif ou protéolyse. p75-ECD (Extracellular Domain), p75-CTF (C Terminal Fragment), p75-ICD (Intracellular Domain).

3.3.3 Voies de signalisation du récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} est le récepteur commun à toutes les NTs matures mais aussi à toutes les proNTs. Cependant, les proNTs se lient à p75^{NTR} avec une affinité plus forte que les formes matures pour lesquelles il représente le récepteur de basse affinité (Lee et al., 2001). Finalement p75^{NTR} peut aussi établir, comme on le verra ensuite, des interactions fonctionnelles avec d'autres récepteurs et notamment avec la sortiline et les Trk, et se comporter alors comme un co-récepteur. Ces interactions aboutissent à des effets biologiques complexes et parfois antagonistes de ceux déterminés par le monomère ou les dimères de p75^{NTR}. Même si le monomère de p75^{NTR} peut induire une signalisation, des travaux récents montrent que le récepteur est déjà sous forme de dimères avant la liaison à ses ligands. La fixation du ligand entraînerait uniquement un changement de conformation du dimère déterminant la séparation des DD, permettant alors le recrutement des protéines adaptatrices, et ainsi la signalisation cellulaire (Vilar et al., 2009, Lin et al., 2015).

Le récepteur p75^{NTR} ne présente pas dans son domaine intracellulaire d'activité enzymatique intrinsèque. Par conséquent, son activation requiert le recrutement de protéines adaptatrices pour déterminer une signalisation en aval. La liaison du récepteur p75^{NTR} par les neurotrophines peut induire selon le contexte cellulaire (nature des protéines adaptatrices, ou présence de co-récepteurs) deux effets majeurs : l'induction de l'apoptose, principalement par l'intermédiaire de la MAPK JNK, ou au contraire l'induction de la survie cellulaire, principalement par l'activation du facteur de transcription NF-κB (Figure 15).

3.3.3.1 Voies de signalisation conduisant à l'apoptose

L'effet pro-apoptotique de p75^{NTR} est lié à l'activation d'une MAPK, la *c-jun* N-terminal kinase ou JNK. Ce processus fait suite au recrutement d'une protéine adaptatrice sur la partie cytoplasmique de p75^{NTR} telle que NRIF (NT-receptor interacting factor), NADE (NT-associated cell death receptor), NRAGE (NT-receptor interacting MAGE homolog) ou encore TRAF (TNF receptor-associated factors). Ces protéines se lient à des régions distinctes du domaine cytoplasmique de p75^{NTR} soit au niveau du domaine Chopper, soit au niveau du DD (Ye et al., 1999, Salehi et al., 2002, Kenchappa et al., 2006, Kim and Hempstead, 2009). Ces protéines recrutent et permettent l'activation notamment d'une GTPase, Rac, suite à l'interaction du ligand avec le récepteur. Rac se lie sur le motif CRIB (« cdc-42/Rac1 interactive binding motif ») présent sur les MAPKKK (MAPK kinase kinases). Cette interaction favorise l'auto-phosphorylation des MAPKKK, induisant ainsi leur activation (Bazenet et al., 1998,

Hirai et al., 1996). Les MAPKKK activées induisent la phosphorylation des MAPK kinases MKK4 et MKK7 qui phosphorylent spécifiquement JNK (Walton et al., 1999). JNK, une fois activée, peut phosphoryler et activer des facteurs de transcription comme p53 ou c-Jun (Harrington et al., 2002), ou des régulateurs pro-apoptotiques, en particulier les protéines Bim, Bad et Bax (Bhakar et al., 2003, Becker et al., 2004). Cela détermine finalement la libération du cytochrome C à partir des mitochondries provoquant l'activation des caspases, en particulier des caspases 3, 6 et 9 (Whitfield et al., 2001, Nykjaer et al., 2005) (Figure 15).

La signalisation pro-apoptotique du récepteur p75^{NTR} induit également l'activation des sphingomyélinases associées à la membrane qui clivent la sphingomyéline en céramides et phosphatidylcholine (Dobrowsky et al., 1994). Les céramides peuvent induire l'activation de JNK et par conséquent de l'apoptose à fortes concentrations mais les mécanismes précis de cette activation ne sont pas connus (Brann et al., 2002). De façon intéressante, à faible concentration, ces céramides peuvent induire des effets inverses favorisant la survie cellulaire (Wang et al., 1999).

3.3.3.2 Voies de signalisation conduisant à la survie cellulaire

De façon contradictoire, l'activation du récepteur p75^{NTR} peut aboutir aussi à des effets anti-apoptotiques et prolifératifs en l'absence ou en présence des récepteurs Trk (Hempstead et al., 1991, DeFreitas et al., 2001). Ces effets biologiques sont induits par l'activation du facteur de transcription NF- κ B dont l'activation reste cependant modeste. Ce facteur est activé dans les cellules par trois voies : la première voie est induite par le recrutement de protéines adaptatrices de la famille TRAF, en particulier TRAF6 via une interaction avec le domaine juxtamembranaire du récepteur (Gentry et al., 2004). TRAF6 détermine l'ubiquitination de p75^{NTR} et recrute le complexe γ -sécrétase générant la formation du fragment p75-ICD capable d'activer NF- κ B (Powell et al., 2009). En effet le recrutement de TRAF6 sur p75-ICD va ensuite permettre de recruter et d'activer la PKC atypique iota (ou PKC_i) (Wooten et al., 2001, Wooten et al., 2000) qui va phosphoryler l'inhibiteur I κ B, libérant ainsi le facteur de transcription NF- κ B actif et induisant sa translocation au noyau (Wooten et al., 2000). La deuxième voie est initiée par le recrutement d'une sérine/thréonine kinase, la protéine RIP-2 (« Receptor interacting-protein 2 »), qui possède un domaine de recrutement des caspases (domaine CARD ou « Caspase Recruiting Domain ») lui permettant de se lier au domaine DD du récepteur p75^{NTR} après activation par les NTs. Une fois activée, RIP-2 va induire la survie cellulaire, via l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Khursigara et al., 2001). La signalisation du

récepteur p75^{NTR} peut finalement conduire à l'activation de la voie de la PI3K, qui participe également à la survie cellulaire en phosphorylant la kinase Akt (ou PKB) (Brunet et al., 1999, Atwal et al., 2000). L'activation d'Akt détermine alors l'activation de NF-κB via la phosphorylation de la kinase IKK1 (ou IKKα) de IκB (Bui et al., 2002).

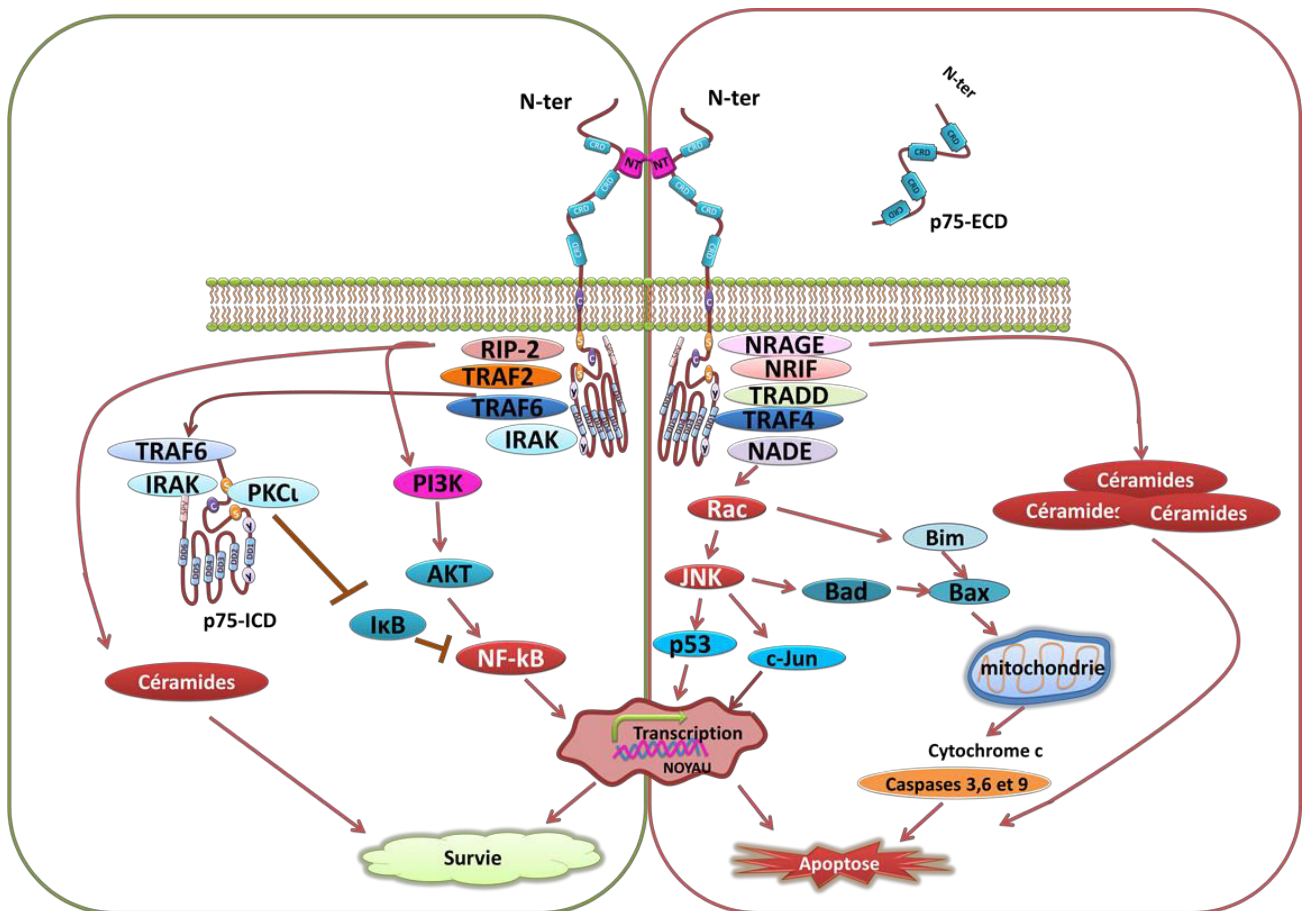


Figure 15: Représentation schématique des voies de signalisation de p75^{NTR}. La fixation des neurotrophines à p75^{NTR} entraîne le recrutement de protéines adaptatrices sur les domaines intracellulaires du récepteur. Elles initient, selon le contexte cellulaire, des voies de signalisation menant à l'apoptose impliquant notamment la kinase JNK, ou menant à la survie via par exemple l'activation de NF-κB. L'activation de p75^{NTR} peut également aboutir à la production de céramides qui, en fonction de leur concentration, sont aussi impliqués dans chacune des 2 voies précédentes.

3.3.3.3 Interaction de p75^{NTR} avec son corécepteur : la sortiline

L'effet apoptotique des pro-neurotrophines est connu depuis longtemps (Lee et al., 2001). Cependant, les récepteurs mis en jeu dans ces effets n'étaient pas clairement identifiés. En 2004, Nykjaer et collaborateurs ont démontré que le proNGF déterminait l'apoptose sélectivement par p75^{NTR} et non par TrkA. Ils ont également démontré que la sortiline est le corécepteur de p75^{NTR} dans l'action pro-apoptotique déclenchée par le pro-NGF, alors que

l'association du NGF au complexe p75^{NTR}-TrkA active une signalisation de survie cellulaire (Nykjaer et al., 2004). De la même façon, la formation d'un complexe proBDNF-sortiline-p75^{NTR} est capable d'induire la mort de neurones sympathiques (Teng et al., 2005). Ces découvertes ont été confirmées dans un modèle de souris KO pour la sortiline, révélant l'importance du complexe proNT-p75^{NTR}-sortiline dans la régulation de la viabilité neuronale (Jansen et al., 2007, Nykjaer and Willnow, 2012).

La sortiline est une glycoprotéine d'environ 95kDa considérée comme l'archétype des membres de la famille des récepteurs « cargo » transmembranaires de type I, parmi lesquels figurent aussi la protéine SorLA/LR11 (Sortilin-related receptor L(DLR class) A) et les protéines SorCS (Sortilin-related receptor CNS expressed 1, 2 et 3) (Hampe et al., 2001, Nyborg et al., 2006). En effet, ces protéines comportent dans leur région extracellulaire un domaine présentant une forte homologie structurale avec la protéine d'adressage de la carboxypeptidase Y de la levure appelée Vps10p (Vacuolar protein sorting 10 protein). Ce domaine Vps10p occupe la majeure partie de la région extracellulaire de ces récepteurs et est impliqué dans la liaison de la sortiline avec ses ligands (Westergaard et al., 2004). La sortiline présente en réalité un grand nombre de ligands en plus des pro-NTs, parmi lesquels un autre neuropeptide, la neurotensine, dont elle constitue un récepteur de faible affinité (ce qui explique l'autre nom de la sortiline : NTSR3 -Neurotensin receptor 3) ou encore la LPL (Lipoprotein Lipase) et l'apoA-V (apolipoprotein A-V) (Nykjaer et al., 2004, Nilsson et al., 2008). La partie transmembranaire de la sortiline est formée d'une seule hélice hydrophobe et se poursuit par un court domaine intracytoplasmique C-terminal ne lui permettant pas d'interagir directement avec des protéines de signalisation. Ainsi la sortiline doit s'associer avec un récepteur capable de signaler pour induire ses effets biologiques. Enfin, la sortiline présente dans sa séquence carboxy-terminale un motif composé de résidus acides, homologue à celui retrouvé dans le récepteur Vps10p ; ce domaine est aussi identique à celui du récepteur MPR (récepteur du mannose-6 phosphate) des cellules de mammifères impliqué dans l'adressage des enzymes lysosomiales du réseau trans-golgien vers les compartiments endosomiaux puis lysosomiaux. Ainsi, la sortiline est retrouvée majoritairement présente au sein du milieu intracytoplasmique (90%) et plus spécifiquement au niveau de l'appareil de Golgi et du réseau trans-golgien (Canuel et al., 2009). Les différentes données obtenues sur sa structure, sa localisation subcellulaire et ses partenaires protéiques ont finalement montré que la sortiline était une protéine multifonctionnelle. Elle est impliquée notamment, en plus de son rôle de co-récepteur : dans l'internalisation et l'adressage des protéines du réseau trans-golgien aux endosomes, dans le processus de sécrétion des proNTs,

ou la liaison et le trafic rétrograde des récepteurs Trk dans les neurones (Nielsen, 2001, Skeldal et al., 2011, Nykjaer and Willnow, 2012).

La sortiline montre donc une dualité fonctionnelle puisqu'elle peut jouer le rôle de transporteur mais également celui de co-récepteur. C'est ainsi qu'elle joue le rôle de co-récepteur pour p75^{NTR} (figure 16) par l'intermédiaire duquel elle engendre l'effet pro-apoptotique des pro-neurotrophines qu'elle lie de manière spécifique (Nykjaer et al., 2004). En effet, contrairement au récepteur p75^{NTR} qui lie uniquement les formes matures de NGF et BDNF, la sortiline ne peut lier que le pro-domaine de ces protéines. La présence de la sortiline permet la formation d'un site de haute affinité favorisant la liaison des proNTs à p75^{NTR} (Feng et al., 2010). Ainsi, les pro-NTs se fixent simultanément sur la sortiline par leur prodomaine, et sur p75^{NTR} par leur partie mature pour former un complexe ternaire, dont chacun des membres a été montré comme indispensable à l'induction d'apoptose (Nykjaer et al., 2004, Teng et al., 2005). La signalisation induite met en jeu, comme on l'a vu pour l'apoptose induite par p75^{NTR}, l'activation de JNK et des caspases 3 et 6 (Volosin et al., 2006). Des études récentes suggèrent, qu'en plus de son rôle de co-récepteur dans la signalisation apoptotique de p75^{NTR}, la sortiline favoriserait le clivage de p75^{NTR} et ainsi la libération de fragments p75^{NTR}-ICD responsables finalement de la mort cellulaire (Skeldal et al., 2012).

3.3.3.4 Interaction de p75^{NTR} avec les récepteurs Trk

L'activation de p75^{NTR} par ses ligands peut initier l'apoptose dans des types cellulaires divers neuronaux et non neuronaux si celui-ci est exprimé indépendamment des Trk. Par contre, lorsque p75^{NTR} et les Trk sont exprimés dans les mêmes cellules, la voie de signalisation déclenchée par les neurotrophines matures entraîne la survie des cellules (Teng and Hempstead, 2004). Lorsque p75^{NTR} est co-exprimé avec les Trk sur la même cellule, l'affinité de liaison des Trk pour les NTs est fortement augmentée comme cela a été démontré pour la liaison du NGF à TrkA (Hempstead et al., 1991). Différents travaux ont permis d'établir la réalité d'une liaison directe entre les récepteurs, et les études stœchiométriques récentes ont donné un rapport de 2 :4 :2 indiquant que le complexe TrkA/NGF/p75^{NTR} serait constitué de 2 dimères de NGF interagissant avec deux molécules de p75^{NTR} et deux molécules de TrkA (Covaceuszach et al., 2015). Concernant la signalisation induite par ce complexe ternaire, bien qu'elle reste à clarifier, certaines études tendent à montrer qu'elle serait différente de celles déclenchées et précédemment décrites par les Trk ou p75^{NTR} (Barker, 2007). Cependant, plusieurs protéines

capables d'interagir physiquement et simultanément avec les récepteurs Trk et p75^{NTR} permettent une signalisation renforcée lorsque le complexe p75^{NTR}-Trk se forme (Arévalo et al., 2004, Chang et al., 2004). Parmi ces protéines on trouve : la protéine ARMS (ankyrin repeat-rich membrane-spanning) (Roux and Barker, 2002), la cavéoline (Okamoto et al., 1998, Bilderback et al., 1999) qui est impliquée dans la formation d'invaginations de la membrane plasmique ou FAIM (Fas Apoptosis Inhibitor Molecule) qui assure la croissance des neurites dépendante du NGF. Finalement, le complexe p62-TRAF6-IRAK décrit dans la signalisation de p75^{NTR} apparaît comme un autre moyen d'associer les 2 signalisations, avec la liaison de TRAF6 à p75^{NTR} et de p62 à TrkA (Wooten et al., 2001).

De façon générale, la signalisation des récepteurs Trk inhibe à plusieurs niveaux la voie proapoptotique majeure induite par p75^{NTR}, la voie JNK. De cette façon, l'activation de la voie Ras supprime la cascade d'activation de JNK. Cet effet est dépendant de l'activation induite par Ras de la voie PI3K, qui par ailleurs, est capable d'inhiber directement la voie JNK (Mazzoni et al., 1999). L'association de ces deux types de récepteurs peut également potentialiser la signalisation de survie induite par les récepteurs Trk. En effet, p75^{NTR} peut lier la protéine adaptatrice des récepteurs Trk, Shc, et stimuler sa phosphorylation pour augmenter la signalisation qui en découle (Epa et al., 2004). Finalement, les deux types de récepteurs activent la voie NF- κ B, ce qui permet un effet synergique des deux signalisations sur la survie cellulaire (Reichardt, 2006).

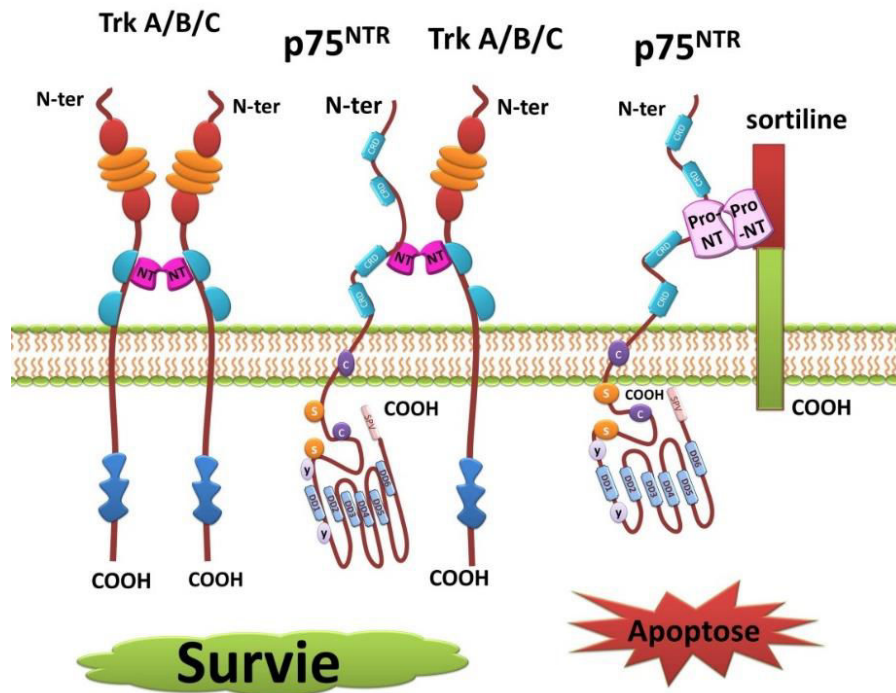


Figure 16: Interaction du récepteur p75^{NTR} avec les récepteurs Trk et la sortiline. (d'après Kaplan and Miller, 2004). La fixation des formes matures des neurotrophines sur les complexes p75^{NTR}/Trk induit l'activation des signalisations de survie alors que la fixation des pro-neurotrophines aux complexes p75^{NTR}/sortiline détermine la signalisation apoptotique.

3.4 Les récepteurs des neurotrophines comme cibles thérapeutiques

Pendant ces dernières années, plusieurs études ont montré que les récepteurs Trk peuvent être des cibles thérapeutiques dans le cas de différents types de cancer. Ces études suggèrent que l'inhibition de la voie de signalisation des neurotrophines peut être une stratégie pour améliorer les résultats des traitements conventionnels. Le **K252a** est un alcaloïde naturel analogue de la staurosporine, qui agit comme un inhibiteur de l'activité des kinases par un effet compétiteur de la fixation de l'ATP au domaine catalytique (Morotti et al., 2002). Au début le K252a a été décrit comme un inhibiteur de l'activité sérine/thréonine kinase, mais les travaux de Tapley en 1992 ont montré que le K252a est un inhibiteur puissant ciblant les récepteurs Trk (Trk A, TrkB et Trk C) (Tapley et al., 1992). Le K252a est également un inhibiteur partiel du récepteur PDGF, les concentrations utilisées pour cet inhibiteur sont faibles, de l'ordre du nanomolaire pour les récepteurs Trk, allant à des concentrations plus élevées pour le récepteur PDGF (Nye et al., 1992). Dans cette gamme de concentrations, le K252a n'a pas présenté d'effet sur les récepteurs de l'EGF, FGF et IGF-1 (Nye et al., 1992, Chin et al., 1997, Morotti et al., 2002). Le K252a a été utilisé *in vivo* dans différents modèles murins de tumeurs réalisés notamment à partir de xénogreffes tumorales sur des souris immunodéficientes. Son injection

chez l'animal n'a pas montré d'effets toxiques chez les animaux traités, et elle a permis de confirmer le rôle de la signalisation BDNF/TrkB dans le développement tumoral comme pour le choriocarcinome placentaire, ou le cancer pulmonaire (Kawamura et al., 2010, Odate et al., 2013).

Le lestauritinib est un dérivé synthétique du K252a appelé également CEP-701 (Knapper et al., 2006). C'est un inhibiteur sélectif des Trk (Trk A, Trk B et Trk C) qui peut inhiber la croissance des cellules de neuroblastome *in vitro* et *in vivo* (xénogreffes tumorales) et améliorer considérablement l'efficacité de la chimiothérapie conventionnelle, via l'inhibition de la signalisation autocrine de survie BDNF/TrkB (Iyer et al., 2010). Il est actuellement en phase d'essais cliniques dans le cas du neuroblastome. Des résultats concluants ont été obtenus à partir de xénogreffes tumorales dans le cancer de la prostate (Weeraratna et al., 2001), cependant les essais cliniques réalisés ensuite n'ont pas permis de prouver l'efficacité du lestauritinib utilisé seul dans ce cancer.

D'autres inhibiteurs pan-Trk ont été testés, parmi lesquels **AZ64** et **GNF-4256** et **AZ623**. Ces molécules sont des inhibiteurs efficaces de l'activation de TrkA/B/C qui ont été utilisés en monothérapie à des concentrations très faibles, et qui ont montré un effet inhibiteur de la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes de neuroblastome. En outre, ils améliorent l'efficacité de la chimiothérapie, sans aucune toxicité supplémentaire (Zage et al., 2011, Iyer et al., 2012, Croucher et al., 2015). Cependant, les études cliniques de ces agents n'ont pas été poursuivies.

La cyclotraxine B est un petit peptide cyclique, qui exerce un rôle antagoniste très puissant et sélectif de TrkB (Cazorla et al., 2010). Ce modulateur allostérique de TrkB est un dérivé du BDNF produit en utilisant une approche peptidomimétique. Il se fixe sur TrkB et inhibe son activation par le BDNF (Chitranshi et al., 2016). Les résultats de l'étude montrent qu'il peut aussi induire des effets anxiolytiques et analgésiques dans des modèles animaux de la douleur neuropathique (Cazorla et al., 2011). La cyclotraxine B représente un outil prometteur pour l'étude de la signalisation de BDNF/TrkB dans les processus physiologiques et pathologiques, et pourrait servir pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment dans le cas du cancer mais aussi les maladies neurologiques (Cazorla et al., 2010).

Des altérations moléculaires liées à des réarrangements localisés dans les gènes *NTRK* ont été identifiées dans plusieurs tumeurs solides, y compris le cancer du poumon, le cancer colo-rectal

ou le glioblastome. Les essais précliniques et cliniques ont montré leur rôle potentiel en tant que biomarqueurs prédictifs pour l'inhibition ciblée, conduisant au développement clinique très récent d'une nouvelle classe de molécules ciblant ces types de récepteurs assez rares, qui sont actuellement en phase précoce d'investigation clinique (Passiglia et al., 2016). Ainsi, **l'entrectinib** est un inhibiteur sélectif ciblant les récepteurs Trk mais aussi d'autres récepteurs tyrosines kinase tels que ALK et ROS (Iyer et al., 2016). Les études *in vitro* et sur des modèles animaux (xénogreffes de lignées tumorales humaines) ont clairement montré la régression de la croissance tumorale lors du traitement par l'entrectinib (Lee et al., 2015). Il a été testé sur un patient atteint d'un cancer du poumon non à petites cellules présentant un réarrangement génétique de *NTRK1* dans le cadre d'une étude de phase 1. Il a permis d'obtenir une activité anti-tumorale significative chez ce patient, indiquant qu'il pourrait être un traitement efficace pour les tumeurs présentant des réarrangements des *NTRK*, y compris ceux ayant des métastases du système nerveux central (Farago et al., 2015). L'entrectinib est actuellement en cours d'essais cliniques de phase 1, chez des patients atteints de tumeurs solides contenant des altérations moléculaires des *NTRK* pour déterminer les doses maximales tolérées et/ou les doses recommandées pour la phase 2. Jusqu'à présent, 67 patients ont été tolérants (Patel et al., 2015, De Braud et al., 2015, Iyer et al., 2016). **LOXO-101** est un inhibiteur compétitif de l'ATP administré par voie orale. C'est un inhibiteur sélectif des récepteurs TrKA/B et C, avec des IC₅₀ très faibles (nanomolaire). Des études précliniques ont testé LOXO-101 dans des lignées de cellules tumorales humaines porteuses de fusion oncogénique avec *NTRK1*, révélant son action inhibitrice sur l'oncoprotéine de fusion produite, associée à une réduction de la croissance tumorale (Ardini et al., 2016). Dans le cadre d'études cliniques de phase 1 des patients porteurs de gènes de fusion *ETV6-NTRK3* (fibrosarcome infantile) ou *LMNA-NTRK1* (sarcome des tissus mous) ont été enrôlés ; les résultats sont très prometteurs car ils montrent que le traitement avec le LOXO-101 apporte un réel bénéfice aux patients avec une régression tumorale (Doebele et al., 2015, Nagasubramanian et al., 2016).

En conclusion, parmi plusieurs inhibiteurs des Trk, l'entrectinib et LOXO-101 sont à un stade plus avancé de développement clinique. Les deux agents ont montré une activité encourageante avec un profil de tolérance acceptable chez les patients atteints de différentes tumeurs solides. Ils sont en train de devenir de nouvelles options thérapeutiques prometteuses pour certains patients notamment atteints de cancers du poumon et présentant des altérations géniques des *NTRK* et les résultats des essais cliniques de phase 2 sont donc très attendus (Passiglia et al., 2016).

3.5 Neurotrophines et lymphocytes B

Les interactions entre le système immunitaire et le système nerveux ont suscité de nombreuses études. Elles ont permis notamment de montrer, de façon très inattendue pour des facteurs de croissance neuronaux, que les cellules immunitaires sécrétaient aussi des neurotrophines qui participaient à la régulation de leurs fonctions biologiques (Hillis et al., 2016). Ainsi, le NGF est connu par son implication dans la survie, l'activation et la différenciation des lymphocytes B et T, des monocytes, des éosinophiles, des neutrophiles, des basophiles et des mastocytes (Tessarollo, 1998). Les cellules dendritiques expriment à la fois TrkA et p75^{NTR} (Labouyrie et al., 1997), alors que les lymphocytes T sécrètent le NGF et expriment p75^{NTR} (Lambiase et al., 1997). *Notre travail de thèse ayant porté sur le rôle de ces neuropeptides, et plus particulièrement de NGF et BDNF, dans la survie des lymphocytes B (LB), nous allons porter notre attention par la suite uniquement sur ces cellules.*

3.5.1 En conditions physiologiques

Peu de travaux à notre connaissance ont porté sur le rôle des proNTs dans les LB normaux, cependant, notre groupe a mis en évidence la production de pro-BDNF à partir de lignées cellulaires B humaines à différents stades de différenciation (Fauchais et al., 2008). Concernant les NTs matures, l'analyse de l'expression des neurotrophines par les lymphocytes B a révélé une expression basale du NGF dans les cellules B humaines naïves et activées. Comparées avec les cellules B naïves, les lymphocytes B mémoire produisent huit fois plus de NGF alors que l'expression des récepteurs Trk était similaire. Ces données suggèrent un rôle du NGF dans la survie à long terme des lymphocytes B (Torcia et al., 1996). Bien que les études ont surtout concerné NGF, l'expression du BDNF a été aussi détectée dans les lymphocytes B humains et murins, comme dans des lignées lymphoblastoïdes représentant différents stades de maturation des lymphocytes B (Kerschensteiner et al., 1999) (Edling et al., 2004, Fauchais et al., 2008).

Les trois récepteurs de haute affinité des neurotrophines (TrkA, TrkB et TrkC) ont été identifiés au niveau des transcrits et au niveau protéique dans les lymphocytes B humains. Cependant l'expression protéique des Trk est souvent faible et varie beaucoup en fonction des

modèles cellulaires utilisés (cellules B humaines périphériques, lignées cellulaires...). De même elle varie en fonction des conditions de culture, et globalement l'ensemble des données montre que l'expression des Trk est augmentée au cours de l'activation des lymphocytes B. La localisation protéine membranaire des Trk est souvent difficile à mettre en évidence notamment dans les cellules au repos, alors que les ARNm sont détectés (D'Onofrio et al., 2000, Fauchais et al., 2008). Contrairement à TrkA qui, lorsqu'il est présent correspond à la forme complète du récepteur, la forme complète de TrkB (full-length TrkB) est souvent peu ou pas détectée, notamment dans les cellules B non activées. Par contre les différentes études rapportent la présence de la forme tronquée TrkB95 (Schenone et al., 1996) (Schuhmann et al., 2005, Fauchais et al., 2008). Il a été proposé que le récepteur TrkB était cytoplasmique, séquestré au repos dans les lymphocytes B et transféré à la membrane plasmique lors de la stimulation des lymphocytes B (Fauchais et al., 2008). L'expression du récepteur TrkC a été relativement peu étudiée dans les lymphocytes B, mais l'expression de l'ARNm codant pour ce récepteur a été observée dans les LB humains (D'Onofrio et al., 2000). La signalisation intracellulaire induite par les récepteurs Trk dans les cellules B serait similaire à celle vue précédemment pour les autres types cellulaires. Par exemple, la signalisation anti-apoptotique induite par NGF/TrkA semble converger sur des voies de signalisation communes aux récepteurs Trk et à celles du récepteur à l'antigène des cellules B (BCR), avec le partage de protéines adaptatrices comme Grb2 et Shs permettant ainsi l'activation de la protéine Ras (Melamed et al., 1999). On observe ainsi l'activation d'Erk-2 (Franklin et al., 1995) de la PI3K et de la PKC γ (Kronfeld et al., 2002).

Les données sont moins claires concernant l'expression du récepteur p75^{NTR} par les lymphocytes B en conditions physiologiques. Les transcrits sont retrouvés dans les cellules B naïves et activées humaines, et au niveau des lignées cellulaires, mais les résultats sur l'expression de la protéine restent discutables tantôt relatant sa présence, tantôt son absence (Torcia et al., 1996, D'Onofrio et al., 2000, Fauchais et al., 2008). Finalement, les travaux de notre équipe ont démontré en 2008, pour la première fois, la présence du co-récepteur de mort, la sortiline, au niveau de lignées cellulaires représentatives des différents stades de maturation B, et dans des cultures primaires de cellules B (Fauchais et al., 2008).

L'ensemble de ces résultats montre que les lymphocytes B ont le potentiel de répondre aux NTs matures mais aussi immatures (proNTs) par des circuits à la fois autocrines et paracrines. Il est important de noter ou de rappeler que l'expression des NTs et de leurs récepteurs par les lymphocytes T et B est induite ou augmentée au cours de l'activation des

cellules, et notamment lors d'un stress cellulaire (classiquement réalisé par une privation sérique ou l'introduction dans les cultures du ligand du récepteur de mort, Fas). De plus, des données très récentes suggèrent, même si cela n'a pas été démontré dans le cas des lymphocytes B, que ces régulations d'expression seraient aussi réalisées lors de la détection d'un signal de danger, comme un pathogène par la signalisation des TLR (Toll like receptor) (Krock et al., 2016, Hillis et al., 2016).

Le BDNF et le NGF sont effectivement impliqués dans la régulation de la fonction des lymphocytes B ; en revanche, les effets de la NT-3 et NT-4/5 sur les lymphocytes B n'ont pas été bien caractérisés. L'utilisation de souris knock-out pour le BDNF a montré son implication dans le développement des lymphocytes B. Ces souris présentent un nombre réduit de cellules B périphériques et un arrêt de la maturation des lymphocytes B au stade pré-B, sans affecter la différenciation ni le nombre des lymphocytes T (Schuhmann et al., 2005). Cet effet sur la maturation des cellules B peut s'expliquer notamment par la production du BDNF par les cellules stromales de la moelle osseuse, ce qui contribuerait par des effets paracrines à la survie et au développement des précurseurs B présents dans leur environnement (Labouyrie et al., 1999). Il a été également montré que le BDNF protège les lymphocytes B de l'apoptose induite par le stress en condition de privation sérique (D'Onofrio et al., 2000, Fauchais et al., 2008). De la même façon, le NGF réalise un facteur de survie autocrine pour les cellules B, y compris pour les lymphocytes B mémoires. Cet effet a été associé à la forte production, sous stimulation NGF, de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Torcia et al., 1996). Ainsi, l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-NGF ou d'un inhibiteur de Trk, réduit le taux d'expression de Bcl-2 dans des cultures primaires de lymphocytes B ; dans ces études, l'absence de la signalisation des neurotrophines déterminait l'activation de la p38 MAPK, conduisant à la phosphorylation de la protéine Bcl-2, et finalement à l'apoptose (Rosini et al., 2000). Le NGF semble agir de façon synergique avec l'interleukine-2 (IL-2) en régulant l'activation et la prolifération des lymphocytes B. Ainsi, NGF régule l'expression du récepteur de l'interleukine-2 (Brodie and Gelfand, 1992, Thorpe et al., 1987) et régule *in vitro* la production d'Ig par les lymphocytes B activés (Kimata et al., 1991), indiquant que le NGF pourrait favoriser la différenciation des lymphocytes B en cellules productrices d'anticorps.

En conclusion, il est donc maintenant admis que les NTs sont des régulateurs autocrines et paracrines, supplémentaires au réseau cytokinique, de la survie et la prolifération notamment des lymphocytes B normaux. Ces informations originales ont naturellement poussé les chercheurs à rechercher leur implication dans le contexte physiopathologique des maladies

lymphoprolifératives, comme les lymphomes B. En parallèle, beaucoup d'autres travaux ont identifié le rôle de ces neuropeptides et de leurs récepteurs dans le processus oncogénique et de façon originale, en plus des cancers du système nerveux, dans divers types de cancers non neuronaux (poumon, colo-rectal, thyroïde, pancréas, prostate, ovaire, sein, voies aéro-digestives) (Wang et al., 2014, Hondermarck, 2012, Chopin et al., 2016).

3.5.2 Neurotrophines, lymphomes B et DLBCL

Alors qu'un grand nombre d'articles relatent le rôle potentiellement important des NTs dans les lymphocytes normaux, très peu d'études ont regardé les niveaux d'expression et les activités de ces neuropeptides dans les cancers des lymphocytes, et plus particulièrement des lymphocytes B. Cependant, globalement l'ensemble des données obtenues à partir de cellules B tumorales confirment le rôle pro-survie autocrine et/ou paracrine des NTs.

De façon paradoxale, alors que la plupart des données sur les lymphocytes B normaux laissaient présager un rôle plus important à NGF, la grande majorité des travaux concernant les maladies lymphoprolifératives B ont mis en évidence le rôle potentiellement important de BDNF dans la survie et la résistance thérapeutique des cellules B tumorales (Hillis et al., 2016). Ainsi, la signalisation de survie liée à l'axe BDNF/TrkB est associée à la survie des lignées cellulaires de lymphomes de Burkitt, et son inhibition notamment en inhibant la synthèse de BDNF (siRNA) à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. De plus, l'inhibition de la signalisation de BDNF sensibilise les cellules aux effets cytotoxiques de la chimiothérapie *in vitro* (Xia et al., 2014). Un axe « BDNF/TrkB » a été aussi identifié chez les patients atteints de myélome multiple et au niveau des lignées cellulaires humaines représentatives de cette pathologie, et le BDNF induit une protection partielle à l'effet apoptotique du bortezomib, notamment par activation de la voie PI3K (Pearse et al., 2005).

La fonction de p75^{NTR} est peu abordée car ce récepteur n'est souvent pas exprimé dans les cellules des patients. Enfin, les données sur la sortiline, obtenues essentiellement à partir de lignées cellulaires (de myélome multiple ou de lymphome de Burkitt), montrent qu'elle pourrait être impliquée dans l'effet pro-apoptotique observé en présence de proNTs. Cependant, une expression membranaire est observée suite à un stress des cellules (privation sérique) même si elle est retrouvée le plus souvent en intracellulaire. Il a été suggéré qu'elle aurait surtout un rôle

dans le processus de sécrétion de BDNF (D'Onofrio et al., 2000, Fauchais et al., 2008, Hillis et al., 2016).

Les travaux réalisés par l'équipe où j'ai effectué mon stage doctoral ont beaucoup contribué à la connaissance du rôle de ces neuropeptides dans les DLBCL. En effet, à notre connaissance, une seule publication d'un autre groupe a analysé le rôle des Trk dans des lymphomes non-hodgkiniens et notamment les DLBCL (Sniderhan et al., 2009). Les données obtenues par l'équipe avant mon arrivée montraient que les lignées de type GCB (SUDHL-4 et SUDHL-6) exprimaient et sécrétaient les formes immatures et matures des neurotrophines (NGF et BDNF). Ces lignées exprimaient aussi (transcrits et protéines) les récepteurs TrkB, p75^{NTR} et la sortiline. De plus l'expression des NTs et leurs récepteurs était modulée par les conditions de culture (stress, présence d'anti-CD20). Ainsi la sécrétion d'NGF était fortement augmentée lors du traitement des cellules par le rituximab. Enfin, des travaux préliminaires montraient que l'inhibition pharmacologique des Trk déterminait une forte apoptose et augmentait la sensibilité des cellules de type GCB à l'effet cytotoxique du rituximab (Bellanger et al., 2011).

Ces résultats suggéraient que la sécrétion de NTs par les cellules tumorales de DLBCL pouvait leur permettre de survivre, et de s'adapter aux conditions du microenvironnement tumoral. En effet, la modulation de l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs, observée après traitement au rituximab, peut représenter une des stratégies que les cellules de DLBCL utilisent pour augmenter leur résistance à la thérapie. *C'est dans ce contexte que s'est situé un des objectifs de notre thèse. Dans un premier travail (article 1 et 2) nous avons poursuivi de façon plus approfondie l'étude du rôle des NTs dans les DLBCL, en abordant notamment leur signification clinique chez les patients et plus particulièrement en lien avec l'agressivité des sous-types et le processus de résistance thérapeutique.*

Résultats

Le sujet qui m'a été confié pour réaliser mon stage doctoral correspondait à la poursuite des travaux initiés notamment par Lydie Dubanet, qui finissait sa thèse lorsque je suis arrivée au laboratoire. Elle a pu prolonger sa présence au laboratoire sur le premier semestre de ma thèse dans le cadre d'un poste d'ATER, et nous avons ainsi collaboré pour finaliser un article en cours en complétant les expérimentations avant de le soumettre pour publication. Cette participation active à ce travail m'a permise de figurer en co-premier auteur de ce premier article publié en 2015 dans la revue *British Journal of Cancer*.

Ainsi au cours des deux premières années de ma thèse, j'ai notamment pour cet article complété l'étude par l'immunohistochimie sur les biopsies des patients en augmentant leur nombre sur la cohorte initiale, afin d'analyser les éventuelles corrélations entre l'expression des neurotrophines ou leurs récepteurs et les données cliniques des patients. En parallèle, j'ai réalisé avec l'aide d'un post-doctorant, Miguel Angel de la Cruz-Morcillo, les expérimentations sur l'inactivation de la signalisation de p75^{NTR} par la technique de shRNA inibant l'expression de ce récepteur. Les résultats de ces expériences ont permis de mettre en évidence le rôle pro-survie inattendu de ce récepteur. Cette fonction pro-survie de p75^{NTR} avait été suggérée par les études d'immuno-précipitation que j'ai réalisées au niveau cellulaire, montrant que le récepteur p75^{NTR} était le plus souvent associé à la forme phosphorylée (activée) des récepteurs Trk et non à la sortiline, son co-récepteur impliqué dans l'induction de mort. Enfin j'ai également réalisé l'étude *in vivo* de l'inhibition pharmacologique des Trk (K252a) sur des modèles murins, obtenus à partir de xénogreffes de cellules de DLBCL humaines chez des souris immunodéficientes. Les résultats ont confirmé que l'inhibition de la signalisation des Trk réduit significativement la croissance tumorale des cellules de DLBCL et potentialise les effets anti-tumoraux du rituximab.

Article 1: Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas

BJC

FULL PAPER

British Journal of Cancer (2015) 113, 934–944 | doi: 10.1038/bjc.2015.274

Keywords: DLBCL; neurotrophins; Trk; p75^{NTR}; apoptosis; rituximab; VEGF

Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas

Lydie Dubanet^{1,6}, Hafidha Bentayeb^{1,6}, Barbara Petit², Agnès Olivrie^{3,4}, Sofiane Saada¹, Miguel A de la Cruz-Morcillo¹, Fabrice Lalloué¹, Marie-Pierre Gourin^{3,4}, Dominique Bordessoule^{3,4,5}, Nathalie Faumont⁵, Manuela Delage-Corre², Anne-Laure Fauchais¹, Marie-Odile Jauberteau¹ and Danielle Troutaud^{*1}

¹EA3842, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France; ²Laboratoire d'Anatomie-Pathologique, CHU de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87000 Limoges Cedex, France; ³Structure Régionale de Référence des Lymphomes du Limousin, CHU de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87000 Limoges Cedex, France; ⁴Service d'Hématologie Clinique, CHU de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87000 Limoges Cedex, France and ⁵UMR CNRS 7276, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland 87025, Limoges Cedex, France

*LD and HB contributed equally to this work

Running title: BDNF/TrkB/p75^{NTR} prosurvival axis in DLBCL

Funding: This work was supported by Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité Départemental de La Haute-Vienne) and CORC (Comité d'Orientation Recherche Cancer en Limousin).

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

E-mail: danielle.troutaud@unilim.fr

Abstract

Background

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a fatal malignancy that needs to identify new targets for additional therapeutic options. This study aimed to clarify the clinical and biological significance of endogenous neurotrophin (NGF and BDNF) in DLBCL biopsy samples and cell lines.

Methods

We analysed expression of NGF, BDNF, and their receptors (Trk, p75^{NTR}) in 51 biopsies and cell lines by immunohistochemistry, immunofluorescence and western blotting. To investigate the biological role of BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis, effects of neurotrophin signalling inhibition were determined on tumor cell survival and VEGF secretion. The pharmacological pan-Trk inhibitor K252a was used for *in vitro* and *in vivo* studies.

Results

A BDNF/TrkB axis was expressed in all biopsies, which was independent of the GCB/non-GCB profile. p75^{NTR}, TrkB and BDNF tumor scores were significantly correlated and high NGF expression was significantly associated with MUM1/IRF4, and the non-GCB subtype. DLBCL cell lines co-expressed neurotrophins and their receptors. The full length TrkB receptor was found in all cell lines, which was also phosphorylated at Tyr-817. p75^{NTR} was associated to Trk and not to its cell death co-receptor sortilin. *In vitro*, inhibition of neurotrophin signalling induced cell apoptosis. K252a caused cell apoptosis, decreased VEGF secretion and potentiated rituximab effect, notably in less rituximab-sensitive cells. *In vivo*, K252a significantly reduced tumor growth and potentiated the effects of rituximab in a GCB-DLBCL xenograft model.

Conclusions

This work argues for a pro-survival role of endogenous neurotrophins in DLBCLs and inhibition of Trk signalling might be a potential treatment strategy for rituximab resistant subgroups.

Keywords: DLBCL, neurotrophins, Trk, p75^{NTR}, apoptosis, rituximab, VEGF.

Introduction:

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) are highly aggressive non-Hodgkin lymphomas (NHL). They are subdivided into 2 major prognostically significant subtypes, germinal center B-cell (GCB) and activated B-cell (ABC) type which are respectively of better and worse prognostic. GCB lymphoma gene expression profile clustered with normal germinal center B cells. By contrast, ABC lymphomas arise from B cells at a plasmablastic stage, just prior to germinal center exit, and therefore express genes that are frequently expressed in mature plasma cells (Alizadeh *et al*, 2000; Rosenwald *et al*, 2002; Wright *et al*, 2003). Although the Akt pathway is constitutively activated in most tumor cells and B-NHL cell lines (Arranz *et al*, 1996; Suzuki *et al*, 2007), constitutive activation of the NF- κ B pathway is crucial for survival of ABC-DLBCL cells but not GCB-DLBCL cells (Davis *et al*, 2001; Lam *et al*, 2005). Those lymphomas present an important clinical challenge. Despite significant survival improvement of patients obtained by combining a monoclonal anti-CD20 antibody, rituximab, with chemotherapy (R-CHOP immunochemotherapy), a subset of patients does not initially respond and several responsive patients develop rituximab resistance (Rezvani and Maloney, 2011).

Neurotrophins (NTs) among with the nerve growth factor (NGF) and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are a family of structurally and functionally related growth factors that are widely expressed in a variety of tissues including the immune system (Vega *et al*, 2003). NTs are synthesized as proforms (proNTs), and both forms are secreted and exert biological activities (Teng *et al*, 2010). The actions of NTs are mediated by three receptor classes: the common p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}), the tropomyosin-related kinase receptors (TrkA for NGF and TrkB for BDNF), and the pro-NT receptor, sortilin (Reichardt, 2006). Trk receptors have also distinct isoforms that affect their function. In humans three major isoforms of TrkB are expressed, the full-length signal-transducing receptor TrkB-TK (or gp145TrkB) and two C-terminal truncated receptors thus lacking the tyrosine kinase domain, TrkB-T1 (or gp95TrkB) and TrkB-T-Shc (De Santi *et al*, 2009). Binding of NTs to the full-length TrkB receptor (TrkB-TK) triggers autophosphorylation of tyrosine residues in the intracellular kinase domain, followed by the activation of several survival signalling cascades, such as the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, MAPK, and PLC- γ pathways. As opposite, binding of NTs to p75^{NTR} signals apoptosis, which involves activation of *c-jun* N-terminal kinase (JNK) and caspases. However, NTs binding to p75^{NTR} also promotes activation of NF- κ B, thereby promoting NF- κ B dependent cell survival signalling (Reichardt, 2006). Indeed, p75^{NTR} signalling is very complex. The receptors exist as dimers but an emerging consensus is that

p75^{NTR} interacts with several co-receptors (as sortilin) and multiple ligands with important physiological consequences (Baker, 2007; Forsyth *et al*, 2014). Notably, *in vivo* and *in vitro* data have clearly indicated that p75^{NTR} and Trk receptors functionally interact, but the precise means by which this occurs has remained unresolved. It is well established that p75^{NTR} potentiates Trk signalling and notably TrkA at least in part by enhancing NGF binding to the TrkA receptor (for review, see Barker, 2007). The work of Wehrman *et al*, (2007) provides key insights into the structural and kinetic issues concerning p75^{NTR} and TrkA interactions in NGF binding. Their structural data suggest the possibility of a ternary complex p75^{NTR}/NGF/TrkA, yet the biochemical data indicate that this complex does not form in living cells. It was proposed that TrkA and p75^{NTR} likely communicate through convergence of downstream signalling pathways and/or shared adaptor molecules, rather than through direct extracellular interactions. As contrast sortilin, an intracellular transport protein for NTs and proNTs, forms a high affinity co-receptor complex with p75^{NTR} involved in the cell death effect of proNTs (Nykjaer *et al*, 2004). Previous studies in our laboratory showed, for the first time in B cell lines that an autocrine BDNF production is up-regulated by stress culture conditions and exerts an anti-apoptotic effect through the sortilin pathway (Fauchais *et al*, 2008). Moreover, we also reported that GCB-DLBCL cell lines secrete NT that can be modified by culture conditions (serum deprivation) or treatment with rituximab (Bellanger *et al*, 2011). We hypothesized that NTs signalling could have a potential autocrine /paracrine role in the clinical heterogeneity of human DLBCL.

Angiogenesis and the proangiogenic growth factor vascular endothelial growth factor (VEGF) have a known role in solid neoplasia, and there is increasing evidence that they also play a role in hematolymphoid neoplasia. Of note, VEGF could have a dual role in lymphomagenesis: as a paracrine angiogenic factor and as an autocrine growth factor (Gratzinger *et al*, 2007). While hypoxia-induced HIF-1 α up regulation is the primary stimulus for VEGF production, aberrant activation of the PI3K and NF- κ B pathways can also contribute to increase HIF-1 α in normoxic conditions and notably in malignant lymphoma cells (Qiao *et al*, 2010; Karar and Maity, 2011). Interestingly in DLBCLs, tumor cells from patients co-expressed VEGF and its receptors VEGFR1 and VEGFR2, suggesting an autocrine loop for VEGF in lymphomagenesis (Wang *et al*, 2004; Gratzinger *et al*, 2008).

The aim of the present study was to evaluate neurotrophin functionality in ABC and GCB like cell lines and their possible association with clinicopathological variables in DLBCLs. As BDNF/TrkB activation of the PI3K/mTOR pathway can lead to an increase in

HIF-1 α that stimulates VEGF production (Nakamura *et al*, 2006), we also examined the potential relationship between neurotrophins and VEGF secretion in DLBCL cell lines. Finally, we investigated *in vivo* the efficacy of Trk pharmacological inhibition combined or not with rituximab in a GCB-DLBCL xenograft model.

Material and methods:

Patient samples

Fifty-one cases of DLBCL treated in the hematology department of Dupuytren Hospital (Limoges, France) were collected from the “Tumorotheque” of Dupuytren Hospital. Tumors were classified according to the World Health Organization classification (Swerdlow *et al*, 2008). DLBCL cases were then categorized as germinal center B-cell (GCB) or non-GCB subtype according to the Hans algorithm based on CD10, Bcl-6 and MUM1 expression (Hans *et al*, 2004). Clinical data of the patients were reviewed and are summarized for all patients in Table 1. This study was conducted after approval of the local ethics committee (N° 98-2012-23). All patients have been informed of the use of their tissue samples in research studies.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were performed as previously described (Troutaud *et al*, 2010) using Envision Kit (Dako Denmark A/S). The anti-NGF, anti-BDNF, anti-p75^{NTR} and anti-TrkB were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), anti-TrkA from R&D (Minneapolis, MN, USA), mouse isotypic control IgG1 from Cell Signalling (Beverly, MA, USA), and rabbit isotypic control was from Sigma (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Validation of the specificity of the antibodies used for the IHC assays has been previously done (Bellanger *et al*, 2011). The staining intensity was scored from 0 to 4 as follows: 0, negative; 1, weak; 2, moderate; 3, strong; 4, very strong. Furthermore, to compare the expression of NGF, BDNF and/or TrkA, TrkB, p75^{NTR} with clinical and pathological parameters, samples were grouped in high (staining intensity > median immuno-histochemical score) and low-expression groups (staining intensity \leq median immunohistochemical score). Section stainings were analysed independently by DT and an hematopathologist (BP or MCD) who were blinded to each other's scores, and without knowledge of clinical information. In case of disagreement, the staining results were re-analysed by the observers on a multihead microscope until consensus was reached.

Human B cell lines and cell cultures

The human GCB-like DLBCL cell lines, SUDHL4 and SUDHL6, were obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) and the two ABC-like DLBCL cell lines, OCI-LY3 and OCI-LY10, were a gift of Pr Feuillard (UMR CNRS 7276, Limoges University) with the kind agreement of Louis M. Staudt (National Cancer Institute, USA). The cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For the viability tests, cells were incubated with: various concentrations of rituximab (1–20 µg/mL, MabThera®, stock 10 mg/mL, a generous gift from CHRU Dupuytren of Limoges, Pharmacie centrale), K252a (350 nM, Alomone labs, Jerusalem, Israel), pro-BDNF (1-10 ng/mL, Alomone labs), neutralizing anti-BDNF (15 µg/mL, Promega, Madison, USA), exogenous BDNF (100 ng/mL, Promega), anti- p75^{NTR} neutralizing antibody (1-10-100 ng/mL, clone ME20.4, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) alone or in combination.

Cell viability assay

Cellular viability was assessed using the colorimetric XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate)-assay (Cell Proliferation Kit II, XTT Roche) as previously reported (Bellanger *et al*, 2011).

Analysis of apoptosis

Apoptosis was determined using the propidium iodide (PI)/Annexin V-FITC double staining method (kit Beckman Coulter, Immunotech, Marseille, France) as previously described (Bellanger *et al*, 2011). This method effectively distinguishes apoptotic cells from necrotic cells. Apoptotic cells exhibited intense green (FITC) and negative or intermediate red (PI) fluorescence (early and late stages of apoptosis, respectively). Necrotic cells exhibited strong green and red fluorescence. Cells were analysed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) acquiring 10 000 events gated on light scatter properties (forward vs side: FSC/SSC) to eliminate debris and cellular aggregates.

Western blotting and immunoprecipitations

Western blotting was performed as described previously (Bellanger *et al*, 2011). Rabbit anti-BDNF, anti-NGF, anti-NT3, anti-p75^{NTR}, goat anti-sortilin, mouse anti-PARP-1 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Mouse anti-TrkB, anti-TrkA and anti-TrkC antibodies were purchased from R&D Systems. Anti-phospho TrkB (pY817) and anti-phospho-TrkC (Y820) were purchased from Abcam (Epitomics, Burlingame, USA) and anti-phospho-TrkA (Y490) from Cell Signalling (Beverly, MA, USA). Protein-loading control was performed with anti- β -actin Ab (Sigma). Visualization of immunocomplexes was accomplished using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). Western blots were scanned using a bioimaging system (Genesnap; Syngene Europe, Cambridge, UK). Co-immunoprecipitations were performed in accordance with the manufacturer's instructions (Catch and Release kit, Millipore) with 500 μ g of proteins and anti-p75^{NTR} for 1 hour at room temperature. Finally immunoprecipitates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, before analysis by western blotting (with anti-Trk, anti-sortilin and anti-p75^{NTR}).

Immunofluorescence microscopy

DLBCL cells were challenged with antibodies against Trk, BDNF, NGF, p75^{NTR} and/or sortilin and analysed by immunofluorescence as previously described (Bellanger *et al*, 2011). Pictures were captured using a Leica microscope and a Leica digital camera. Images were processed using Leica IM500 Image Manager.

Cell supernatant VEGF immunoassay

Growth medium was collected and VEGF-A levels were determined using the human VEGF ELISA kit (PeproTech, Rocky Hill, USA) according to the manufacturer's recommendations. All tests were performed in duplicate.

In vivo Xenografts

All animal studies were conducted in accordance with the guidelines established by the internal Institutional Animal Care and Use Committee (CREEAL N°2-07-2012). 4 weeks old SCID mice (CB17.SCID) were supplied by Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). For *in vivo* K252a efficacy, we used a DLBCL xenograft model. SCID mice were injected with 1×10^7 SUDHL4 cells subcutaneously. After the tumors had become established (~6 weeks after tumor inoculation) mice were divided (day 0) into treatment and control groups (at least five mice per group). Intraperitoneal administration of K252a dissolved in physiological saline (0.5 mg/kg)

was performed every 3 days for 3 weeks. Rituximab was administered i.p., alone or in combination of K252a, at a dose of 25 mg/kg twice a week. For negative controls, treatment with vehicle alone was used. Animals weighted between 20 and 26 g on day of treatment. All animals were ear-tagged and monitored individually throughout the experiment. The dose of K252a chosen for this experiment was based on published studies (Kawamura *et al*, 2010). Tumor volume (cm³) was estimated by three weekly measurements of the length (L), width (W) and height (H) of the tumor using the formula: volume = L × W × H. Mice were killed after 17 days of treatment. Tumor control samples were harvested and analysed by immunohistochemistry for their human origin (with anti-human CD20, Dako Denmark A/S) and for NTs/p75^{NTR}/Trk expression. Moreover, western blotting analysis of Ki-67 expression (Dako Denmark A/S), used to evaluate proliferative index, and of PARP cleavage for apoptosis induction were performed in some tumor samples from K252a treated and vehicle control mice.

Statistical methods

Statistical analyses were performed using the StatView v5.0 software (Abacus Concepts). Significance between groups in the *in vitro* and xenograft studies were done using a Student's t test. For the DLBCL patient samples, mean comparisons were based on Mann-Whitney U test, and correlations between quantitative variables were assessed using the Spearman rank correlation coefficient ρ . $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

DLBCL patient samples are characterized by a BDNF/TrkB axis and NGF expression is correlated with the ABC phenotype.

We explored the pattern of NTs and their receptor expression in a cohort of 51 patients, with 29 were evaluated as GCB subtype and 22 as non-GCB (Table 1). This study was performed at the transcript and protein levels. mRNA for NGF, BDNF, TrkA, full-length (TrkB145) and truncated TrkB, p75^{NTR} and sortilin were found in GCB and non-GCB biopsies (Supplementary Figure S1). Interestingly, only some patients had transcripts for the full length TrkB receptor. We further examined all the biopsy samples at the protein level by immunohistochemistry as compared to normal reactive lymph nodes (RLN). As expected, positive stainings for BDNF, TrkB, p75^{NTR}, and with a lesser intensity for NGF and TrkA, were observed in numerous B cells within the germinal centers of reactive lymph nodes (Figure 1 A). Furthermore, as shown in Figure 1 A and B, NTs expression was seen in tumor B cells of all DLBCL samples as well

as for TrkB with moderate to strong intensity staining. Of note, antibodies used for the protein study detect both forms of Trk receptors. In the majority, tumor samples were also moderately positive for TrkA and p75^{NTR}. As for the reactive lymph nodes, immunostainings show evidence of a BDNF/TrkB axis in all DLBCL biopsy samples that was not significantly associated with a GCB or non-GCB phenotype. However, except for TrkA, stronger staining intensities were frequently observed with the non-GCB subtype of DLBCL patients (Figure 1 A and B). Accordingly, NGF expression was correlated positively with Mum1, the ABC subtype marker and, as expected, with the non-GCB subtype ($p = 0.008$ and $p = 0.04$ respectively, Supplementary Table S2). Indeed, a higher expression of NGF was found statistically associated to Mum1 positive compared to Mum1 negative biopsies (Figure 1 C and Supplementary Table S3). Finally TrkB expression was also positively correlated with those of BDNF and p75^{NTR} ($p = 0.01$ and $p = 0.006$ respectively, Supplementary Table S2). No significant correlation was found with clinicopathological parameters (data not shown).

Table 1. Baseline patient clinical characteristics

Characteristic		Number of patients ($n = 51$)
Age (range)		63 ±15 (29–89)
	≤ 60	18
	> 60	33
Sex (M/F)		32/19
GCB		29 (57%)
Ann Arbor	Stage I/II	15
	Stage III/IV	14
IPI	Low/low-intermediate (≤ 2)	19
	Intermediate-high/high (> 2)	10
Non-GCB		22 (43%)
Ann Arbor	Stage I/II	8
	Stage III/IV	14
IPI	Low/low-intermediate (≤ 2)	9
	Intermediate-high/high (> 2)	13
Serum LDH level >1x normal		18 (35%)
Therapy regimen		R-CHOP
5-Year overall survival		69%

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

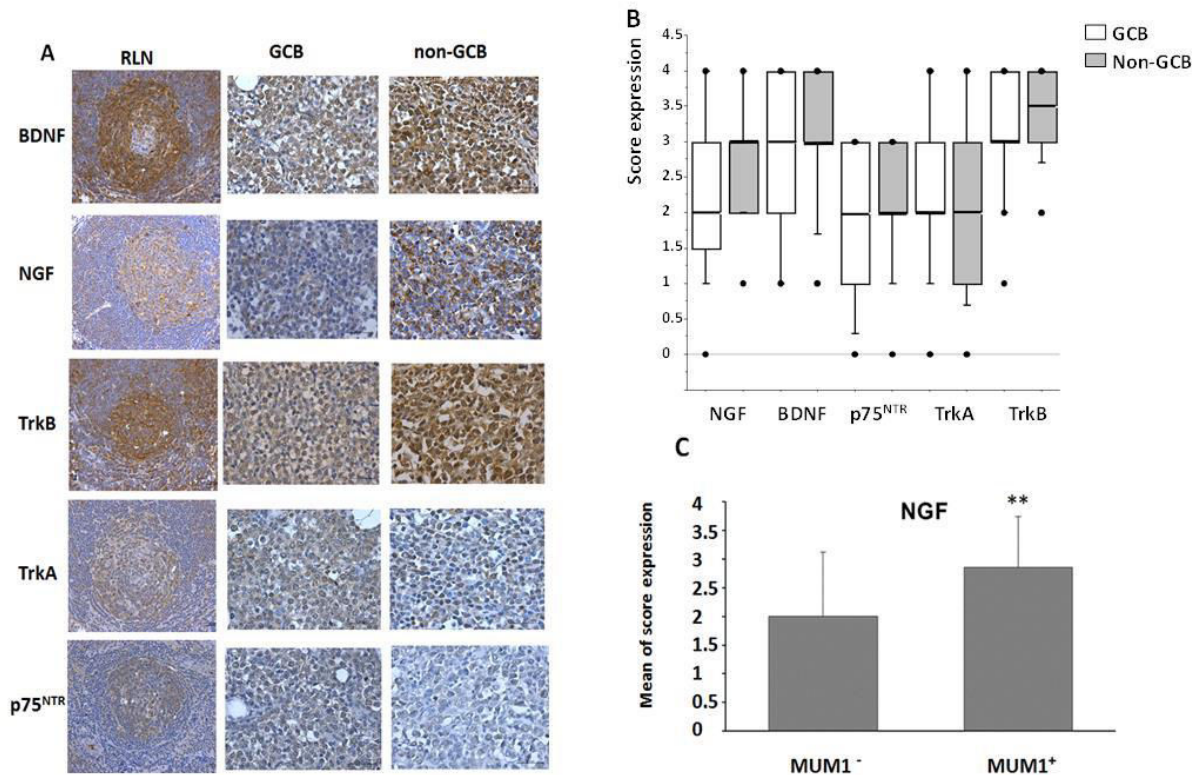
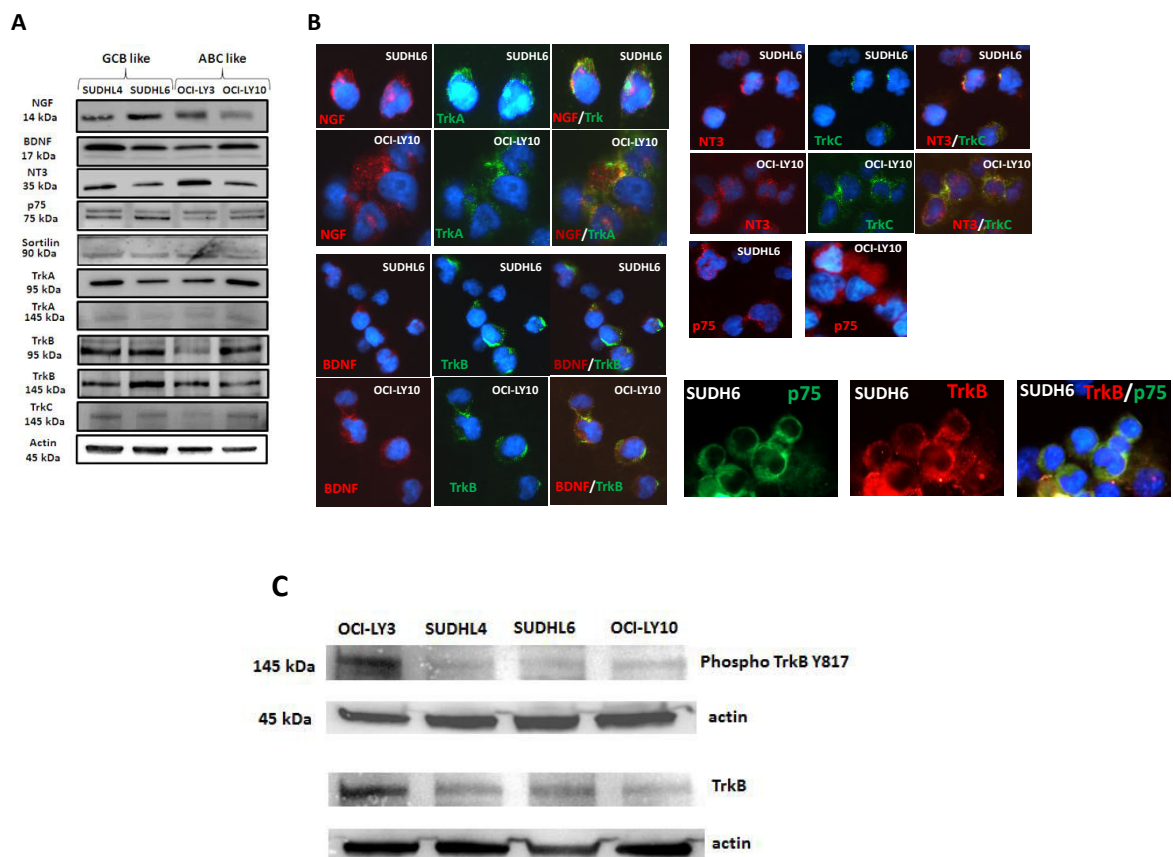


Figure 1. Immunohistochemical staining in DLBCL tumor samples. (A) Examples of NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75^{NTR} stainings are done for a tumor biopsy of GCB and non-GCB DLBCL subtype (200x) as compared to normal reactive lymph node (RLN). (B) Box-plots analysis showing distribution of total immunostaining scores determined in non-GCB tumor samples (n= 22) as compared to GCB (n=29) DLBCL subtype. The horizontal line corresponds to the median value, the box length to the interquartile range. Box whiskers represent the maximum and minimum range excluding any extreme outliers (shown as dots). (C) Enhanced NGF expression is associated with MUM1 positive tumors. Results are expressed as means \pm SD of immunostaining NGF scores. **: $p < 0.01$ (Mann-Whitney test).

Both GCB and ABC subtypes of DLBCL cell lines express neurotrophins and their receptors.

Our clinical data suggest that NTs and Trk receptors may be functional in DLBCL and could be also associated with an aggressive phenotype. We therefore used DLBCL cell lines of ABC (OCI-LY3 and OCI-LY10) and GCB (SUDHL4 and SUDHL6) subtype to comparatively analyse modulation of NTs signalling on cell survival. NGF, BDNF, NT3, their high affinity receptors TrkA, TrkB and TrkC respectively, and their low affinity receptor p75^{NTR} with its coreceptor sortilin are present in all GCB and ABC DLBCL cell lines tested. Differences in protein expression were found (Figure 2 A) depending on cell lines but not on subtype of DLBCL. Trk receptors are produced even though the precursor form gp110 (TrkA110) predominated in the cell extracts. Notably a very weak expression of mature form gp140 (TrkA140) was always found by western blot for all DLBCL cell lines. In contrast, TrkB was expressed as both full-length (kinase-intact, TrkB145) and truncated (kinase-deleted, TrkB95)

isoforms. Membrane localization of all receptors except sortilin was also demonstrated in GCB and ABC-like cells by immunofluorescence analysis performed without cell permeabilization, as shown in Figure 2 B for SUDHL6 and OCI-LY10. Interestingly, NT stainings performed on cell surface colocalized with Trk receptors that strongly suggests autocrine/paracrine loops involved in the regulation of tumor cell survival. Accordingly, basal activation notably of a fraction of TrkB was observed in DLBCL cell lines as demonstrated by the phosphorylation of Tyr-817 (Figure 2 C). Furthermore, p75^{NTR} was found associated to TrkA and TrkB by co-immunoprecipitation analysis (Figure 2 D) and not to sortilin. This association was also detected with the phosphorylated Trk as shown in Figure 2D for TrkB (phospho-TrkB Y817) suggesting a survival role for p75^{NTR} by p75^{NTR}/Trk interaction in growing cells, rather than an apoptotic function mediated by p75^{NTR}/sortilin association. Finally, we also observed by immunofluorescence analysis some p75^{NTR} /Trk co-localization at the cell membrane of DLBCL cell lines, as it is shown for TrkB in SUDHL6 cells (Figure 2 B).



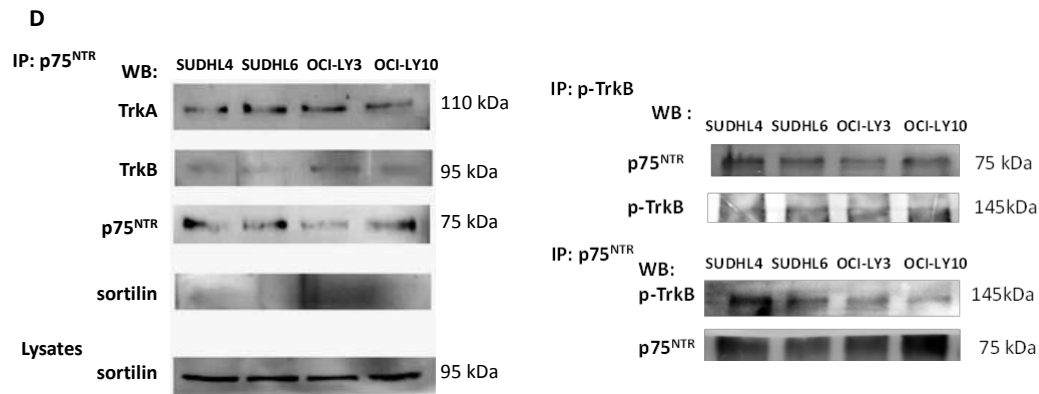


Figure 2. Comparative study of the pattern expression of neurotrophins and their receptors in GCB and ABC like DLBCL cell lines. (A) Analysis of NGF, BDNF, NT3 and their receptor expression in cell lysates of two GCB like (SUDHL4 and SUDHL6) and two ABC like (OCI-LY3 and OCI-LY10) cell lines, by western blotting after a 72h culture. Blots were reprobbed with anti- β -actin as a loading control. Data are representative of at least 4 independent experiments. (B) Immunofluorescence staining performed without cell permeabilization in DLBCL cell lines confirmed surface Trk receptors and neurotrophins or p75^{NTR} expression on tumor B cells (revealed by Alexa Fluor 488, in green or Alexa Fluor 594, in red). Merged image (yellow) revealed NTs/Trk or Trk/ p75^{NTR} colocalization in DLBCL (in blue: DAPI staining). Data are done for SUDHL6 to compare with OCI-LY10 and are representative of at least 3 independent experiments. (C) TrkB-phosphotyrosine Y817 level was revealed by western blotting in all DLBCL cell lysates after a 72h culture in basal conditions. (D) Protein lysates from all cell lines were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-p75^{NTR} or anti-phospho TrkB (Y817) followed by immunoblotting (WB) with indicated antibodies, showing p75^{NTR} interaction with Trk receptors but not with sortilin. Data are representative of 3 independent experiments.

Trk receptors are functional in DLBCL cell lines and their inhibition potentiates rituximab sensitivity of GCB as well as ABC cell lines.

We have previously shown that Trk pharmacological inhibition induces apoptosis of a GCB cell line, SUDHL4, and synergizes rituximab induced cytotoxicity (Bellanger *et al*, 2011). ABC cell lines are known to be more resistant to therapeutic agents like rituximab. To test if Trk receptors promote differential effect on cell survival in DLBCL cell lines, we exposed ABC and GCB cells to a pharmacologic pan-Trk inhibitor, K252a, for 48h. Inhibition of Trk activation by K252a was confirmed in cell lines as shown in Figure 3 A, for SUDHL4 and OCI-LY10, by the reduced phosphorylation of TrkB (Y817) as well as TrkA (Y490) and TrkC (Y820) receptors. Results showed that Trk inhibition significantly decreased cell viability of GCB cells (as shown for SUDHL4 in Figure 3 B). This effect was observed also for the ABC cell line, OCI-LY10, even though it was only significant after 72h of treatment. As expected no significant effect of rituximab was observed for the ABC cell line viability in contrast to the GCB. As contrast, rituximab induced apoptosis in the two cell lines but GCB cells were higher

sensitive than ABC subtype when considering the total apoptotic response and notably in presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ of rituximab (Figure 3 C). Sensitivity of cells to K252a was also confirmed by analysis of cellular apoptosis as shown for SUDHL4 and OCI-LY10 in Figure 3 C. Indeed, inhibition of Trk receptors with K252a induced a significant apoptosis in OCI-LY10 with $41.6\% \pm 7.4$ of apoptotic cells vs $27.1\% \pm 6.8$ in controls (means of 5 independent experiments, $p = 0.003$). As expected, we also confirmed the significant apoptotic effect of K252a in SUDHL4 cells (with $38.6\% \pm 16.5$ of apoptotic cells vs $15\% \pm 5.0$ in controls, means of 5 independent experiments, $p = 0.004$). Interestingly, association of rituximab and K252a treatments induced a significant increase of SUDHL4 and OCI-LY10 apoptotic cell percentage as compared to rituximab alone (i.e. $42.2\% \pm 13.4$ of apoptotic cells for SUDHL4 cells treated with K252a + rituximab 20 $\mu\text{g/mL}$ vs $31.5\% \pm 5.2$ for rituximab alone – $p = 0.02$ and $51.6\% \pm 6.1$ of apoptotic OCI-LY10 cells treated with K252a + rituximab 20 $\mu\text{g/mL}$ vs $41.2\% \pm 7.6$ for rituximab alone – $p = 0.04$). It is noteworthy that this synergistic apoptotic effect was also significantly observed, using the XTT assay, on SUDHL4 and OCI-LY10 cell viability within 48h of culture when K252a was associated to the higher rituximab concentration (Figure 3 B). We confirmed the higher apoptotic response obtained with combined treatments in all GCB and ABC cell lines tested by detection of the cleaved form of the PARP-1, as shown for SUDHL4 and OCI-LY10 in Figure 3 D. Thus, inhibition of Trk signalling can significantly improve the rituximab sensitivity of DLBCL cells, included the less sensitive rituximab ABC phenotype.

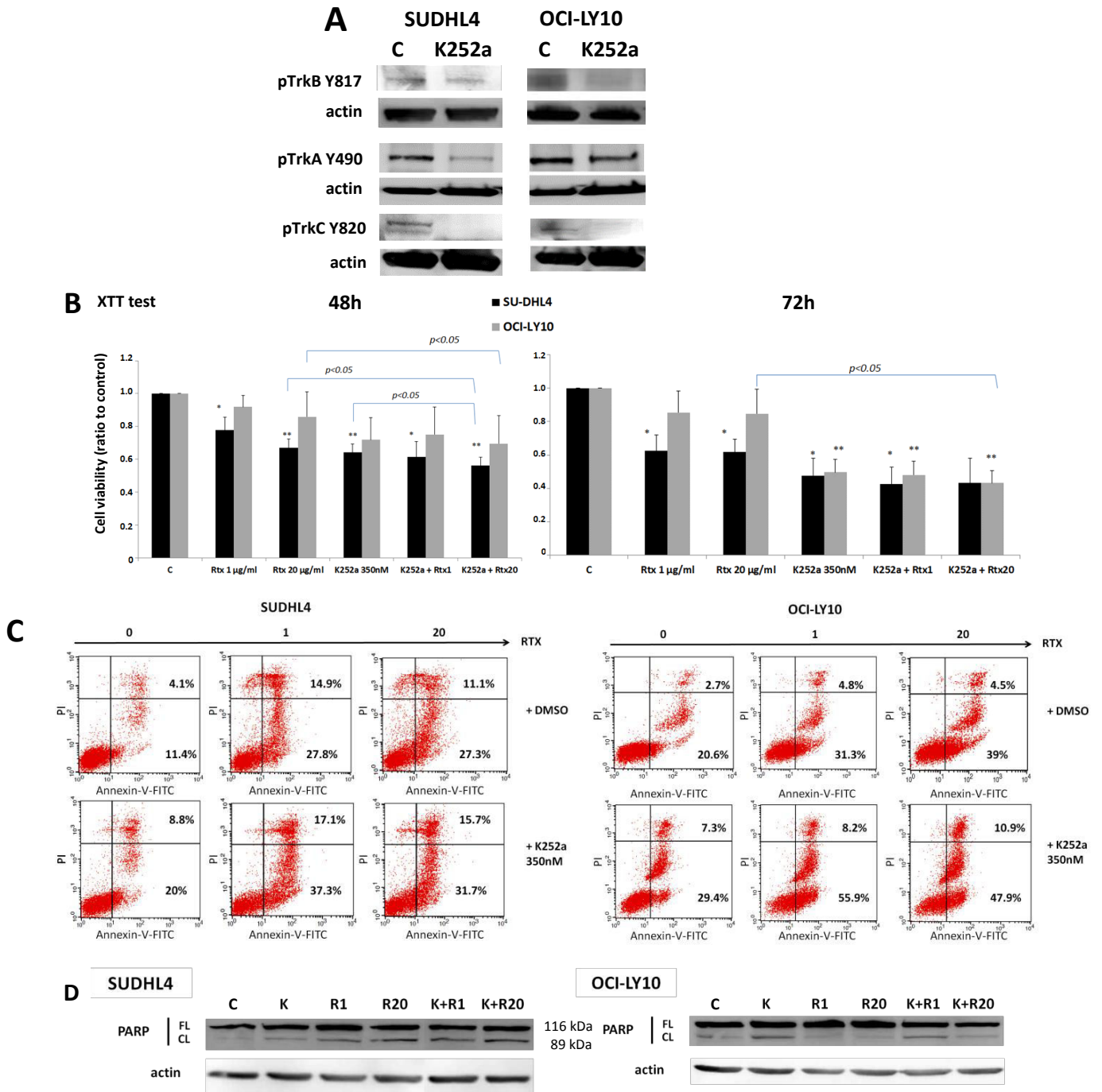


Figure 3. Pharmacological inhibition of Trk receptors sensitizes the effect of rituximab in ABC and GCB cell lines. GCB (SUDHL4) and ABC (OCI-LY10) like DLBCL cells were exposed to rituximab (RTX, 1 and 20 µg/mL) with or without (C, controls) pharmacological inhibitor of Trk receptors, K252a (350 nM). (A) Inhibition of Trk signalling by K252a was confirmed in both cell lines by western blot analysis of TrkA, TrkB and TrkC receptor phosphorylation. (B) Viability of cells was evaluated during 48h and 72h using the XTT test and data are expressed as means ± SD of relative cell viability (ratio) related to control obtained from 4 independent experiments. **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ when compared to DMSO controls (Student's t-test). (C) Apoptosis induced by rituximab and/or K252a was analysed by flow cytometry using the Annexin-V-FITC/PI dual staining. Ratio of early and late apoptotic (lower right quadrant) and necrotic (upper right quadrant) cells obtained after 36 h cell culture are expressed as cell percentages. Example of flow cytometric analysis representative of 3 experiments is done. (D) Rituximab (R) or/and K252a (K) induced apoptosis was also evaluated by western blot analysis of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage after 48h exposure in cell lysates. Data are representative of 3 independent experiments. FL: full-length (FL), CL: cleaved PARP. Actin expression is done as loading reference.

Evidence of a BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis in GCB cell lines.

Given the ability of K252a to inhibit survival of malignant DLBCL cells, and because full-length TrkB was produced by GCB and ABC like cell lines (as seen in Figure 2 A), we next further explored the BDNF axis in these cells. Blocking endogenous BDNF with neutralizing antibodies for 48h decreased cell viability in both GCB cell lines SUDHL4 and SUDHL6 with more significance for SUDHL4 ($p < 0.01$; Figure 4 A). Moreover, exogenous pro-BDNF (10 $\mu\text{g/mL}$) significantly decreases the cell viability ($p < 0.05$) of both GCB cell lines. Similar results could be observed with antagonistic anti-p75^{NTR} suggesting that p75^{NTR}/TrkB interaction is involved in survival signalling activities (Figure 4 A). However, no significant effect was found for the ABC cell line tested (OCI-LY10). The apoptotic effects of pro-BDNF, anti-BDNF and anti-p75^{NTR} neutralizing antibodies were confirmed in cell lysates of GCB cell lines which revealed the proteolytic cleavage of PARP-1 (Figure 4 B). Of note, PARP cleavage was sometimes also observed notably in OCI-LY3 cells following exposition to exogenous pro-BDNF and antagonist p75^{NTR} antibodies as compared to control. Collectively, our results suggest a pro-survival function of the BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis in the DLBCL cells, which could be more decisive for the GCB phenotype.

Rituximab and Trk inhibition decrease VEGF secretion by DLBCL cells.

Previous studies have shown that neurotrophins, and notably BDNF/TrkB, modulate VEGF production (Nakamura *et al*, 2006). We quantified VEGF secretion in culture cell supernatant (Figure 4 C and D). We observed that VEGF production significantly varied between DLBCL cells rather than cell subtype, with for example 252 ± 60 and 190 ± 41 pg/mL for SUDHL4 and OCI-LY10 respectively (data obtained from 5 independent assays). In contrast, the OCI-LY3 cell production was higher and more variable with VEGF production of 501 ± 133 pg/mL . No significant effect of anti-BDNF, exogenous pro-BDNF and anti-p75^{NTR} treatments was observed on VEGF secretion in the GCB and ABC cell lines tested (Figure 4 C). However, when cells were exposed to the Trk inhibitor, K252a, we observed a strong decrease in VEGF secretion that reached levels, for SUDHL4 cells, lower than the threshold detection of the ELISA kit used for VEGF quantification. Furthermore, this effect was detected for all GCB and ABC cell lines tested (as shown for OCI-LY3 in Figure 4 D). Finally, we showed that rituximab significantly decreased VEGF secretion. Interestingly, as shown in Figure 4 C and D, this effect was only observed for the rituximab sensitive GCB cell lines (i.e. SUDHL4) and not for the more resistant ABC cells (OCI-LY10 and OCI-LY3).

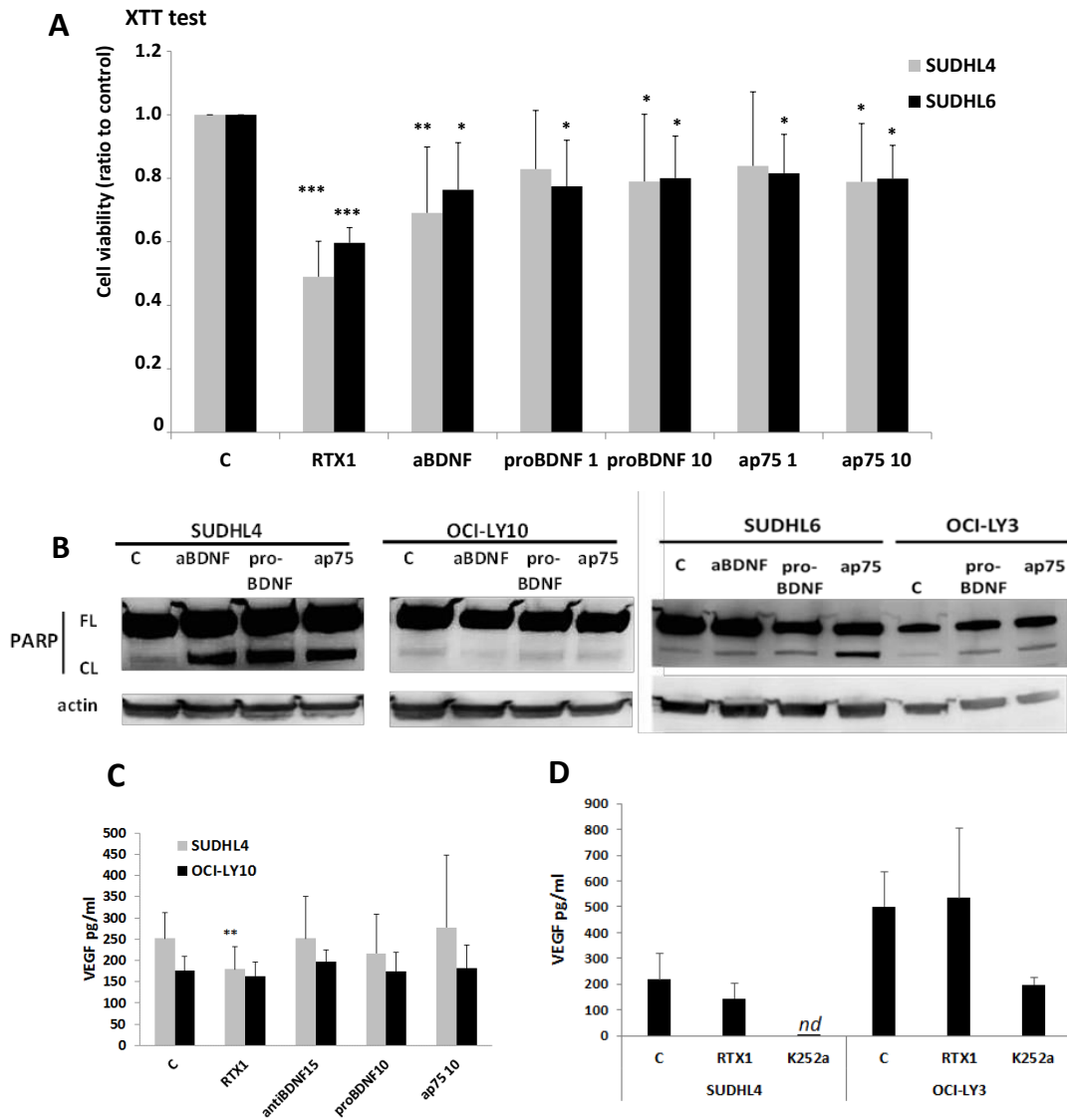
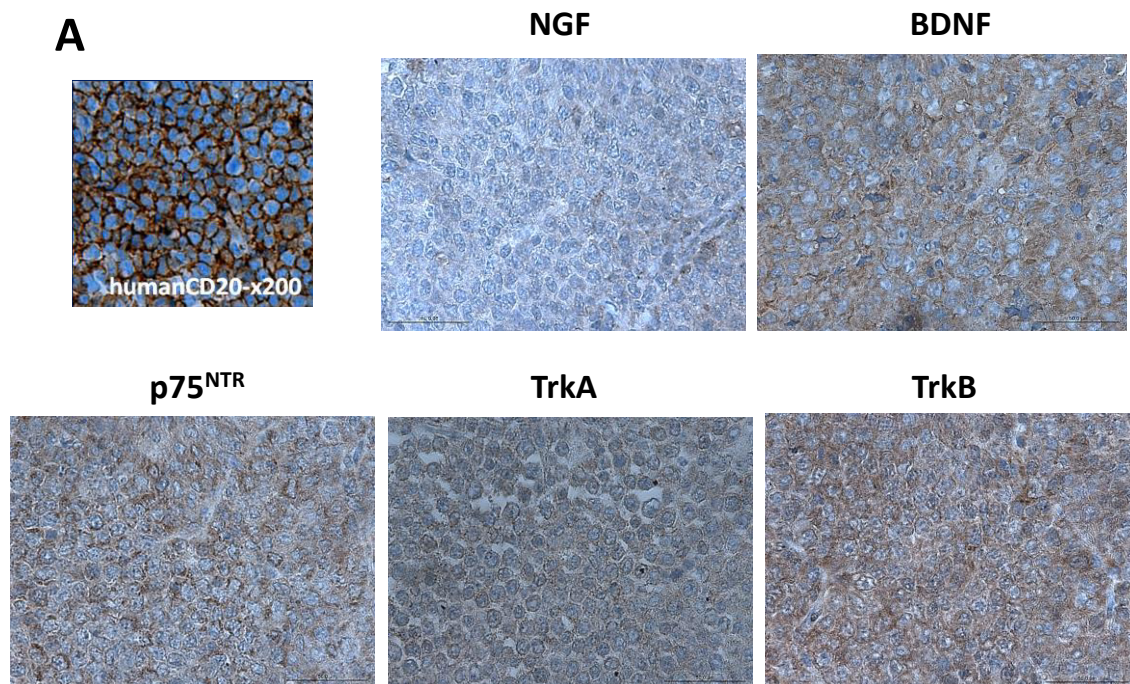


Figure 4. A BDNF neurotrophin axis is functional in DLBCL cell lines Effect of neutralization of endogenous BDNF (with anti-BDNF, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or $p75^{\text{NTR}}$ signalling (with anti- $p75^{\text{NTR}}$ neutralizing antibodies, 1 and 10 ng/mL) and exogenous pro-BDNF (1 and 10 ng/mL) was analysed on DLBCL cells during 72h. **(A)** Viability of cells exposed to anti-BDNF or pro-BDNF or anti- $p75^{\text{NTR}}$ was evaluated in reference to rituximab response (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) using the XTT metabolic test. Data obtained on GCB DLBCL cells after 72h exposure are done as means \pm SD of relative cell viability (ratio) related to control obtained from 7 independent experiments. Student *t* test was used to determine significance, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ when compared to controls (C). **(B)** Analysis of apoptosis revealed by western blotting detection of PARP cleavage. Data obtained for GCB cell lines (SUDHL4 and SUDHL6) compared to ABC cell lines (OCI-LY10 and OCI-LY3) are representative of 3 independent experiments. Actin is done as loading control. **(C)** VEGF secretion by DLBCL cells was quantified by ELISA in cell supernatants after 48h. Results are expressed as means \pm SD (pg/mL) of at least 4 independent assays. **: $p < 0.01$ when compared to controls (Student *t* test). **(D)** Effect of Trk inhibition by K252a exposure was also analysed on VEGF secretion as compared to rituximab (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in SUDHL4 and OCI-LY3 supernatants. Results are expressed as means \pm SD (pg/mL) of 3 independent assays. nd= non detectable.

Trk receptor inhibition decreases tumor growth in a GCB-DLBCL xenograft model.

To investigate the potential *in vivo* efficacy of the pan-Trk pharmacologic inhibitor K252a, we used a DLBCL xenograft model. SCID mice were subcutaneously inoculated with SUDHL4 cells and tumors were allowed to establish for 6 weeks before treatment. As shown in Figure 5 A, we confirmed by immunohistochemistry the human cell origin phenotype of the tumors by human CD20 expression, and the potential role of a BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis as for human DLBCL biopsies. Tumors were significantly smaller in animals treated with K252a than controls 12 days after treatment initiation ($p < 0.05$) and until the end of experiment ($p < 0.01$ at 18 days post treatment). Compared with controls, treatment with K252a alone was shown to result in a 35% reduction in tumor volume (3.52 vs 5.36 cm³, Figure 5 B). This effect was associated with a reduced Ki67 expression and an increase of PARP cleavage demonstrating apoptosis in tumor samples of K252a treated mice in reference to vehicle controls (Figure 5 C). As expected, rituximab administered i.p at 25 mg/kg/d twice a week was significantly more efficacious than K252a monotherapy, with approximately 70% tumor growth rate inhibition at day18. However, combination therapy led to a significant improvement in tumor growth inhibition versus rituximab monotherapy, with a marked effect through day3 to day8 ($p < 0.05$), and approximately 85% tumor growth rate inhibition at day18 (Figure 5 B).



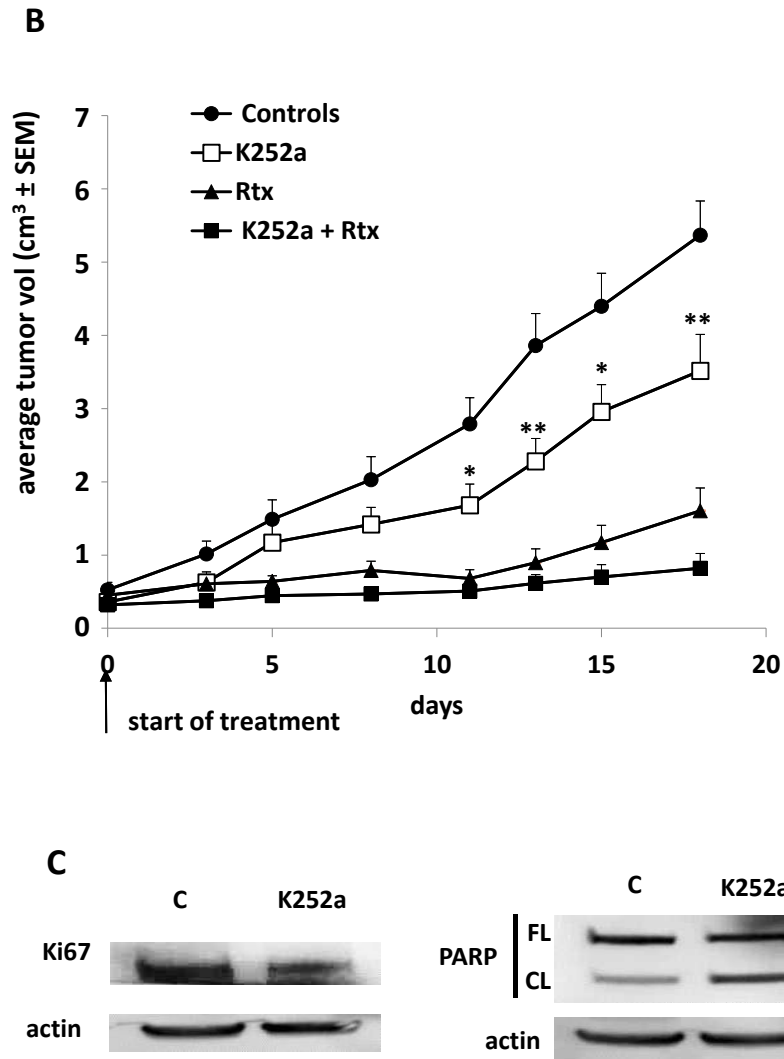


Figure 5. *In vivo* efficacy of K252a in a DLBCL xenograft model. For the GCB-DLBCL xenograft model, SCID mice were injected with 1×10^7 SUDHL4 cells subcutaneously. (A) The human SUDHL4 cell origin of tumors was confirmed by immunohistochemistry (with anti-human CD20) and representative stainings for NGF, BDNF, Trk and p75^{NTR} receptor are done (x400). (B) After the tumors had become established (~6 weeks after tumor inoculation), mice were treated with vehicle (Controls, n = 10), K252a (0.5 mg/kg, n = 10) or rituximab (25 mg/kg, n = 5) or both agents (n = 8) for 3 weeks. Results are expressed as mean tumor volumes (cm³) \pm SD. *, ** $p < 0.05$ and 0.01 respectively vs control group, Student's t test. (C) Example of a representative western blotting analysis of Ki67 expression and PARP cleavage is shown for tumor samples of K252a treated mice compared with vehicle control mice. Actin is done as loading control.

Discussion

Several recent studies have provided evidence for a role of Trk pathway activation contributing to chemoresistance in tumorigenesis from non-neural tissues (Thiele *et al*, 2009; Akil *et al*, 2011; Okugawa *et al*, 2013). We have previously shown that GCB cell lines produce neurotrophins (NGF, BDNF) that were modulated by culture conditions (Bellanger *et al*, 2011). This prompted us to evaluate the role of neurotrophins and/or their receptors in tumor clinical heterogeneity of DLBCLs. We thus analysed their expression in a cohort of 51 DLBCL patients. Although a direct prognostic value was not established here, our results show that expression of NGF, BDNF and their Trk and p75^{NTR} receptors occur in DLBCL tumors. Furthermore, we report for the first time evidence of a strong BDNF/TrkB phenotype in DLBCL that seems not in relation with cell-of-origin classification. On the contrary higher expression of NGF was associated with the non-GCB profile and notably the ABC phenotype characterized by prominent nuclear factor- κ B activation. Even though, as the immunohistochemistry Hans algorithm used for cell of origin (COO) subtype determination is considered imperfect (Hans *et al*, 2004), these associations must to be confirmed in a larger cohort of patients. This finding is however consistent with a previous report showing, in normal stimulated B cells, NF- κ B activation as a key regulatory event for B-cell-derived NGF production (Heese, *et al*, 2006). This can explain the correlation observed in the present work, even if weakly, between high NGF expression and non-GCB subtype (mostly ABC) of DLBCLs. These data strongly suggest that autocrine/paracrine NT survival loops are involved in DLBCL tumor survival and aggressiveness. Moreover as TrkB, p75^{NTR} and BDNF expressions are correlated, we hypothesize a pro-survival BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis in DLBCLs.

We therefore used DLBCL cell lines of ABC phenotype to evaluate neurotrophin functionality compared to GCB cells. Both GCB (SUDHL4/6) and ABC (OCI-LY3/10) cell lines express membranous TrkA, TrkB and TrkC receptors, even if weakly, and produce their neurotrophin ligands NGF, BDNF and NT3 respectively. Although antibodies used for immunofluorescence detected all forms of Trk receptors, a prominent expression of the TrkA precursor (TrkA110) and with a lesser extend truncated form of TrkB receptors (gp95TrkB) were detected by western blotting. Moreover, immunoprecipitation studies showed that p75^{NTR} is associated with TrkA110 and gp95TrkB receptors suggesting a biological role for these isoforms. Accordingly, a particular role of truncated form of TrkB (gp95) was previously reported in various B cell lines (Fauchais *et al*, 2008; Sniderhan *et al*, 2009). Furthermore, Trk receptors and notably TrkB was found phosphorylated at tyrosine 817 in all cell lines. This last

data provides evidence for a membranous expression of the full-length TrkB receptor (gp145TrkB) and probably activation of PLC α pathways in basal culture conditions. Interestingly p75^{NTR} and phospho-TrkB can be also coimmunoprecipitated suggesting they are certainly in close proximity to one another which we proved by immunofluorescence colocalization of p75^{NTR}/TrkB at the plasma membrane of DLBCL cell lines. It has long been known that p75^{NTR} potentiates Trk signalling and it was proposed that TrkA and p75^{NTR} communicate through convergence of downstream signalling pathways and/or shared adaptor molecules (Wehrman *et al*, 2007). The higher detection of truncated form of TrkB than TrkB145 itself, that we also observed at the transcript level in DLBCL tumor samples, has been recently observed in other non neuronal cancers like for example breast tumors (Vanhecke *et al*, 2011). To date, little is known on the biological role of truncated TrkB, lacking the kinase domain, but recent works suggest cooperation between p75^{NTR} and truncated TrkB (TrkB-T1 or gp95TrkB). Indeed, TrkB-T1 was proposed to act as dominant-negative to p75^{NTR} in neurons (Michaelsen *et al*, 2010). Therefore, our results argue for an association of p75^{NTR} to activate Trk in DLBCL cell lines suggesting a synergistic signalling. Moreover, some p75^{NTR}/truncated Trk complex may interfere with the apoptotic signalling of p75^{NTR} which need to heterodimerize with the co-receptor sortilin (Nykjaer *et al*, 2004). This hypothesis is consistent with the fact that sortilin expression cannot be clearly observed at the cell membrane, neither in anti-p75^{NTR} immunoprecipitates from cell lysates.

We also observed a co-localization of Trk receptors and their respective ligands at the cell surface of DLBCL cells, suggesting that NTs mediate autocrine loops. Therefore we used the pan-Trk pharmacological inhibitor K252a, to evaluate the functionality of pro-survival Trk receptors expressed by our DLBCL cell lines (i.e. TrkA, TrkB and TrkC). Results showed that inhibition of Trk signalling by K252a induced apoptosis in cells of both DLBCL subtypes. These data confirm previous reports obtained in NHL cell lines including DLBCL lines (Bellanger *et al*, 2011, Sniderhan *et al*, 2009), but in the present study we compared the effect of Trk inhibition between ABC and GCB cell lines. Furthermore, we demonstrated a synergistic apoptotic effect of K252a with rituximab. Interestingly, this effect was significant even for the ABC cell lines tested (OCI-LY10 and OCI-LY3) which were less sensitive or unresponsive to rituximab as compare to the GCB lines. The apoptosis-induced response of B lymphoma cells exposed to rituximab is well known, and mechanisms imply inhibition of survival pathways that are constitutively activated in most of NHL like PI3K/Akt, Erk1/2, and NF- κ B leading also to chemosensitization (Suzuki *et al*, 2007; Weiner, 2010). Interestingly, these survival pathways are also activated by Trk signalling, (Teng *et al*, 2010) and thus targeted by the Trk

pharmacologic inhibition, leading to a potential additive action with rituximab exposure. The less sensitivity of the ABC cells, OCI-LY10, as compared to GCB (SUDHL4 and SUDHL6) is in agreement with earlier studies, showing that, as for ABC DLBCLs, ABC lines are characterized by constitutive NF- κ B activation (Davis *et al*, 2001; Wright *et al*, 2003). The ability of NF- κ B to inhibit responses to cancer therapeutic agents was proposed to contribute to the refractory clinical behaviour of ABC DLBCLs (Baldwin, 2001). Interestingly, in the OCI-LY3 cell line, K252a was shown to induce a subnuclear distribution of NF- κ B resulting in the sequestration of RelA in the nucleolus, thereby inhibiting NF- κ B dependent gene transcription (Sniderhan *et al*, 2009). In this regard, the K252a sensitivity of the ABC cell lines suggests that targeting these Trk signalling may lead to improvements in rituximab-containing treatment protocols.

Since a clear full-length TrkB expression was found in all cell lines, we therefore evaluated the functionality of the BDNF/TrkB axis in these cells. Results obtained with neutralizing anti-BDNF or anti-p75^{NTR} as well as pro-BDNF cell exposure showed a cytotoxic effect with cell apoptosis that was revealed by the proteolytic cleavage of PARP-1 which is a pro-apoptotic signature (Chaitanya *et al*, 2010). This effect, however lower than the rituximab response, was only significant in the GCB cell lines. Accordingly, analysis of relative mRNA expression suggested a BDNF/TrkB pathway that could be more present in the two GCB cell lines tested as compared to the two ABC subtype (Supplementary Figure S2); as contrast a significant marked expression of p75^{NTR} mRNA was found in the ABC cell line, OCI-LY3. These differences in NT phenotypes observed in DLBCL cell lines compared to primary tumors could result from multiple factors as the inaccuracy of current immunohistochemistry Hans algorithm, or culture conditions of ABC cell lines (i.e. RPMI culture medium with 10% SVF which is not always used in others studies for these cells). However, the limited set of cell lines for each subtype used in this work don't allow us to conclude on the differential expression and function of NT across GCB and ABC cell lines.

The cytotoxic effect observed with exogenous pro-BDNF suggests evidence of some p75^{NTR}/sortilin complex at cell membrane, which signalling may be enhanced by this treatment. To clarify p75^{NTR} function in DLBCL we recently performed p75^{NTR} downregulation in GCB and ABC cell lines with shRNA. We significantly reduced levels of p75^{NTR} in SUDHL4, SUDHL6 and OCI-LY10 (Supplementary Figure S3), and this inhibition significantly increased rituximab sensitivity of the three cell lines. However, we did not observe reduction in cell viability without rituximab, as with antagonistic anti-p75^{NTR}. Presumably we could not detect

cell death in cells transfected with p75^{NTR} shRNA, as p75^{NTR} expression was not completely abolished (~50% of protein inhibition). Even though preliminary, these recent data confirm a survival function of p75^{NTR} in DLBCL cells that could be involved in rituximab resistance of some more aggressive subtype like ABC. Collectively results obtained by different inhibitions of NT signalling in the present work argue for a pro-survival BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis in DLBCL cells that was also suggested by the DLBCL tumor sample results.

The tumor microenvironment has been shown to be an important prognostic factor in patients with DLBCL, and two stromal gene-expression signatures that predicted survival in CHOP and R-CHOP-treated patients were identified. The prognostically favorable stromal-1 signature reflects extracellular-matrix deposition and histiocytic infiltration. By contrast, the prognostically unfavorable stromal-2 signature, including VEGFR2 receptor, reflects tumor blood-vessel density (Lenz *et al*, 2008). Indeed, VEGF was strongly detected in DLBCL tumor cells which co-express VEGF and its receptors VEGFR1 and VEGFR2, suggesting autocrine loops (Wang *et al*, 2004; Gratzinger *et al*, 2008). Of note, VEGF /VEGFR-mediated autocrine loops have been implied in the survival and growth of NHL cell lines (Wang *et al*, 2004). Interestingly, VEGFR2 involved in neovascularization and not VEGFR1 expression predicts poor overall survival in DLBCL treated with immunochemotherapy (R-CHOP) (Gratzinger *et al*, 2010). Anti-VEGF therapies (bevacizumab) have been also evaluated in recent clinical studies. Results showed that bevacizumab might only be beneficial in DLBCL with high relative expression of endothelial markers and angiogenic regulators (Seymour *et al*, 2014). In the present work we also focused on VEGF secretion. As expected, we detected VEGF secretion in all tested DLBCL cell supernatants. Interestingly, pharmacological inhibition of Trk signalling significantly reduced VEGF secretion in both groups, suggesting for the first time in DLBCLs a link between neurotrophins and VEGF production. In addition our finding that rituximab only affects VEGF secretion of the rituximab sensitive GCB cell lines indicates, for the first time, a relationship between rituximab-induced apoptosis and secretion of this growth factor. Activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway, which is observed in the majority of human cancers including most of the DLBCLs, can increase VEGF secretion both by HIF-1 α dependent and independent mechanisms (Karar and Maity, 2011). As NGF-TrkA and/or BDNF/TrkB activation of the PI3K/mTOR pathway leads to an increase of HIF-1 α that stimulates VEGF promoter activity and transcription in neuroblastoma cells (Nakamura *et al*, 2006; Nakamura *et al*, 2011), we propose that Trk signalling pathway contributes to VEGF secretion in DLBCL cells. Consistent with this hypothesis, rituximab by inhibiting the same

survival pathway could lead, as Trk signalling inhibition by K252a, to the inhibition of VEGF production that we observed in the present work for GCB cell lines. This effect could be prevented in ABC cell lines that continue to secrete VEGF even after rituximab exposure, by the constitutive activation of NF- κ B pathway known also to be involved in HIF-1 α activation (Karar and Maity, 2011).

Finally, inhibition of endogenous Trk signalling by K252a was evaluated with a GCB-DLBCL xenograft model. Data show a statistical reduction of tumor growth which was associated with a cytotoxic effect on tumor cells, as we demonstrated in the *in vitro* study. This effect was however lower than rituximab monotherapy. Blocking BDNF/TrkB signalling by K252a was recently shown to suppress tumor growth also in gastric cancer, but it did not affect 5-fluorouracil sensitivity (Okugawa *et al*, 2013). Interestingly, consistent with our *in vitro* studies, we demonstrate here for the first time that in combination regimen, pharmacological Trk inhibition potentiates the effects of rituximab monotherapy on established DLBCL xenografts. However, further mechanistic investigations will be necessary to precise if concomitant K252a and rituximab therapy result in synergistic or additive effects.

Altogether, our data show evidence for a pro-survival role of endogenous neurotrophins in DLBCLs that could be involved in aggressive phenotypes. Notably, as we propose in Figure 6, our results indicate that inhibition of Trk signalling could be a potential treatment strategy for ABC subtype and subgroup of DLBCL depending to a large extent on angiogenesis via VEGF for tumor survival and proliferation.

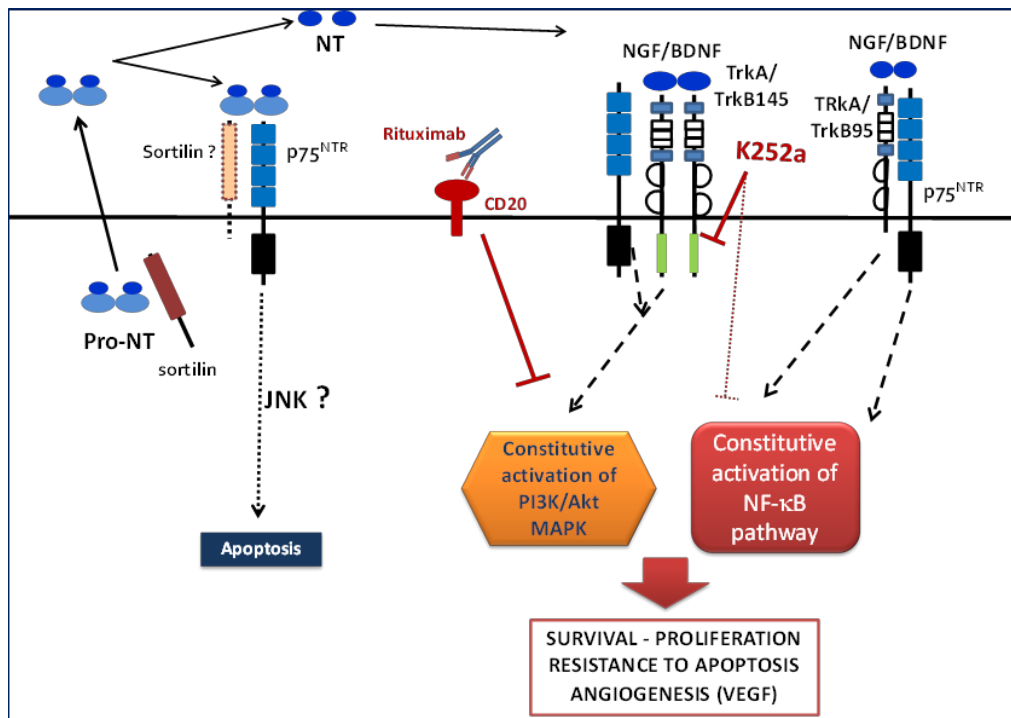


Figure 6. Schematic representation of a neurotrophin axis in the biology of DLBCL cells. Neurotrophins (NT) are produced as pro-neurotrophins (pro-NT) and secreted by tumor B cells. Enzymatic cleavage leads to the release of mature NTs in cell microenvironment that realize autocrine/paracrine loops of regulation. In ABC phenotype, activation of the NF-κB pathway enhances the production of NGF. NT signalling (i.e. BDNF/TrkB145) potentiates cell survival pathways and VEGF secretion that are already dependent of constitutively activated pathways in DLBCL cells (PI3K/Akt, MAPK and for ABC subtype the NF-κB pathway). This effect could lead to enhanced resistance to treatment. p75^{NTR} receptor should be involved in cell survival by its interaction with Trk receptor (i.e. full-length TrkB145 or truncated TrkB95) rather than in apoptosis by its sortilin association. Anti-CD20 therapy (i.e. rituximab) inhibits also the constitutively activated survival pathways (like PI3K-Akt) in B tumor cells leading in chemosensitization to drug-induced apoptosis. Thus Trk pharmacological inhibition (i.e. K252a) can contribute to enhance cell sensitivity to rituximab therapy, notably for relative resistant phenotypes as ABC subtype of DLBCL.

Acknowledgments

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

Disclosures

All authors report no relevant financial conflicts of interest.

Authorship

Conception and design: DT, MOJ, DB. Acquisition, analyse and interpretation of data: LD, HB, DT, BP, AO, MADLCM, FL, SS, MPG, MDC. ALF. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content: DT, NF, MOJ, DB. Wrote the paper including design of

figures: DT, LD, HB, MADLCM. Final approval of the version to be published: DT, MOJ, NF, DB, ALF.

References

- Akil H, Perraud A, Mélin C, Jauberteau MO, Mathonnet M. (2011) Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One* **6**:e25097.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**: 503-511.
- Arranz E, Robledo M, Martínez B, Gallego J, Román A, Rivas C, Benítez J (1996) Incidence of homogeneously staining regions in non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet* **87**:1-3.
- Baldwin AS (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* **107**: 241-246.
- Barker PA (2007) High Affinity Not in the Vicinity? *Neuron* **53**: 1-4.
- Bellanger C, Dubanet L, Lise MC, Fauchais AL, Bordessoule D, Jauberteau MO, Troutaud D (2011) Endogenous neurotrophins and Trk signalling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS One* **6**: e27213.
- Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* **8**:31.
- Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM (2001) Constitutive nuclear factor B κ B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* **194** :1861–1874.
- De Santi L, Annunziata P, Sessa E, Bramanti P (2009) Brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptor in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **287**: 17-26.
- Fauchais AL, Lalloué F, Lise MC, Boumediene A, Preud'homme JL, Vidal E, Jauberteau MO (2008) Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol* **181**: 3027-3038.

- Forsyth PA, Krishna N, Lawn S, Valadez JG, Qu X, Fenstermacher DA, Fournier M, Potthast L, Chinnaiyan P, Gibney GT, Zeinieh M, Barker PA, Carter BD, Cooper MK, Kenchappa RS. (2014) p75 neurotrophin receptor cleavage by α - and γ -secretases is required for neurotrophin -mediated proliferation of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem* **289**: 8067-8085.
- Gratzinger D, Zhao S, Marinelli RJ, Kapp AV, Tibshirani RJ, Hammer AS, Hamilton-Dutoit S, Natkunam Y (2007) Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Am J Pathol* **170**: 1362-1369.
- Gratzinger D, Zhao S, Tibshirani RJ, Hsi ED, Hans CP, Pohlman B, Bast M, Avigdor A, Schiby G, Nagler A, Byrne GE Jr, Lossos IS, Natkunam Y (2008) Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Lab Invest* **88**: 38-47.
- Gratzinger D, Advani R, Zhao S, Talreja N, Tibshirani RJ, Shyam R, Horning S, Sehn LH, Farinha P, Briones J, Lossos IS, Gascoyne RD, Natkunam Y (2010) Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP). *Br J Haematol* **148**: 235-244.
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC (2004) Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103**: 275-282.
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC (2004) Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103**: 275-282.
- Heese K, Inoue N, Sawada T (2006) NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. *Cell Mol Immunol* **3**: 63-66.

- Karar J, Maity A (2011) PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci* 4:51.
- Kawamura N, Kawamura K, Manabe M, Tanaka T (2010) Inhibition of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signalling suppresses choriocarcinoma cell growth. *Endocrinology* 151: 3006-3014.
- Lam LT, Davis RE, Pierce J, Hepperle M, Xu Y, Hottelet M, Nong Y, Wen D, Adams J, Dang L, Staudt LM (2005) Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 11: 28–40.
- Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle A, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E, Braziel RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Wrench D, Lister TA, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM (2008) Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. *N Engl J Med* 359: 2313-2323.
- Michaelsen K, Zagrebelsky M, Berndt-Huch J, Polack M, Buschler A, Sendtner M, Korte M (2010) Neurotrophin receptors TrkB.T1 and p75NTR cooperate in modulating both functional and structural plasticity in mature hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 32: 1854-1865.
- Nakamura K, Martin KC, Jackson JK, Beppu K, Woo CW, Thiele CJ (2006) Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 α in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 66: 4249-4255.
- Nakamura K, Tan F, Li Z, Thiele CJ (2011) NGF activation of TrkA induces vascular endothelial growth factor expression via induction of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Cell Neurosci* 46: 498-506.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427: 843-848.
- Okugawa Y, Tanaka K, Inoue Y, Kawamura M, Kawamoto A, Hiro J, Saigusa S, Toiyama Y, Ohi M, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M (2013) Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B pathway in gastric cancer. *Br J Cancer* 108: 121-130.

- Qiao Q, Nozaki Y, Sakoe K, Komatsu N, Kirito K (2010) NF- κ B mediates aberrant activation of HIF-1 in malignant lymphoma. *Exp Hematol* **38**: 1199-1208.
- Reichardt B (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**: 1545-1564.
- Rezvani AR, Maloney DG (2011) Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol* **24**: 203-216.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. *N Engl J Med* **346**: 1937-1947.
- Seymour JF, Pfreundschuh M, Trněný M, Sehn LH, Catalano J, Csiny E, Moore N, Coiffier B (2014) R-CHOP with or without bevacizumab in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma: final MAIN study outcomes. *Haematologica* **99**:1343-1349.
- Sniderhan LF, Garcia-Bates TM, Burgart M, Bernstein SH, Phipps RP, Maggirwar SB (2009) Neurotrophin signalling through tropomyosin receptor kinases contributes to survival and proliferation of non-Hodgkin lymphoma. *Exp Hematol* **37**: 1295-1309.
- Suzuki E, Umezawa K, Bonavida B (2007) Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene* **26**: 6184-6193.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Jaffe ES (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edn. IARC Press: Lyon, France.
- Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL (2010) Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol* **70**: 350-359.
- Thiele CJ, Li Z, McKee AE (2009) On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* **15**: 5962-5967.
- Troutaud D, Petit B, Bellanger C, Marin B, Gourin-Chaury MP, Petit D, Olivrie A, Feuillard J, Jauberteau MO, Bordessoule D (2010) Prognostic significance of BAD and AIF apoptotic pathways in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **10**: 118-124.3
- Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S, Meignan S, Germain E, Berteaux N, Nurcombe V, Le Bourhis X, Hondermarck H (2011) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5

are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clin Cancer Res* **17**: 1741-1752.

Vega JA, García-Suárez O, Hannestad J, Pérez-Pérez M, Germanà A (2003) Neurotrophins and the immune system. *J Anat* **203**: 1-19.

Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A (2004) Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis* **7**: 335-345.

Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC (2007) Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* **53**: 25-38.

Weiner GJ (2010) Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* **47**: 115-123.

Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM (2003) A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9991-9996.

Supplementary information

Material and Methods

RT-PCR analysis of biopsy samples

Total RNA was extracted from frozen biopsy specimens with Qiagen RNeasy isolation system (Qiagen, Hilden, Germany), treated with RNase-free DNase I (Qiagen) and quantified by the OD_{260/280} ratio using the Nanodrop spectrophotometer ND-1000 (Labtech). The RNA quality was evaluated on Agilent 2100 bioanalyser using the RNA 6000 Labchip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). For cDNA synthesis total RNA (2 µg) was reverse transcribed with the Super Script III First-strand synthesis kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, using oligo(dT) or with high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Amplification was performed using *Taq*DNA polymerase (Invitrogen) and specific primers as previously reported [17, 18]. Transcripts of NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75^{NTR} and sortilin were obtained using UnoCycler (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Thirty-five PCR cycles were performed (94°C for 30 s, 58°C or 60°C for 30 s as previously described in Bellanger *et al*, 2011, 72°C for 45s, and an extension step of 72°C for 7 min).

Real-time quantitative PCR analysis

Total RNA (1 µg) was used as template for cDNA synthesis (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the cDNAs were used for quantitative real-time PCR analysis using TaqMan probes, labeled with 5' reporter dye 6FAM and the 3' Minor Groove Binder-Non-Fluorescent Quencher (MGB-NFQ) (Applied Biosystems). Experiments were performed in duplicate in at least three independent experiments and PCR runs were performed and analysed on an Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time (Applied Biosystems), with a two-step PCR protocol (95°C for 20 s followed by 40 cycles of 95°C for 3 s and 60°C for 30 s). Each reaction was assessed using 400 nM of the forward and reverse primers, 200 nM labeled probe, and 100 ng cDNA template (RNA-cDNA equivalent) mixed with TaqMan Fast-Univ Master Mix (Applied Biosystems). BDNF, full-length (TrkB145) and truncated (TrkB95) TrkB, and p75^{NTR} primers were purchased from Lifetechnologie. The sequences of primers and TaqMan probes are shown in Table S1. Data were normalized to Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) housekeeping gene as an internal control (Predesigned Human HPRT Primer/Probe Mix; Applied Biosystems). The quantitative PCR efficiency was assessed using regression curve performed with cDNA serial dilutions samples (400, 200, 100, 50, and 25 ng cDNA) (Peirson

et al. 2003) (PMID: 12853650). The comparative Δ Ct method was used for relative quantification of gene expression.

Transfections and lentivirus infections

293T cells were transfected with pLKO control vector or pLKO_shp75NTR vector (Sigma SHCLND-NM_002507) following standard procedures. 48 hours after transfection, media containing lentiviral particles (control or shp75NTR) was collected and used for DLBCL cell lines infection. 48 hours after infection, cells were selected with 5 μ g/ml of puromycin. p75^{NTR} interference was confirmed by western blotting and pRT-PCR.

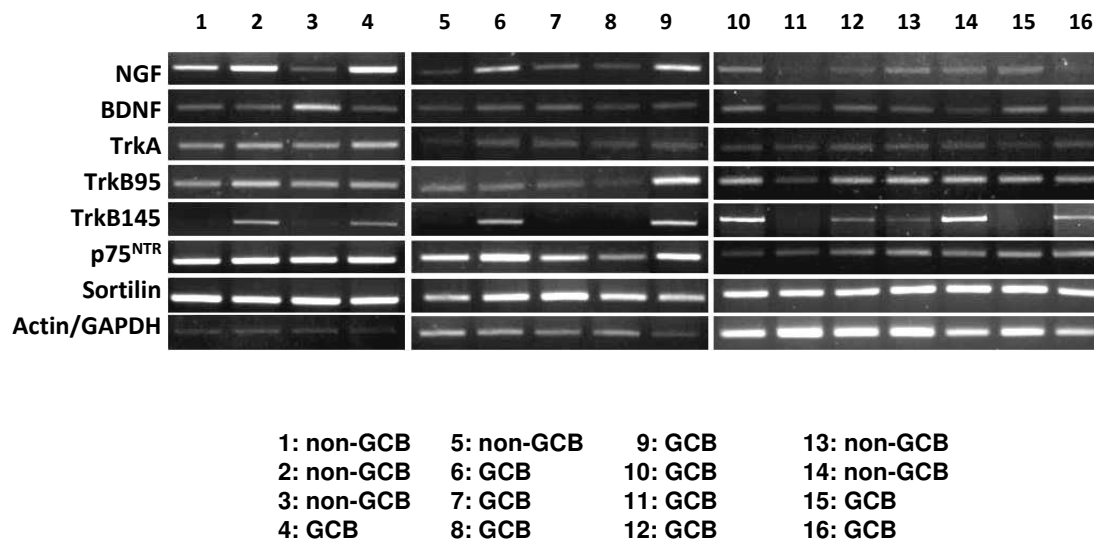


Figure S1. mRNA expression of neurotrophins and their receptors in DLBCLs: comparison with cell-of-origin classification. RT-PCR analysis was performed on 6 non GCB and 10 GCB DLBCL patient biopsies using specific primers to NGF, BDNF, TrkB (truncated and full-length receptors), TrkA, p75^{NTR} and sortilin. Constitutively expressed actin or GAPDH (patient 10 to 16) is a control of PCR efficiency.

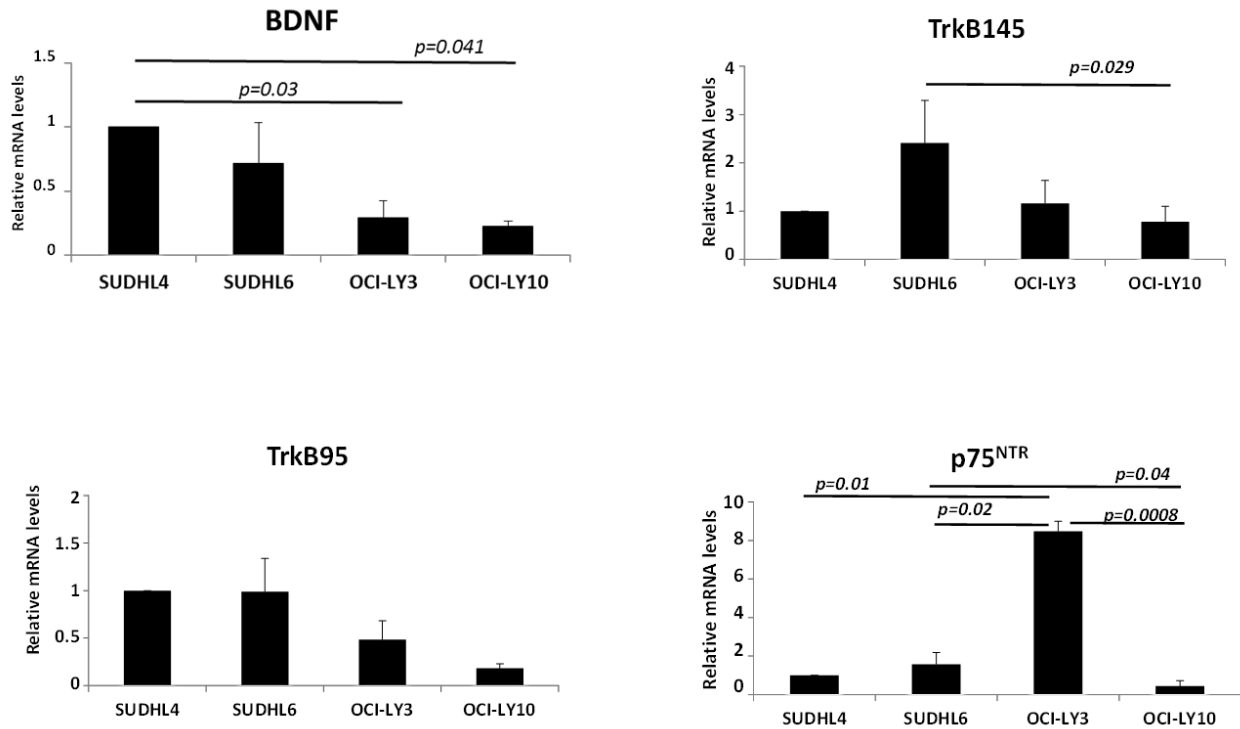


Figure S2. Modulation of BDNF, TrkB and p75^{NTR} transcript expressions in DLBCL cell lines. Quantification polymerase chain reaction assay was performed to measure the mRNA relative levels of BDNF, full-length (TrkB145) and truncated (TrkB95) TrkB and p75^{NTR} in GCB (SUDHL4 and SUDHL6) versus ABC (OCI-LY3 and OCI-LY10) cell lines. Gene expressions were compared to the SUDHL4 cell line mRNA levels and normalized to HPRT housekeeping gene mRNA levels. Histograms represent relative quantification means \pm SEM. “*p*” values were evaluated by comparing to the SUDHL4 mRNA levels by One-Way ANOVA.

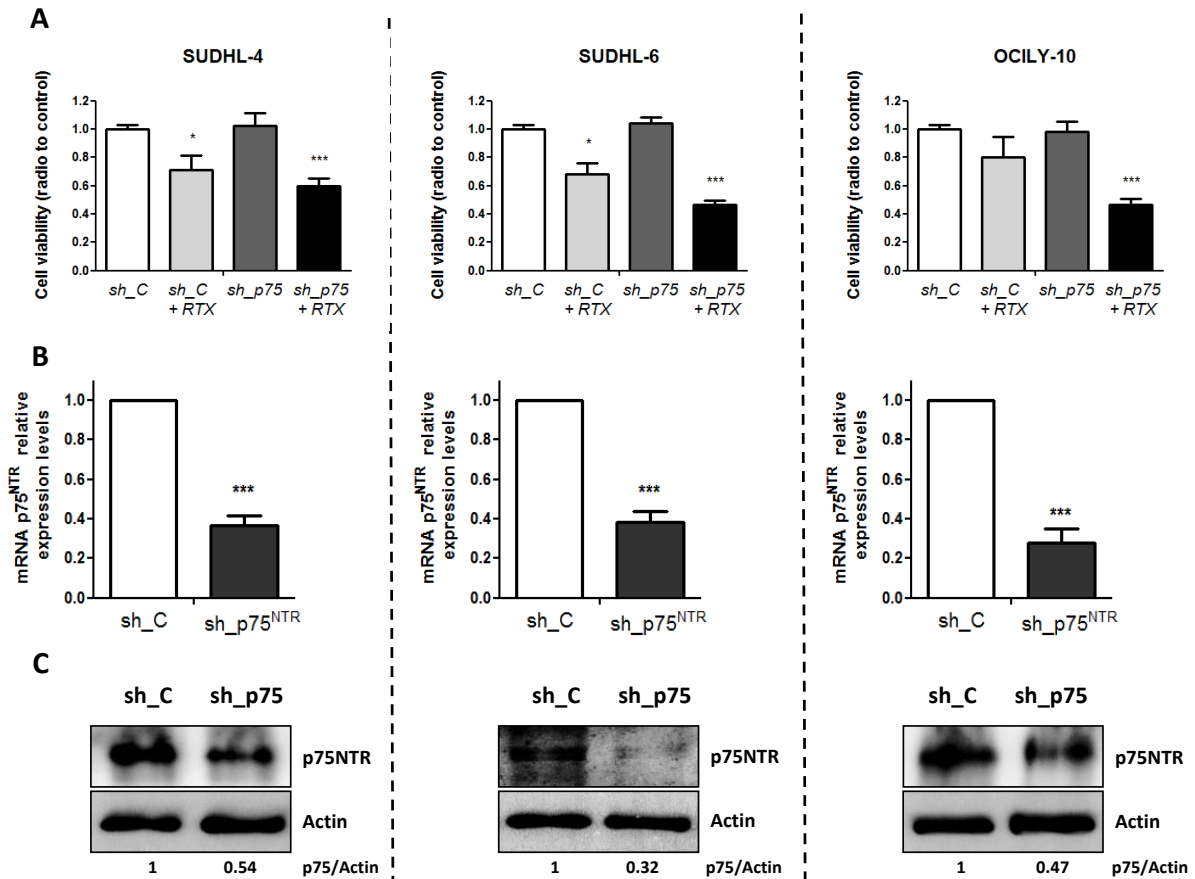


Figure S3. Inhibition of p75^{NTR} expression increases the rituximab sensitivity of DLBCL cell lines. Human GCB-like (SUDHL4 and SUDHL6) and ABC-like (OCI-LY10) DLBCL cell lines were transduced with lentivirus carrying shRNA against p75^{NTR} (shp75) or empty vector (sh_C). (A) Viability was assessed with or without rituximab (1 μ g/ml) 48 hours after treatment by using XTT method. Histograms show the quantification of at least three independent experiments performed in triplicates each one. (B) Relative levels of p75^{NTR} were evaluated by qRT-PCR for the three DLBCL cell lines. (C) Protein levels for p75^{NTR} were analysed by western blotting in DLBCL cell lysates for controls (sh_C) or p75^{NTR} reduced conditions (sh_p75). Actin was used as loading control. Student *t* test was used to determine significance, *: $p < 0.05$; and ***: $p < 0.001$ when compared to controls.

Table S1. Sequences of primer pairs and probes used for real-time RT-PCR

Names		Sequences	GenBank references
BDNF	Forward	GGCTATGTGGAGTTGGCATT	NM_170735.5
	Reverse	CAAAACGAAGGCCTCTGAAG	
	<i>Probe</i>	<i>ATTCTGAGTGGCCATCCCAAGGTCTAG</i>	
TrkB-FL Full lenght (TrkB145)	Forward	CTGGTGAAAATCGGGGACT	NM_006180.3
	Reverse	AGGAAATTCACGACGGAAAG	
	<i>Probe</i>	<i>TGTACAGCACTGACTACTACAGGGTCCGGTG</i>	
TrkB-T1 Truncated (TrkB95)	Forward	AAGATCCCCTGGATGGGTA	NM_00100709 7.1
	Reverse	GGAAGTGCTGCTTATCTGGG	
	<i>Probe</i>	<i>ATAAAGGAAAAGACAGAGAAAGGGGCTGTG</i>	
P75^{NTR}	Forward	CACCACCGACAACCTCATC	NM_002507.3
	Reverse	AAGCAGAACAAGCAAGGAGC	
	<i>Probe</i>	<i>CCTACATAGCCTTCAAGAGGTGGAACAGCT</i>	

Table S2. Correlation of combined immunohistochemical scores and DLBCL subtype

	NGF	TrkB
BDNF		0.353 <i>p=0.01</i>
p75^{NTR}		0.377 <i>p=0.006</i>
Mum1/IRF4	0.369 <i>p=0.008</i>	
GCB versus non-GCB phenotype	0.280 <i>p=0.04</i>	

Correlation coefficient and *p-value* as determined by the Spearman rank correlation test.

Table S3. Phenotype characteristics and NGF status of patients with DLBCL

	NGF expression		
	Low ¹	High	
N	21	30	
MUM1/IRF4			
Negative	11	6	<i>p=0.03</i>
positive	10	24	

¹ NGF staining scores of 0-2 are denoted as “low” and scores of 3-4 as “high”
N: number of patients - *p-value* as determined by the Fisher’s exact test.

Article 2: Préambule

Rappel sur les exosomes

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires de taille nanométrique, qui sont des acteurs probables d'un mécanisme de communication intercellulaire et jouent un rôle, comme on le verra ensuite, dans la physiopathologie des tumeurs. Les exosomes ont été décrits pour la première fois en 1981 comme des microvésicules sécrétées par différents types cellulaires *in vitro* et ayant une composition lipidique différente de la membrane plasmique, ce qui suggère une origine différente et plus complexe qu'un simple bourgeonnement membranaire (Trams et al., 1981). Les exosomes peuvent être sécrétés par quasiment tous les types cellulaires, notamment les réticulocytes, les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes B, les cellules dendritiques, les mastocytes, les plaquettes et les cellules épithéliales (Wubbolts et al., 2003, Kharaziha et al., 2012). Du fait de leur origine endosomale, les exosomes sont riches en molécules de CMH II et en tétraspanines (CD37, CD53, CD63, CD81, CD82...). Les exosomes ont été détectés dans des fluides biologiques tels que le sang (Caby et al., 2005), la salive (Ogawa et al., 2008), le liquide céphalo-rachidien (Street et al., 2012), le lait maternel (Admyre et al., 2007), le liquide amniotique ou l'urine (Pisitkun et al., 2004).

Le mécanisme de formation des exosomes a été observé « par hasard » en 1987, en suivant l'endocytose du récepteur à la transferrine (TfR) par des réticulocytes en maturation, en microscopie électronique, dans différents compartiments cellulaires. Ils ont été d'abord observés à la membrane, puis dans des endosomes précoces, ensuite dans des microvésicules à l'intérieur d'endosomes multi-vésiculés (ou corps multivésiculaires, MBV) et enfin dans le milieu extracellulaire après fusion des MBV avec la membrane plasmique (Johnstone, 2005).

La biogenèse des exosomes

L'origine des exosomes réside dans la formation de vésicules intraluminales (ILV) dans les endosomes multivésiculés (MVE) (Figure 17). La composition des exosomes produits est ainsi étroitement liée à la machinerie permettant la formation de ces ILV. Différentes études se sont focalisées sur cette problématique et il apparaît que la formation des exosomes ne résulte pas d'une seule et unique machinerie mais de différents mécanismes indépendants (Keller et al., 2006). Un des mécanismes importants met en jeu la capture de protéines, internalisées à partir de la surface cellulaire ou issues de l'appareil de Golgi, par la machinerie de transport endosomal ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Cette machinerie nécessite que ces protéines soient préalablement ubiquitinylées. Elle est constituée de 3

complexes protéiques ESCRT 0, ESCRT I et ESCRT II qui interviennent de façon coordonnée et hiérarchique dans la formation des ILV. Au cours de ce processus, des ARN cytosoliques et d'autres protéines peuvent directement accéder à l'intérieur des vésicules en formation avant leur clivage, pour donner des vésicules libres dans les MVB (Robbins and Morelli, 2014). Cependant ce mécanisme n'est pas l'unique existant. En effet, même après l'inhibition de tous les complexes ESCRT simultanément à l'aide de shRNA, tous les compartiments de la voie d'endocytose sont intacts et il y a toujours création d'ILV et d'exosomes (Stuffers et al., 2009). De plus certaines protéines comme les molécules de classe II du CMH, retrouvées dans les exosomes, ne nécessitent pas d'être ubiquitylées pour être adressées dans les ILV, mettant en évidence l'existence de mécanismes ESCRT indépendants. Ainsi, un autre mécanisme de formation des ILV semble reposer sur la propriété des céramides à induire la coalescence des radeaux lipidiques déterminant ensuite une invagination de la membrane endocytaire au niveau de ces microdomaines lipidiques. La scission de la vésicule dans le lumen se produirait lorsque les lipides des deux « bouts » de la couche lipidique externe de la vésicule sont suffisamment proches pour se mélanger et qu'il y a accumulation de LBPA (Lysobisphosphatidic Acid) au niveau du « cou » de la vésicule (Subra et al., 2007). Effectivement les exosomes sont enrichis en sphingolipides, céramides et composants des radeaux lipidiques comme le cholestérol (de Gassart et al., 2003).

Pour devenir des exosomes, les ILV formées doivent être libérées dans le milieu extracellulaire. Cette libération implique tout d'abord un transport du corps multivésiculaire jusqu'à la membrane plasmique de la cellule, puis une fusion membranaire qui permettra alors la sécrétion des ILV dans le milieu extracellulaire. Ce trajet est initié et contrôlé par des protéines appelées Rabs, GTPases que l'on retrouve aussi associées à la membrane de différents compartiments cellulaires. Les Rabs (Rab 4, Rab7, Rab 11, Rab 27 a et b, Rab 35) contrôlent le trafic membranaire intracellulaire et la fusion du MVB à la membrane plasmique, cette dernière étape semblant nécessiter en plus le rôle de protéines de la machinerie SNARE (soluble NSF attachment protein receptors).

L'étude des protéines communément retrouvées dans les exosomes a révélé une spécificité de la population protéique présente et une absence totale des protéines de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique. Bien que des facteurs d'élongation et histones soient parfois observés dans les échantillons, ces protéines sont probablement des contaminants protéiques issus des corps apoptotiques, qui sont isolés en même temps que les exosomes. La composition des exosomes issus de différentes cellules est publiée dans la base de données

ExoCarta. Deux autres bases existent : Vesiclepedia (Kalra et al., 2012) et EVpedia (Kim et al., 2013) dans lesquelles sont publiées des données sur les compositions (protéines, lipides et ARN) des exosomes et des micro-vésicules (MV). Cependant, ces données doivent être relativisées et peuvent prêter à discussion en fonction des méthodes utilisées pour la purification des exosomes, parfois sous-optimales. Les exosomes sont des vésicules de 50 à 100 nm de diamètre qui ont une densité comprise entre 1,13 et 1,19 g/ml et peuvent être purifiées en fonction de leurs caractéristiques (taille et densité) par des méthodes d'ultracentrifugation continue ou discontinue et/ou ultrafiltration (Théry et al., 2009). Cependant, un facteur limitant dans la caractérisation des vésicules extracellulaires est l'absence de méthodes fiables pour les quantifier. Une des méthodes pour analyser de petites quantités d'exosomes est une procédure de FACS optimisée basée sur le marquage des vésicules isolées avec des sondes fluorescentes analysées par cytométrie en flux (Nolte-'t Hoen et al., 2012). En complément, le NanoSight LM10 est basé sur la diffusion automatique des nanoparticules en fonction de leur taille sur une base individuelle, bien qu'il soit difficile d'établir une distinction entre les vésicules et les petits agrégats (Lo Cicero et al., 2015). Les protéines, qui peuvent être présentes dans les exosomes, sont issues notamment des données de spectrométrie de masse obtenues après analyse des vésicules extracellulaires issues de différents types cellulaires. On peut répartir les différentes protéines en fonction de leur localisation dans les exosomes et leur rôle (Figure 17) : à leur membrane les exosomes présentent des protéines d'adhésion comme les intégrines et les tétraspanines, des protéines de signalisation intracellulaire comme les synténines, des protéines impliquées dans la présentation des antigènes comme les CMH I et II (Lamparski et al., 2002, Lynch et al., 2009), et d'autres protéines comme les flotillines connues par leur ancrage à la membrane des radeaux lipidiques (Street et al., 2012). A l'intérieur, les exosomes contiennent des protéines du cytosquelette telles que les actines, les tubulines ou encore les myosines. C'est aussi le cas de certaines Rab, histones, enzymes du métabolisme cellulaire comme la GAPDH, ou encore de protéines jouant un rôle dans l'initiation de la synthèse protéique comme EEF1A1 (Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1). Enfin les exosomes contiennent aussi des protéines jouant un rôle dans la formation des ILV au niveau des MVB, telles que Alix ou les protéines des complexes ESCRT (Gonzales et al., 2009) et des protéines chaperones HSP70 et HSP90 (Kang et al., 2008). Notons qu'à côté de ces protéines « structurales et communes » des exosomes, ces nanovésicules présentent à leur surface notamment des protéines spécifiques, signature de leur cellule d'origine. Ainsi, les vésicules sécrétées par les cellules B normales ou malignes expriment, comme on l'a vu dans l'introduction, le marqueur CD20, cible aussi de l'immunothérapie.

Les exosomes contiennent également des phospholipides, des shingomyélines, du cholestérol et des gangliosides (Wubbolts et al., 2003). Ils contiendraient aussi des céramides, des glycérophospholipides, des phospholipides insaturés et des phosphatidyléthanolamines (Subra et al., 2007, Trajkovic et al., 2008).

En plus des protéines, les exosomes transportent également des quantités non négligeables d'ARNm et ARN non codants, incluant des microARN (miARN) qui sont distribués et fonctionnels dans les cellules cibles dites réceptrices. Ce dernier élément est très important parce que la présence d'ARNm dans les exosomes entraîne le transfert de l'information génétique permettant l'expression de certaines protéines par des cellules qui ne les expriment pas auparavant. De même, les microARN peuvent induire une inhibition ciblée de l'expression de certaines protéines dans les cellules réceptrices (Record et al., 2011, Robbins and Morelli, 2014, Wang and Lotze, 2014).

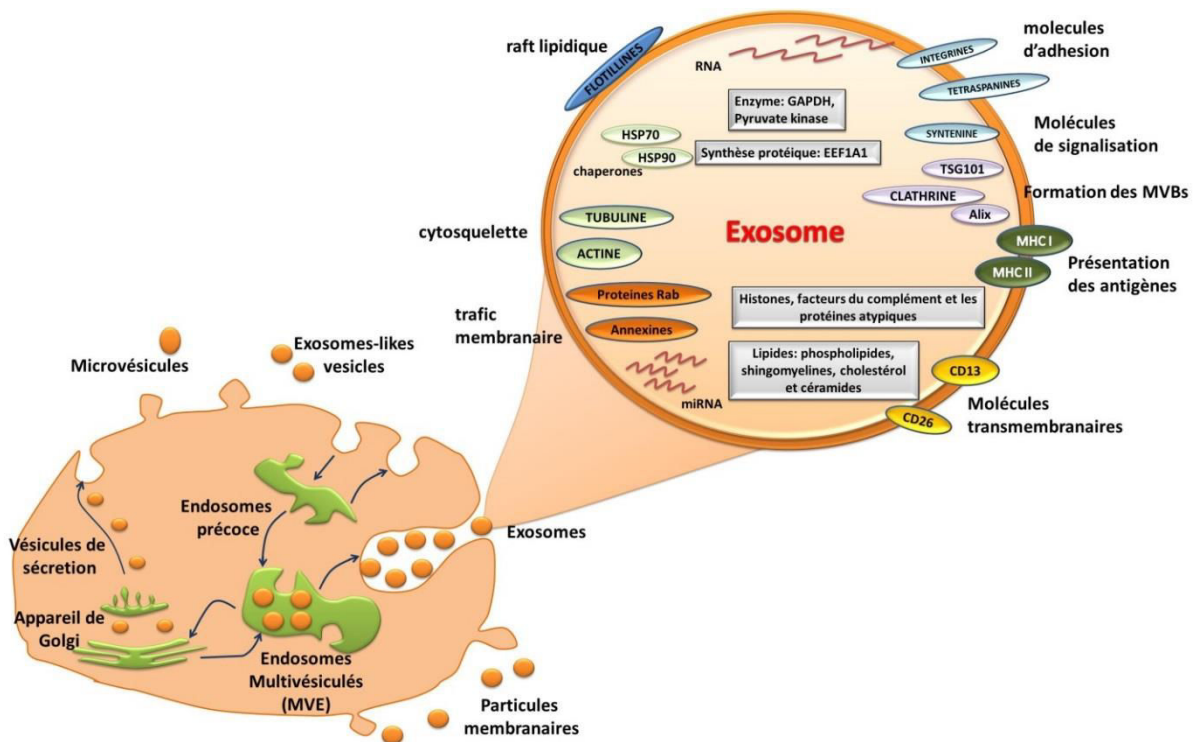


Figure 17: Différentes vésicules sécrétées par les cellules et principales molécules retrouvées dans les exosomes (adapté selon Théry et al, 2009). Les vésicules de sécrétion sont formées à partir de l'appareil de Golgi et contiennent du matériel contenu dans le lumen du compartiment. A l'opposé, les vésicules membranaires sécrétées par les cellules contiennent du matériel d'origine cytosolique. On distingue les vésicules qui émanent directement de la membrane plasmique (microvésicules et particules membranaires), et celles qui ont pour origine l'invagination d'une membrane intracellulaire : exosomes. Les protéines listées ici ont été retrouvées dans environ 30% des exosomes répertoriés dans la littérature (sécrétés par des cellules en culture et retrouvés dans les fluides biologiques).

Rôle des exosomes dans le processus tumoral

De nombreuses fonctions ont été attribuées aux exosomes ces dernières années mais la plupart des études ont été menées sur des modèles *in vitro* et peu en conditions physiologiques. Ainsi le rôle *in vivo* de ces nanovésicules reste à préciser.

Les données *in vitro* ont abouti à l'idée que les exosomes étaient un vecteur central de la communication intercellulaire, mais aussi réalisaient des plateformes de signalisations (signalosomes) modulant notamment le fonctionnement du système immunitaire. Ainsi, de nombreuses études ont montré que les exosomes sécrétés par des cellules présentatrices d'antigènes, dont les cellules B, expriment les molécules de classe I et II du CMH et des molécules de co-stimulation et d'adhérence à leur surface. Ces caractéristiques permettent aux exosomes d'activer directement les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ induisant une forte réponse immunitaire (Raposo et al., 1996, Zitvogel et al., 1998). De plus, les exosomes produits par les cellules dendritiques peuvent aussi transmettre de manière active leur CMH II (Théry et al., 2002) ou leur CMH I (Lynch et al., 2009) à des modèles de cellules dendritiques n'exprimant pas ces molécules, pour leur permettre d'activer les lymphocytes T.

La découverte que la plupart des cellules cancéreuses étaient capables de sécréter des exosomes a suscité un intérêt scientifique important pour comprendre leur fonction physiopathologique, et un certain nombre de travaux ces 10 dernières années ont permis de confirmer le rôle des exosomes tumoraux *in vivo*. Le groupe de Clothilde Théry a beaucoup contribué à la progression des connaissances dans ce domaine, en utilisant notamment des cellules tumorales dont le processus de sécrétion d'exosomes avait été interrompu de façon stable (inhibition de l'expression de Rab27a), puis en analysant leur capacité *in vivo* à développer des tumeurs et à interagir avec le système immunitaire. Alors que les tumeurs contrôles se développaient progressivement et formaient des métastases, celles qui présentaient une diminution de 50% du processus de sécrétion des exosomes, suite à la perte d'expression de Rab27, ne se développaient presque pas (Bobrie and Théry, 2013). D'autres travaux relatent par exemple que les exosomes issus de sérum de patientes atteints de cancer du sein, mais pas ceux de personnes saines, induisent la formation de tumeurs chez des souris injectées avec des cellules épithéliales non cancéreuses (Melo et al., 2014). Ces données suggèrent que les exosomes peuvent contribuer au développement de la tumeur mais aussi à la progression tumorale incontrôlée, en permettant la transformation des cellules normales en cellules malignes (Zhang et al., 2015).

Les données expérimentales montrent globalement que les exosomes peuvent avoir plusieurs rôles dans le processus tumoral (Figure 18) : ils peuvent manipuler l'environnement local et systémique contribuant à la croissance de la tumeur et à sa dissémination. Ils peuvent aussi moduler et programmer le système immunitaire pour induire une réponse immune anti-tumorale (immunogénicité, notamment via la forte densité des Ag tumoraux) comme l'inhiber (immunosuppression locale ou systémique). De plus les exosomes tumoraux sont très hétérogènes d'un cancer à l'autre, et comme on le voit peuvent induire un réseau d'interactions cellulaires complexes (Kahlert and Kalluri, 2013).

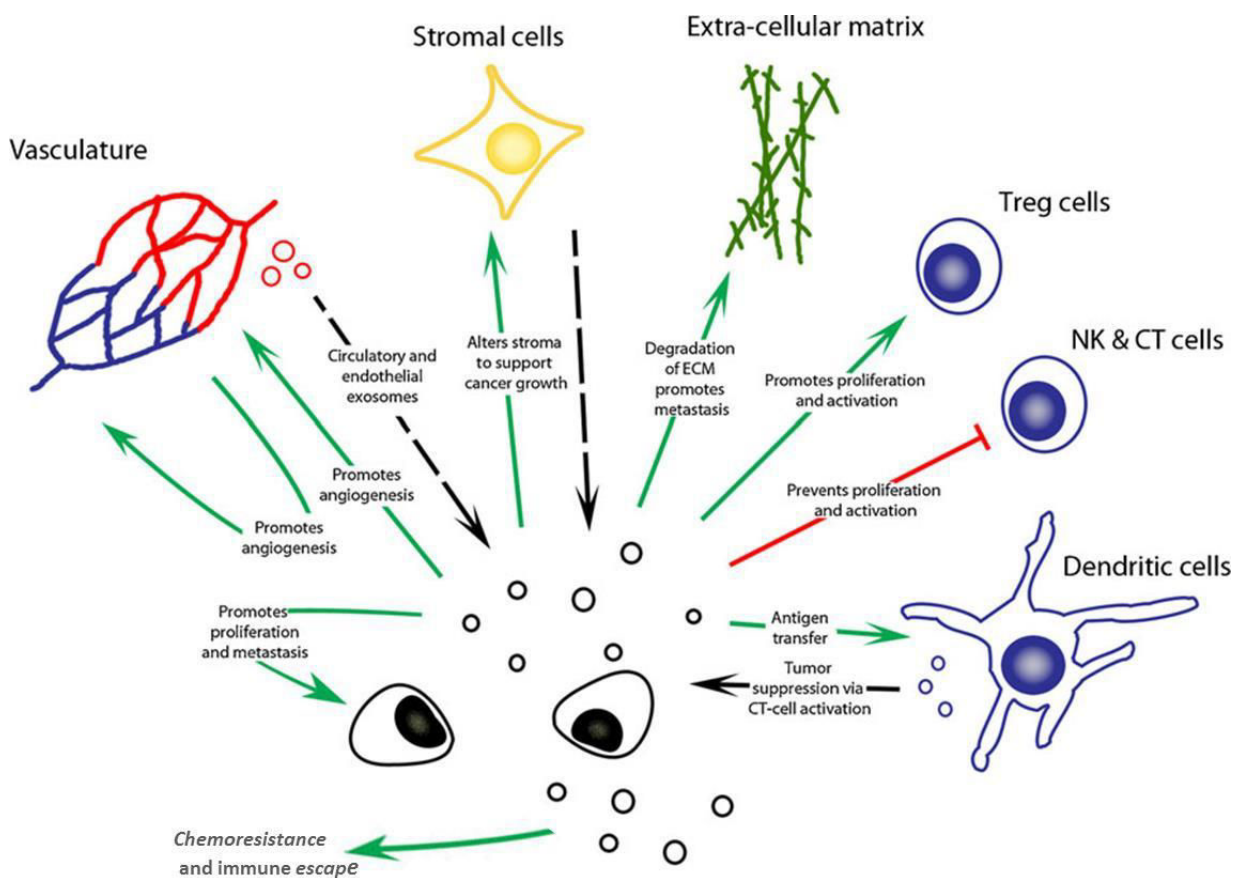


Figure 18: Rôle des exosomes dans la tumorigénèse. (Ge et al., 2012). Les exosomes sont fortement impliqués dans l'initiation, la croissance, la progression tumorale notamment par le transfert de protéines oncogéniques et d'acides nucléiques. Ainsi, par exemple, les exosomes dérivés de tumeurs peuvent activer des cellules endothéliales, convertir des fibroblastes et les cellules souches mésenchymateuse en myofibroblastes, ou dégrader la matrice extra-cellulaire (ECM) pour faciliter l'angiogénèse tumorale et les processus de métastases. Les exosomes issus des cellules tumorales contribuent aussi à créer un microenvironnement immunosuppresseur en induisant l'apoptose des cellules T effectrices, en inhibant l'activité des cellules NKs, ou en favorisant l'activation des lymphocytes T régulateurs. A l'inverse, par le transfert d'Ag, ils participent à l'initiation d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Finalement, les exosomes peuvent participer au développement de résistance thérapeutique via l'exportation de drogues et la neutralisation des anticorps utilisée dans l'immunothérapie.

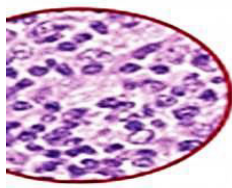
Exosomes et résistance thérapeutique

Les exosomes peuvent aussi contribuer au développement de résistances thérapeutiques à travers toute une variété de mécanismes. Les cellules tumorales peuvent transmettre aux cellules sensibles, via les exosomes, des protéines associées au processus de résistance aux drogues, créant donc une population plus importante de cellules qui ne sont pas affectées par les traitements utilisés dans la chimiothérapie (Corcoran et al., 2012). Ce mécanisme peut aussi impliquer le transfert de microARN. Ainsi, dans une étude sur des lignées de cancer du sein, le groupe de Chen a comparé des lignées résistantes aux traitements (adriamycine et docétaxel) avec des lignées sensibles. Plus précisément, ils ont analysé les microARN contenus dans les exosomes des lignées sensibles comparativement aux lignées résistantes. Certains microARN (miR-100, miR-222, miR-30a, miR-17) semblent être transférés dans les cellules pour conférer la chimiorésistance. Une fois transférés aux cellules sensibles, ces miARN modifient la progression du cycle cellulaire et affecte les voies de l'apoptose pour diminuer la sensibilité aux médicaments (Chen et al., 2014).

Il a été démontré que la modulation de la chimiosensibilité des autres cellules n'est pas le seul moyen par lequel les exosomes augmenteraient la chimiorésistance. Ils participent à la résistance thérapeutique en permettant l'efflux des drogues y compris dans les lymphomes B agressifs, même si les données sont peu nombreuses. En effet, les cellules tumorales peuvent séquestrer les médicaments utilisés dans la chimiothérapie dans les compartiments subcellulaires et les exporter via les exosomes pour se protéger de leurs effets cytotoxiques (Safaei, 2005, Chapuy et al., 2008). La biogenèse des exosomes dépend notamment, comme on l'a vu, de l'expression de molécules « transporteur », et des travaux ont montré l'implication de protéines associées au phénomène de résistance multidrogue (MDR) notamment le transporteur ABCA3 (ATP binding Cassette transporter A3) dans des cellules leucémiques et lymphomateuses B (Chapuy et al., 2008, Aung et al., 2011). Ce transporteur, impliqué dans le transport des lipides endogènes, est localisé aux niveaux des membranes intracellulaires. Contrairement aux autres membres de la famille des ABC, il ne confère pas un efflux classique des substrats physiologiques et drogues mais plutôt une séquestration intracellulaire et un transport vésiculaire. Ainsi de façon très intéressante, une étude très récente, réalisée sur des lignées cellulaires de DLBCL, montre que l'inhibition génétique ou chimique d'ABCA3 empêche, en inhibant le processus de sécrétion des exosomes, l'efflux des drogues utilisées dans la chimiothérapie (anthracyclines) et augmente leur rétention intracellulaire et par conséquent leur efficacité cytotoxique. (Koch et al., 2016).

Finally, and this is the mechanism we chose to study during our thesis, exosomes can interfere with the action of immunotherapy antibodies by modulating their binding to tumor cells. Thus, exosomes secreted by breast cancer cells, overexpressing the HER2 receptor, also present this receptor on their surface, which interferes with the efficacy of therapeutic antibodies targeting this marker (trastuzumab) (Ciravolo et al., 2012). This is also the case for B lymphoma cells that secrete exosomes carrying CD20, a target of therapeutic antibodies, which determine « decoy receptors » for anti-CD20 therapeutics. The binding of anti-CD20 to CD20 on exosomes protects tumor cells from the cytotoxic effects induced by anti-CD20. These works, certainly performed only *in vitro*, suggest that exosomes participate in this process of therapeutic evasion in aggressive B lymphomas (Aung et al., 2011).

In conclusion, exosomes appear to play a key role in the tumor process, notably by participating in tumor development and metastasis or by interfering with the efficacy of treatments. It is on this last aspect that we chose to focus in the framework of our thesis. In fact, as we have emphasized, few data report the potentially determining function of exosome secretion in aggressive lymphomas and thus DLBCL. Or, the modulation of CD20 expression at the cellular level as an exosomal element remains a central element of future therapeutic strategies for these cancers.



ASH® Meeting on Lymphoma Biology

JUNE 18-21, 2016 • COLORADO SPRINGS, CO

Article 2: DLBCL-derived exosomes: a new link between TrkB and rituximab sensitivity?

Hafidha Bentayeb¹, Marine Aitamer¹, Maud Branchaud¹, Amandine Magnaudeix¹, Kim Heang Ly^{1,2}, Julie Abraham^{3,4,5}, Marie-Odile Jauberteau¹ and Danielle Troutaud¹.

¹EA3842 « Cellular Homeostasis and Diseases » Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland 87025 Limoges Cedex, France. ² Service de Médecine interne, CHU de Limoges 2 Avenue Martin Luther King, 87000 Limoges, France ³UMR CNRS 7276, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland 87025 Limoges Cedex, France. ⁴Service d'Hématologie Clinique, CHU de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87000 Limoges, France ⁵Structure Régionale de Référence des Lymphomes du Limousin, CHU de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87000 Limoges, France

Running title: TrkB signaling and exosomes in DLBCL

Funding: This work was supported by Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité Départemental de La Haute-Vienne) and CORC (Comité d'Orientation Recherche Cancer en Limousin).

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

E-mail: danielle.troutaud@unilim.fr

Abstract

Despite significant survival benefit of Diffuse Large B-cell Lymphomas (DLBCL) patients when treated with R-CHOP immunochemotherapy, approximately 10-15% of patients exhibit primary refractory disease and 20-25% relapse after initial response to therapy. Decreased CD20 expression has been postulated to be one of the most important etiologies contributing to rituximab resistance. Furthermore, recent data show that exosomes released from aggressive B-cell lymphoma cells carry the CD20 target antigen and act as decoy targets upon rituximab exposure, allowing lymphoma cells to escape from humoral immunotherapy. We have previously demonstrated that BDNF/TrkB can realize autocrine / paracrine loops involved in the survival of human DLBCL cell lines. In the present work we evaluated the capacity of a recently characterized agonist of TrkB (7,8-DHF) to regulate CD20 expression and interfere with rituximab treatment. Our results confirm *in vivo*, on a DLBCL xenograft model, that secretion of exosomes allow DLBCL cells to escape from rituximab cytotoxicity. We also demonstrated a reduced CD20 expression at the exosome level after rituximab exposure. Finally, results strongly suggest for the first time that neurotrophin signaling may contribute to therapeutic resistance in DLBCL in regulating cell survival and exosomes CD20 levels.

Introduction:

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common subtype of NHL, accounting for 30% to 40% of all newly diagnosed cases in the world. DLBCLs are highly aggressive and heterogeneous lymphomas that would imminently be fatal without treatment. Two major prognostically significant subtypes have been identified which differ from the cell origin, germinal center B-cell (GCB) and activated B-cell (ABC) type of better and worse prognostic respectively (Alizadeh et al., 2000; Wright et al., 2003; Lenz and Staudt, 2010). Although the Akt pathway is constitutively activated in most tumor cells and B-NHL cell lines, a hallmark of ABC DLBCL is constitutive activation of the NF- κ B pathway. This constitutive activation confers a selective advantage for survival and resistance to conventional chemotherapeutic regimens (Davis et al., 2001; Lam et al., 2005; Bonavida 2014). Monoclonal anti-CD20 antibody, rituximab, in combination of CHOP chemotherapy (R-CHOP immunochemotherapy) has been widely used with favourable results and is the standard treatment for several kinds of B-NHL, included DLBCL, but many patients are not cured with this immunotherapy (Coiffier, 2007; Rezvani and Maloney, 2011). Indeed primary or acquired resistance to rituximab has become a considerable problem. Several mechanisms of resistance have been predicted but their clinical significance remain unclear. However, decreased CD20 expression has been postulated to be one of the most important etiologies contributing to rituximab resistance. Thus targeting the modulation of CD20 membrane expression, that represents a key factor determining the anti-CD20 effectiveness, could be an important challenge for novel therapy combined with immunotherapy in B-cell neoplasms.

Recent data show that exosomes released from aggressive B-cell lymphoma cells *in vitro* and *in vivo* carry the CD20 target antigen and act as decoy targets upon rituximab exposure, allowing lymphoma cells to escape from humoral immunotherapy (Aung et al., 2011). Exosomes are small membrane vesicles secreted by several cell types during exocytic fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane. In normal condition, exosomes are secreted from erythroid progenitors during their maturation process, as well as from B-lymphocytes and dendritic cells. Exosomes are able to play multiple immunomodulatory functions leading to investigations aiming at vaccinations against malignant disease. Importantly, cancer cells have been shown to secrete exosomes in greater amounts than normal cells (Kahlert, 2013), and as exosome composition seems to be cell and tissue specific, they are highly suitable to serve as diagnostic markers. Current knowledge of tumor derived-exosomes suggests that they can play an important role in the development and progression of cancer.

They are able to modulate intercellular communication within the tumor microenvironment by the transfer of multiple signaling molecules like protein, lipid and RNA cargo (Hannafon and Ding, 2013). In hematopoietic cells, exosomes have been also detected in the supernatant of several tumor cell lines, including the T-lymphoblastic cell line Jurkat and the erythroleukemic cell line K562. In B cells data related with exosomes were focused in EBV (Epstein-Barr virus)-transformed human B-cell lines (Gutzeit et al., 2014) and very few studies have examined their role in B-NHL. Furthermore, the biological stimuli regulating exosome secretion quantitatively and/or qualitatively still remain poorly defined and notably after rituximab exposure.

Neurotrophins (NTs) among with the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are structurally and functionally related growth factors that are widely expressed in a variety of tissues including the immune system. Binding of BDNF to its high-affinity receptor TrkB triggers cell survival by activating several signalling pathways (PI3K/Akt, MAPK, and PLC- γ). Recently we have demonstrated that BDNF can realize autocrine / paracrine loops involved in the survival of human DLBCL cell lines. Furthermore inhibition of Trk signalling induced cell apoptosis and potentiated the cytotoxic effect of rituximab *in vitro* and *in vivo* (Bellanger et al, 2011; Dubanet and al, 2015). We hypothesized that BDNF/TrkB signaling could interfere with rituximab sensitivity and thus may contribute to therapeutic resistance.

The objective of this work was to evaluate the effect of 7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF), a recently characterized agonist of TrkB (Jang and al, 2010), on cell survival, exosome secretion and CD20 expression in reference to rituximab exposure effect. This work was performed on different ABC (OCI-LY3/10) and GCB (SUDHL4/6) DLBCL human cell lines known to be respectively less and more sensitive to the rituximab. We finally performed *in vivo* experiments, using a GCB-DLBCL xenograft model in SCID mice, to analyze 7,8-DHF effect on the exosome capacity to interfere with rituximab treatment. The findings discussed in this study may improve our understanding of the molecular events leading to the expression of CD20 at the cellular and exosomal levels.

Material and methods:

Human B cell lines and cell cultures

The human GCB-like DLBCL cell lines, SUDHL4 and SUDHL6, were obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) and the two ABC-like DLBCL cell lines, OCI-LY3 and OCI-LY10, were a gift of Pr Feuillard (UMR CNRS 7276, Limoges University) with the kind agreement of Louis M. Staudt (National Cancer Institute, USA). The cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For the viability tests, cells were incubated with rituximab (1 µg/mL, MabThera®, stock 10 mg/mL, a generous gift from CHRU Dupuytren of Limoges, Pharmacie centrale), K252a (350 nM, Alomone labs, Jerusalem, Israel), 7,8-DHF (500 nM, Sigma-Aldrich, France) alone or in combination.

Analysis of apoptosis

Apoptosis was determined using the propidium iodide (PI)/Annexin V-FITC double staining method (kit Beckman Coulter, Immunotech, Marseille, France) as previously described (Bellanger *et al*, 2011). This method effectively distinguishes apoptotic cells from necrotic cells. Apoptotic cells exhibited intense green (FITC) and negative or intermediate red (PI) fluorescence (early and late stages of apoptosis, respectively). Necrotic cells exhibited strong green and red fluorescence. Cells were analysed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) acquiring 10 000 events gated on light scatter properties (forward vs side: FSC/SSC) to eliminate debris and cellular aggregates.

Western blotting

Cell or exosome pellets were treated with RIPA buffer and after centrifugation at 12,000g for 12 minutes the supernatant was collected. Western blotting steps were performed as described previously (Bellanger *et al*, 2011). Rabbit anti-CD63 and mouse anti-β-actin were purchased from Sigma-Aldrich. Rabbit anti-flotillin 1 and anti-flotillin 2 were purchased from Cell Signaling Technology. Mouse anti-CD20 was purchased from Dakko. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from Dako. Blotted proteins were detected and quantified using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) and a bioimaging system (Genesnap; Syngene).

Flow cytometry and immunofluorescence analysis of surface CD20 expression

Indirect immunofluorescence analysis was carried out after washing the cells three times in PBS. Cells were then incubated with PE-labeled anti-CD20 antibody (mouse IgG2a anti-CD20-PE, Beckman Coulter) or isotypic control (mouse IgG-PE, Beckman Coulter) for 30 min at 4°C at the concentration recommended by the manufacturer. After washing, cells were resuspended in PBS/0.1% PFA. CD20-positive cells were analyzed with a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) acquiring 10 000 events after gating on light scatter properties (forward vs side: FSC/SSC) to eliminate debris and cellular aggregates. The mean fluorescence intensity (MFI) values were used as a semiquantitative measure of the CD20 expression.

Alternatively, DLBCL cells were challenged with antibodies against CD20 and analyzed by immunofluorescence as previously described (Bellanger *et al*, 2011). Images were captured using a Leica microscope and a Leica digital camera, and were processed using Leica IM500 Image Manager, or a confocal laser scanning microscope (LSM 510 META, Zeiss).

Exosome preparation and quantification

Exosomes were harvested from 72h supernatants of SUDHL4, SUDHL6, OCI-LY3 and OCI-LY10 cultured in RPMI 1640 with 10% exosome-depleted FBS by differential centrifugation and ultracentrifugation, according to standard protocols (Théry and al., 2006). The final pellets, that contained exosomes, were then resuspended immediately in PBS (when used for *in vivo* experiments or flow cytometry) or in lysis buffer (when used for western blotting). Exosomes were quantified by measuring whole protein (Bio-Rad DC Protein Assay). Western blot analysis detecting flotillin-1 or flotillin-2, CD63 and CD20 expression in comparison with whole cell lysates were realized as described before.

Immunocapture of exosomes for flow cytometry analysis

For immunoisolation, 35 µl (~5.10⁷ billes) of 4-µm-diameter aldehyde/sulfate latex beads (Interfacial Dynamics, Portland, OR, USA) were coated with anti-CD63 mAb and then mixed with exosome samples followed by overnight incubation at 4° C, according to standard protocols (Théry and al., 2006). After washing, beads were labelled with anti-CD20-PE and samples were then processed for flow cytometry as described before for the expression of membrane CD20.

Electronic microscopy

Purified exosomes were captured using immunobeads coupled with anti-CD63 antibodies and analyzed using transmission electron microscopy (TEM) at the Poitiers University (Service Anatomie et Cytologie Pathologiques CHU-La Milétrie).

***In vivo* Xenografts**

All animal studies were conducted in accordance with the guidelines established by the internal Institutional Animal Care and Use Committee (CREEAL N°2-07-2012). 4 weeks old SCID mice (CB17.SCID) were supplied by Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). For analyze the *in vivo* effect of exosomes derived from 7,8-DHF treated-cell cultures on rituximab efficacy, we used a DLBCL xenograft model. SCID mice were injected with 1×10^7 SUDHL4 cells subcutaneously. After the tumors had become established (~6 weeks after tumor inoculation) mice were divided (day 0) into treatments and control groups (6 mice per group). Rituximab (25 mg/kg) was administered i.p. twice a week, alone or in combination of purified exosomes (1.10^7 cells-driven exosomes) from 72h DLBCL cell cultures (SUDHL4 and OCI-LY3) exposed or not to 7,8-DHF (500 nM). For negative controls, treatment with vehicle alone was used. Animals weighted between 20 and 26g on day of treatment. All animals were ear-tagged and monitored individually throughout the experiment. Tumor volume (cm^3) was estimated every 3 days during 2 weeks by measurements of the length (L), width (W) and height (H) of the tumor, using the formula: $\text{volume} = L \times W \times H$. Mice were killed after 14 days of treatment.

Statistical methods

Statistical analyses were performed using the StatView v5.0 software (Abacus Concepts). Significance between groups in the *in vitro* and xenograft studies were done using a Student's t test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Characterization of exosomes purified from DLBCL cell line supernatants

ABC and GCB DLBCL-derived exosomes were isolated from cell culture supernatants by differential centrifugation. The purified exosome samples were examined by TEM, and purified vesicles were observed with heterogeneous sizes, ranging from approximately 50 to 150 nm (Fig 1A). The western blot analysis revealed the exosome specific proteins CD63 and flotilline-1/2 commonly identified in exosomal preparations. These proteins were detected in the exosome samples after 48h of cell culture, and were enriched after 72h (Fig 1B). To compare exosome secretion by the different DLBCL cells, we quantified whole proteins of the exosome samples (Fig 1C). OCI-LY3 cells seemed to have the highest level of exosome secretion. As expected GCB and ABC-derived exosomes carried CD20, however SDS-PAGE analysis of CD20 showed only one of the two immunoreactive bands found in total cellular lysates (see Fig 2D), that are known to reflect different phosphorylation status of the protein. Of note, a higher CD20 exosomal expression was found in OCI-LY3 exosomes when compared to SUDHL4 cells (Fig 1D). Taken together, our results confirmed the exosome quality of the isolated fractions, and the differential secretion by DLBCL cell lines that seemed not to be in relation with the DLBCL subtype.

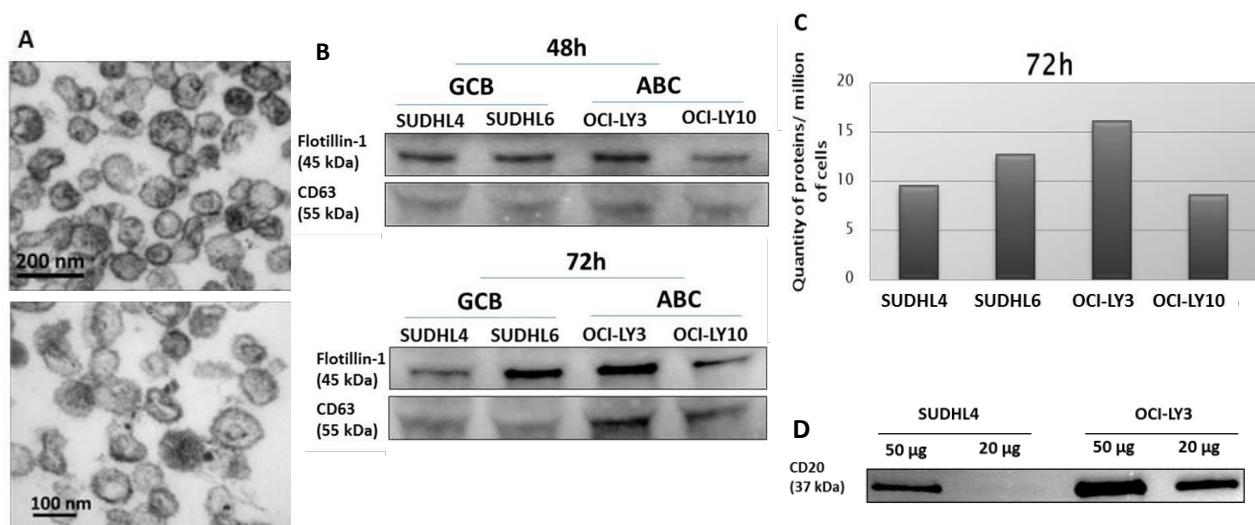


Figure 1. Characterization of exosomes purified from DLBCL cell line supernatants. Exosomes were purified from 10 ml of DLBCL cell line supernatants (A) Structural analysis of OCI-LY3-derived exosomes: micrographs from electron microscopy (exosomes were purified according Clotilde Thery and al., 2006). (B) The exosomes markers flotillin-1 and CD63 were detected by western blot analysis. (C) Relative quantification of exosomes: amount of exosome protein accumulated over 72 h in the culture medium of DLBCL cells (means of 2 independent experiments) (D) Western blot analysis of CD20 exosomal expression in SUDHL4 and OCI-LY3 cells.

A TrkB agonist protects DLBCL cells from rituximab-induced apoptosis

We have previously shown an autocrine BDNF/TrkB signaling in DLBCL cell lines (Dubanet et al, 2015). To further explore the mechanisms involved in the TrkB effects on DLBCL cell

survival, we used a TrkB agonist (7,8-DHF) (Jang et al, 2010). GCB and ABC DLBCL cell lines were pre-exposed to 7,8-DHF (500nM) with or without rituximab (Rtx 1µg/ml) and a pan-Trk inhibitor (K252a, 350 nM) in complete medium exosomes-free for 72 h. Apoptosis was detected by FACS analysis using the PI/annexin V-FITC dual staining. As expected, TrkB activation and inhibition were associated to enhanced and reduced phosphorylation (Y817) of the receptor respectively (Fig2A). As we previously reported, inhibition of Trk signaling (K252a) induced a strong apoptosis as shown for SUDHL4 in Fig 2B. Interestingly, eventhough no effect was observed when used alone, preincubation of cells for 30 minutes with the TrkB agonist conferred a protection against acute rituximab-induced apoptosis. This effect was cancelled by K252a exposure demonstrating TrkB involvement in the cell protection effect of 7,8-DHF.

***In vitro* regulatory effects of rituximab and 7,8-DHF on the CD20 cellular and exosomal level in DLBCL cell lines**

Expression of cellular membrane CD20 was analyzed by flow cytometry in rituximab-treated SUDHL4 cells after 48h and 72h. Rituximab exposure strongly reduced CD20 membrane expression in DLBCL cells as previously reported (Czuczman and al, 2008) (Fig 2C). This reduction was not associated to membrane rituximab binding as it was confirmed for the total CD20 level by western blot analysis in lysates of all DLBCL cell lines tested. Indeed, this reduction was observed both for the rituximab-sensitive (SUDHL4) and less sensitive (OCI-LY3) cell line, as indicated by the PARP cleavage data (Fig2D). However, level of surface CD20 expression was not modified after 48 and 72h (data not shown) cell exposure with DHF or K252a. Expression of CD20 was further analyzed by western blot on exosomes derived from 10 mL of ABC (OCI-LY10) and GCB (SUDHL4) cell supernatants after 48h of culture. Flotillin-2 was used as control to analyze exosome release. Data from flotillin-2 expression suggest that rituximab increases exosome release as previously reported (Aung and al, 2011). This side-effect of rituximab was observed for GCB and ABC cell lines. Of note, we show for the first time a reduced CD20 expression by exosomes derived from SUDHL4 and OCI-LY10 cells exposed to rituximab (Fig 2E), that we confirmed by cytometric analysis on immunocaptured CD63⁺ exosomes (data not shown). As contrast, DHF exposure induced variable effects depending to the cell line. Interestingly, DHF strongly enhanced CD20

expression on exosomes derived from SUDHL4 cells, and with a lesser extend for exosomes purified from OCI-LY10 (Fig 2E).

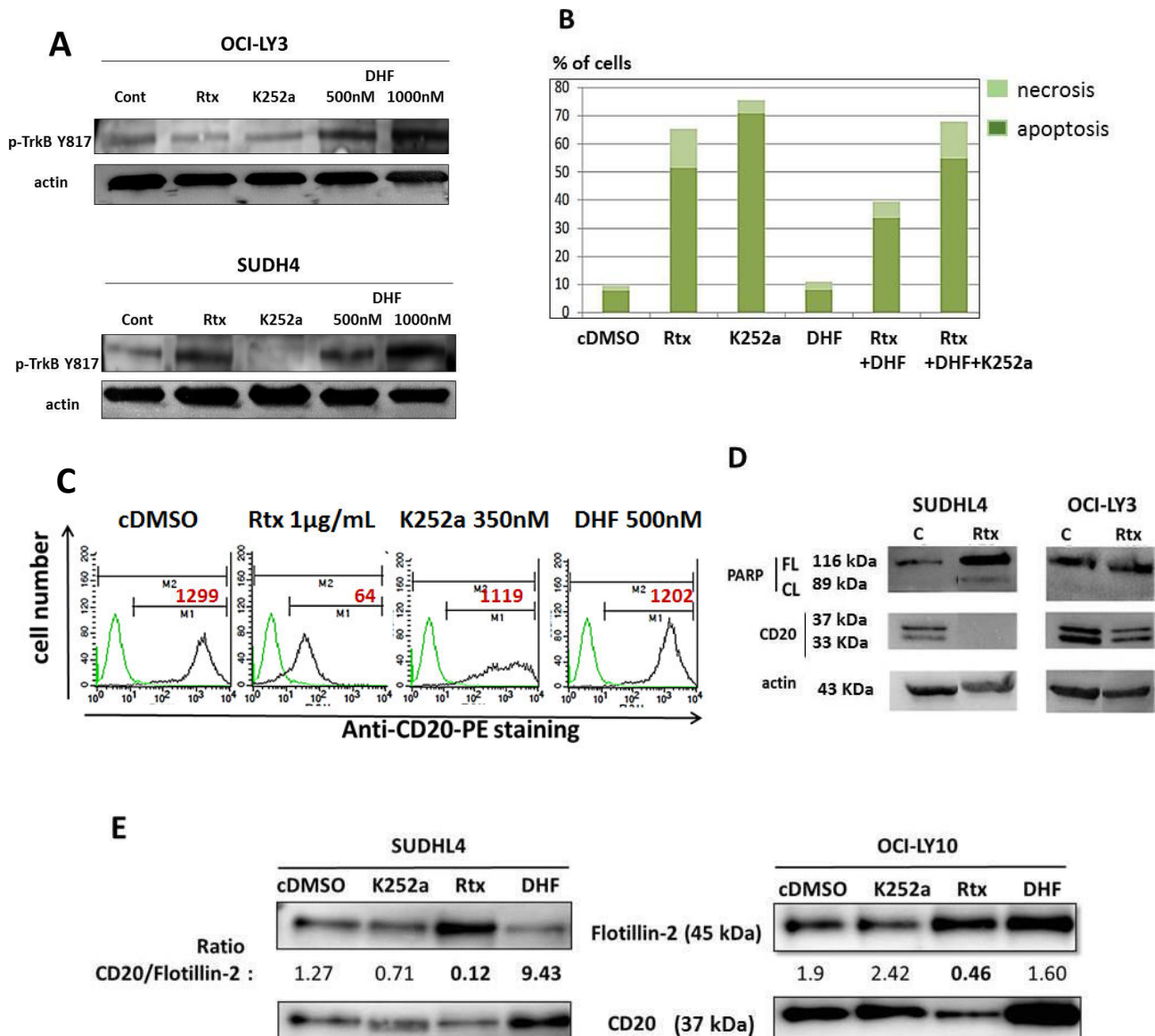


Figure 2. Effect of a TrkB agonist (7,8-DHF) in cell survival and CD20 expression in DLBCL cell lines. SUDHL4 cells were exposed to treatments (Rituximab, Rtx 1µg/ml or/and the Trk inhibitor K252a 350 nM and 7,8-DHF 500 nM) for 72h (A) TrkB phosphorylation status (p-TrkB at Y817) was analyzed by western blot. Actin was used as a loading control. (B) Flow cytometric analysis of apoptosis was realized using the PI/annexin V-FITC dual staining. Data are expressed as means of 2 independent experiments. (C) Expression of cellular membrane CD20 was analyzed by flow cytometry with specific antibody conjugated to PE in SUDHL4 cells after 48h. Histograms are representative of 3 independent experiments, in green the isotype Ab control and in red the MFI value of CD20 positive cells (gated in M1). (D) Reduced expression of CD20 after rituximab exposure was also confirmed in cell lysates by western blot analysis, in rituximab sensitive cells (SUDHL4) and less sensitive (OCI-LY3) as indicated by the cleavage of PARP. (E) Expression of exosomal membrane CD20 was analyzed by western blot in exosomes purified from GCB (SUDHL4) and ABC (OCI-LY10) cell supernatants (10 mL) after 48h treatment. Quantification of CD20 expression in reference to flotillin-2 was also done. Results are representative of 2 independent experiments.

Indeed, the strong CD20 expression observed in exosomes from OCI-LY10 after rituximab treatment seems to reflect a global enhanced secretion of exosomes, as revealed by the flotillin-2 expression. Even preliminary, these results strongly suggest that TrkB signaling may interfere with the rituximab cytotoxic effect in DLBCL cells by up-regulating CD20 expression at the exosomal level that could be associated also with a global enhanced exosome secretion.

Exosomal evasion of rituximab therapy in a DLBCL xenograft model is modulated by the DLBCL subtype

Recent data show that exosomes released from aggressive B-cell lymphoma cells act as decoy targets upon rituximab exposure, allowing lymphoma cells to escape from humoral immunotherapy (Aung et al., 2011). To further explore this protection, we analyzed *in vivo* the effects of exosomes derived from GCB-DLBCL cells as compared to ABC sub-type. We used a GCB-DLBCL xenograft model in which SCID mice were subcutaneously inoculated with SUDHL4 cells. Each group of mice received different treatments: i.p. injection of rituximab or PBS solution (control mice), in association or not with exosomes purified from cell supernatants after 72h of cell culture of OCI-LY3 or SUDHL4. Tumor growth in mice treated only with SUDHL4 and OCI-LY3-derived exosomes was not significantly different from control (Fig 3A). As expected our data show that DLBCL-derived exosomes allow tumors to escape rituximab effect. Interestingly, OCI-LY3-derived exosomes protect more significantly tumors against rituximab cytotoxicity than SUDHL4-derived exosomes. This result may be related to the higher amount of secreted exosomes that we observed for OCI-LY3 cells as compared to SUDHL4, and/or exosomal CD20 abundance.

***In vivo* effect of exosomes derived from 7,8-DHF cell cultures on rituximab resistance in DLBCL**

Our *in vitro* data showed that treatment with TrkB agonist, 7,8-DHF, enhanced CD20 exosomal expression. Therefore, we used SUDHL4-derived exosomes from 7,8-DHF-treated culture cells to explore their capacity to modulate the rituximab effect *in vivo*. As shown in Fig 3B, exosomes derived from DHF-treated SUDHL4 tends to slow down tumor growth when injected alone in mice, but this effect was not significant as compared to control mice. In double-treated mice (with rituximab and exosomes derived from DHF-treated SUDHL4) rituximab inhibitory effect was nearly completely canceled and tumor growth was significantly rescued (Fig 3B). Indeed, tumor volumes were not significantly different from those of mice treated only with SUDHL4-derived exosomes. However, there is still a significant down-modulation of tumor growth, that we observed from 9 days post-treatment, in double-treated mice when compared with tumor

growth in control. All together this data show for the first time that TrkB activation enhances exosomal evasion of rituximab treatment in a DLBCL xenograft model. This effect could be correlated with the up-regulated CD20 expression at the exosome level that we observed in cell cultures exposed to 7,8-DHF.

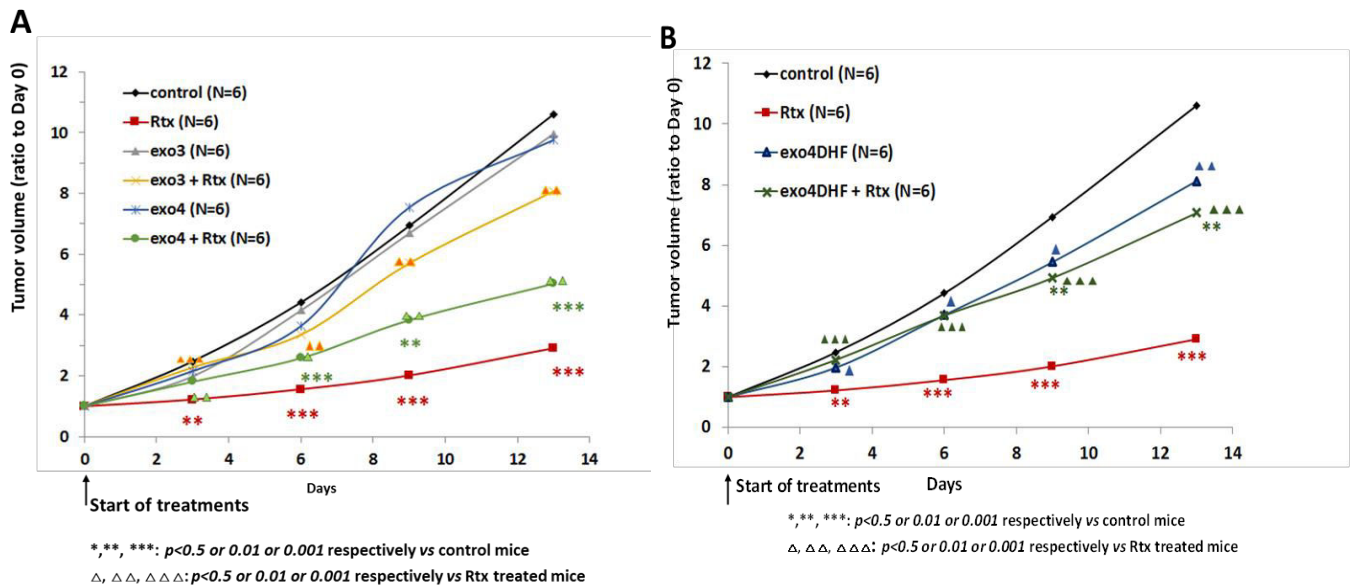


Figure 3. *In vivo* experimental approach: effect of exosomes on the rituximab efficacy in a GCB-DLBCL xenograft model. For the GCB-DLBCL xenograft model, SCID mice were injected with 1×10^7 SUDHL4 cells subcutaneously. Mice were injected i.p. twice per week for 3 weeks with exosomes purified from supernatants of different cell cultures: exosomes from OCI-LY3 cell cultures (exo3), exosomes from SUDHL4 cell cultures (exo4), exosomes from SUDHL4 cells treated with 500 nM DHF (exo4DHF). Mice were also injected (i.p) or not (control injected with vehicle) at the same times with rituximab (25 mg/kg) (Rtx). Tumor size was measured every 3 days during 2 weeks and tumor volume is expressed as the ratio to tumor size at day 0 for each group (N=6 mice/group – Student’s t test). (A) GCB and ABC derived exosomes differentially reduced rituximab efficacy on tumor growth. (B) Effect of TrkB activation by 7,8-DHF on the capacity of exosomes to allow rituximab escape.

Discussion

We have previously shown that autocrine BDNF/TrkB survival pathways may affect rituximab efficacy in DLBCL (Dubanet et al, 2015). Present study provides for the first time *in vitro* and *in vivo* evidence for a role of TrkB in cell escape from rituximab treatment that could involve exosomal CD20 regulation.

Decreased CD20 expression has been postulated to be one of the most important etiologies contributing to rituximab resistance. The impact of CD20 levels at onset of the disease on patient prognosis has been analyzed, showing a significantly inferior overall and progression-free survival for CD20 negative patients who received R-CHOP treatment compared to patients

who were CD20 normal (Suzuki et al, 2012). Moreover, a CD20-negative phenotypic transformation was observed in patients after rituximab treatment, and in B lymphoma cells rituximab was shown to down regulate CD20 gene expression partially by using epigenetic mechanisms (Czuczman et al. 2008; Hiraga et al., 2009; Miyoshi et al., 2012). Thus, targeting the modulation of CD20 membrane expression is still an important challenge for novel therapy in DLBCL.

7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF) is a member of the flavonoid family that has been identified as the first small-molecule compound that crosses the blood brain barrier, binds with high affinity and specificity to the BDNF, and activates its down-stream signaling cascade (Jang et al, 2010). We have previously shown in ABC and GCB DLBCL cell lines that BDNF and TrkB can realize autocrine loops that may be involved in tumor cell survival. Moreover, Trk inhibition (K252a) induced apoptosis of DLBCL cells and significantly potentiated the cytotoxic effects of rituximab *in vitro* and *in vivo* in a SUDHL4-DLBCL xenograft model (Dubanet et al., 2015). In the present work, we used 7,8-DHF to mimic BDNF effect in DLBCL cells. We show that 7,8-DHF protected DLBCL cells from rituximab-mediated apoptosis and this effect was cancelled in presence of the pan-Trk inhibitor, K252a. These results, with the enhanced phosphorylation of TrkB induced by 7,8-DHF, demonstrate the survival protection realized by BDNF/TrkB pathway in DLBCL that may lead to rituximab resistance. Erk and Akt signaling pathways, involved in the TrkB signaling (Arévalo & Wu, 2006) have been also demonstrated to control the up-regulated expression of CD20 on human tumor B cells (Wojciechowski et al, 2005; Winiarska et al, 2014). Thus, we further evaluated the role of TrkB activation on the regulation of CD20 membrane expression. We first analyzed CD20 membrane level of DLBCL cells exposed to different treatments. We confirmed the previously reported down-regulation of CD20 level after rituximab exposure (Johnson et al. 2009; Miyoshi et al, 202). Moreover, we show that this effect is observed in GCB as well as in ABC DLBCL cell lines. However, no significant variation of membrane CD20 levels was found after incubation with 7,8-DHF or K252a alone.

Exosome secretion occurs in a variety of different cell types, especially tumor cells and hematopoietic cells, including B and T lymphocytes (Raposo et al, 1996; Bobrie and Théry, 2013). The biologic functions attributed to tumor-derived exosomes include immune-suppression, stimulation of angiogenesis, and modulation of the tumor stroma (Andreola et al, 2002; Liu et al, 2006; Zhang et al., 2015). However, exosome secretion may also contribute to drug resistance. Indeed, exosome release from B-cell lymphoma cells, by the expression of

CD20, has been shown to act as decoy targets upon rituximab exposure, allowing lymphoma cells to escape from humoral immunotherapy (Aung et al, 2011). Moreover, recently DLBCL cells were shown to efficiently extrude doxorubicin and pixantrone, in part compacted in exosomes (Koch et al, 2016). However, mechanisms of CD20 regulation at the exosomal level need to be clarified for the different DLBCL cell sub-types. Thus we evaluated also CD20 expression in exosomes derived from GCB in comparison to ABC cell lines. Results show that exosomal CD20 expression was variable independently of the sub-type of DLBCL, with a higher level for exosomes derived from OCI-LY3. This variation may mirror the differences in CD20 membrane levels in parental cell lines, as it has been reported among tumor B cell lines, or in patients (Olejniczak et al, 2006; Johnson et al, 2009). Of interest, present data show that rituximab also determines a strong reduction of CD20 expression at the exosomal level in GCB and ABC cell lines. To our knowledge, this is the first report suggesting that CD20 expression in exosomes is down-regulated by rituximab. In addition even preliminary, we found for the first time that TrkB activation enhances *in vitro* CD20 expression in exosomes derived from SUDHL4 cells. To further evaluate *in vivo* the role of exosomes in rituximab susceptibility of DLBCL cells, we established xenografts of SUDHL4 cells in SCID mice. We found that exosomes may have *in vivo* a differential protective effect against rituximab treatment, depending of DLBCL sub-type. OCI-LY3-derived exosomes were more effective than SUDHL4-derived exosomes. We hypothesize that this effect could be associated to the higher exosome CD20 levels demonstrated for OCI-LY3 cells by the *in vitro* analysis. Of interest, exosomes-derived from SUDHL4 cells exposed to the TrkB agonist were able to strongly inhibit *in vivo* the rituximab efficacy on tumor growth. Eventhough these data have to be confirmed, they strongly suggest that, by enhancing CD20 level on exosomes, TrkB activation may allow cells to escape rituximab therapy. This effect of TrkB could be mediated by activation of PI3K/AKT and ERK signaling pathways that have been recently identified as important regulators of *CD20* transcription and CD20 level in tumor B-cells (Winiarska et al., 2014) (Wojciechowski et al., 2005). However, additional experimental data are needed to confirm the molecular mechanisms of TrkB-regulated exosomal CD20 expression.

In conclusion, results presented in this study, as shown in the schematic representation (figure 4) show for the first time in DLBCL that TrkB signaling pathway could be involved in tumor B-cell resistance to rituximab-mediated apoptosis by regulating both cell survival and exosomes CD20 level. Thus, the cell sensitivity to rituximab therapy involving CD20 expression at

cellular and exosome membranes may be influenced by differential BDNF/TrkB signaling that could vary in function of the sub-type or aggressive phenotypes of DLBCL.

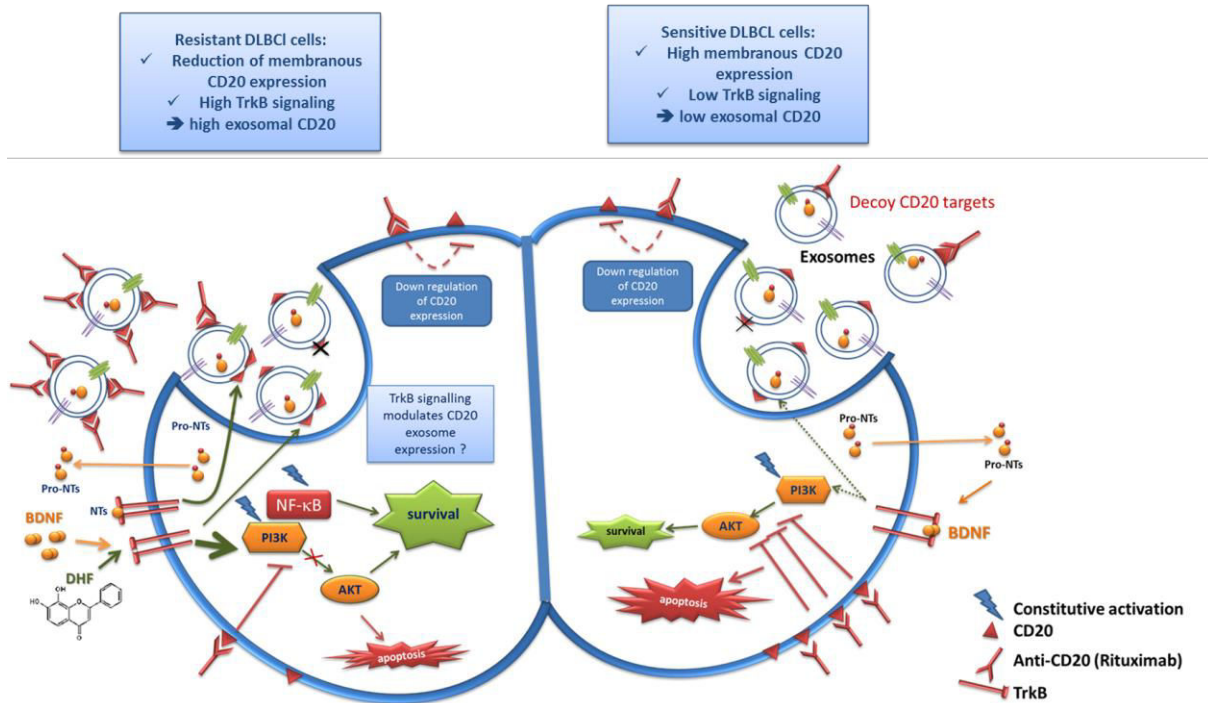


Figure 4. Schematic representation of how neurotrophin signaling may interfere with rituximab sensitivity. Recent data show that exosomes released from aggressive B-cell lymphoma cells carry the CD20 antigen and act as decoy targets upon rituximab exposure, allowing lymphoma cells to escape from humoral immunotherapy. Binding of BDNF (or the TrkB agonist, 7,8-DHF) to its high-affinity receptor TrkB triggers activation of several survival signaling pathways, such as the PI3K/Akt, MAPK and NF-κB known to be inhibited in the apoptotic effect of rituximab. Recently we have demonstrated that BDNF can realize autocrine/ paracrine loops involved in the survival of human DLBCL cell lines. Our present data strongly suggest that TrkB signaling may affect also rituximab sensitivity, and thus therapeutic resistance, in regulating CD20 exosomal expression that could vary between DLBCL subtypes (ABC and GCB).

References

- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-511.
- Andreola G, Rivoltini L, Castelli C et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 2002; 195:1303–16.
- Arévalo, J. C., and S. H. Wu. « Neurotrophin Signaling: Many Exciting Surprises! » *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63 2006; 13: 1523-37.
- Aung T, Chapuy B, Vogel D, et al. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(37): 15336-41.

- Bellanger C, Dubanet L, Lise MC, et al. Endogenous neurotrophins and Trk signalling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS One* 2011; 6: e27213.
- Bobrie A, Théry C. Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal? *Biochem Soc Trans.* 2013; 41(1): 263-7.
- Bonavida B. Postulated mechanisms of resistance of B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab treatment regimens: strategies to overcome resistance. *Semin Oncol.* 2014; 41(5): 667-77.
- Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene.* 2007; 26(25): 3603-13.
- Czuczman, M.S., Olejniczak, S., Gowda, A., et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(5):1561-70.
- Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor B κ B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1861–74.
- Dubanet L, Bentayeb H, Petit B, et al. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Cancer.* 2015; 113(6): 934-44.
- Gutzeit C, Nagy N, Gentile M, et al. Exosomes derived from Burkitt's lymphoma cell lines induce proliferation, differentiation, and class-switch recombination in B cells. *J Immunol.* 2014; 192(12): 5852-62.
- Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(7):14240-69.
- Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* 2009; 113: 4885–93.
- Jang SW, Liu X, Yepes M, et al. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(6):2687-92.
- Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood* 2009; 113(16): 3773-80.
- Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med.* 2013; 91(4): 431-7.
- Koch R, Aung T, Vogel D, Chapuy B, et al. Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone. *Clin Cancer Res.* 2016; 22(2): 395-404.
- Lam LT, Davis RE, Pierce J, et al. Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 28–40
- Liu C, Yu S, Zinn K, et al. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* 2006; 176: 1375–85.
- Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med* 2010; 362(15): 1417-29.
- Miyoshi H, Arakawa F, Sato K, et al. Comparison of CD20 expression in B-cell lymphoma between newly diagnosed, untreated cases and those after rituximab treatment. *Cancer Sci* 2012; 103(8): 1567-73
- Olejniczak SH, Stewart CC, Donohue K, Czuczman MS. A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. *Immunol Invest* 2006; 35: 93-114.
- Raposo G, Nijman HW, StoorvogelW, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996; 183: 1161–72.

- Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011; 24: 203-16.
- Suzuki Y, Yoshida T, Wang G, et al. Association of CD20 levels with clinicopathological parameters and its prognostic significance for patients with DLBCL. *Ann Hematol* 2012; 91(7): 997-5.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3: Unit 3.22.
- Winiarska M, Bojarczuk K, Pyrzynska B, et al. Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *MAbs*. 2014; 6(5): 1300-13.
- Wojciechowski W, Li H, Marshall S, et al. Enhanced expression of CD20 in human tumor B cells is controlled through ERK-dependent mechanisms. *J Immunol* 2005; 174(12): 7859-68.
- Wright G, Tan B, Rosenwald A, et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9991-6.
- Zhang X, Yuan X, Shi H, et al. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol* 2015; 8: 83.

Article 3: Préambule

Emergence en oncologie du rôle des prohibitines et des facteurs d'initiation de la traduction protéique : évaluation d'un nouvel outil thérapeutique pour les DLBCL, les flavaglines.

Les flavaglines (ou rocaglamides) sont une famille de molécules, dérivées du rocaglamide extrait de plantes asiatiques du genre *Aglaia*, qui présentent des propriétés anticancéreuses uniques. La première flavagline bioactive, le rocaglamide, a été identifiée en 1982 sur la base de ses effets anti-leucémiques (King et al., 1982). Depuis, une centaine de flavaglines naturelles ont été caractérisées à partir de ces plantes, qui ont toutes une structure chimique de type cyclopenta[b]benzofurane. Ces molécules présentent des effets inhibiteurs de la croissance tumorale à des concentrations très faibles (nM) (Li-Weber, 2015). Leurs fonctions antitumorales ont été démontrées *in vitro* sur plusieurs lignées tumorales, mais aussi *in vivo* dans différents modèles de cancers murins (notamment du sein, de la prostate et dans des leucémies à cellules B), et sur la croissance tumorale de xénogreffes réalisées chez la souris de différentes lignées tumorales humaines (Kim et al., 2006, Lucas et al., 2009). L'intérêt pour ces composés vient notamment du manque de toxicité envers les cellules saines normales (cellules endothéliales de la veine ombilicale, cellules épithéliales intestinales, lymphocytes périphériques, cellules souches hématopoïétiques et cardiomyocytes) (Ribeiro et al., 2012). De plus, un certain nombre d'études *in vivo* ont montré que ces molécules sensibilisent à l'effet de drogues de la chimiothérapie et interfèrent avec certaines résistances thérapeutiques (Basmadjian et al., 2013). Dès 1996 on a attribué l'effet anti-tumoral de ces molécules à une inhibition de la synthèse protéique, mais les mécanismes moléculaires n'ont été découverts que beaucoup plus tard. Ainsi ce n'est qu'en 2008 que l'activité anti-tumorale de certaines flavaglines comme la molécule naturelle, le silvestrol, a été attribuée à leur capacité à interférer avec l'activité de l'hélicase eIF4A, empêchant l'incorporation de la protéine eIF4A libre dans le complexe eIF4F (Bordeleau et al., 2008). La capacité du silvestrol (ou de l'épisilvestrol) à se lier à eIF4A a été confirmée en 2013 par Chambers et al, avec une très haute spécificité. De plus, en 2012 les prohibitines PHB1 et PHB2 ont été identifiées comme d'autres cibles des flavaglines (Polier et al., 2012). Cette découverte est très intéressante en oncologie, car en se fixant sur les PHBs, les flavaglines inhibent la signalisation Ras-c-Raf-MEK-ERK, voie de survie très souvent suractivée dans de nombreux types de cancers. En effet, c-Raf doit interagir avec les PHBs pour être ensuite phosphorylé par Ras et ainsi déclencher la cascade des MAPK menant à Erk (Rajalingam et al., 2005). De plus, en se liant aux PHBs et en inhibant la

signalisation Ras-c-Raf-MEK-ERK, les flavaglines inhibent aussi la phosphorylation et l'activation de kinases en aval dont les Mnk (MAP kinase signal-integrating kinases). Or le substrat des Mnk, qui est fortement impliqué par ses fonctions oncogéniques dans la biologie des cellules tumorales, est le facteur d'initiation eIF4E (Proud, 2015). En effet, eIF4E intervient dans la formation du complexe eIF4F impliqué dans la traduction « cap-dépendante » des ARNm, qui est composé de 3 protéines distinctes: l'eIF4E qui lie spécifiquement la coiffe méthylée en 5' de l'ARNm (m7Gppp-), l'hélicase eIF4A et une molécule « d'échafaudage » eIF4G qui assure la cohésion de l'ensemble. Bien que la signification de la phosphorylation de l'eIF4E (sur la Ser209 de son extrémité C-terminale) ne soit pas encore tout à fait comprise, elle a été associée à une augmentation de l'affinité de liaison de l'eIF4E pour la coiffe des ARNm. De plus, eIF4E stimulerait préférentiellement la traduction de certains ARNm (dits « eIF4E sensitive ») codant pour des protéines de survie et oncogènes impliqués dans le développement tumoral et/ou le processus métastatique tels que les cycline D1 et D3, c-Myc, le VEGF (vascular endothelial growth factor), Bcl-2 ou c-Myc (Graff et al., 2008, Robert et al., 2009). Ainsi, les niveaux de la forme phosphorylée et totale du facteur eIF4E ont été retrouvés très élevés dans un certain nombre de cancers chez l'homme et associés à un mauvais pronostic y compris dans les DLBCL (Demosthenous et al., 2015, Proud, 2015).

Le groupe de Laurent Désaubry (UMR 7200, Université de Strasbourg) avec qui l'équipe EA3842 collabore, synthétise des flavaglines et a identifié des dérivés présentant des activités biologiques supérieures aux molécules naturelles. De façon intéressante, ces nouvelles flavaglines dont celle que nous avons utilisée dans ce travail de thèse, le FL3, ont la capacité de se lier aux cibles moléculaires décrites précédemment, PHBs et eIF4A, ne sont pas soumises au mécanisme d'efflux des drogues (résistance multi-drogues, MDR) et potentialisent les effets anticancéreux des anthracyclines (Thuaud et al., 2009, Polier et al., 2012, Boussebart et al., 2014). Ces dernières années, comme nous venons de l'évoquer, un certain nombre de travaux ont montré l'intérêt dans divers cancers, y compris les lymphomes agressifs comme les DLBCL, à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant la machinerie de traduction protéique (Hagner et al., 2010, Horvilleur et al., 2014). De plus, alors que des études très récentes relatent que l'augmentation d'expression de PHB1 est associée à un mauvais pronostic dans certains cancers, comme le cancer du poumon non à petites cellules (Zhu et al., 2015), aucune donnée n'existait, au démarrage de notre thèse, sur le rôle des PHBs dans les DLBCL.

C'est pourquoi dans cette dernière partie de notre travail nous avons évalué les effets anti-tumoraux d'une flavagline synthétique, le FL3, et notamment en lien avec une potentielle

sensibilisation aux effets cytotoxiques de l'immunothérapie. En effet, comme on l'a vu, ces flavaglines ciblent des signalisations différentes (PHBs, eIF4A) mais qui pourraient s'avérer complémentaires des effets cytotoxiques des anti-CD20.

Les résultats obtenus et présentés ci-après ont fait l'objet d'un article que nous avons soumis pour publication dans le journal *Blood*.

Article 3: Evidence for the biological and therapeutic relevance of the prohibitin and EIF4A ligand, FL3, in non-Hodgkin B cell lymphoma.

Hafidha Bentayeb¹, Lydie Dubanet¹, Qian Zhao², Laurent Désaubry^{2,3}, Armand de Gramont⁴, Eric Raymond^{4,5}, Barbara Petit⁶, Agnès Olivrie⁷, Dominique Bordessoule⁷, Marie-Odile Jauberteau¹, and Danielle Troutaud^{1*}.

¹EA3842, Université de Limoges, France; ²Therapeutic Innovation Laboratory, UMR7200, CNRS/Université de Strasbourg, Illkirch, France, ³Sino-French Joint Lab of Food Nutrition/Safety and Medicinal Chemistry, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China, ⁴AFR Oncology, 1 place Paul Verlaine, Boulogne-Billancourt, France, ⁵Beaujon University Hospital (AP-HP – PRES Paris 7 Diderot), 100 boulevard du Général Leclerc, Clichy, France, ⁶Laboratoire d'Anatomie-Pathologique, CHU de Limoges France, ⁷Service d'Hématologie Clinique, CHU de Limoges, France.

Running title: anticancer mechanisms of flavaglines in DLBCL

Funding: This research was supported by Cancéropôle GSO (Grand Sud Ouest) and the Ligue Contre le Cancer (Haute-Vienne). Laurent Désaubry was supported by the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC). We are also grateful to ANRT for fellowships to Q.Z.

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

E-mail: danielle.troutaud@unilim.fr

Text: 4054 words- Abstract: 240 words

Number of Figures: 7 (and 1 supplementary figure) ; Number of tables: 1

Number of references: 52

Abstract

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) are highly aggressive and heterogeneous. Treatment with R-CHOP immunochemotherapy (combination of monoclonal anti-CD20 antibody, rituximab, with CHOP chemotherapy) provides a significant survival benefit for most patients, but most who fail R-CHOP have a dismal outcome. Within the last decade, next-generation sequencing technologies have unveiled the remarkable molecular complexity of DLBCL that may be exploited for therapeutic benefit. Here, we evaluated the antitumoral efficacy of FL3 in DLBCL cell lines. FL3 is a ligand of the scaffold proteins, prohibitin 1 and 2, and the initiation factor of translation, eIF4A. FL3 strongly induced apoptosis of DLBCL cells *in vitro* and *in vivo* in a GCB-DLBCL xenograft murine model. It also sensitized GCB and ABC cell lines to the cytotoxic effect of rituximab. Apoptosis was associated with prohibitin 1 (PHB1) translocation from mitochondria to the nucleus, suggesting a role in FL3-induced cell death of DLBCL cells. FL3 reduced ERK and eIF4E phosphorylation and downregulated total Akt and VEGF protein levels. It also directly altered eIF4F complex formation and activity. We also observed this effect in FL3 treated cells during rituximab exposure. Finally, data obtained on biopsy samples from DLBCL patients showed a high expression of PHB1 in tumor B cells that may be decisive for cell survival and patient outcome. In summary, our results suggest that the flavagline FL3, by targeting both PHB and eIF4A, may be an attractive therapeutic option, in particular to overcome resistance to immunochemotherapy.

Key points:

- The PHBs and eIF4A ligand, FL3, promotes *in vitro* and *in vivo* anti-tumoral capacities in DLBCL and synergizes rituximab-induced apoptosis.

Introduction

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) are highly aggressive non-Hodgkin lymphomas (NHLs), for which the incidence increases with age (median age at diagnosis is 70 years). Gene expression profiling subdivides DLBCLs into two major subtypes, the germinal center B-cell (GCB-DLBCL) and activated B-cell (ABC-DLBCL) subtypes. Among them, patients with GCB DLBCL have a better prognosis.¹ The pathogenesis of DLBCL is not fully understood, but recent studies have highlighted several features. Gene alterations in DLBCL primarily involve multiple lesions in genes involved in epigenetic regulation (the histone methyltransferase, MLL2), genes that control immune recognition by T cells (β 2-microglobulin, CD58, etc.), and those associated with post-germinal center differentiation, several of which lead to NF- κ B activation (CD40, Toll-like receptor, etc.).² Aberrant signaling through mTOR leads to the upregulation of eukaryotic initiation factor-4B (eIF4B) expression, a coactivator of eIF4A helicase. This results in the upregulated synthesis of downstream eIF4B targets such as DAXX, BCL2, and ERCC5, which contribute to DLBCL survival and chemoresistance.³ Moreover, aberrant expression of several biomarkers, including MYC, BCL2, eIF4E, and VEGF, have been linked to a poor prognosis.⁴⁻⁶ R-CHOP immunochemotherapy (a combination of anti-CD20 antibody, rituximab, with CHOP chemotherapy) provides a significant survival benefit to most patients, but approximately 10-15% of patients exhibit primary refractory disease and 20-25% relapse after initial response to therapy.⁷ Many elderly patients are not eligible for intensive therapeutic approaches, and the outcome in patients who fail R-CHOP is dismal.⁷⁻⁹ The development of new drugs is still clearly needed to target relapsing or non-responsive patients.

Flavaglines are natural compounds, characterized by a common cyclopenta[*b*]furan skeleton, that are extracted from medicinal plants of the genus *Aglaia* and display anticancer activities.¹⁰ These compounds inhibit the proliferation of tumor cells at low concentrations without toxicity to normal cells, and show no sign of toxicity in mice. They trigger apoptosis through various pathways including those that involve cytochrome C, apoptosis inducing factor (AIF), and caspase 12, as well as the JNK and p38MAP kinase pathways, depending on the cancer cell type.¹¹⁻¹⁴ Although flavaglines have been known to inhibit protein synthesis since 1996, their molecular mechanism has only been recently uncovered. They exert their activities by binding to eukaryotic initiation factor-4A (eIF4A) and prohibitins (PHBs)¹⁵⁻¹⁸, which have been recently identified as therapeutic targets in oncology, including lymphoma.^{19,20} Binding to eIF4A leads to translational inhibition through stabilization of RNA-bound eIF4A in the eIF4F

complex, preventing new incorporation of free eIF4A.^{15,21} Prohibitin 1 (PHB1) and prohibitin 2 (PHB2) are scaffold proteins that have been implicated in the regulation of diverse cellular processes, including the Ras-mediated c-Raf-MEK-ERK signaling pathway.^{22,23} Binding of flavaglines to PHBs specifically inhibits the PHB-c-Raf interaction, thus preventing membrane localization of the complex.¹⁶ Inhibition of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway by flavaglines also leads to down-regulation of MNK-1-mediated phosphorylation of eIF4E, and consequently, the cap-dependent synthesis of many proteins involved in cell division and resistance to apoptosis.^{16,18}

Inhibition of eIF4A and prohibitins using flavaglines may be a potential therapeutic strategy for DLBCL. Here, we show that flavagline-dependent interference with the eIF4F complex and survival pathways resulted in significant antitumoral efficacy using cell lines and a GCB-DLBCL xenograft murine model.

Methods

Patient samples

Tumor biopsy specimens were obtained before treatment from 53 patients with de novo DLBCL treated in the hematology department of Dupuytren Hospital (Limoges, France). The clinical features of these patients have been previously described.²⁴ Tumors were classified according to the World Health Organization classification²⁵ and categorized as belonging to the germinal center B-cell (GCB) or non-GCB subtype according to the Hans algorithm based on CD10, BCL6, and MUM1 expression.²⁶ All samples were studied after approval of the local ethics committee (N° 98-2012-23).

Cell culture

Two GCB-DLBCL lines (SUDHL4 and SUDHL6 - DSMZ) and two ABC-DLBCL lines (OCI-LY3 and OCI-LY10 given by Pr. Feuillard, UMR CNRS 7276, Limoges University, with the kind agreement of the Louis M. Staudt, National Cancer Institute, USA) were used. Cells were grown in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Hyclone), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Gibco).

Cell viability assay

5×10^4 cells/well were seeded in flat-bottom 96-well microtiter plates (Starsted, Inc.) and FL3 (0-100 nM) or solvent (DMSO) was added in triplicate. FL3 was synthesized according to an established procedure.²⁷ Cell viability was assessed after 48 and 72 h using the XTT assay (Cell Proliferation Kit II, XTT Roche) according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as the relative cell viability (ratio) compared to untreated control cells. Nonlinear dose-response curves were fitted to the data using Graphpad Prism Version 5 software. From these curves, GI50 (the concentration of FL3 at which the fraction of affected cells is 50%) and Emax values (the fraction of affected cells at the maximum effect of FL3) were calculated for each DLBCL cell line tested.

Analysis of apoptosis

DLBCL cells (1×10^6 cells/mL) were treated with FL3 (20 nM) or rituximab (RTX, 1 and 20 μ g/mL MabThera®, a generous gift from the CHRU Dupuytren of Limoges, Pharmacie Centrale) alone or in combination. After 48 h, apoptosis was determined using the propidium iodide (PI)/Annexin V-FITC double staining method (kit Beckman Coulter, Immunotech) as previously described.²⁸

Immunofluorescence and confocal microscopy

The cellular (mitochondria, nucleus) localization of AIF and PHB1 upon FL3 exposure was studied by immunofluorescence staining and confocal microscopy analysis. Details are given in the Supplemental Methods.

Subcellular fractionation

For analysis of the intracellular trafficking of AIF and PHB1, subcellular fractionation was performed using a nuclear/cytoplasmic fractionation kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's protocol. We used GAPDH (Sigma Aldrich) and Histone 3 antibodies (Santa Cruz) as controls for the cytoplasmic and nuclear fractions, respectively.

Western blotting

Proteins were obtained from whole cell lysates using lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% NP-40, 10% glycerol, and 150 mM NaCl supplemented with 1% protease and phosphatase inhibitor mixtures) (Sigma) as previously described.²⁴ The proteins (50 μ g/lane) were then separated on 5-15% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes (Merck

Millipore). The membranes were probed with the primary Abs: mouse anti-Akt, rabbit anti-phospho-Ser473Akt, rabbit anti-Erk1/2 or anti-phospho-Erk1/2, anti-AIF, anti-PHB1, anti-eIF4E or anti-Phospho-eIF4E (Cell signaling Technology), mouse anti-PARP (Santa Cruz Biotechnology) and anti- β actin (Sigma), and rabbit anti-VEGF (Abcam) and then with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:1000, DakoCytomation). Blotted proteins were detected and quantified using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) and a bioimaging system (Genesnap; Syngene).

7-Methyl-GTP cap binding assay

5×10^5 cells were washed in PBS and resuspended in lysis buffer. After centrifugation, (16 000 x g for 10 min at 4°C) 200 μ g protein was applied to 20 μ L immobilized γ -aminophenyl-7-methyl-guanosine 5'-triphosphate (m7GTP) agarose beads (Jena Bioscience) and incubated for 3 h at 4°C. The samples were analyzed for eIF4A and eIF4E by western blotting.

Cell supernatant VEGF immunoassay

Growth medium was collected and VEGF-A levels were determined using the human VEGF ELISA kit (PeproTech), according to the manufacturer's instructions. All tests were performed in duplicate. Results are expressed in pg/ml.

Immunohistochemistry (IHC)

IHC stainings were performed as previously described using the Envision Kit (Dako Denmark A/S).²⁹ Rabbit anti-PHB1, anti-PHB2, anti-AIF antibodies were purchased from Cell Signaling Technology and mouse anti-Ki67 was obtained from Dakko. Mouse and rabbit isotypic control antibodies were purchased from Sigma. For PHB expression in biopsy samples, the staining intensity was scored from 0 to 4 as follows: 0, negative; 1, weak; 2, moderate; 3, strong; 4, very strong. All tumor samples were PHB1 positive. For statistical analysis, a staining index score ≥ 3 indicated tumors with high PHB1 expression, and < 3 low PHB1 expression.

***In vivo* Xenografts**

All animal studies were conducted in accordance with the guidelines established by the internal Institutional Animal Care and Use Committee (CREEAL N°2-07-2012). Four-week-old SCID mice (CB17.SCID) were supplied by Janvier Labs. Mice were inoculated with 1×10^7 SUDHL4 cells subcutaneously. All animals were ear-tagged and monitored individually. After the tumors had become established (~6 weeks) i.p. administration of FL3 (15 mg/kg diluted in DMSO/PBS with 5% Cremophor) or vehicle alone (DMSO/PBS with 5% Cremophor) was performed two

times per week for two weeks. The tumor volume (cm³) was estimated by three weekly measurements and calculated using the formula length x width x height. Mice were killed after 13 days of treatment and tumor samples were harvested for analysis.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using StatView v5.0 software (SAS Institute; Cary, NC). Significance between groups in the *in vitro* and xenograft studies was determined using the Student's t-test. For the DLBCL patient studies, correlations between quantitative variables were assessed using the Spearman rank correlation coefficient. The duration of overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis to the date of last follow-up or death. The duration of progression-free survival (PFS) was calculated from the date of diagnosis to the time of progression or death. Kaplan-Meier survival curves were used to estimate OS and PFS rates, and the log-rank (Mantel-Cox) test was used to assess differences in survival between groups. *P* values < 5% were considered to be statistically significant

Results

FL3-mediated cell cytotoxicity in DLBCL cells

The cytotoxicity of FL3 (1-100 nM) was evaluated on GCB (SUDHL4 and SUDHL6) and ABC (OCI-LY3 and OCI-LY10) DLBCL subtype cell lines. FL3 significantly reduced cell viability of all cell lines after 72 h of treatment with 50% growth inhibition (GI₅₀) values between 15 and 32 nM (Figure 1A). Cytotoxicity increased slightly in a dose- and time-dependent manner, but the cell lines were relatively resistant to high concentrations of FL3 with a maximum of 51 to 61% cells affected (E_{max}) at 100 nM. We further investigated the cell signaling pathways involved in FL3-mediated cytotoxicity. Using the propidium iodide (PI)/Annexin V-FITC double staining method, we demonstrated that 20 nM FL3 induced apoptosis in all cell lines tested as shown for SUDHL4 and OCI-LY10 cells in Figure 1B. This effect was confirmed by detection of the cleaved form of the caspase substrate polyADP-ribose polymerase (PARP, Figure 1C). Flavaglines, particularly FL3, have been shown to sensitize cells to drug targeted therapy³⁰. We thus investigated whether FL3 could potentiate rituximab-induced apoptosis in GCB, and ABC DLBCL cell lines that are less sensitive to rituximab (Figure 1B and C). FL3 enhanced rituximab cytotoxicity in resistant ABC cell lines (OCI-LY3 or OCI-LY10) and the combination proved to be synergistic in the SUDHL4 and OCILY-10 cell lines (Figure 1 B).

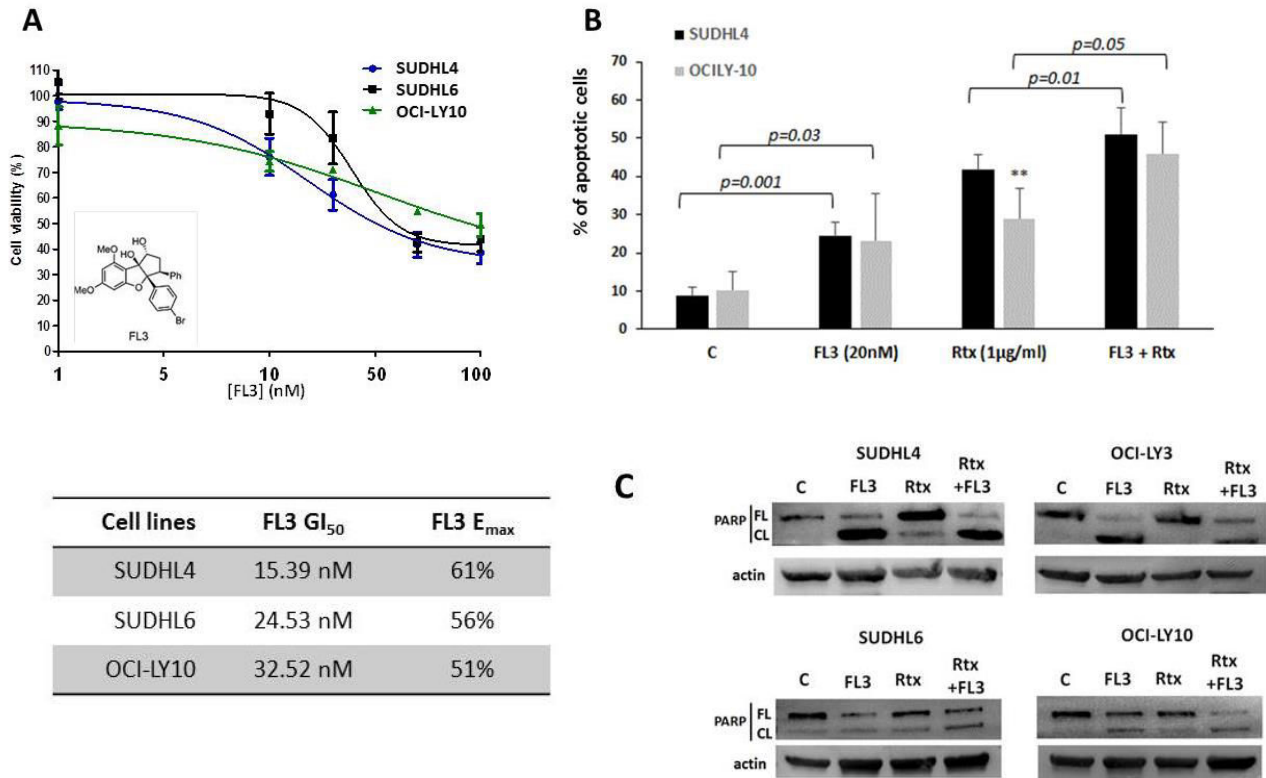


Figure 1. Apoptosis is involved in FL3-mediated cytotoxicity in GCB- and ABC-DLBCL cell lines. (A) Dose-response of GCB (SUDHL4/6) and ABC (OCI-LY10) DLBCL cell-line viability after 72 h FL3 treatment using the XTT test. The plot shows the means \pm SEM of four independent experiments performed in triplicate. Inset: The chemical structure of FL3. The table shows 50% growth-inhibition values (GI₅₀) and maximum effected cells (E_{max}) for each cell line. (B) Flow cytometry analysis of cellular apoptosis induced by DMSO (Control) or 20 nM FL3 with or without rituximab (1 μ g/ml) for 72 h by PI/Annexin V-FITC double staining. Results are shown for the SUDHL4 and OCI-LY10 cell lines as the mean percentages of apoptotic cells of five independent experiments. **indicates a significant difference between the two cell lines ($p < 0.01$) (C) western blot analysis of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in GCB (SUDHL4, SUDHL6) and ABC (OCI-LY3, OCI-LY10) cell lysates from non-treated cells or cells treated with 20 nM FL3 with or without rituximab (1 μ g/ml) for 48 h. Data are representative of three independent experiments. FL: full-length (FL), CL: cleaved PARP. Actin was used as a loading control.

Mitochondria-nuclear translocation of AIF and PHB is associated with FL3-induced apoptosis

Previous reports have implicated the mitochondrial protein AIF in FL3-mediated, caspase-independent cell death.²⁷ Thus, we analyzed the localization of AIF in DLBCL cells upon exposure to FL3. We mostly detected AIF in the cytosolic fraction (Figure 2A) in non-treated cells, specifically in mitochondria, as revealed by colocalization of AIF with the mitochondrial Tom20 protein (Figure 2B). After treatment with 20 nM FL3 for 72 h, a fraction of AIF translocated to the nucleus and colocalized with DAPI staining (Figure 2A and 2B). We analyzed the expression and localization of PHBs in the DLBCL cell lines as flavaglines prevent

tumor growth and sensitize resistant cancer cells to apoptosis by binding to PHBs.¹⁶ PHB1, and to a lesser extent PHB2, were found in all DLBCL cell lines tested (Figure 2C).

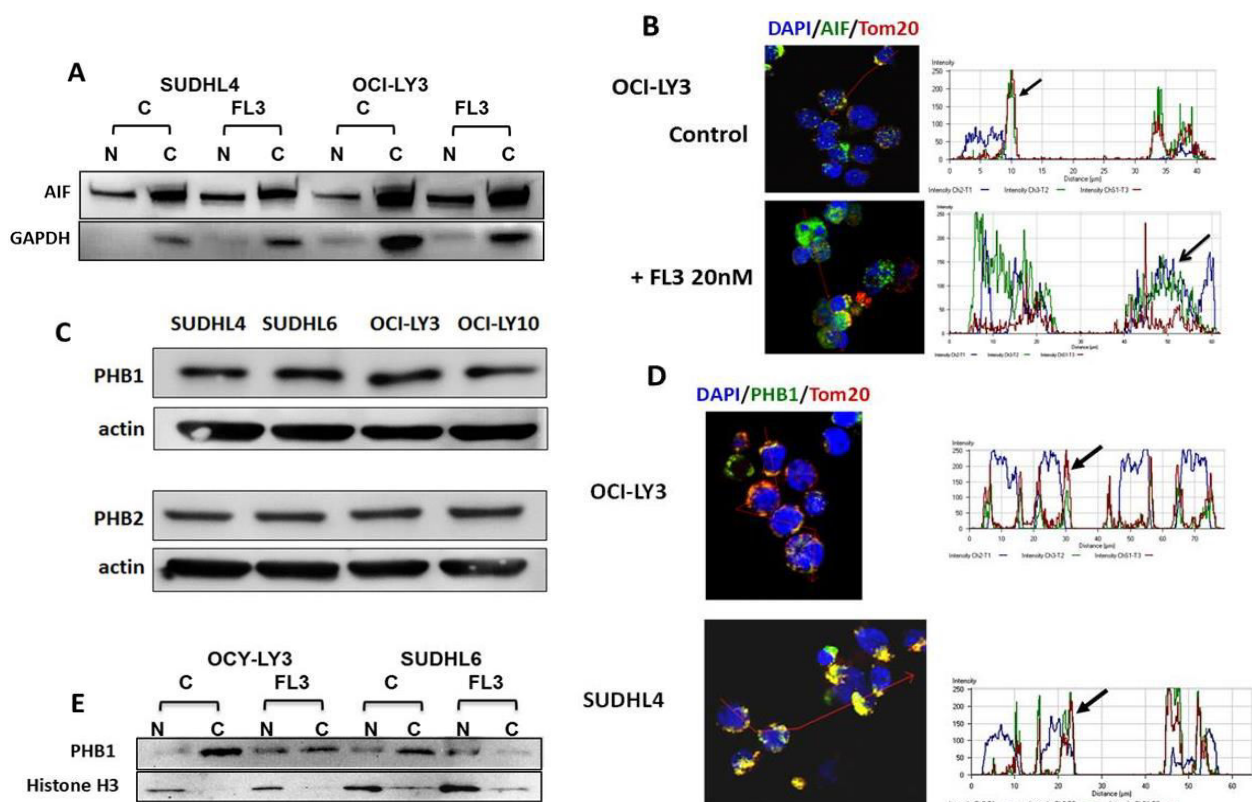


Figure 2. Shift of AIF and PHB1 from mitochondria to the nucleus during FL3-induced apoptosis in DLBCL cell lines. (A) The intracellular localization of AIF was studied in SUDHL4 and OCI-LY3 cell lysate nuclear (N) and cytosol (C) fractions after 72 h of FL3 exposure by western blot analysis. GAPDH expression was used to demonstrate the purity of the fractions. Results are representative of two independent experiments. (B) Nuclear translocation of AIF was also observed by confocal analysis as shown for OCI-LY3 cells after 72h exposure of FL3 (20 nM). Single confocal sections show fluorescence in green (Alexa-488, AIF), red (Alexa-594, Tom-20), and blue (DAPI staining, nuclei). Merged images were performed and revealed AIF/mitochondria colocalization (yellow) in control cultures and AIF/nuclear colocalization in some cells after FL3 exposure. The profiles of blue, green, and red fluorescence colocalization were analyzed using quantification software (Zeiss). The peaks of fluorescence colocalization are labelled with arrows. Similar results were obtained in three independent experiments. (C) Protein level of Prohibitin1 (PHB1) and Prohibitin2 (PHB2) in GCB and ABC cell lines was analyzed by western blotting and actin was used as a loading control. Representative images from at least three independent experiments are shown. (D) Mitochondrial localization of PHB1 in GCB and ABC DLBCL cell lines under basal culture conditions. SUDHL4 and OCI-LY3 were stained with anti-PHB1 (revealed by Alexa-488 conjugated secondary Ab) anti-Tom20 (mitochondria) and DAPI (nuclei) as indicated in (B). Merged images were performed and show substantial PHB1/mitochondria colocalizations (yellow) after 72 h of basal culture conditions. The profiles of blue, green, and red fluorescence colocalization were analyzed using quantification software (Zeiss). Examples of peaks of fluorescence colocalization are labelled with arrows. Similar results were obtained in at least three independent experiments. (E) FL3-induced nuclear translocation of PHB1 in DLBCL cell lines. OCI-LY3 and SUDHL6 cells were treated or not (control, C) with FL3 (20 nM) for 72 h. Nuclear and cytosol fractions of cell lysates were prepared and subjected to western blot analysis. Histone H3 expression was used to demonstrate the purity of the fractions. The results shown are representative of two independent experiments.

We further investigated the effect of FL3 on PHB1 localization as the subcellular localization of PHBs may determine their final effects on cell survival and apoptosis.²³ PHB1 was found mainly in the mitochondria in the control cultures, as revealed by the colocalization of PHB1 staining with the mitochondrial marker (Tom20) (Figure 2D). Subcellular fractionation followed by western blot analysis showed that PHB1 translocated into the nucleus after cell exposure to FL3 (Figure 2E). These data suggest that PHB1 translocation from mitochondria to the nucleus may be involved as AIF in FL3-induced apoptosis of DLBCL cells.

FL3 reduces ERK signaling, eIF4E phosphorylation, and eIF4A cap-binding activity in DLBCL cell lines

We first evaluated the phosphorylation status of multiple cellular kinases in DLBCL cell lines upon 48h FL3 exposure (20 nM) using the human phospho-kinase antibody array (details available in supplemental Methods). SUDHL4 and OCI-LY3 displayed a similar phosphorylation status profile (FigureS1), except for phospho-p53, reflecting the different p53 mutational status of the two cell lines (wild-type for OCI-LY3 and mutated for SUDHL4). We observed a slight decrease in phosphorylated p38 and ERK1/2 levels in SUDHL4 and OCI-LY3 cells, respectively after FL3 exposure (FigureS1B). We confirmed that 72 h FL3 treatment reduced ERK1/2 phosphorylation in both OCI-LY3 and SUDHL4 cells in a concentration-dependent manner by western blot analysis (Figure 3A). These effects strongly suggest involvement of PHB-dependent regulation of the Ras-Raf-MEK-ERK-MNK1 pathway. Consistent with this hypothesis, we observed a marked reduction in the phosphorylation of the cap binding eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), a major downstream effector of MNK1, in SUDHL4 cells and, to a lesser extent, in OCI-LY3 cells. This effect was sustained when FL3 was associated with rituximab exposure in SUDHL4 cell cultures (Figure 3 B and C).

We tested whether the formation of the eIF4F complex, and thus cap-dependent translation, is involved in FL3 cell sensitivity, as FL3 also inhibits eIF4A activity.³⁰ We determined the status of the eIF4F complex in the various cell lines using a cap-binding assay in which synthetic m7GTP-Agarose beads were used to capture eIF4E and its binding partners (i.e. eIF4A). FL3 reduced eIF4A cap-binding in the GCB and ABC cell lines tested, as well as the eIF4E protein level, particularly in SUDHL4 cells (Figure 3 D). We also observed this effect under rituximab treatment. Altogether, our results demonstrate that FL3 targets and disrupts the eIF4F complex in DLBCL cell lines whether or not they are treated with rituximab.

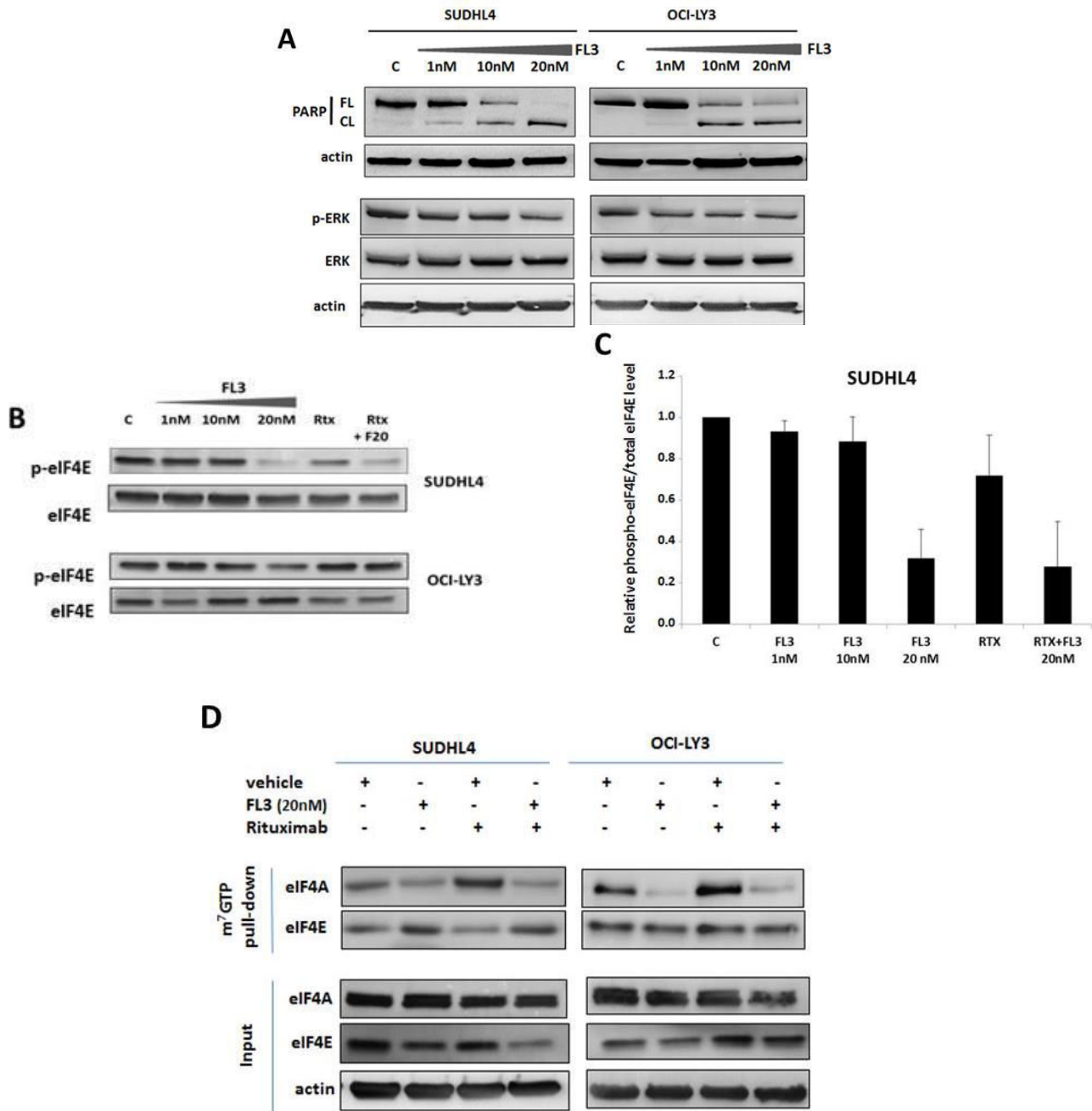


Figure 3. FL3 reduces Erk pathway and eIF4A cap-binding activity in DLBCL cell lines. Whole cell lysates of GCB (SUDHL4) and ABC (OCI-LY3) cell lines obtained from 72 h cultures in the presence or absence (C, control) of FL3 (1-20 nM) and/or Rituximab (Rtx, 1 μ g/ml) were used for western blot analysis of: (A) extracellular signal-regulated kinase ERK1/2 (ERK), phospho-ERK1/2 (p-ERK), and PARP expression. (B) Total and phospho-eIF4E protein levels. Results are representative of three independent experiments. (C) Densitometry analysis of phospho-eIF4E to total eIF4E levels is shown for SUDHL4 cell lysates. Data are the means \pm SD of three independent experiments. (D) Protein lysates from cell cultures were harvested following 72 h treatment and incubated with m⁷GTP agarose beads overnight at 4°C. Western blot analysis was performed to observe eIF4A and eIF4E binding to m⁷GTP in eluates from beads (m⁷GTP pull-down) and total extracts (input). Data are representative of two independent experiments.

Akt and VEGF protein levels are highly reduced in FL3-treated DLBCL cells.

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathway may be constitutively activated in DLBCL. Thus, we finally analyzed the phosphorylation status of Akt under FL3 treatment. We confirmed the presence of activated p-Akt in the control cell lysates, as expected (Figure 4A). We observed a large reduction of Akt phosphorylation 72 h after FL3 exposure, but in contrast to ERK1/2, this effect was associated with a significant reduction of Akt protein levels in the cell lysates relative to controls (Figure 4A). This effect was selective for Akt and did not affect other proteins, such as ERK1/2, β -actin (Figure 4A and 4B), GAPDH, or PI3K (data not shown). The decrease in Akt level was FL3 dose-dependent (Figure 4B) for all cell lines tested.

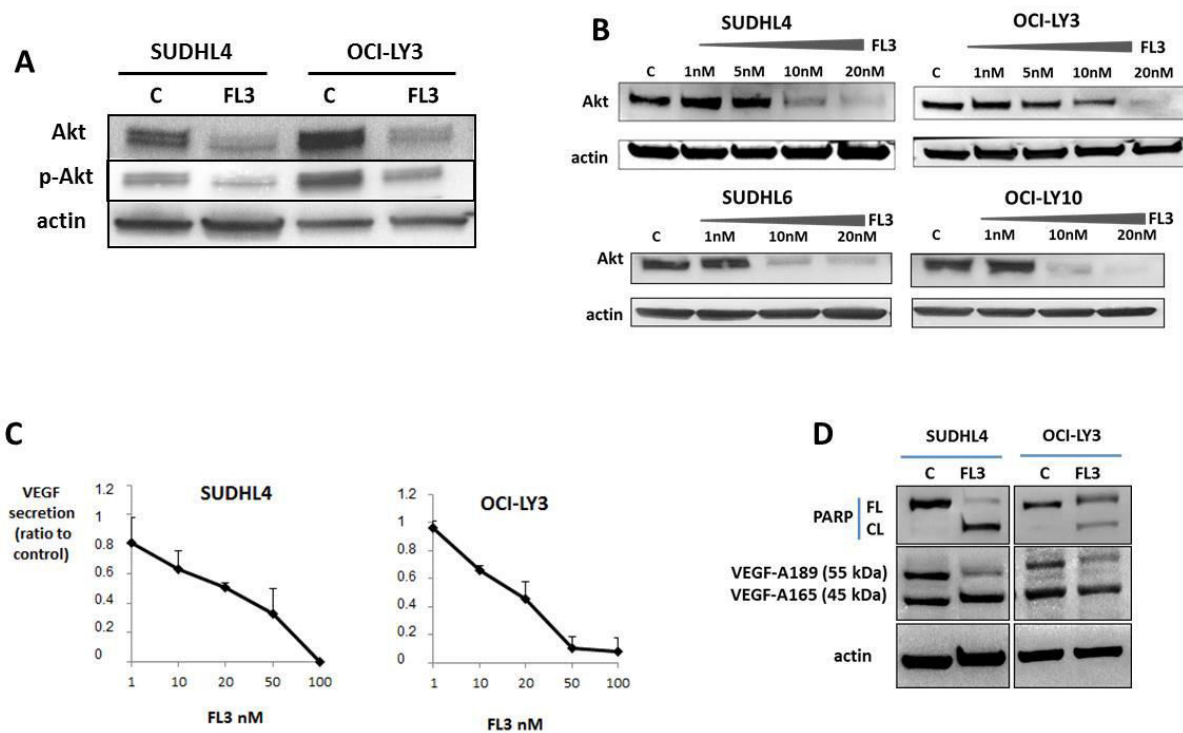


Figure 4. FL3 inhibits Akt and VEGF protein levels in a dose-dependent manner. Whole cell lysates of SUDHL4 and OCI-LY3 cell lines obtained from 72 h cultures in the presence or absence (C, control) of FL3 (1-20 nM) were used for western blot analysis of: **(A)** total (Akt) and phospho-Ser473-Akt (p-Akt) expressions **(B)** the concentration-dependent effect of FL3 on Akt protein levels in DLBCL cell lysates. Actin is shown as a loading control. Results are representative of three independent experiments. **(C)** ELISA quantification of VEGF in the supernatant of SUDHL4 and OCI-LY3 cell lines treated or not (DMSO control) with various concentrations of FL3 for 48 h. Results are expressed as the means \pm SD of biological assays performed in duplicate and obtained in two independent experiments. **(D)** Western blot analysis of VEGF in SUDHL4 and OCI-LY3 cell lysates with or without (C) FL3 treatment (20 nM). PARP cleavage was evaluated for apoptotic analysis as in Figure 1; actin was used as a loading control. Results are representative of two independent experiments.

Finally, we evaluated the protein levels of one of the downstream targets of eIF4F, VEGF, as we showed that FL3 impairs eIF4F complex formation and activity. The apoptotic effect of FL3 was associated with a strong reduction of VEGF-A secretion by DLBCL cells that was also FL3 concentration-dependent (Figure 4C). Reduced VEGF secretion in the cell supernatants correlated with a large decrease in VEGF protein levels in the cell lysates, as for Akt, that was more pronounced for the VEGF-A189 than the VEGF-A165 isoform (Figure 4D). These data confirm the effective disruption of eIF4E-driven translation by FL3 in DLBCL cells.

FL3 decreases tumor growth in a GCB-DLBCL xenograft model.

We used a DLBCL xenograft model to investigate the *in vivo* efficacy of FL3. SCID mice were subcutaneously inoculated with SUDHL4 cells and tumors were allowed to become established for six weeks before treatment. Treatment with FL3 (15 mg/kg, i.p.) induced strong and significant inhibition of DLBCL tumor growth (Figure 5A), with a 49% reduction in tumor volume 13 days after treatment relative to controls (1.64 vs 3.36 cm³). This effect was associated with reduced Ki67 expression (Figure 5B) and increased PARP cleavage (Figure 5C), demonstrating apoptosis in tumor samples of FL3 treated mice. We also observed strong localization of AIF in the nucleus of several tumor cells from FL3 treated mice by IHC analysis (Figure 5B). *In vivo* analysis confirmed that FL3-induced apoptosis was accompanied by reduced phosphorylation of ERK1/2 and decreased Akt expression in biopsy tumor samples (Figure 5C).

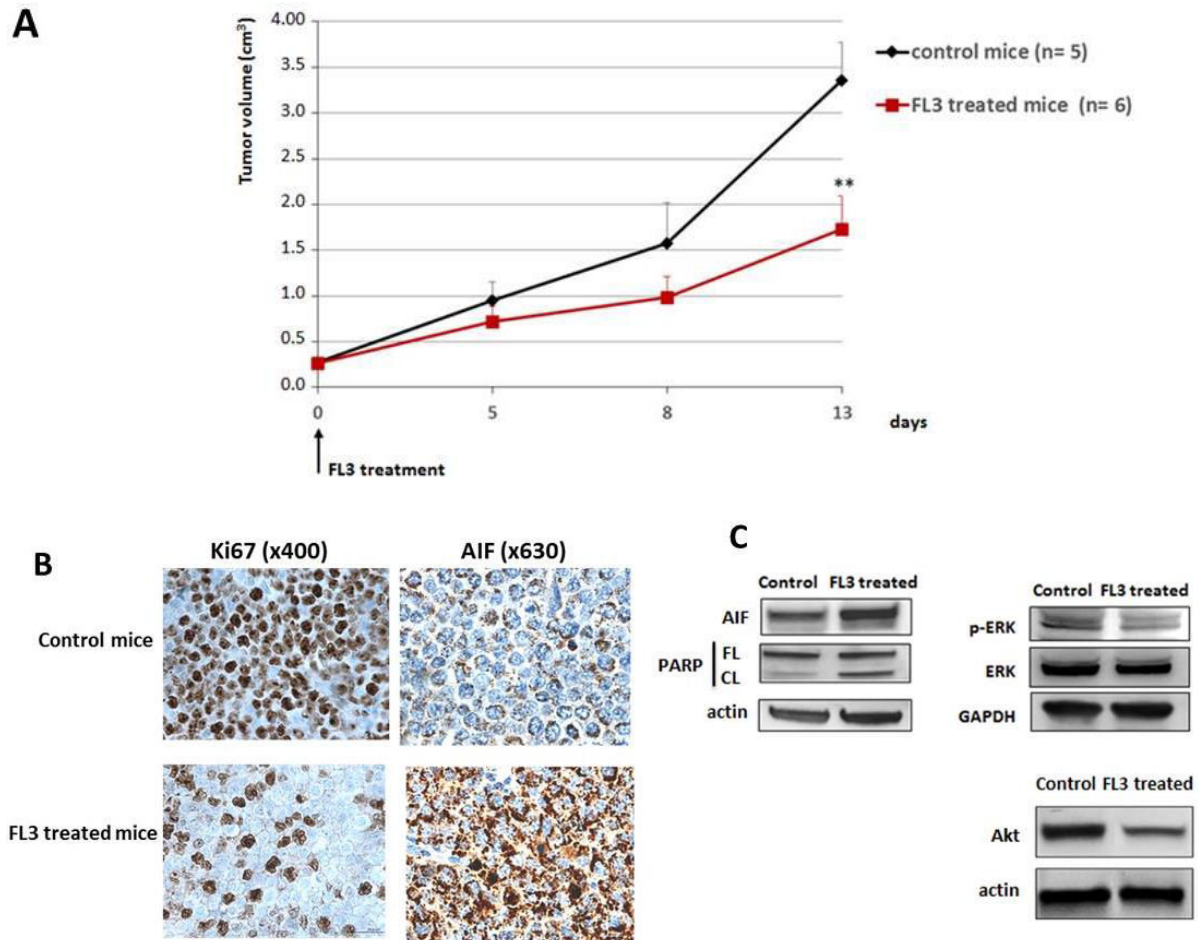
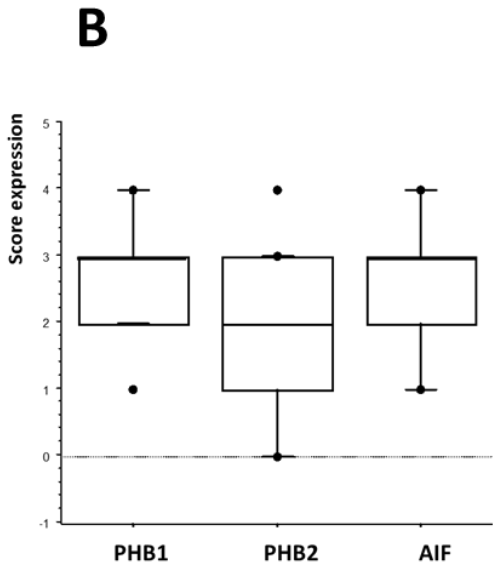
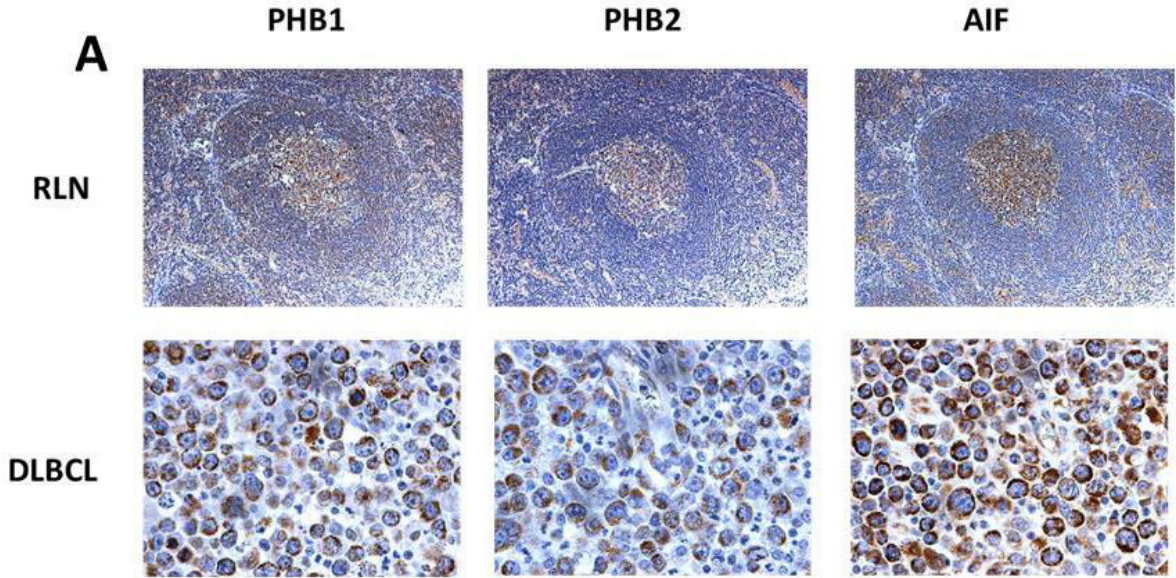


Figure 5. FL3 inhibits the growth of DLBCL tumors xenografted in mice. SCID mice bearing tumors from SUDHL4 cells were injected i.p. with either vehicle or FL3 (15 mg/kg) twice per week for two weeks. **(A)** The means \pm SEM of tumor volume from the mice are shown. **indicates a significant difference between the control group and FL3 group ($p = 0.015$). The arrow indicates the start of FL3 treatment. **(B)** Tumors were immunostained for Ki67 and AIF. IHC photographs are representative fields from control and FL3 treated animals. **(C)** Western blotting was performed to detect the protein expression levels of the indicated molecules from tumor samples. Actin or GAPDH were used as the internal controls. Representative data of two independent experiments are shown for vehicle control- and FL3-treated mice.

PHB1 is highly expressed in tumor B cells of DLBCL patients

PHBs have an important role in the etiology of cancers. We thus evaluated the expression of PHB1 and PHB2 in 53 patient samples, comprising 30 with a GCB subtype and 23 with a non-GCB subtype. We compared PHB1 and PHB2 staining in the tumor samples with that of normal reactive lymph nodes (RLN) by IHC. PHB1 was significantly more abundant than PHB2 in DLBCL tumor cells (mean score of 2.7 ± 0.8 and 1.7 ± 1.3 for PHB1 and PHB2 respectively, $p < 0.001$, t -test), although the staining was variable (Figures 6A and 6B). We also observed positive staining for PHB1 and, to a lesser extent, PHB2 in most B cells within the germinal centers of RLNs (Figure 6A). We mostly detected this strong immunoreactivity in perinuclear

mitochondria as revealed by highly AIF expression in the patients' biopsy samples (Figure 5A), as expected from our *in vitro* data. PHB1 and PHB2 staining strongly correlated with each other ($p < 0.0001$) and also significantly correlated with AIF staining ($p = 0.001$ and $p = 0.006$ for PHB1 and PHB2, respectively, table 1). We further investigated the correlation between enhanced PHB expression and clinicopathological parameters, but we did not observe differential PHB expression in relation to DLBCL subtype or clinical parameters (data not shown). An analysis of survival data showed that high PHB1 expression tended to be associated with shorter OS and shorter PFS ($p = 0.07$) in our patient cohort (Figure 6C), although we found no statistical difference. These results suggest that PHB1 may be involved in tumorigenesis and the clinical course of DLBCL.



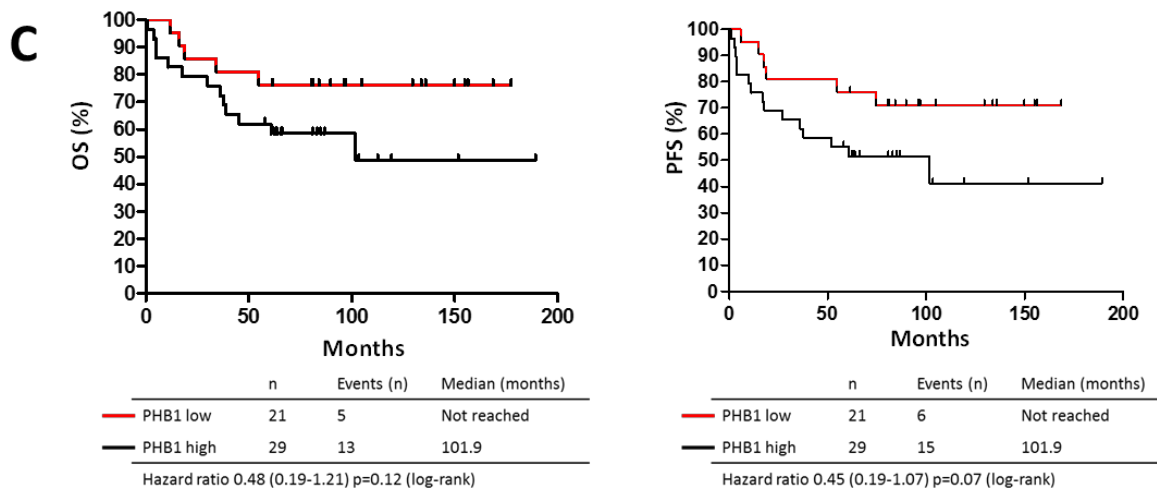


Figure 6. Immunophenotype and prognostic impact of PHB expression in DLBCL (A) Examples of immunohistochemical stainings of PHB1, PHB2, and AIF in DLBCL tumor samples (x400) and normal reactive lymph nodes (RLN, 200x). (B) Box-plot analysis showing the distribution of total immunostaining scores determined for the tumor samples (n = 53). The horizontal line corresponds to the median value and the box length to the interquartile range. Box whiskers represent the maximum and minimum range excluding extreme outliers (shown as dots). (C) Kaplan-Meier plots of OS and PFS in patients with DLBCL (n = 50) stratified by PHB1 expression level.

Table 1: Correlation coefficients for the relationship between PHB and AIF levels in DLBCL.

(n=53)	PHB1	PHB2
PHB2	0.683 <i>p</i> <0.0001	
AIF	0.443 <i>p</i> =0.001	0.390 <i>p</i> =0.006

Correlation coefficient and *p*-value as determined by the Spearman rank correlation test.

Discussion

The present study was designed to evaluate the anti-tumoral efficacy of the flavagline, FL3, in DLBCL with the ultimate goal of promoting tumor regression or preventing tumor relapse. We focused on FL3 because of its abilities to inhibit eIF4A and PHB1, its capacity to overcome multidrug resistance, and its *in vivo* activity.^{27,30} We demonstrated the *in vitro* and *in vivo* (xenografts in mice) antitumor effect of FL3 in DLBCL that was mediated by apoptosis pathways. FL3 targets the downstream effector-signaling pathways of PHB and alters eIF4F complex formation and activity in DLBCL cells. Finally, data obtained on biopsy samples

suggest, for the first time, that an FL3 target, PHB1, may be a negative prognostic factor in DLBCL patients treated with immunochemotherapy.

The apoptotic effect of FL3 involved AIF translocation to the nucleus, as well as a caspase-dependent pathway demonstrated by PARP cleavage in DLBCL. Of interest, FL3 demonstrated synergistic cytotoxicity in combination with rituximab, which was also significant for ABC cell lines. The hallmark of ABC DLBCL is constitutive activation of the NF- κ B pathway which provides a selective advantage for survival and resistance to conventional therapeutic regimens.^{31,32} Consistent with this, inhibition of NF- κ B by flavagline derivatives was demonstrated to sensitize resistant leukemic T cells toward cancer therapy induced apoptosis.³³ We have previously shown that a high level of AIF in tumor B cells of patients with DLBCL was predictive of longer OS in non-rituximab treated patients, suggesting its proapoptotic role in the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents.²⁹ Emerging protocols targeting caspase-independent systems are being developed for clinical trials^{34,35}, as defects in the control of cell death are a major cause of resistance to tumor therapy. Collectively, our data indicate that FL3 may be a potential therapeutic option for DLBCL by enhancing the cytotoxicity of conventional therapy (R-CHOP).

Flavaglines were recently shown to exert their antitumor activity, including in leukemia and E μ -Myc lymphoma mouse models, by binding to the RNA helicase eIF4A and stabilizing its interaction with mRNA. This action prevents incorporation of free eIF4A into the eIF4F complex.^{17,36-39} We examined the role of the eIF4F complex in the FL3 sensitivity of DLBCL cell lines using a cap-binding assay. We showed that FL3 induced a marked decrease in eIF4F complex formation and activity. These data suggest the direct inhibition of eIF4A by FL3 and, consequently, on eIF4F-dependent mRNA translation in DLBCL. The natural flavagline, silvestrol, was recently shown to reduce eIF4A cap-binding activity and oncoprotein expression under BCR activation in DLBCL cell lines.⁴⁰ From a therapeutic perspective, we show here that combination treatment with FL3 and rituximab can lead to sustained inhibition of eIF4A and eIF4F activity, improving the anti-tumor efficacy over that of rituximab alone.

Flavaglines can also indirectly inhibit the translational machinery by inhibiting MEK/ERK signaling, leading to the inhibition of eIF4E phosphorylation.^{12,16,18} Indeed, eIF4E is phosphorylated by mitogen-activated protein kinase (MAPK)-interacting kinases 1 and 2 (MNK), the substrates of Erk1/2, as well as by p38 MAPKs.⁴¹ The MEK/ERK signaling pathway is stabilized or up-regulated in a large number of cancers, including lymphoma.⁴⁰⁻⁴⁵

Here, we observed reduced phosphorylation of ERK1/2 following FL3-induced apoptosis of GCB and ABC cell lines that we also confirmed in the *in vivo* model. Furthermore, we show for the first time that FL3 strongly inhibits eIF4E phosphorylation in DLBCL cell lines, with a greater effect in SUDHL4 than OCI-LY3. eIF4E has been implicated in tumorigenesis, including lymphomagenesis, and eIF4E phosphorylation at Ser209 upon activation of ERK1/2 or p38 MAPKs is required for the oncogenic potential of eIF4E.^{46,47} Although eIF4E globally regulates cap-dependent protein synthesis, it contributes to malignancy by selectively enabling the translation of a limited pool of mRNAs including those that encode key proteins involved in cellular growth, angiogenesis, survival, and malignancy (e.g. cyclin D1, c-Myc, VEGF, matrix metalloprotease 9).¹⁹ Inhibition of eIF4F activity by FL3 may account for the inhibition of VEGF synthesis and subsequent Akt degradation⁴⁸, that we observed. This may collectively promote a pro-apoptotic feedback loop in DLBCL cells.

The binding of flavaglines, including FL3, to PHB proteins has been implicated in the inhibition of the MEK/ERK signaling pathway.¹⁶ This interaction prevents PHB-c-Raf membrane localization, thereby inhibiting c-Raf activation and Raf-MEK-ERK-MNK1-mediated phosphorylation of eIF4E.^{16,22} However, the role of PHBs in tumorigenesis is complex.²⁰ PHBs may promote survival or cell death depending on their intracellular localization, post-translational modifications, environment, and the cell-type.^{20,23} We first evaluated the expression of PHBs in DLBCL cell lines as there were no published studies in DLBCL. PHB1 and, to a lesser extent, PHB2 were strongly expressed in both DLBCL subgroups. We further investigated the shift in localization of PHB1 in DLBCL cells following FL3 exposure. PHB1 mainly localized to the mitochondria in growing cells and colocalized with AIF, as already described.⁴⁹ Similar to AIF, PHB1 shifts from the cytoplasm to the nucleus during FL3-induced apoptosis. Our data provide further support for a close relationship between PHB and AIF during apoptosis.⁵⁰ The mechanisms responsible for the PHB translocation are yet to be clearly identified, but the phosphorylation of PHB1 by Akt was recently shown to mediate its mitochondrial localization.⁵¹ Here, we suggest that the reduction of Akt activity in DLBCL cells following FL3 exposure may be critical for the re-localization of PHB to the nucleus. Nuclear re-localization of PHBs during apoptosis involves a direct interaction between PHBs and both p53 and Rb, which may explain its role in promoting apoptosis.⁵⁰ Our results strongly indicate that nuclear localization of PHB1 is involved in the apoptotic effect of FL3, although additional studies are needed to determine their precise role in the nucleus.

Our *in vitro* data indicate that PHBs may be crucial for DLBCL cell survival. Thus, we further analyzed PHB1 and PHB2 protein levels in 53 sample biopsies of patients by IHC. We confirmed that PHB1 was more highly expressed than PHB2. PHB and AIF stainings were highly correlated, suggesting the colocalization of these proteins in mitochondria, as in the DLBCL cell lines. We also observed, for the first time, that a high expression of PHB1 tends to correlate with an aggressive clinical course. Indeed, evidence of a role for PHB1 in cancer progression has been recently reported.^{20,23} PHB1 is overexpressed in many tumors, suggesting a potential role in cancer progression.⁵² PHB1 is proven to be associated with tumors, but this is the first study to examine the role of PHB1 in B lymphomas. Although confirmation in a large cohort of patients is necessary, present data suggest that PHBs play a crucial role in DLBCL cell survival, and may be a potential novel therapeutic target in DLBCL.

In light of recent scientific knowledge in cell signaling, including the role of PHBs and eIF4A in the etiology of cancer (summarized in Figure 7), we propose that flavaglines may be a promising tool in DLBCL therapeutic strategies to sensitize tumor cells to conventional therapy.

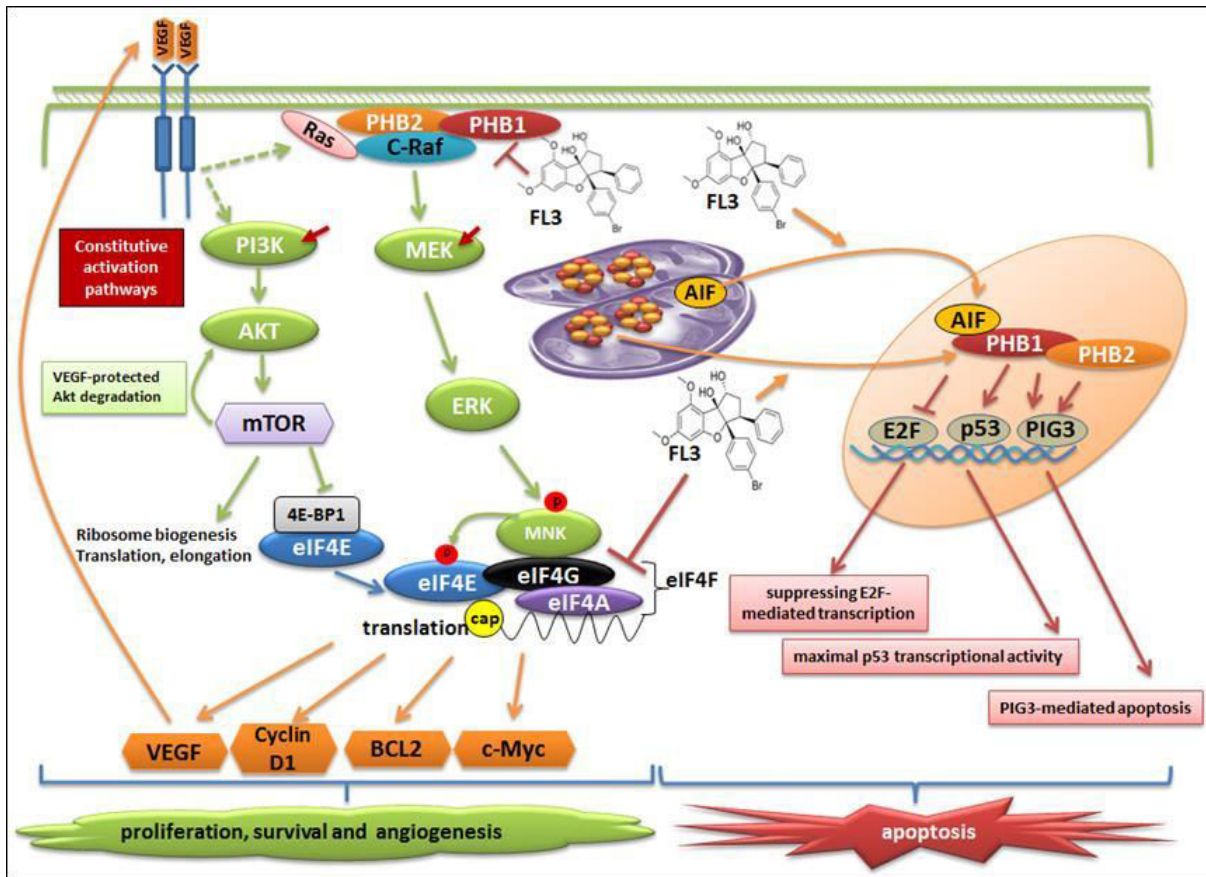


Figure 7. Schematic representation of FL3 targets in DLBCL cells.

In DLBCL, the constitutive activation of the Ras/MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways plays a critical role in oncogenesis, regulating mRNA translation (phosphorylation of 4E-BP, release of free eIF4E) and cellular transformation. These pathways converge on a crucial effector of translation, the initiation factor eIF4E, which binds the 5' cap of mRNAs and controls the translation of various malignancy-associated mRNAs. The association of PHB1/PHB2 with c-Raf at the inner plasma membrane is involved in the MEK/ERK/MNK1 signaling pathway. Binding of FL3 to PHB1/2 prevents their interaction with c-Raf, inhibiting Raf/MEK/ERK/MNK1 mediated phosphorylation of eIF4E. FL3 may also stabilize RNA-binding of eIF4A in the eIF4F complex, inhibiting the incorporation of free eIF4A into this complex. Consequently, FL3 inhibits the synthesis of proteins involved in cellular growth, angiogenesis, survival, and malignancy (e.g. c-Myc, VEGF, BCL2, cyclin D1, etc.), thus triggering tumor cell apoptosis. As VEGF-R signaling is involved in mTOR-mediated Akt stabilization, the inhibition of VEGF production by FL3 may also reduce intracellular Akt levels, which may contribute to cell death. In the mitochondria, PHB1 and PHB2 heterodimers associate to form a PHB complex involved with AIF in the morphological and functional integrity of the mitochondria. Our data show that FL3-induced apoptosis is associated with AIF and PHB1 translocation from the cytoplasm (mitochondria) to the nucleus in DLBCL cell lines. In the nuclear compartment, AIF may participate in apoptosis, primarily in a caspase-independent context. PHB1 has been shown to colocalize with many transcription factors, such as p53, Rb, and E2F, and could trigger cancer cell apoptosis by E2F-, p53- or P53 inducible gene 3- (PIG3) dependent mechanisms. (Adapted from Li-Weber, 2014 and Peng et al., 2015).

Acknowledgments

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

Authorship Contribution: DT, HB, LD, and AG conceived and designed the research; HB, LD, DT, BP, and QZ synthesized the flavagline FL3 and analyzed and/or interpreted the data; DT and HB wrote the paper including the design of figures; DB and AO provided clinical samples and data; AG, LD, MOJ, and GR critically revised the manuscript for important intellectual content.

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

References

1. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015; 125(1):22-32.
2. Pasqualucci L1, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011; 43(9):830-837.
3. Horvilleur E, Sbarrato T, Hill K, et al. A role for eukaryotic initiation factor 4B overexpression in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2014; 28(5):1092-1102.
4. Gratzinger D, Zhao S, Tibshirani RJ, Hsi ED, et al. Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Lab Invest* 2008; 88: 38-47.
5. Hagner PR, Schneider A, Gartenhaus RB. Targeting the translational machinery as a novel treatment strategy for hematologic malignancies. *Blood*. 2010; 115(11):2127-2135.
6. Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann Oncol*. 2014; 25(11):2124-2133.
7. Sehn LH. Paramount prognostic factors that guide therapeutic strategies in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012: 402-409.
8. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene*. 2007; 26(25):3603-3613.
9. Pfreundschuh M. How I treat elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2010; 116(24):5103-5110.
10. Basmadjian C, Thuaud F, Ribeiro N, Désaubry L. Flavaglines: potent anticancer drugs that target prohibitins and the helicase eIF4A. *Future Med Chem*. 2013; 5:2185-2197.
11. Hausott B, Greger H, Marian B. Flavaglines: a group of efficient growth inhibitors block cell cycle progression and induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Int J Cancer*. 2004; 109(6):933-940.
12. Zhu JY, Lavrik IN, Mahlkecht U, et al. The traditional Chinese herbal compound rocaglamide preferentially induces apoptosis in leukemia cells by modulation of mitogen-activated protein kinase activities. *Int J Cancer*. 2007; 121:1839–1846.

13. Lucas DM, Edwards RB, Lozanski G, et al. The novel plant-derived agent silvestrol has B-cell selective activity in chronic lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo. *Blood*. 2009; 113(19):4656-4666.
14. Ribeiro N, Thuaud F, Nebigil C, Désaubry L. Recent advances in the biology and chemistry of the flavaglines. *Bioorg Med Chem*. 2012; 20(6):1857-1864.
15. Bordeleau ME, Robert F, Gerard B, et al. Therapeutic suppression of translation initiation modulates chemosensitivity in a mouse lymphoma model. *J Clin Invest*. 2008; 118(7):2651-2660.
16. Polier G, Neumann J, Thuaud F, et al. The natural anticancer compounds rocaglamides inhibit the Raf-MEK-ERK pathway by targeting prohibitin 1 and 2. *Chem Biol*. 2012 ; 19(9):1093-1104.
17. Chambers JM, Lindqvist LM, Webb A, et al. Synthesis of biotinylated episilvestrol: highly selective targeting of the translation factors eIF4A/II. *Org Lett*. 2013; 15(6):1406-1409.
18. Li-Weber M. Molecular mechanisms and anti-cancer aspects of the medicinal phytochemicals rocaglamides (=flavaglines). *Int J Cancer*. 2015; 137(8):1791-1799.
19. Bhat M, Robichaud N, Hulea L, et al. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2015; 14(4):261-278.
20. Koushyar S, Jiang WG, Dart DA. Unveiling the potential of prohibitin in cancer. *Cancer Lett*. 2015; 369(2):316-322.
21. Cencic R, Carrier M, Galicia-Vázquez G, et al. Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta[b]benzofuran, silvestrol. *PLoS One*. 2009; 4(4):e5223.
22. Rajalingam K, Rudel T. Ras-Raf signaling needs prohibitin. *Cell Cycle*. 2005; 4(11):1503-1505.
23. Peng YT, Chen P, Ouyang RY, Song L. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis*. 2015; 20(9):1135-1149.
24. Dubanet L, Bentayeb H, Petit B, et al. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Cancer*. 2015; 113(6):934-944.
25. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edn. 2008; IARC Press: Lyon, France.
26. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004; 103: 275-282.
27. Thuaud F, Bernard Y, Türkeri G, et al. Synthetic analogue of rocaglaol displays a potent and selective cytotoxicity in cancer cells: involvement of apoptosis inducing factor and caspase-12. *J Med Chem*. 2009; 52(16):5176-5187.
28. Bellanger C, Dubanet L, Lise MC, et al. Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS One*. 2011; 6(11):e27213.
29. Troutaud D, Petit B, Bellanger C, et al. Prognostic significance of Bad and AIF apoptotic pathways in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk*. 2010; 10(2):118-124.
30. Boussemart L, Malka-Mahieu H, Girault I, et al. eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature*. 2014; 513(7516):105-109.
31. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM () Constitutive nuclear factor B κ B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*. 2001; 194:1861-1874.
32. Lam LT, Davis RE, Pierce J, et al. Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 28-40.

33. Baumann B, Bohnenstengel F, Siegmund D, et al. Rocaglamide derivatives are potent inhibitors of NF-kappa B activation in T-cells. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 44791–44800.
34. Reed JC, Pellicchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood.* 2005; 106:408-418.
35. Delavallée L, Cabon L, Galán-Malo P, et al. AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life.* 2011; 63(4):221-232.
36. Cencic R, Robert F, Galicia-Vázquez G, et al. Modifying chemotherapy response by targeted inhibition of eukaryotic initiation factor 4A. *Blood Cancer J.* 2013; 3:e128.
37. Wolfe AL, Singh K, Zhong Y, et al. RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature.* 2014 ; 513(7516):65-70.
38. Lin CJ, Nasr Z, Premisrirut PK, et al. Targeting synthetic lethal interactions between Myc and the eIF4F complex impedes tumorigenesis. *Cell Rep.* 2012; 1(4):325-333.
39. Iwasaki S, Floor SN, Ingolia NT. Rocaglates convert DEAD-box protein eIF4A into a sequence-selective translational repressor. *Nature.* 2016
40. Steinhardt JJ, Peroutka RJ, Mazan-Mamczarz K, et al. Inhibiting CARD11 translation during BCR activation by targeting the eIF4A RNA helicase. *Blood.* 2014; 124(25):3758-3767.
41. Landon AL, Muniandy PA, Shetty AC, et al. MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. *Nat Commun.* 2014;5: 5413.
42. Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, et al. Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of nonHodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res.* 2004; 64(19): 7117-7126.
43. Scholl FA, Dumesic PA, Khavari PA. Effects of active MEK1 expression in vivo. *Cancer Lett.* 2005; 230(1):1-5.
44. Dai B, Zhao XF, Hagner P, et al. Extracellular signal- regulated kinase positively regulates the oncogenic activity of MCT-1 in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 2009; 69(19):7835-7843.
45. Bhalla S, Evens AM, Dai B, et al. The novel anti-MEK small molecule AZD6244 induces BIM-dependent and AKT-independent apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2011; 118(4):1052-1061.
46. Proud CG. Mnks, eIF4E phosphorylation and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1849(7):766-773.
47. Wendel HG, Silva RL, Malina A, et al. Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007; 21(24):3232-3237
48. Riesterer O, Zingg D, Hummerjohann J, et al. Degradation of PKB/Akt protein by inhibition of the VEGF receptor/mTOR pathway in endothelial cells. *Oncogene.* 2004; 23(26):4624-4635.
49. Nijtmans LG, Artal SM, Grivell LA, Coates PJ. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59: 143-155.
50. Song W, Tian L, Li SS, et al. The aberrant expression and localization of prohibitin during apoptosis of human cholangiocarcinoma Mz-ChA-1 cells. *FEBS Lett.* 2014; 588(3): 422-428
51. Jiang L, Dong P, Zhang Z, et al. Akt phosphorylates Prohibitin 1 to mediate its mitochondrial localization and promote proliferation of bladder cancer cells. *Cell Death Dis.* 2015; 6:e1660.
52. Theiss AL, Sitaraman SV. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813(6):1137-1143.

Supplementary information

Supplemental methods

Immunofluorescence and confocal microscopy

Cells (2×10^6) were fixed with PBS/4% paraformaldehyde for 10 min on ice and permeabilized with cold methanol (at -20°C). After washing in PBS, the samples were further blocked with PBS/3% BSA for 20 min and primary Abs (rabbit anti-AIF or anti-PHB1, from Cell Signaling Technology and mouse anti-Tom20, from Santa Cruz Biotechnology), or IgG controls were added and the cells incubated overnight at 4°C . The cells were then washed in PBS/1% BSA and incubated with Alexa-labeled secondary Abs (goat anti-mouse Alexafluor 594 or goat anti-rabbit Alexafluor 488, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) for 1 h on ice. After two washes, the samples were finally incubated with DAPI (Molecular Probes, Invitrogen), placed under a coverslip, and sealed using mounting media (Dako). Images were captured using a Leica microscope and a Leica digital camera, and were processed using Leica IM500 Image Manager, or a confocal laser scanning microscope (LSM 510 META, Zeiss).

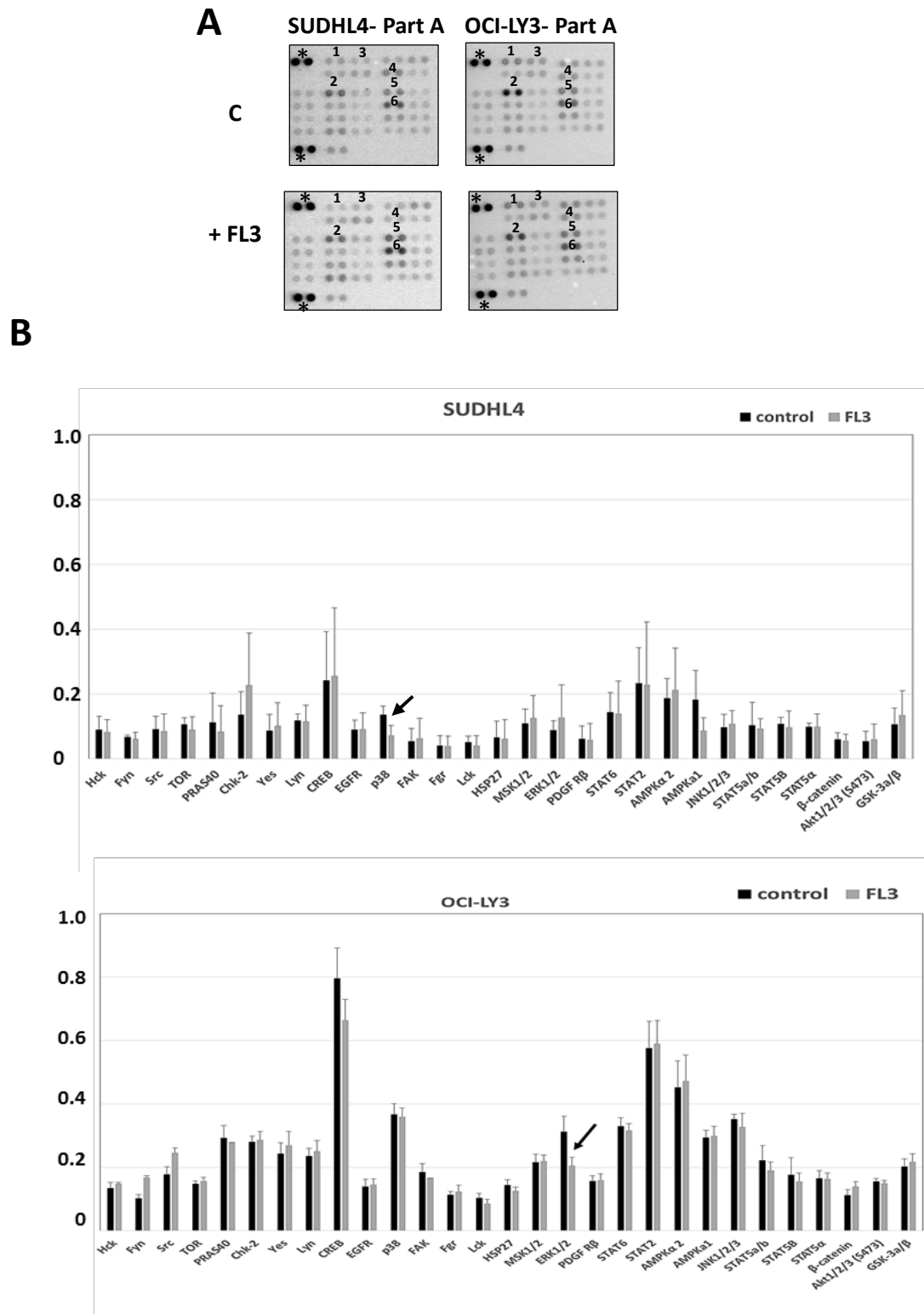
Phosphokinase proteome analysis

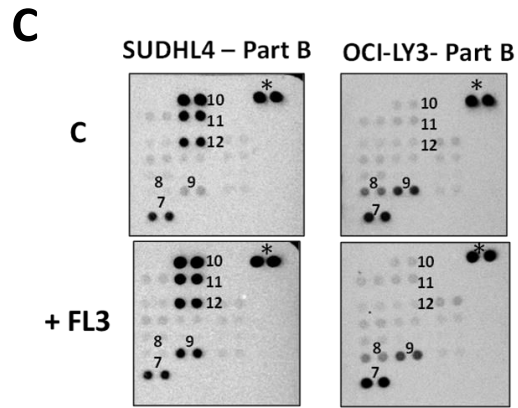
Analysis of the phosphokinase proteome profiling of cell lysates was performed with the Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D systems) according to manufacturer's instructions. The array is spotted in duplicate with capture and control antibodies for 46 kinases. 500 μg protein was used in each experiment. Detection of the Phospho-Kinase Array was performed using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). Scanned images were analyzed by extracting the pixel density of each spot on the array using the Image J software (National Institutes of Health, Maryland, U.S) and were expressed as arbitrary units (a.u.). Multiple film exposures were used to verify the linearity of the samples analyzed and to avoid saturation of the film. In antibody arrays, the average signal of the pair of duplicate spots, representing each phosphorylated kinase protein, was calculated after subtraction of background values (pixel density) from negative control spots and normalization to average values from positive control spots. The spot intensities were normalized as recommended by manufacturers by subtracting the averaged background intensity obtained from the negative control spots from each of the measurements.

Supplementary figures

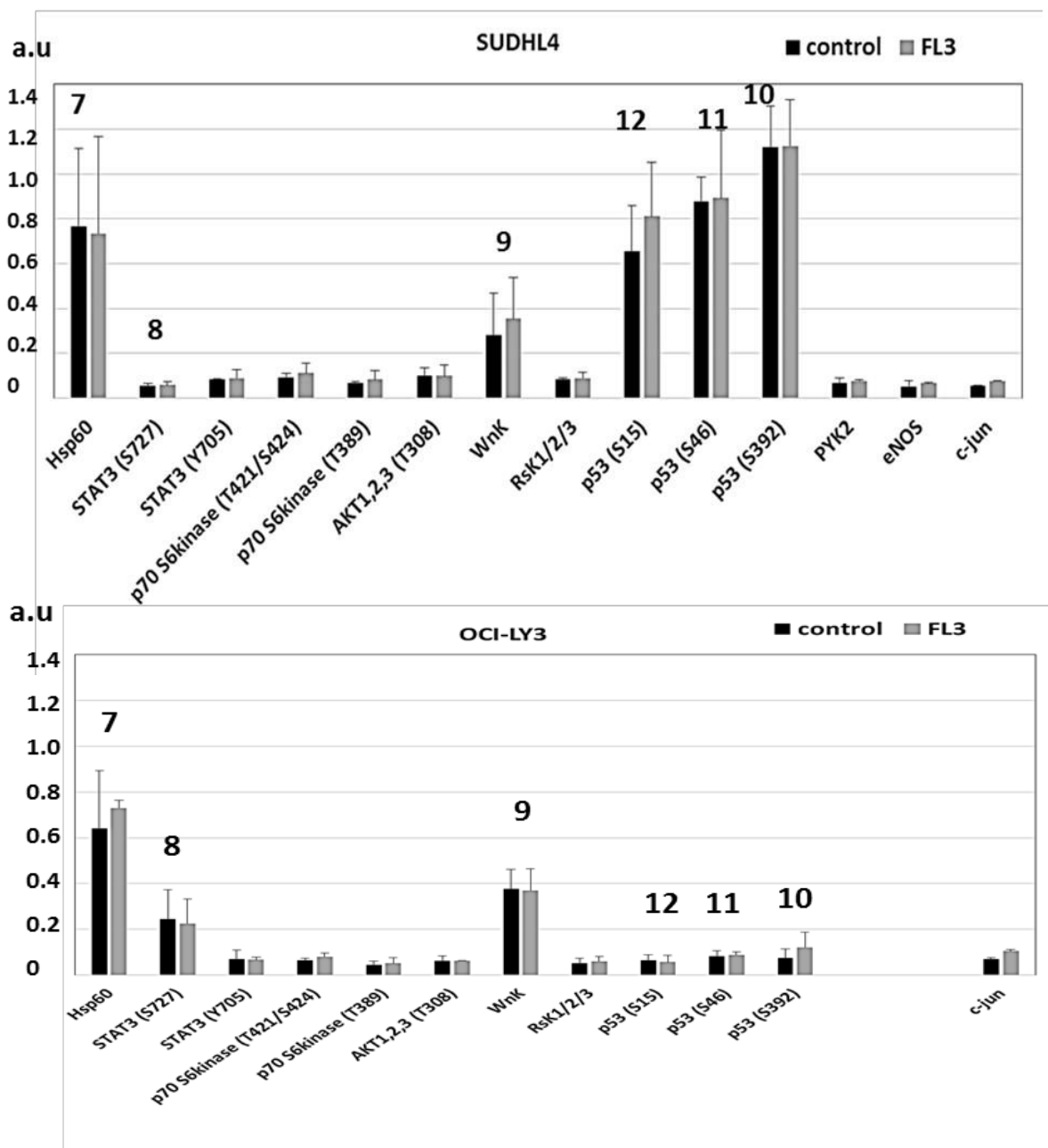
Figure S1. Effect of FL3 on the kinase phosphorylation profile of DLBCL cell lines.

SUDHL4 and OCI-LY3 cells were either untreated (C) or treated with 20 nM of FL3 for 48h. Parts A (A and B) and B (C and D) of the human phospho-kinase array were each incubated with 500 μ g of cell lysate proteins. (A, C) Representative examples of two kinase arrays are done. (B, D) Graphs represent the mean spot pixel intensities of indicated proteins.





D



DISCUSSION, CONCLUSION, PERSPECTIVES

DISCUSSION, CONCLUSION, PERSPECTIVES

L'ensemble de notre travail de thèse a concerné les mécanismes de résistance et donc aussi de sensibilisation à l'immunothérapie ciblant le CD20 (rituximab) dans les DLBCL. Nous avons abordé ces mécanismes sous 2 axes : (i) un axe « Neurotrophines » évaluant l'impact des boucles autocrines de survie réalisées par ces facteurs de croissance très originaux pour des cellules immunitaires (ii) un axe « Flavaglines » nous permettant de découvrir de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques pour ces lymphomes, comme les PHBs ou le facteur d'initiation eIF4A.

DLBCL et résistance au rituximab: implication de l'axe BDNF/TrkB /p75^{NTR}

Cette première partie de notre travail a abouti à la mise en évidence d'un axe de survie BDNF/TrkB/p75^{NTR} pouvant interférer avec les effets cytotoxiques de l'immunothérapie et plus particulièrement ceux du rituximab. Ces résultats ont été obtenus en combinant plusieurs approches, *in vitro* (lignées cellulaires humaines de DLBCL), *in vivo* (modèle de xénogreffes tumorales chez des souris SCID) et chez les patients en analysant des biopsies tumorales par immunohistochimie. Les cellules B tumorales des patients présentent effectivement des taux élevés de neurotrophines et de leurs récepteurs de haute (Trk) et de basse affinité p75^{NTR}. Ces expressions semblent plus importantes chez les patients non-GCB mais seule l'expression du NGF a été significativement corrélée au type plus agressif non-GCB (ABC) sans doute en lien avec la signalisation NF-κB représentative de ce sous-type, comme on l'a discuté dans l'article paru dans *British Journal of Cancer*.

L'originalité de notre travail a été de montrer par des approches de shRNA (en plus de l'utilisation d'anticorps antagonistes de p75^{NTR}) le rôle pro-survie de p75^{NTR} dans les DLBCL, alors qu'il est plus classiquement vu comme un récepteur de mort. En effet si l'expression et l'implication des neurotrophines dans la tumorigenèse et la chimiorésistance a été démontrée dans plusieurs tumeurs non neurales (Thiele et al., 2009, Akil et al., 2011, Okugawa et al., 2013), le rôle de p75^{NTR} en oncologie reste controversé. Il est proposé tantôt comme un suppresseur tumoral dans certains cancers (carcinomes de la prostate, vessie, estomac, foie) où il est sous-exprimé et où sa surexpression inhibe la prolifération et induit l'apoptose (Jin et al., 2007, Khwaja et al., 2008). Dans d'autres cancers dont les mélanomes, cancers du pancréas, gliomes et cancers du sein il exerce, comme on le suppose dans les DLBCL, un rôle plutôt de promoteur tumoral en favorisant la survie et l'invasion des cellules cancéreuses (Marchetti et al., 2004, Wang et al., 2008, Vanhecke et al., 2011). Il est intéressant de noter que la fonction

pro-tumorale de p75^{NTR} dans ces cancers est associée à l'effet du NGF et nécessite son interaction avec TrkA (Dollé et al., 2003, Bapat et al., 2016, Chakravarthy et al., 2016). Nos travaux de thèse montrent que dans les cellules de DLBCL le récepteur p75^{NTR} était le plus souvent retrouvé associé à TrkA et TrkB et non à son co-récepteur de mort, la sortiline. Ces données suggèrent fortement que cette interaction est nécessaire à la signalisation de survie de p75^{NTR}. L'analyse de ces interactions entre les différents récepteurs, Trk, p75^{NTR} et sortiline à la surface des cellules de DLBCL, à l'aide notamment de la technique de PLA (Proximity Ligation Assay) permettrait sans doute de préciser leur nature et leur dynamique en fonction des traitements.

Malgré les données des patients sur NGF, nous avons choisi de nous concentrer sur l'axe BDNF/TrkB car seule la protéine TrkB était exprimée dans sa forme complète (en plus de tronquée) dans les lignées cellulaires de DLBCL. Cependant, au cours de la thèse nous avons abordé la fonctionnalité des récepteurs Trk *in vitro* comme *in vivo* en utilisant un inhibiteur pharmacologique pan-Trk, le K252a. En effet, les approches par si ou shRNA pour inhiber spécifiquement la synthèse du récepteur TrkB dans les lignées cellulaires de DLBCL n'ont pas abouti. L'induction de l'apoptose cellulaire et la potentialisation de l'effet du rituximab par le K252a notamment dans les cellules moins sensibles au rituximab, ont été confirmées ensuite *in vivo* sur la croissance tumorale de xénogreffes réalisées à partir de cellules de DLBCL humaines sur des souris SCID. L'utilisation d'anticorps neutralisants anti-BDNF nous a permis de confirmer plus spécifiquement le rôle pro-survie de la signalisation BDNF/TrkB. Ce travail a été poursuivi et complété par la suite, en utilisant un agoniste des récepteurs TrkB (7,8-DHF). Nous avons démontré alors, en cohérence avec les résultats précédents, que la stimulation *in vitro* de TrkB protégeait les cellules de DLBCL de l'apoptose induite par le rituximab. Cette protection était annulée par le co-traitement avec le K252a.

Pour approfondir le rôle des NTs dans le processus de résistance thérapeutique des DLBCL, nous avons choisi de cibler les résistances au rituximab dans un premier temps et d'étudier par conséquent l'expression du CD20. En effet, l'activation des voies PI3K/AKT et Raf/MEK/ERK lors de la signalisation des Trk (Lawn et al., 2015) sont aussi impliquées dans la régulation positive au niveau transcriptionnel et protéique du CD20 (Wojciechowski et al., 2005, Winiarska et al., 2014). Ce travail a été entrepris au niveau des cellules mais aussi au niveau des exosomes produits par les cellules de DLBCL. En effet, le processus de sécrétion des exosomes est connu pour être impliqué à plusieurs niveaux, comme on l'a vu dans l'étude bibliographique, dans l'échappement thérapeutique. Ainsi nous avons utilisé l'agoniste de TrkB

pour réaliser cette étude. Les résultats les plus originaux sont ceux retrouvés au niveau des exosomes, suite à la mise au point du protocole de purification et de caractérisation de la sécrétion d'exosomes par les lignées cellulaires GCB et ABC. Nous avons d'abord comparé l'expression du CD20 dans une lignée du sous-type ABC et une lignée du sous-type GCB. La lignée OCI-LY3 (sous-type ABC), connue pour sa faible sensibilité au rituximab, semble exprimer plus de CD20 à la surface des exosomes que la lignée SUDHL4 (sous-type GCB) connue pour sa plus forte sensibilité. Même si ces résultats restent à confirmer par d'autres approches, ils semblent corrélés avec ceux de l'étude *in vivo* (xénogreffes) où nous montrons que les exosomes issus de la lignée OCI-LY3 restaurent de façon très significative la croissance tumorale chez les souris traitées pourtant avec le rituximab. Cet effet protecteur est moins important quand les souris sont co-injectées avec le rituximab et les exosomes issus de la lignée sensible SUDHL4. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que la relative résistance au rituximab des lignées ABC par rapport aux lignées GCB pourrait être aussi en lien avec l'expression différentielle du CD20 au niveau des exosomes par les lignées des deux sous-types. Bien que très préliminaires les résultats obtenus avec l'agoniste de TrkB sont très prometteurs. En effet, une forte augmentation de l'expression du CD20 est observée dans les exosomes issus des cultures de cellules SUDHL4 en présence de l'agoniste de TrkB (7,8-DHF) et ces exosomes réalisent *in vivo* (xénogreffes tumorales de SUDHL4) une protection quasi-totale vis-à-vis du rituximab.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats sur les NTs indiquent que l'inhibition sélective de la voie BDNF/TrkB pourrait permettre dans certains cas où cette voie est sur-exprimée, de sensibiliser aux effets des anti-CD20 à deux niveaux : en augmentant l'apoptose dans les cellules tumorales, et en interférant avec le rôle des exosomes dans l'échappement thérapeutique.

Un certain nombre de perspectives se dégagent pour confirmer notamment les données sur les exosomes :

- valider par d'autres techniques plus précises notamment la microscopie électronique et la cytométrie en flux (après immunocapture pour les exosomes), les études *in vitro* sur la régulation d'expression du CD20 par les lignées cellulaires humaines de DLBCL (GCB versus ABC) au niveau cellulaire, membranaire et exosomal, en fonction des différents traitements.

- préciser le rôle de la signalisation des NTs sur ce processus, en utilisant un inhibiteur sélectif de TrkB (cyclotraxin-B) et des lignées de DLBCL déficientes en BDNF et/ou TrkB par la technique CRISPR-cas9.
- Analyser l'expression du CD20 dans les tumeurs des souris traitées avec les exosomes et l'immunothérapie.
- débiter une analyse des exosomes circulants chez les patients atteints de DLBCL en fonction de leur statut biologique et clinique. Ce travail ouvre des perspectives plus larges que la seule présence du CD20 dans les exosomes produits par les cellules tumorales B au cours de ces pathologies. Notamment, nous avons débuté une analyse des acteurs de la signalisation des NTs au niveau des exosomes. Ainsi, les exosomes retrouvés dans le sang peuvent refléter l'état général de la personne et pourraient être de nouveaux marqueurs biologiques utilisés comme outils de diagnostic, pronostic et/ou de suivi au cours du processus tumoral. Pour exemple, certains microARN contenus dans les exosomes produits par certaines tumeurs comme le cancer de la prostate, le cancer du poumon sont spécifiques des cellules tumorales et sont des biomarqueurs potentiels pour le diagnostic de ces pathologies (Rabinowits et al., 2009, Hessvik et al., 2013, Li et al., 2016). De même, la claudine-4 contenue dans les exosomes sanguins des patientes atteintes d'un cancer ovarien n'est pas retrouvée dans les exosomes sanguins des personnes saines et pourrait être un biomarqueur diagnostic (Li et al., 2009).

Les flavaglines: ligands de nouvelles cibles thérapeutiques dans les DLBCL?

Cette deuxième partie de notre thèse a été orientée vers la recherche de nouveaux « candidats médicaments » pour ces lymphomes avec comme objectif là encore, de permettre notamment une sensibilisation aux anti-CD20.

Ce travail se situe dans le cadre d'une collaboration avec le groupe du Dr Laurent Désaubry de l'Université de Strasbourg qui nous a fourni notamment les flavaglines (FL3) qui sont synthétisées dans son laboratoire. L'originalité de ce travail a été de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentiellement importantes dans ces lymphomes, et peu ou pas étudiées jusqu'alors. Ainsi nous montrons que, dans les DLBCL, la flavagline FL3 détermine l'apoptose et la sensibilisation aux effets cytotoxiques du rituximab par une inhibition directe (eIF4A) et indirecte (via le rôle des PHBs dans la stabilisation de la voie Erk) du processus de traduction des ARNm cap-dépendante. Cette régulation met en jeu notamment les protéines PHBs dont le rôle n'avait pas été évalué dans ces cancers. Nous avons commencé à analyser la

signification physiologique et clinique des PHBs dans les DLBCL. Les premiers résultats obtenus sur une cohorte de 53 patients (30 GCB et 23 non-GCB) sont très intéressants suggérant que la forte expression de PHB1 pourrait être associée avec un mauvais pronostic des patients. L'ensemble de ces résultats permet d'envisager que les flavaglines seraient de bons candidats pour sensibiliser et augmenter l'efficacité de l'immunothérapie dans les DLBCL, en ciblant des voies alternatives et complémentaires aux effets apoptotiques du rituximab.

Les perspectives de ce travail vont être d'approfondir les mécanismes moléculaires des flavaglines dans leurs effets anti-tumoraux sur les DLBCL. Nous nous attacherons plus précisément à définir l'implication et le rôle d'une des cibles des flavaglines, les PHBs, plus originale dans ces cancers. Pour cela nous envisageons :

- de compléter l'analyse chez les patients en augmentant leur nombre afin de vérifier si la tendance observée pour PHB1, en lien avec le mauvais pronostic clinique, se confirme.
- d'étudier l'effet de la surexpression de PHB1 notamment par la technique de CRISPR-cas9 sur la sensibilité des cellules tumorales aux effets cytotoxiques de différents traitements (rituximab, flavaglines).
- De rechercher si les flavaglines ont la capacité de moduler l'expression du CD20 au niveau transcriptionnel et au niveau protéique. Des résultats préliminaires très récents suggèrent que les flavaglines (FL3) pourraient moduler et stabiliser l'expression du CD20 membranaire au niveau des lignées cellulaires de DLBCL, notamment suite à l'exposition des cellules au rituximab. Le rôle éventuel de régulations épigénétiques du gène du CD20 sera envisagé. L'expression du CD20 sera finalement étudiée aussi au niveau des exosomes.

En conclusion l'ensemble de notre travail de thèse s'inscrit dans la compréhension des mécanismes moléculaires multiples et souvent complexes rendant compte de la très forte hétérogénéité clinique des DLBCL. Ils devraient contribuer aussi, notamment par les perspectives qu'ils ouvrent, à une meilleure connaissance des voies impliquées dans la régulation de l'expression du CD20 dans les cellules tumorales et au niveau des exosomes. Enfin ils soulignent l'importance de développer des thérapies ciblées et proposent de nouvelles stratégies pour sensibiliser à l'action des thérapies conventionnelles, et tenter de prévenir les échecs thérapeutiques encore trop fréquents dans ces lymphomes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P.A., Scheynius, A., and Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 1969–1978.
- Akil, H., Perraud, A., Mélin, C., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2011). Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One* *6*, e25097.
- Alderson, R.F., Curtis, R., Alterman, A.L., Lindsay, R.M., and DiStefano, P.S. (2000). Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. *Brain Res.* *871*, 210–222.
- Alexander, D.D., Mink, P.J., Adami, H.-O., Chang, E.T., Cole, P., Mandel, J.S., and Trichopoulos, D. (2007). The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *Int. J. Cancer* *120 Suppl 12*, 1–39.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* *403*, 503–511.
- Anastasia, A., Barker, P.A., Chao, M.V., and Hempstead, B.L. (2015). Detection of p75NTR Trimers: Implications for Receptor Stoichiometry and Activation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *35*, 11911–11920.
- Ardini, E., Menichincheri, M., Banfi, P., Bosotti, R., De Ponti, C., Pulci, R., Ballinari, D., Ciomei, M., Texido, G., Degrassi, A., et al. (2016). Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. *Mol. Cancer Ther.* *15*, 628–639.
- Arévalo, J.C., and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *63*, 1523–1537.
- Arévalo, J.C., Yano, H., Teng, K.K., and Chao, M.V. (2004). A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *EMBO J.* *23*, 2358–2368.
- Atwal, J.K., Massie, B., Miller, F.D., and Kaplan, D.R. (2000). The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* *27*, 265–277.
- Aung, T., Chapuy, B., Vogel, D., Wenzel, D., Oppermann, M., Lahmann, M., Weinlage, T., Menck, K., Hupfeld, T., Koch, R., et al. (2011). Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 15336–15341.
- Banner, D.W., D’Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* *73*, 431–445.
- Bapat, A.A., Munoz, R.M., Von Hoff, D.D., and Han, H. (2016). Blocking Nerve Growth Factor Signaling Reduces the Neural Invasion Potential of Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One* *11*, e0165586.
- Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* *1*, 549–553.
- Barker, P.A. (2007). High affinity not in the vicinity? *Neuron* *53*, 1–4.
- Barker, P.A., and Shooter, E.M. (1994). Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* *13*, 203–215.
- Barker, P.A., Miller, F.D., Large, T.H., and Murphy, R.A. (1991). Generation of the truncated form of the nerve growth factor receptor by rat Schwann cells. Evidence for post-translational processing. *J. Biol. Chem.* *266*, 19113–19119.
- Barker, P.A., Lomen-Hoerth, C., Gensch, E.M., Meakin, S.O., Glass, D.J., and Shooter, E.M. (1993). Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J. Biol. Chem.* *268*, 15150–15157.
- Basmadjian, C., Thuaud, F., Ribeiro, N., and Désaubry, L. (2013). Flavaglines: potent anticancer drugs that target prohibitins and the helicase eIF4A. *Future Med. Chem.* *5*, 2185–2197.
- Bazenet, C.E., Mota, M.A., and Rubin, L.L. (1998). The small GTP-binding protein Cdc42 is required for nerve growth factor withdrawal-induced neuronal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 3984–3989.
- Becker, E.B.E., Howell, J., Kodama, Y., Barker, P.A., and Bonni, A. (2004). Characterization of the c-

- Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 8762–8770.
- Beers, S.A., Chan, C.H.T., French, R.R., Cragg, M.S., and Glennie, M.J. (2010). CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin. Hematol.* 47, 107–114.
- Béguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K.L., Rosen, M., Shen, H., Yang, S.N., Wang, L., Ezponda, T., et al. (2013). EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell* 23, 677–692.
- Béguelin, W., Sawh, S., Chambwe, N., Chan, F.C., Jiang, Y., Choo, J.-W., Scott, D.W., Chalmers, A., Geng, H., Tsikitas, L., et al. (2015). IL10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs. *Leukemia* 29, 1684–1694.
- Bellanger, C., Dubanet, L., Lise, M.-C., Fauchais, A.-L., Bordessoule, D., Jauberteau, M.-O., and Troutaud, D. (2011). Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS One* 6, e27213.
- Bellosillo, B., Villamor, N., López-Guillermo, A., Marcé, S., Esteve, J., Campo, E., Colomer, D., and Montserrat, E. (2001). Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 98, 2771–2777.
- Berninger, B., García, D.E., Inagaki, N., Hahnel, C., and Lindholm, D. (1993). BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺ elevation in hippocampal neurones. *Neuroreport* 4, 1303–1306.
- Bhakar, A.L., Howell, J.L., Paul, C.E., Salehi, A.H., Becker, E.B.E., Said, F., Bonni, A., and Barker, P.A. (2003). Apoptosis induced by p75^{NTR} overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 11373–11381.
- Bil, J., Winiarska, M., Nowis, D., Bojarczuk, K., Dabrowska-Iwanicka, A., Basak, G.W., Sulek, K., Jakobisiak, M., and Golab, J. (2010). Bortezomib modulates surface CD20 in B-cell malignancies and affects rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity. *Blood* 115, 3745–3755.
- Bilderback, T.R., Gazula, V.R., Lisanti, M.P., and Dobrowsky, R.T. (1999). Caveolin interacts with Trk A and p75^{NTR} and regulates neurotrophin signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 257–263.
- Bobrie, A., and Théry, C. (2013). Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal? *Biochem. Soc. Trans.* 41, 263–267.
- Bonavida, B. (2014). Postulated mechanisms of resistance of B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab treatment regimens: strategies to overcome resistance. *Semin. Oncol.* 41, 667–677.
- Bordeleau, M.-E., Robert, F., Gerard, B., Lindqvist, L., Chen, S.M.H., Wendel, H.-G., Brem, B., Greger, H., Lowe, S.W., Porco, J.A., et al. (2008). Therapeutic suppression of translation initiation modulates chemosensitivity in a mouse lymphoma model. *J. Clin. Invest.* 118, 2651–2660.
- Boussemer, L., Malka-Mahieu, H., Girault, I., Allard, D., Hemmingsson, O., Tomasic, G., Thomas, M., Basmadjian, C., Ribeiro, N., Thuaud, F., et al. (2014). eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature* 513, 105–109.
- Brann, A.B., Tcherpakov, M., Williams, I.M., Futerman, A.H., and Fainzilber, M. (2002). Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 277, 9812–9818.
- Bresnahan, P.A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H.L., Brake, A.J., Barr, P.J., and Thomas, G. (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J. Cell Biol.* 111, 2851–2859.
- Breuzza, L., Garcia, M., Delgrossi, M.-H., and Le Bivic, A. (2002). Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp. Cell Res.* 273, 178–186.
- Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E., Kolla, V., and Evans, A.E. (2009). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 3244–3250.
- Brodie, C., and Gelfand, E.W. (1992). Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J. Immunol. Baltim. Md* 148, 3492–3497.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis:

- a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391–398.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–868.
- Bubien, J.K., Zhou, L.J., Bell, P.D., Frizzell, R.A., and Tedder, T.F. (1993). Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J. Cell Biol.* 121, 1121–1132.
- Bui, N.T., König, H.-G., Culmsee, C., Bauerbach, E., Poppe, M., Kriegstein, J., and Prehn, J.H.M. (2002). p75 neurotrophin receptor is required for constitutive and NGF-induced survival signalling in PC12 cells and rat hippocampal neurones. *J. Neurochem.* 81, 594–605.
- Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., and Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* 17, 879–887.
- Camicia, R., Winkler, H.C., and Hassa, P.O. (2015). Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review. *Mol. Cancer* 14.
- Campo, E., Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H., and Jaffe, E.S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117, 5019–5032.
- Cang, S., Mukhi, N., Wang, K., and Liu, D. (2012). Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J. Hematol. Oncol.* J Hematol Oncol 5, 64.
- Canuel, M., Bhattacharyya, N., Balbis, A., Yuan, L., and Morales, C.R. (2009). Sortilin and prosaposin localize to detergent-resistant membrane microdomains. *Exp. Cell Res.* 315, 240–247.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–758.
- Cartron, G., Watier, H., Golay, J., and Solal-Celigny, P. (2004). From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 104, 2635–2642.
- Cazorla, M., Jouveineau, A., Rose, C., Guilloux, J.-P., Pilon, C., Dranovsky, A., and Prémont, J. (2010). Cyclotraxin-B, the First Highly Potent and Selective TrkB Inhibitor, Has Anxiolytic Properties in Mice. *PLoS ONE* 5.
- Cazorla, M., Prémont, J., Mann, A., Girard, N., Kellendonk, C., and Rognan, D. (2011). Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1846–1857.
- Chakravarthy, R., Mnich, K., and Gorman, A.M. (2016). Nerve growth factor (NGF)-mediated regulation of p75(NTR) expression contributes to chemotherapeutic resistance in triple negative breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 1541–1547.
- Chang, M.-S., Arevalo, J.C., and Chao, M.V. (2004). Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J. Neurosci. Res.* 78, 186–192.
- Chao, M.V., and Bothwell, M. (2002). Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 33, 9–12.
- Chao, M.V., and Hempstead, B.L. (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18, 321–326.
- Chao, M.V., Bothwell, M.A., Ross, A.H., Koprowski, H., Lanahan, A.A., Buck, C.R., and Sehgal, A. (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232, 518–521.
- Chapuy, B., Koch, R., Radunski, U., Corsham, S., Cheong, N., Inagaki, N., Ban, N., Wenzel, D., Reinhardt, D., Zapf, A., et al. (2008). Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. *Leukemia* 22, 1576–1586.
- Chen, W., Liu, X., Lv, M., Chen, L., Zhao, J., Zhong, S., Ji, M., Hu, Q., Luo, Z., Wu, J., et al. (2014). Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PloS One* 9, e95240.
- Chiarlamello, A., Neuman, K., Palm, K., Metsis, M., and Neuman, T. (1995). Helix-loop-helix transcription factors mediate activation and repression of the p75LNGFR gene. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6036–6044.
- Chin, L.S., Murray, S.F., Zitnay, K.M., and Rami, B. (1997). K252a inhibits proliferation of glioma cells by blocking platelet-derived growth factor signal transduction. *Clin. Cancer Res. Off. J.*

- Am. Assoc. Cancer Res. *3*, 771–776.
- Chitranshi, N., Gupta, V., Dheer, Y., Gupta, V., Vander Wall, R., and Graham, S. (2016). Molecular determinants and interaction data of cyclic peptide inhibitor with the extracellular domain of TrkB receptor. *Data Brief* *6*, 776–782.
- Choi, W.W.L., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Piris, M.A., Banham, A.H., Delabie, J., Braziel, R.M., Geng, H., Iqbal, J., Lenz, G., et al. (2009). A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 5494–5502.
- Chopin, V., Lagadec, C., Toillon, R.-A., and Le Bourhis, X. (2016). Neurotrophin signaling in cancer stem cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 1859–1870.
- Ciravolo, V., Huber, V., Ghedini, G.C., Venturelli, E., Bianchi, F., Campiglio, M., Morelli, D., Villa, A., Della Mina, P., Menard, S., et al. (2012). Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J. Cell. Physiol.* *227*, 658–667.
- Clary, D.O., and Reichardt, L.F. (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11133–11137.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* *6*, 443–446.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1954). A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SARCOM AS 37 AND 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *40*, 1014–1018.
- Coiffier, B. (2005). State-of-the-art therapeutics: diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *23*, 6387–6393.
- Coiffier, B. (2007). Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* *26*, 3603–3613.
- Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., et al. (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* *346*, 235–242.
- Coiffier, B., Feugier, P., Mounier, N., Franchi-Rezgui, P., Van Den Neste, E., Macro, M., Haioun, C., Sebban, C., Bordessoule, D., and Tilly, H. (2007). Long-term results of the GELA study comparing R-CHOP and CHOP chemotherapy in older patients with diffuse large B-cell lymphoma show good survival in poor-risk patients. *ASCO Meet. Abstr.* *25*, 8009.
- Corbit, K.C., Foster, D.A., and Rosner, M.R. (1999). Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 4209–4218.
- Corcoran, C., Rani, S., O'Brien, K., O'Neill, A., Prencipe, M., Sheikh, R., Webb, G., McDermott, R., Watson, W., Crown, J., et al. (2012). Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PloS One* *7*, e50999.
- Coulson, E.J., Reid, K., Baca, M., Shipham, K.A., Hulett, S.M., Kilpatrick, T.J., and Bartlett, P.F. (2000). Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* *275*, 30537–30545.
- Covaceuszach, S., Konarev, P.V., Cassetta, A., Paoletti, F., Svergun, D.I., Lamba, D., and Cattaneo, A. (2015). The conundrum of the high-affinity NGF binding site formation unveiled? *Biophys. J.* *108*, 687–697.
- Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T.C., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W.M., French, R.R., and Glennie, M.J. (2003). Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* *101*, 1045–1052.
- Croucher, J.L., Iyer, R., Li, N., Molteni, V., Loren, J., Gordon, W.P., Tuntland, T., Liu, B., and Brodeur, G.M. (2015). TrkB inhibition by GNF-4256 slows growth and enhances chemotherapeutic efficacy in neuroblastoma xenografts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *75*, 131–141.
- Cultrera, J.L., and Dalia, S.M. (2012). Diffuse large B-cell lymphoma: current strategies and future directions. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* *19*, 204–213.
- Czuczman, M.S., Olejniczak, S., Gowda, A., Kotowski, A., Binder, A., Kaur, H., Knight, J., Starostik, P., Deans, J., and Hernandez-Ilizaliturri, F.J. (2008). Acquisition of rituximab resistance in

- lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 1561–1570.
- Davis, R.E., Brown, K.D., Siebenlist, U., and Staudt, L.M. (2001). Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* *194*, 1861–1874.
- De Braud, F.G., Niger, M., Damian, S., Bardazza, B., Martinetti, A., Pelosi, G., Marrapese, G., Palmeri, L., Cerea, G., Valtorta, E., et al. (2015). Alka-372-001: First-in-human, phase I study of entrectinib—an oral pan-trk, ROS1, and ALK inhibitor—in patients with advanced solid tumors with relevant molecular alterations. *J Clin Oncol* *33*.
- De Paepe, P., and De Wolf-Peeters, C. (2007). Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia* *21*, 37–43.
- De Paepe, P., Achten, R., Verhoef, G., Wlodarska, I., Stul, M., Vanhentenrijk, V., Praet, M., and De Wolf-Peeters, C. (2005). Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *23*, 7060–7068.
- Deans, J.P., Li, H., and Polyak, M.J. (2002). CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology* *107*, 176–182.
- Dechant, G., and Barde, Y.A. (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* *7*, 413–418.
- DeFreitas, M.F., McQuillen, P.S., and Shatz, C.J. (2001). A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 5121–5129.
- Demosthenous, C., Han, J.J., Stenson, M.J., Maurer, M.J., Wellik, L.E., Link, B., Hege, K., Dogan, A., Sotomayor, E., Witzig, T., et al. (2015). Translation initiation complex eIF4F is a therapeutic target for dual mTOR kinase inhibitors in non-Hodgkin lymphoma. *Oncotarget* *6*, 9488–9501.
- Descamps, S., Toillon, R.A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S.M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J.P., and Hondermarck, H. (2001). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *276*, 17864–17870.
- Ding, B.B., Yu, J.J., Yu, R.Y.-L., Mendez, L.M., Shakhovich, R., Zhang, Y., Cattoretti, G., and Ye, B.H. (2008). Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* *111*, 1515–1523.
- Dobrowsky, R.T., Werner, M.H., Castellino, A.M., Chao, M.V., and Hannun, Y.A. (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* *265*, 1596–1599.
- Doebele, R.C., Davis, L.E., Vaishnavi, A., Le, A.T., Estrada-Bernal, A., Keysar, S., Jimeno, A., Varella-Garcia, M., Aisner, D.L., Li, Y., et al. (2015). An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov.* *5*, 1049–1057.
- Dollé, L., El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Nurcombe, V., and Hondermarck, H. (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* *22*, 5592–5601.
- D’Onofrio, M., de Grazia, U., Morrone, S., Cuomo, L., Spinsanti, P., Frati, L., Gulino, A., and Ragona, G. (2000). Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. *Eur. Cytokine Netw.* *11*, 283–291.
- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* *85*, 1067–1076.
- Drouet, F., Cahu, X., Pointreau, Y., Denis, F., and Mahé, M.-A. (2010). [Non-hodgkin’s lymphomas]. *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.* *14 Suppl 1*, S210-229.
- Dubonet, L., Bentayeb, H., Petit, B., Olivrie, A., Saada, S., de la Cruz-Morcillo, M.A., Lalloué, F., Gourin, M.-P., Bordessoule, D., Faumont, N., et al. (2015). Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br. J. Cancer* *113*, 934–944.

- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., and Greenberg, M.E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661–665.
- Edling, A.E., Nanavati, T., Johnson, J.M., and Tuohy, V.K. (2004). Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J. Neurosci. Res.* 77, 709–717.
- Einfeld, D.A., Brown, J.P., Valentine, M.A., Clark, E.A., and Ledbetter, J.A. (1988). Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J.* 7, 711–717.
- Epa, W.R., Markovska, K., and Barrett, G.L. (2004). The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J. Neurochem.* 89, 344–353.
- Farago, A.F., Le, L.P., Zheng, Z., Muzikansky, A., Drilon, A., Patel, M., Bauer, T.M., Liu, S.V., Ou, S.-H.I., Jackman, D., et al. (2015). Durable Clinical Response to Entrectinib in NTRK1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 10, 1670–1674.
- Fauchais, A.-L., Lalloué, F., Lise, M.-C., Boumediene, A., Preud'homme, J.-L., Vidal, E., and Jauberteau, M.-O. (2008). Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 3027–3038.
- Feng, D., Kim, T., Özkan, E., Light, M., Torkin, R., Teng, K.K., Hempstead, B.L., and Garcia, K.C. (2010). Molecular and Structural Insight into proNGF Engagement of p75NTR and Sortilin. *J. Mol. Biol.* 396, 967–984.
- Fenner, B.M. (2012). Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 15–24.
- Feugier, P., Van Hoof, A., Sebban, C., Solal-Celigny, P., Bouabdallah, R., Fermé, C., Christian, B., Lepage, E., Tilly, H., Morschhauser, F., et al. (2005). Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 4117–4126.
- Flowers, C.R., Sinha, R., and Vose, J.M. (2010). Improving Outcomes for Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *CA. Cancer J. Clin.*
- Fontán, L., and Melnick, A. (2013). Molecular pathways: targeting MALT1 paracaspase activity in lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 6662–6668.
- (France), C. national hospitalier d'information sur le médicament (2001). Médicaments utilisés en cancérologie: évaluation thérapeutique (CNHIM).
- Franklin, R.A., Brodie, C., Melamed, I., Terada, N., Lucas, J.J., and Gelfand, E.W. (1995). Nerve growth factor induces activation of MAP-kinase and p90rsk in human B lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 154, 4965–4972.
- Gascoyne, R.D. (1997). Pathologic prognostic factors in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 11, 847–862.
- de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102, 4336–4344.
- Gatter, K., and Pezzella, F. (2010). Diffuse large B-cell lymphoma. *Diagn. Histopathol.* 16, 69–81.
- Ge, R., Tan, E., Sharghi-Namini, S., and Asada, H.H. (2012). Exosomes in Cancer Microenvironment and Beyond: have we Overlooked these Extracellular Messengers? *Cancer Microenviron.* 5, 323–332.
- Gentry, J.J., Rutkoski, N.J., Burke, T.L., and Carter, B.D. (2004). A functional interaction between the p75 neurotrophin receptor interacting factors, TRAF6 and NRIF. *J. Biol. Chem.* 279, 16646–16656.
- Glass, D.J., Nye, S.H., Hantzopoulos, P., Macchi, M.J., Squinto, S.P., Goldfarb, M., and Yancopoulos, G.D. (1991). TrkB mediates BDNF/NT-3-dependent survival and proliferation in fibroblasts lacking the low affinity NGF receptor. *Cell* 66, 405–413.
- Gluck, W.L., Hurst, D., Yuen, A., Levine, A.M., Dayton, M.A., Gockerman, J.P., Lucas, J., Denis-Mize, K., Tong, B., Navis, D., et al. (2004). Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-hodgkin's lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical response. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 2253–2264.
- Golay, J., Lazzari, M., Facchinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A., and Introna,

- M. (2001). CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 98, 3383–3389.
- Gonzales, P.A., Pisitkun, T., Hoffert, J.D., Tchapyjnikov, D., Star, R.A., Kleta, R., Wang, N.S., and Knepper, M.A. (2009). Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20, 363–379.
- Graff, J.R., Konicek, B.W., Carter, J.H., and Marcusson, E.G. (2008). Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res.* 68, 631–634.
- Grob, P.M., Ross, A.H., Koprowski, H., and Bothwell, M. (1985). Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 260, 8044–8049.
- Guiton, M., Gunn-Moore, F.J., Glass, D.J., Geis, D.R., Yancopoulos, G.D., and Tavaré, J.M. (1995). Naturally occurring tyrosine kinase inserts block high affinity binding of phospholipase C gamma and Shc to TrkC and neurotrophin-3 signaling. *J. Biol. Chem.* 270, 20384–20390.
- Habermann, T.M., Weller, E.A., Morrison, V.A., Gascoyne, R.D., Cassileth, P.A., Cohn, J.B., Dakhil, S.R., Woda, B., Fisher, R.I., Peterson, B.A., et al. (2006). Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 3121–3127.
- Hagner, P.R., Schneider, A., and Gartenhaus, R.B. (2010). Targeting the translational machinery as a novel treatment strategy for hematologic malignancies. *Blood* 115, 2127–2135.
- Hallböök, F. (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 616–621.
- Hallböök, F., Ibáñez, C.F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6, 845–858.
- Hampe, W., Rezgaoui, M., Hermans-Borgmeyer, I., and Schaller, C.H. (2001). The genes for the human VPS10 domain-containing receptors are large and contain many small exons. *Hum. Genet.* 108, 529–536.
- Hannafon, B.N., and Ding, W.-Q. (2013). Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14240–14269.
- Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Campo, E., Braziel, R.M., Jaffe, E.S., et al. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103, 275–282.
- Harjunpää, A., Wiklund, T., Collan, J., Janes, R., Rosenberg, J., Lee, D., Grillo-López, A., and Meri, S. (2001). Complement activation in circulation and central nervous system after rituximab (anti-CD20) treatment of B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 42, 731–738.
- Harrington, A.W., Kim, J.Y., and Yoon, S.O. (2002). Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 156–166.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peters, C., Falini, B., and Gatter, K.C. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361–1392.
- Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., and Chao, M.V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350, 678–683.
- Henry, C., Deschamps, M., Rohrlich, P.-S., Pallandre, J.-R., Rémy-Martin, J.-P., Callanan, M., Traverse-Glehen, A., GrandClément, C., Garnache-Ottou, F., Gressin, R., et al. (2010). Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. *Blood* 115, 2420–2429.
- Herrup, K., and Shooter, E.M. (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 3884–3888.
- Hessvik, N.P., Sandvig, K., and Llorente, A. (2013). Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer. *Front. Genet.* 4, 36.
- Heyn, H., and Esteller, M. (2013). EZH2: an epigenetic gatekeeper promoting lymphomagenesis. *Cancer Cell* 23, 563–565.
- Hillis, J., O'Dwyer, M., and Gorman, A.M. (2016). Neurotrophins and B-cell malignancies. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 41–56.

- Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, T., Shimada, K., Ito, M., Nakamura, S., Kiyoi, H., Kinoshita, T., and Naoe, T. (2009). Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* *113*, 4885–4893.
- Hirai, S., Izawa, M., Osada, S., Spyrou, G., and Ohno, S. (1996). Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* *12*, 641–650.
- Hofmeister, J.K., Cooney, D., and Coggeshall, K.M. (2000). Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells. Mol. Dis.* *26*, 133–143.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y.A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* *344*, 339–341.
- Holden, P.H., Asopa, V., Robertson, A.G., Clarke, A.R., Tyler, S., Bennett, G.S., Brain, S.D., Wilcock, G.K., Allen, S.J., Smith, S.K., et al. (1997). Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nat. Biotechnol.* *15*, 668–672.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emllet, D.R., Dieterich, R., and Wong, A.J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12419–12424.
- Hondermarck, H. (2012). Neurotrophins and their receptors in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* *23*, 357–365.
- Horvilleur, E., Sbarrato, T., Hill, K., Spriggs, R.V., Screen, M., Goodrem, P.J., Sawicka, K., Chaplin, L.C., Touriol, C., Packham, G., et al. (2014). A role for eukaryotic initiation factor 4B overexpression in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* *28*, 1092–1102.
- Hu, S., Xu-Monette, Z.Y., Tzankov, A., Green, T., Wu, L., Balasubramanyam, A., Liu, W., Visco, C., Li, Y., Miranda, R.N., et al. (2013). MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* *121*, 4021–4031; quiz 4250.
- Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T.F.E., Bernd, H.-W., Cogliatti, S.B., Dierlamm, J., Feller, A.C., et al. (2006). A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N. Engl. J. Med.* *354*, 2419–2430.
- Iqbal, J., Meyer, P.N., Smith, L.M., Johnson, N.A., Vose, J.M., Greiner, T.C., Connors, J.M., Staudt, L.M., Rimsza, L., Jaffe, E., et al. (2011). BCL2 Predicts Survival in Germinal Center B-cell-like Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with CHOP-like Therapy and Rituximab. *Clin. Cancer Res.* *17*, 7785–7795.
- Ishibashi, K., Suzuki, M., Sasaki, S., and Imai, M. (2001). Identification of a new multigene four-transmembrane family (MS4A) related to CD20, HTm4 and beta subunit of the high-affinity IgE receptor. *Gene* *264*, 87–93.
- Iyer, R., Evans, A.E., Qi, X., Ho, R., Minturn, J.E., Zhao, H., Balamuth, N., Maris, J.M., and Brodeur, G.M. (2010). Lestaurtinib enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in murine xenograft models of neuroblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 1478–1485.
- Iyer, R., Varela, C.R., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Light, J.E., Evans, A.E., Zhao, H., Thress, K., Brown, J.L., et al. (2012). AZ64 inhibits TrkB and enhances the efficacy of chemotherapy and local radiation in neuroblastoma xenografts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *70*, 477–486.
- Iyer, R., Wehrmann, L., Golden, R.L., Naraparaju, K., Croucher, J.L., MacFarland, S.P., Guan, P., Kolla, V., Wei, G., Cam, N., et al. (2016). Entrectinib is a potent inhibitor of Trk-driven neuroblastomas in a xenograft mouse model. *Cancer Lett.* *372*, 179–186.
- Janknecht, R., Ernst, W.H., Pingoud, V., and Nordheim, A. (1993). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J.* *12*, 5097–5104.
- Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J.R., Teng, K., Lioubinski, O., Sjoegaard, S.S., Breiderhoff, T., Gotthardt, M., Lin, F., Eilers, A., et al. (2007). Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat. Neurosci.* *10*, 1449–1457.
- Jazirehi, A.R., and Bonavida, B. (2011). Development of rituximab-resistant B-NHL clones: an in vitro model for studying tumor resistance to monoclonal antibody-mediated immunotherapy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *731*, 407–419.

- Jazirehi, A.R., Vega, M.I., and Bonavida, B. (2007). Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res.* *67*, 1270–1281.
- Jilani, I., O'Brien, S., Manshuri, T., Thomas, D.A., Thomazy, V.A., Imam, M., Naeem, S., Verstovsek, S., Kantarjian, H., Giles, F., et al. (2003). Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *102*, 3514–3520.
- Jin, H., Pan, Y., He, L., Zhai, H., Li, X., Zhao, L., Sun, L., Liu, J., Hong, L., Song, J., et al. (2007). p75 neurotrophin receptor inhibits invasion and metastasis of gastric cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* *5*, 423–433.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* *47*, 545–554.
- Johnson, N.A., Boyle, M., Bashashati, A., Leach, S., Brooks-Wilson, A., Sehn, L.H., Chhanabhai, M., Brinkman, R.R., Connors, J.M., Weng, A.P., et al. (2009). Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood* *113*, 3773–3780.
- Johnstone, R.M. (2005). Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells. Mol. Dis.* *34*, 214–219.
- Jones, K.R., and Reichardt, L.F. (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 8060–8064.
- Kahle, P., Barker, P.A., Shooter, E.M., and Hertel, C. (1994). p75 nerve growth factor receptor modulates p140trkA kinase activity, but not ligand internalization, in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* *38*, 599–606.
- Kahlert, C., and Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *91*, 431–437.
- Kalra, H., Simpson, R.J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V.C., Borràs, F.E., Breakefield, X., Budnik, V., et al. (2012). Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* *10*, e1001450.
- Kang, D., Oh, S., Ahn, S.-M., Lee, B.-H., and Moon, M.H. (2008). Proteomic analysis of exosomes from human neural stem cells by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* *7*, 3475–3480.
- Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2004). Neurobiology: A move to sort life from death. *Nature* *427*, 798–799.
- Kawamura, N., Kawamura, K., Manabe, M., and Tanaka, T. (2010). Inhibition of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling suppresses choriocarcinoma cell growth. *Endocrinology* *151*, 3006–3014.
- Kehrl, J.H., Riva, A., Wilson, G.L., and Thévenin, C. (1994). Molecular mechanisms regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression. *Immunol. Today* *15*, 432–436.
- Keller, S., Sanderson, M.P., Stoeck, A., and Altevogt, P. (2006). Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* *107*, 102–108.
- Kenchappa, R.S., Zampieri, N., Chao, M.V., Barker, P.A., Teng, H.K., Hempstead, B.L., and Carter, B.D. (2006). Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* *50*, 219–232.
- Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V.V., Misgeld, T., Klinkert, W.E., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R.L., Bartke, I., et al. (1999). Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* *189*, 865–870.
- Kharaziha, P., Ceder, S., Li, Q., and Panaretakis, T. (2012). Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim. Biophys. Acta* *1826*, 103–111.
- Khursigara, G., Bertin, J., Yano, H., Moffett, H., DiStefano, P.S., and Chao, M.V. (2001). A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 5854–5863.
- Khwaja, F.S., Quann, E.J., Pattabiraman, N., Wynne, S., and Djakiew, D. (2008). Carprofen induction of p75NTR-dependent apoptosis via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 3539–3545.
- Kim, T., and Hempstead, B.L. (2009). NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death. *EMBO J.* *28*, 1612–1623.

- Kim, D.-K., Kang, B., Kim, O.Y., Choi, D.-S., Lee, J., Kim, S.R., Go, G., Yoon, Y.J., Kim, J.H., Jang, S.C., et al. (2013). EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 2.
- Kim, S., Salim, A.A., Swanson, S.M., and Kinghorn, A.D. (2006). Potential of cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* species in cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med. Chem.* 6, 319–345.
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Kusunoki, T., Hosoi, S., and Mikawa, H. (1991). Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production. *Eur. J. Immunol.* 21, 137–141.
- King, M.L., Chiang, C.-C., Ling, H.-C., Fujita, E., Ochiai, M., and McPhail, A.T. (1982). X-Ray crystal structure of rocaglamide, a novel antileulemic 1H-cyclopenta[b]benzofuran from *Aglaia elliptifolia*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1150–1151.
- Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 22–33.
- Klein, R., Parada, L.F., Coulier, F., and Barbacid, M. (1989). trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* 8, 3701–3709.
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., and Barbacid, M. (1991a). The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65, 189–197.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991b). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395–403.
- Knapper, S., Burnett, A.K., Littlewood, T., Kell, W.J., Agrawal, S., Chopra, R., Clark, R., Levis, M.J., and Small, D. (2006). A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood* 108, 3262–3270.
- Koch, R., Aung, T., Vogel, D., Chapuy, B., Wenzel, D., Becker, S., Sinzig, U., Venkataramani, V., von Mach, T., Jacob, R., et al. (2016). Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 395–404.
- Koene, H.R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, A.E., and de Haas, M. (1997). Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90, 1109–1114.
- Kohrt, H.E., Sagiv-Barfi, I., Rafiq, S., Herman, S.E.M., Butchar, J.P., Cheney, C., Zhang, X., Buggy, J.J., Muthusamy, N., Levy, R., et al. (2014). Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 123, 1957–1960.
- van der Kolk, L.E., Grillo-López, A.J., Baars, J.W., Hack, C.E., and van Oers, M.H. (2001). Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *Br. J. Haematol.* 115, 807–811.
- Krappmann, D. (2012). Attacking MALT1 for ABC-DLBCL therapy. *Oncotarget* 3, 1489–1490.
- Krock, E., Currie, J.B., Weber, M.H., Ouellet, J.A., Stone, L.S., Rosenzweig, D.H., and Haglund, L. (2016). Nerve Growth Factor Is Regulated by Toll-Like Receptor 2 in Human Intervertebral Discs. *J. Biol. Chem.* 291, 3541–3551.
- Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Gelfand, E.W., and Brodie, C. (2002). NGF rescues human B lymphocytes from anti-IgM induced apoptosis by activation of PKCzeta. *Eur. J. Immunol.* 32, 136–143.
- Labouyrie, E., Parrens, M., de Mascarel, A., Bloch, B., and Merlio, J.P. (1997). Distribution of NGF receptors in normal and pathologic human lymphoid tissues. *J. Neuroimmunol.* 77, 161–173.
- Labouyrie, E., Dubus, P., Groppi, A., Mahon, F.X., Ferrer, J., Parrens, M., Reiffers, J., de Mascarel, A., and Merlio, J.P. (1999). Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am. J. Pathol.* 154, 405–415.
- Lam, L.T., Davis, R.E., Pierce, J., Hepperle, M., Xu, Y., Hottelet, M., Nong, Y., Wen, D., Adams, J., Dang, L., et al. (2005). Small molecule inhibitors of I kappa B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 28–40.
- Lam, L.T., Wright, G., Davis, R.E., Lenz, G., Farinha, P., Dang, L., Chan, J.W., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., and Staudt, L.M. (2008). Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse

- large B-cell lymphoma. *Blood* 111, 3701–3713.
- Lamballe, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967–979.
- Lambiase, A., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S., Bonini, S., Starace, G., D’Elios, M.M., De Carli, M., and Aloe, L. (1997). Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100, 408–414.
- Lamparski, H.G., Metha-Damani, A., Yao, J.-Y., Patel, S., Hsu, D.-H., Ruegg, C., and Le Pecq, J.-B. (2002). Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* 270, 211–226.
- Lawn, S., Krishna, N., Pisklakova, A., Qu, X., Fenstermacher, D.A., Fournier, M., Vrionis, F.D., Tran, N., Chan, J.A., Kenchappa, R.S., et al. (2015). Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J. Biol. Chem.* 290, 3814–3824.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948.
- Lee, S.J., Li, G.G., Kim, S.T., Hong, M.E., Jang, J., Yoon, N., Ahn, S.M., Murphy, D., Christiansen, J., Wei, G., et al. (2015). NTRK1 rearrangement in colorectal cancer patients: evidence for actionable target using patient-derived tumor cell line. *Oncotarget* 6, 39028–39035.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., and Barde, Y.A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149–152.
- Lenz, G., and Staudt, L.M. (2010). Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 362, 1417–1429.
- Lenz, G., Wright, G., Dave, S.S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., Xu, W., Tan, B., Goldschmidt, N., Iqbal, J., et al. (2008a). Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 359, 2313–2323.
- Lenz, G., Wright, G.W., Emre, N.C.T., Kohlhammer, H., Dave, S.S., Davis, R.E., Carty, S., Lam, L.T., Shaffer, A.L., Xiao, W., et al. (2008b). Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13520–13525.
- Lenz, G., Wright, G., Dave, S.S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., Xu, W., Tan, B., Goldschmidt, N., Iqbal, J., et al. (2008c). Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 359, 2313–2323.
- Lessmann, V., Gottmann, K., and Malcangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341–374.
- Léveillé, C., AL-Daccak, R., and Mourad, W. (1999). CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur. J. Immunol.* 29, 65–74.
- Li, H., Ayer, L.M., Lytton, J., and Deans, J.P. (2003). Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 278, 42427–42434.
- Li, H., Ayer, L.M., Polyak, M.J., Mutch, C.M., Petrie, R.J., Gauthier, L., Shariat, N., Hendzel, M.J., Shaw, A.R., Patel, K.D., et al. (2004). The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts: antibody binding increases the affinity of the association through an epitope-dependent cross-linking-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 279, 19893–19901.
- Li, J., Sherman-Baust, C.A., Tsai-Turton, M., Bristow, R.E., Roden, R.B., and Morin, P.J. (2009). Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. *BMC Cancer* 9, 244.
- Li, Z., Ma, Y.-Y., Wang, J., Zeng, X.-F., Li, R., Kang, W., and Hao, X.-K. (2016). Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients. *OncoTargets Ther.* 9, 139–148.
- Liepinsh, E., Ilag, L.L., Otting, G., and Ibáñez, C.F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 16, 4999–5005.
- Lim, S.H., and Levy, R. (2014). Translational medicine in action: anti-CD20 therapy in lymphoma. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 193, 1519–1524.
- Lin, Z., Tann, J.Y., Goh, E.T.H., Kelly, C., Lim, K.B., Gao, J.F., and Ibanez, C.F. (2015). Structural basis of death domain signaling in the p75 neurotrophin receptor. *eLife* 4, e11692.
- Li-Weber, M. (2015). Molecular mechanisms and anti-cancer aspects of the medicinal phytochemicals rocaglamides (=flavaglines). *Int. J. Cancer* 137, 1791–1799.
- Lo Cicero, A., Stahl, P.D., and Raposo, G. (2015). Extracellular vesicles shuffling intercellular

- messages: for good or for bad. *Curr. Opin. Cell Biol.* 35, 69–77.
- Lossos, I.S. (2005). Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 6351–6357.
- Luberg, K., Wong, J., Weickert, C.S., and Timmusk, T. (2010). Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J. Neurochem.* 113, 952–964.
- Luberg, K., Park, R., Aleksejeva, E., and Timmusk, T. (2015). Novel transcripts reveal a complex structure of the human TRKA gene and imply the presence of multiple protein isoforms. *BMC Neurosci.* 16, 78.
- Lucas, D.M., Edwards, R.B., Lozanski, G., West, D.A., Shin, J.D., Vargo, M.A., Davis, M.E., Rozewski, D.M., Johnson, A.J., Su, B.-N., et al. (2009). The novel plant-derived agent silvestrol has B-cell selective activity in chronic lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo. *Blood* 113, 4656–4666.
- Lynch, S., Santos, S.G., Campbell, E.C., Nimmo, A.M.S., Botting, C., Prescott, A., Antoniou, A.N., and Powis, S.J. (2009). Novel MHC class I structures on exosomes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 1884–1891.
- Macor, P., Tripodo, C., Zorzet, S., Piovan, E., Bossi, F., Marzari, R., Amadori, A., and Tedesco, F. (2007). In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab. *Cancer Res.* 67, 10556–10563.
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., and Yancopoulos, G.D. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247, 1446–1451.
- Maloney, D.G., Grillo-López, A.J., White, C.A., Bodkin, D., Schilder, R.J., Neidhart, J.A., Janakiraman, N., Foon, K.A., Liles, T.M., Dallaire, B.K., et al. (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90, 2188–2195.
- Mandelbaum, J., Bhagat, G., Tang, H., Mo, T., Brahmachary, M., Shen, Q., Chadburn, A., Rajewsky, K., Tarakhovskiy, A., Pasqualucci, L., et al. (2010). BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 18, 568–579.
- Manshouri, T., Do, K., Wang, X., Giles, F.J., O'Brien, S.M., Saffer, H., Thomas, D., Jilani, I., Kantarjian, H.M., Keating, M.J., et al. (2003). Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood* 101, 2507–2513.
- Marchetti, D., Aucoin, R., Blust, J., Murry, B., and Greiter-Wilke, A. (2004). p75 neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J. Cell. Biochem.* 91, 206–215.
- Martelli, M., Ferreri, A.J.M., Agostinelli, C., Di Rocco, A., Pfreundschuh, M., and Pileri, S.A. (2013). Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 87, 146–171.
- Martin-Zanca, D., Mitra, G., Long, L.K., and Barbacid, M. (1986). Molecular characterization of the human trk oncogene. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 2, 983–992.
- Mazzoni, I.E., Saïd, F.A., Aloyz, R., Miller, F.D., and Kaplan, D. (1999). Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 9716–9727.
- McGregor, L.M., McCune, B.K., Graff, J.R., McDowell, P.R., Romans, K.E., Yancopoulos, G.D., Ball, D.W., Baylin, S.B., and Nelkin, B.D. (1999). Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4540–4545.
- Melamed, I., Patel, H., Brodie, C., and Gelfand, E.W. (1999). Activation of Vav and Ras through the nerve growth factor and B cell receptors by different kinases. *Cell. Immunol.* 191, 83–89.
- Melo, S.A., Sugimoto, H., O'Connell, J.T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L.T., Melo, C.A., et al. (2014). Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell* 26, 707–721.
- Metsis, M., Timmusk, T., Allikmets, R., Saarma, M., and Persson, H. (1992). Regulatory elements and transcriptional regulation by testosterone and retinoic acid of the rat nerve growth factor receptor

- promoter. *Gene* 121, 247–254.
- Middlemas, D.S., Lindberg, R.A., and Hunter, T. (1991). trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol. Cell. Biol.* 11, 143–153.
- Mirnic, Z.K., Yan, C., Portugal, C., Kim, T.-W., Saragovi, H.U., Sisodia, S.S., Mirnic, K., and Schor, N.F. (2005). P75 neurotrophin receptor regulates expression of neural cell adhesion molecule 1. *Neurobiol. Dis.* 20, 969–985.
- Miyoshi, H., Arakawa, F., Sato, K., Kimura, Y., Kiyasu, J., Takeuchi, M., Yoshida, M., Ichikawa, A., Ishibashi, Y., Nakamura, Y., et al. (2012). Comparison of CD20 expression in B-cell lymphoma between newly diagnosed, untreated cases and those after rituximab treatment. *Cancer Sci.* 103, 1567–1573.
- Mohammad, R.M., Aboukameel, A., Nabha, S., Ibrahim, D., and Al-Katib, A. (2002). Rituximab, Cyclophosphamide, Dexamethasone (RCD) regimen induces cure in WSU-WM xenograft model and a partial remission in previously treated Waldenström's macroglobulinemia patient. *J. Drug Target.* 10, 405–410.
- Monnereau A, Remontet L, Maynadié M, Binder-Foucard F, Belot A, Troussard X, Bossard N. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. Partie 2 – Hémopathies malignes. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire ; 2013. 88 p.
- Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J., and Wolfman, A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260, 1658–1661.
- Morgan, G., Vornanen, M., Puitinen, J., Naukkarinen, A., Brincker, H., Olsen, J., Coeburgh, J.W., Vrints, L.W., Clayden, D., McNally, R., et al. (1997). Changing trends in the incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Europe. Biomed Study Group. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 8 *Suppl* 2, 49–54.
- Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* 42, 181–185.
- Morotti, A., Mila, S., Accornero, P., Tagliabue, E., and Ponzetto, C. (2002). K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene* 21, 4885–4893.
- Muris, J.J.F., Meijer, C.J.L.M., Vos, W., van Krieken, J.H.J.M., Jiwa, N.M., Ossenkoppele, G.J., and Oudejans, J.J. (2006). Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J. Pathol.* 208, 714–723.
- Nabhan, C., and Kay, N.E. (2011). The emerging role of ofatumumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Med. Insights Oncol.* 5, 45–53.
- Nadezhdin, K.D., García-Carpio, I., Goncharuk, S.A., Mineev, K.S., Arseniev, A.S., and Vilar, M. (2016). Structural Basis of p75 Transmembrane Domain Dimerization. *J. Biol. Chem.* 291, 12346–12357.
- Nadler, L.M., Korsmeyer, S.J., Anderson, K.C., Boyd, A.W., Slaughenhaupt, B., Park, E., Jensen, J., Coral, F., Mayer, R.J., and Sallan, S.E. (1984). B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 74, 332–340.
- Nagasubramanian, R., Wei, J., Gordon, P., Rastatter, J.C., Cox, M.C., and Pappo, A. (2016). Infantile Fibrosarcoma With NTRK3-ETV6 Fusion Successfully Treated With the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Pediatr. Blood Cancer* 63, 1468–1470.
- Nakagawara, A., Liu, X.G., Ikegaki, N., White, P.S., Yamashiro, D.J., Nycum, L.M., Biegel, J.A., and Brodeur, G.M. (1995). Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics* 25, 538–546.
- Natkunam, Y., Farinha, P., Hsi, E.D., Hans, C.P., Tibshirani, R., Sehn, L.H., Connors, J.M., Gratzinger, D., Rosado, M., Zhao, S., et al. (2008). LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 447–454.
- Naveilhan, P., Neveu, I., Baudet, C., Funakoshi, H., Wion, D., Brachet, P., and Metsis, M. (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 41, 259–268.

- Nielsen, M.S. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 20, 2180–2190.
- Nilsson, S.K., Christensen, S., Raarup, M.K., Ryan, R.O., Nielsen, M.S., and Olivecrona, G. (2008). Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the VPS10p domain receptor families. *J. Biol. Chem.* 283, 25920–25927.
- Nolte-'t Hoen, E.N.M., van der Vlist, E.J., Aalberts, M., Mertens, H.C.H., Bosch, B.J., Bartelink, W., Mastrobattista, E., van Gaal, E.V.B., Stoorvogel, W., Arkesteijn, G.J.A., et al. (2012). Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 8, 712–720.
- Nyborg, A.C., Ladd, T.B., Zwizinski, C.W., Lah, J.J., and Golde, T.E. (2006). Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel γ -secretase substrates. *Mol. Neurodegener.* 1, 3.
- Nye, S.H., Squinto, S.P., Glass, D.J., Stitt, T.N., Hantzopoulos, P., Macchi, M.J., Lindsay, N.S., Ip, N.Y., and Yancopoulos, G.D. (1992). K-252a and staurosporine selectively block autophosphorylation of neurotrophin receptors and neurotrophin-mediated responses. *Mol. Biol. Cell* 3, 677–686.
- Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci.* 35, 261–270.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843–848.
- Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. (2005). p75NTR--live or let die. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 49–57.
- Odate, S., Onishi, H., Nakamura, K., Kojima, M., Uchiyama, A., Kato, M., and Katano, M. (2013). Tropomyosin-related kinase B inhibitor has potential for tumor regression and relapse prevention in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *Anticancer Res.* 33, 3699–3703.
- Oflazoglu, E., and Audoly, L.P. (2010). Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology. *mAbs* 2, 14–19.
- Ogawa, Y., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., and Yanoshita, R. (2008). Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1059–1062.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “preassembled signaling complexes” at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 5419–5422.
- Okugawa, Y., Tanaka, K., Inoue, Y., Kawamura, M., Kawamoto, A., Hiro, J., Saigusa, S., Toiyama, Y., Ohi, M., Uchida, K., et al. (2013). Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B pathway in gastric cancer. *Br. J. Cancer* 108, 121–130.
- Palko, M.E., Coppola, V., and Tessarollo, L. (1999). Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 775–782.
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491.
- Park, Y.H., Sohn, S.K., Kim, J.G., Lee, M.-H., Song, H.S., Kim, M.K., Jung, J.S., Lee, J.-J., Kim, H.J., and Kim, D.H. (2009). Interaction between BCL2 and interleukin-10 gene polymorphisms alter outcomes of diffuse large B-cell lymphoma following rituximab plus CHOP chemotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 2107–2115.
- Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S.V., Aster, J.C., Murty, V.V., Shipp, M.A., and Dalla-Favera, R. (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 203, 311–317.
- Passiglia, F., Caparica, R., Giovannetti, E., Giallombardo, M., Listi, A., Diana, P., Cirrincione, G., Caglevic, C., Raez, L.E., Russo, A., et al. (2016). The potential of neurotrophic tyrosine kinase (NTRK) inhibitors for treating lung cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 25, 385–392.
- Patel, M.R., Bauer, T.M., Liu, S.V., Drilon, A., Wheler, J., Shaw, A., Farago, A., Ou, S.-H.I., Luo, D., Yeh, L., et al. (2015). STARTRK-1: Phase 1/2a study of entrectinib, an oral Pan-Trk, ROS1, and ALK inhibitor, in patients with advanced solid tumors with relevant molecular alterations. *Age* 1, 10.
- Pearse, R.N., Swendeman, S.L., Li, Y., Rafii, D., and Hempstead, B.L. (2005). A neurotrophin axis in

- myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* *105*, 4429–4436.
- Petrie, R.J., and Deans, J.P. (2002). Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 2886–2891.
- Pfeifer, M., Grau, M., Lenze, D., Wenzel, S.-S., Wolf, A., Wollert-Wulf, B., Dietze, K., Nogai, H., Storek, B., Madle, H., et al. (2013). PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 12420–12425.
- Pfreundschuh, M., Trümper, L., Osterborg, A., Pettengell, R., Trneny, M., Imrie, K., Ma, D., Gill, D., Walewski, J., Zinzani, P.-L., et al. (2006). CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* *7*, 379–391.
- Pisitkun, T., Shen, R.-F., and Knepper, M.A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 13368–13373.
- Polier, G., Neumann, J., Thuaud, F., Ribeiro, N., Gelhaus, C., Schmidt, H., Giaisi, M., Köhler, R., Müller, W.W., Proksch, P., et al. (2012). The natural anticancer compounds rocaglamides inhibit the Raf-MEK-ERK pathway by targeting prohibitin 1 and 2. *Chem. Biol.* *19*, 1093–1104.
- Polyak, M.J., Taylor, S.H., and Deans, J.P. (1998). Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 3242–3248.
- Polyak, M.J., Li, H., Shariat, N., and Deans, J.P. (2008). CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* *283*, 18545–18552.
- Powell, J.C., Twomey, C., Jain, R., and McCarthy, J.V. (2009). Association between Presenilin-1 and TRAF6 modulates regulated intramembrane proteolysis of the p75NTR neurotrophin receptor. *J. Neurochem.* *108*, 216–230.
- Proud, C.G. (2015). Mnk3, eIF4E phosphorylation and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1849*, 766–773.
- Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., Day, J.M., Taylor, D.D., and Kloecker, G.H. (2009). Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer* *10*, 42–46.
- Radeke, M.J., Misko, T.P., Hsu, C., Herzenberg, L.A., and Shooter, E.M. (1987). Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* *325*, 593–597.
- Rahmé, R., Benayoun, E., Pautas, C., Cordonnier, C., Wagner-Ballon, O., and Maury, S. (2013). Treatment with 5-azacytidin upregulates the expression of CD20 in CD20-negative B cell acute lymphoblastic leukemia: a case report. *Exp. Hematol.* *41*, 505–507.
- Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., Rapp, U.R., and Rudel, T. (2005). Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nat. Cell Biol.* *7*, 837–843.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* *183*, 1161–1172.
- Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2011). Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem. Pharmacol.* *81*, 1171–1182.
- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim. Biophys. Acta* *1841*, 108–120.
- Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *361*, 1545–1564.
- Renaudineau, Y., Devauchelle-Pensec, V., Hanrotel, C., Pers, J.-O., Saraux, A., and Youinou, P. (2009). Monoclonal anti-CD20 antibodies: mechanisms of action and monitoring of biological effects. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* *76*, 458–463.
- Rezvani, A.R., and Maloney, D.G. (2011). Rituximab resistance. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *24*, 203–216.
- Ribeiro, N., Thuaud, F., Nebigil, C., and Désaubry, L. (2012). Recent advances in the biology and chemistry of the flavaglines. *Bioorg. Med. Chem.* *20*, 1857–1864.
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C.M., Blendy, J.A., and Ginty, D.D. (1999). Mediation by a CREB

- family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286, 2358–2361.
- Robbins, P.D., and Morelli, A.E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 195–208.
- Robert, F., Carrier, M., Rawe, S., Chen, S., Lowe, S., and Pelletier, J. (2009). Altering Chemosensitivity by Modulating Translation Elongation. *PLoS ONE* 4.
- Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G., and Barde, Y.A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4, 487–492.
- Rodríguez-Tébar, A., Dechant, G., Götz, R., and Barde, Y.A. (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 11, 917–922.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltmane, J.M., et al. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 346, 1937–1947.
- Rosini, P., De Chiara, G., Lucibello, M., Garaci, E., Cozzolino, F., and Torcia, M. (2000). NGF withdrawal induces apoptosis in CESS B cell line through p38 MAPK activation and Bcl-2 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 753–759.
- Roux, P.P., and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 67, 203–233.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G., et al. (1992). Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360, 689–692.
- Safaei, R. (2005). Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 4, 1595–1604.
- Salehi, A.H., Xanthoudakis, S., and Barker, P.A. (2002). NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 48043–48050.
- von Schack, D., Casademunt, E., Schweigreiter, R., Meyer, M., Bibel, M., and Dechant, G. (2001). Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat. Neurosci.* 4, 977–978.
- Schenone, A., Gill, J.S., Zacharias, D.A., and Windebank, A.J. (1996). Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 64, 141–149.
- Schliemann, C., Palumbo, A., Zuberbühler, K., Villa, A., Kaspar, M., Trachsel, E., Klapper, W., Messen, H.D., and Neri, D. (2009). Complete eradication of human B-cell lymphoma xenografts using rituximab in combination with the immunocytokine L19-IL2. *Blood* 113, 2275–2283.
- Schuhmann, B., Dietrich, A., Sel, S., Hahn, C., Klingenspor, M., Lommatzsch, M., Gudermann, T., Braun, A., Renz, H., and Nockher, W.A. (2005). A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J. Neuroimmunol.* 163, 15–23.
- Scuto, A., Kujawski, M., Kowolik, C., Krymskaya, L., Wang, L., Weiss, L.M., Digiusto, D., Yu, H., Forman, S., and Jove, R. (2011). STAT3 inhibition is a therapeutic strategy for ABC-like diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 71, 3182–3188.
- Sehgal, A., Patil, N., and Chao, M. (1988). A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3160–3167.
- Sehn, L.H. (2012). Paramount prognostic factors that guide therapeutic strategies in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2012, 402–409.
- Sehn, L.H., and Gascoyne, R.D. (2015). Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* 125, 22–32.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chrétien, M., and Murphy, R.A. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.* 314 (Pt 3), 951–960.

- Shan, D., Ledbetter, J.A., and Press, O.W. (2000). Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *48*, 673–683.
- Shelton, D.L., Sutherland, J., Gripp, J., Camerato, T., Armanini, M.P., Phillips, H.S., Carroll, K., Spencer, S.D., and Levinson, A.D. (1995). Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *15*, 477–491.
- Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* *24*, 1–29.
- Shipp, M.A., Ross, K.N., Tamayo, P., Weng, A.P., Kutok, J.L., Aguiar, R.C.T., Gaasenbeek, M., Angelo, M., Reich, M., Pinkus, G.S., et al. (2002). Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat. Med.* *8*, 68–74.
- Siberil, S., Dutertre, C.-A., Boix, C., and Teillaud, J.-L. (2005). [Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes]. *Transfus. Clin. Biol. J. Soc. Francaise Transfus. Sang.* *12*, 114–122.
- Singh, V., Gupta, D., and Almasan, A. (2015). Development of Novel Anti-Cd20 Monoclonal Antibodies and Modulation in Cd20 Levels on Cell Surface: Looking to Improve Immunotherapy Response. *J. Cancer Sci. Ther.* *7*, 347–358.
- Skeldal, S., Matusica, D., Nykjaer, A., and Coulson, E.J. (2011). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR). *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *33*, 614–625.
- Skeldal, S., Sykes, A.M., Glerup, S., Matusica, D., Palstra, N., Autio, H., Boskovic, Z., Madsen, P., Castrén, E., Nykjaer, A., et al. (2012). Mapping of the Interaction Site between Sortilin and the p75 Neurotrophin Receptor Reveals a Regulatory Role for the Sortilin Intracellular Domain in p75 Neurotrophin Receptor Shedding and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *287*, 43798–43809.
- Ślabicki, M., Lee, K.S., Jethwa, A., Sellner, L., Sacco, F., Walther, T., Hüllelein, J., Dietrich, S., Wu, B., Lipka, D.B., et al. (2016). Dissection of CD20 regulation in lymphoma using RNAi. *Leukemia.*
- Smith, M.R. (2003). Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* *22*, 7359–7368.
- Sniderhan, L.F., Garcia-Bates, T.M., Burgart, M., Bernstein, S.H., Phipps, R.P., and Maggirwar, S.B. (2009). Neurotrophin signaling through tropomyosin receptor kinases contributes to survival and proliferation of non-Hodgkin lymphoma. *Exp. Hematol.* *37*, 1295–1309.
- Sondermann, P., and Szymkowski, D.E. (2016). Harnessing Fc receptor biology in the design of therapeutic antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* *40*, 78–87.
- Staudt, L.M. (2010). Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000109.
- Steinhardt, J.J., and Gartenhaus, R.B. (2012). Promising personalized therapeutic options for diffuse large B-cell Lymphoma Subtypes with oncogene addictions. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 4538–4548.
- de StGroth, S.F., and Scheidegger, D. (1980). Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods* *35*, 1–21.
- Stoilov, P., Castren, E., and Stamm, S. (2002). Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *290*, 1054–1065.
- Street, J.M., Barran, P.E., Mackay, C.L., Weidt, S., Balmforth, C., Walsh, T.S., Chalmers, R.T.A., Webb, D.J., and Dear, J.W. (2012). Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J. Transl. Med.* *10*, 5.
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic Cph. Den.* *10*, 925–937.
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., and Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* *89*, 205–212.
- Sugimoto, T., Tomita, A., Hiraga, J., Shimada, K., Kiyoi, H., Kinoshita, T., and Naoe, T. (2009). Escape mechanisms from antibody therapy to lymphoma cells: downregulation of CD20 mRNA by recruitment of the HDAC complex and not by DNA methylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *390*, 48–53.
- Suzuki, E., Umezawa, K., and Bonavida, B. (2007). Rituximab inhibits the constitutively activated

- PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene* 26, 6184–6193.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390.
- Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Desantis, G., Tessitore, A., Vetuschi, A., Sfera, R., Rucci, N., Argenti, B., Screpanti, I., et al. (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 6, 347–360.
- Takizawa, M., Tolarová, H., Li, Z., Dubois, W., Lim, S., Callen, E., Franco, S., Mosaico, M., Feigenbaum, L., Alt, F.W., et al. (2008). AID expression levels determine the extent of cMyc oncogenic translocations and the incidence of B cell tumor development. *J. Exp. Med.* 205, 1949–1957.
- Tam, W., Gomez, M., Chadburn, A., Lee, J.W., Chan, W.C., and Knowles, D.M. (2006). Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 107, 4090–4100.
- Taniuchi, M., Johnson, E.M., Roach, P.J., and Lawrence, J.C. (1986). Phosphorylation of nerve growth factor receptor proteins in sympathetic neurons and PC12 cells. In vitro phosphorylation by the cAMP-independent protein kinase FA/GSK-3. *J. Biol. Chem.* 261, 13342–13349.
- Tapley, P., Lamballe, F., and Barbacid, M. (1992). K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7, 371–381.
- Tedder, T.F., and Engel, P. (1994). CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol. Today* 15, 450–454.
- Tedder, T.F., Klejman, G., Schlossman, S.F., and Saito, H. (1989). Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 142, 2560–2568.
- Teeling, J.L., Mackus, W.J.M., Wiegman, L.J.J.M., van den Brakel, J.H.N., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., et al. (2006). The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 362–371.
- Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2004). Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 61, 35–48.
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 5455–5463.
- Tessarollo, L. (1998). Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 125–137.
- Testoni, M., Zucca, E., Young, K.H., and Bertoni, F. (2015). Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 1069–1080.
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O., and Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* 3, 1156–1162.
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593.
- Thiele, C.J., Li, Z., and McKee, A.E. (2009). On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 5962–5967.
- Thompson, C.A., Purushothaman, A., Ramani, V.C., Vlodavsky, I., and Sanderson, R.D. (2013). Heparanase regulates secretion, composition, and function of tumor cell-derived exosomes. *J. Biol. Chem.* 288, 10093–10099.
- Thorpe, L.W., Werrbach-Perez, K., and Perez-Polo, J.R. (1987). Effects of nerve growth factor on the expression of interleukin-2 receptors on cultured human lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 496, 310–311.
- Thuaud, F., Bernard, Y., Türkeri, G., Dirr, R., Aubert, G., Cresteil, T., Baguet, A., Tomasetto, C.,

- Svitkin, Y., Sonenberg, N., et al. (2009). Synthetic analogue of rocaglaol displays a potent and selective cytotoxicity in cancer cells: involvement of apoptosis inducing factor and caspase-12. *J. Med. Chem.* *52*, 5176–5187.
- Tilly, H., Vitolo, U., Walewski, J., da Silva, M.G., Shpilberg, O., André, M., Pfreundschuh, M., Dreyling, M., and ESMO Guidelines Working Group (2012). Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO 23 Suppl 7*, vii78-82.
- Torcia, M., Bracci-Laudiero, L., Lucibello, M., Nencioni, L., Labardi, D., Rubartelli, A., Cozzolino, F., Aloe, L., and Garaci, E. (1996). Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* *85*, 345–356.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* *319*, 1244–1247.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem, N., and Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* *645*, 63–70.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 133–146.
- Tsutsumi, Y., Ohigashi, H., Ito, S., Shiratori, S., and Teshima, T. (2016). 5-Azacytidine partially restores CD20 expression in follicular lymphoma that lost CD20 expression after rituximab treatment: a case report. *J. Med. Case Reports* *10*, 27.
- Uchida, J., Lee, Y., Hasegawa, M., Liang, Y., Bradney, A., Oliver, J.A., Bowen, K., Steeber, D.A., Haas, K.M., Poe, J.C., et al. (2004). Mouse CD20 expression and function. *Int. Immunol.* *16*, 119–129.
- Underwood, C.K., Reid, K., May, L.M., Bartlett, P.F., and Coulson, E.J. (2008). Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* *37*, 346–358.
- Unruh, T.L., Li, H., Mutch, C.M., Shariat, N., Grigoriou, L., Sanyal, R., Brown, C.B., and Deans, J.P. (2005). Cholesterol depletion inhibits src family kinase-dependent calcium mobilization and apoptosis induced by rituximab crosslinking. *Immunology* *116*, 223–232.
- Vaillant, A.R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (1999). Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J. Cell Biol.* *146*, 955–966.
- Valent, A., Danglot, G., and Bernheim, A. (1997). Mapping of the tyrosine kinase receptors trkA (NTRK1), trkB (NTRK2) and trkC(NTRK3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence in situ hybridization. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *5*, 102–104.
- Valentine, M.A., Cotner, T., Gaur, L., Torres, R., and Clark, E.A. (1987). Expression of the human B-cell surface protein CD20: alteration by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 8085–8089.
- Vanhecke, E., Adriaenssens, E., Verbeke, S., Meignan, S., Germain, E., Berteaux, N., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. (2011). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 1741–1752.
- Venugopal, P., Sivaraman, S., Huang, X.K., Nayini, J., Gregory, S.A., and Preisler, H.D. (2000). Effects of cytokines on CD20 antigen expression on tumor cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* *24*, 411–415.
- Viatour, P., Bentires-Alj, M., Chariot, A., Deregowski, V., de Leval, L., Merville, M.-P., and Bours, V. (2003). NF- kappa B2/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia* *17*, 1349–1356.
- Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R.S., Reversi, A., Klos-Applequist, J.M., Karaca, E., Simi, A., Spuch, C., Choi, S., Friedman, W.J., et al. (2009). Ligand-independent signaling by disulfide-crosslinked dimers of the p75 neurotrophin receptor. *J. Cell Sci.* *122*, 3351–3357.
- Volosin, M., Song, W., Almeida, R.D., Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., and Friedman, W.J. (2006). Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 7756–7766.
- Walshe, C.A., Beers, S.A., French, R.R., Chan, C.H.T., Johnson, P.W., Packham, G.K., Glennie, M.J., and Cragg, M.S. (2008). Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell

- antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 16971–16984.
- Walton, M., Woodgate, A.M., Muravlev, A., Xu, R., During, M.J., and Dragunow, M. (1999). CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *J. Neurochem.* 73, 1836–1842.
- Wang, W., and Lotze, M.T. (2014). Good things come in small packages: exosomes, immunity and cancer. *Cancer Gene Ther.* 21, 139–141.
- Wang, L., Rahn, J.J., Lun, X., Sun, B., Kelly, J.J.P., Weiss, S., Robbins, S.M., Forsyth, P.A., and Senger, D.L. (2008). Gamma-secretase represents a therapeutic target for the treatment of invasive glioma mediated by the p75 neurotrophin receptor. *PLoS Biol.* 6, e289.
- Wang, W., Chen, J., and Guo, X. (2014). The role of nerve growth factor and its receptors in tumorigenesis and cancer pain. *Biosci. Trends* 8, 68–74.
- Wang, Y.M., Seibenhener, M.L., Vandenplas, M.L., and Wooten, M.W. (1999). Atypical PKC zeta is activated by ceramide, resulting in coactivation of NF-kappaB/JNK kinase and cell survival. *J. Neurosci. Res.* 55, 293–302.
- Weeraratna, A.T., Dalrymple, S.L., Lamb, J.C., Denmeade, S.R., Miknyoczki, S., Dionne, C.A., and Isaacs, J.T. (2001). Pan-trk inhibition decreases metastasis and enhances host survival in experimental models as a result of its selective induction of apoptosis of prostate cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 2237–2245.
- Weiner, G.J. (2010). Rituximab: mechanism of action. *Semin. Hematol.* 47, 115–123.
- Weiner, L.M., Surana, R., and Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 317–327.
- Westergaard, U.B., Sørensen, E.S., Hermey, G., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Kirkegaard, K., Jacobsen, C., Gliemann, J., Madsen, P., and Petersen, C.M. (2004). Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J. Biol. Chem.* 279, 50221–50229.
- Whitfield, J., Neame, S.J., Paquet, L., Bernard, O., and Ham, J. (2001). Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 29, 629–643.
- Wing, E.J., Magee, D.M., Whiteside, T.L., Kaplan, S.S., and Shadduck, R.K. (1989). Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor alpha and interferon in cancer patients. *Blood* 73, 643–646.
- Winiarska, M., Bojarczuk, K., Pyrzynska, B., Bil, J., Siernicka, M., Dwojak, M., Bobrowicz, M., Miazek, N., Zapala, P., Zagozdzon, A., et al. (2014). Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *mAbs* 6, 1300–1313.
- Wojciechowski, W., Li, H., Marshall, S., Dell’Agnola, C., and Espinoza-Delgado, I. (2005). Enhanced expression of CD20 in human tumor B cells is controlled through ERK-dependent mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 7859–7868.
- Wong, J., and Garner, B. (2012). Evidence that truncated TrkB isoform, TrkB-Shc can regulate phosphorylated TrkB protein levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 331–335.
- Wooten, M.W., Zhou, G., Seibenhener, M.L., and Coleman, E.S. (1994). A role for zeta protein kinase C in nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 395–403.
- Wooten, M.W., Seibenhener, M.L., Neidigh, K.B., and Vandenplas, M.L. (2000). Mapping of atypical protein kinase C within the nerve growth factor signaling cascade: relationship to differentiation and survival of PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4494–4504.
- Wooten, M.W., Vandenplas, M.L., Seibenhener, M.L., Geetha, T., and Diaz-Meco, M.T. (2001). Nerve growth factor stimulates multisite tyrosine phosphorylation and activation of the atypical protein kinase C’s via a src kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8414–8427.
- Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, E.H., Wiestner, A., and Staudt, L.M. (2003). A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9991–9996.
- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* 278, 10963–10972.
- Xia, D., Li, W., Zhang, L., Qian, H., Yao, S., and Qi, X. (2014). RNA interference-mediated knockdown of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes cell cycle arrest and apoptosis in B-cell

- lymphoma cells. *Neoplasma* 61, 523–532.
- Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S. i, Nakatani, A., Ikeuchi, T., and Hatanaka, H. (1997). Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 272, 30334–30339.
- Yan, H., and Chao, M.V. (1991). Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J. Biol. Chem.* 266, 12099–12104.
- Yang, X., Martin, T.A., and Jiang, W.G. (2013). Biological influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on colon cancer cells. *Exp. Ther. Med.* 6, 1475–1481.
- Ye, B.H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R.S., et al. (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat. Genet.* 16, 161–170.
- Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J.J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C.A., et al. (1999). TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J. Biol. Chem.* 274, 30202–30208.
- Young, K.H., Leroy, K., Møller, M.B., Colleoni, G.W.B., Sánchez-Beato, M., Kerbauy, F.R., Haioun, C., Eickhoff, J.C., Young, A.H., Gaulard, P., et al. (2008). Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood* 112, 3088–3098.
- Zage, P.E., Graham, T.C., Zeng, L., Fang, W., Pien, C., Thress, K., Omer, C., Brown, J.L., and Zweidler-McKay, P.A. (2011). The selective Trk inhibitor AZ623 inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroblastoma cell proliferation and signaling and is synergistic with topotecan. *Cancer* 117, 1321–1391.
- Zhang, J., Grubor, V., Love, C.L., Banerjee, A., Richards, K.L., Mieczkowski, P.A., Dunphy, C., Choi, W., Au, W.Y., Srivastava, G., et al. (2013). Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1398–1403.
- Zhang, S., Guo, D., Luo, W., Zhang, Q., Zhang, Y., Li, C., Lu, Y., Cui, Z., and Qiu, X. (2010). TrkB is highly expressed in NSCLC and mediates BDNF-induced the activation of Pyk2 signaling and the invasion of A549 cells. *BMC Cancer* 10, 43.
- Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H., and Xu, W. (2015). Exosomes in cancer: small particle, big player. *J. Hematol. Oncol.* 8, 83.
- Zhou, X., Hu, W., and Qin, X. (2008). The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *The Oncologist* 13, 954–966.
- Zhu, X., Xu, Y., Solis, L.M., Tao, W., Wang, L., Behrens, C., Xu, X., Zhao, L., Liu, D., Wu, J., et al. (2015). Long-circulating siRNA nanoparticles for validating Prohibitin1-targeted non-small cell lung cancer treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7779–7784.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* 4, 594–600.
- Zupan, A.A., Osborne, P.A., Smith, C.E., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M., and Johnson, E.M. (1989). Identification, purification, and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 11714–11720.