

**UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES
ECOLE DOCTORALE HOMME ENVIRONNEMENT SANTE
Année universitaire 2009-2010**

THESE
Pour l'obtention
du diplôme de Doctorat de l'Université de Franche-Comté
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Par Carole HENRY-DUNAND

**Identification d'un transcrit alternatif du gène CD20 dans les
hémopathies B, codant pour une nouvelle protéine et impliqué
dans les résistances au Rituximab. Cible potentielle en
immunothérapie anti-tumorale.**

Sous la direction du Dr Christophe FERRAND

Soutenue le 16 décembre 2010

Composition du Jury :

Directeur de thèse : Dr Christophe FERRAND

Rapporteurs : Pr Thierry FEST
Dr Bernard MAILLERE

Examineurs : Dr Jean-Luc TEILLAUD
Dr Christophe DE ROMEUF

Résumé

Dans le cadre de l'utilisation du système « gène suicide » en thérapie génique, le gène de susceptibilité HSV-tk avait été utilisé dans une approche de modulation de l'alloréactivité après greffe de moelle osseuse. Ce modèle a montré ses limites et notre laboratoire s'est orienté vers l'utilisation du système CD20/Rituximab (RTX). En tant que protéine membranaire, la molécule CD20 permet un tri des cellules génétiquement modifiées ; de plus elle est la cible d'un anticorps monoclonal, le RTX, permettant la lyse des cellules exprimant cet antigène.

Dans cette thématique, nous nous sommes intéressés à l'existence d'une population de lymphocytes T exprimant CD20. En effet, la molécule CD20 normalement exprimée sur les lymphocytes B, a été décrite, comme étant présente sur un petit contingent de LT. Nous avons émis l'hypothèse que cette population pouvait être un artefact observé en cytométrie en flux.

Dans un deuxième temps, un épissage alternatif du gène CD20 a été mis en évidence au laboratoire, codant un ARNm tronqué (nommé Δ CD20). Cet ARNm est lié à l'activation et/ou à la transformation cellulaire. Ce travail a donc consisté en la caractérisation de cet ARNm Δ CD20 et en la mise en évidence de la protéine codée par cet ARNm. CD20 étant la cible du traitement par RTX, nous avons également mis en relation la présence de cet ARNm avec les résistances au traitement.

La dernière partie des résultats concerne l'exploration d'une approche d'immunothérapie anti-tumorale ciblant cette protéine Δ CD20. Nous avons ainsi généré des LT spécifiques de Δ CD20. Le but à long terme de cette stratégie serait d'améliorer le traitement des patients réfractaires au traitement par RTX et/ou en rechute.

Mots-clé : CD20, Rituximab, épissage alternatif, immunothérapie anti-tumorale.

Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. Potential target in an anti-tumoral immunotherapy approach.

Summary

Within the framework of the use of the "gene-suicide" system, the gene of susceptibility HSV-tk had been used to modulate alloreactivity after bone-marrow transplantation. This model showed its limits and our laboratory turned to the use of the CD20/Rituximab (RTX) system. Indeed, as a membrane protein, the molecule CD20 allows a cell sorting of the genetically modified cells; furthermore it is the target of a monoclonal antibody, the RTX, allowing the lysis of the cells expressing this antigen.

In this context, we were interested in the existence of a population of T lymphocytes expressing the CD20 molecule. Indeed, the molecule CD20 normally expressed on B cells was described, in the literature, as being present on a small contingent of T cells. We emitted the hypothesis that this population could be an artefact observed in flow cytometry.

Secondly, an alternative splice of the CD20 gene was brought to light in the laboratory, coding a truncated mRNA called deltaCD20 (Δ CD20). This mRNA is connected to the activation and/or cellular transformation. This work thus consisted of the characterization of this mRNA Δ CD20 and in the revealing of the protein coded by this mRNA. CD20 being the target of the treatment by RTX, we also put in relation the presence of this mRNA with the RTX resistances *in vitro* and *in vivo*.

The last part of the results concerns the exploration of an anti-tumoral immunotherapy approach targeting this protein Δ CD20, expressed in B cells malignancies and potentially involved in RTX resistances. We so generated CD20 specific T cells. The long-term purpose of this strategy would be to improve the treatment of refractory patients and/or in relapse after RTX treatment.

Key words: CD20, Rituximab, alternative splice, immunotherapy.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Pierre Tiberghien pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie bien évidemment les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail et pris de leur temps si précieux : le Pr Thierry Fest, le Dr Bernard Maillère, le Dr Jean-Luc Teillaud et le Dr Christophe de Romeuf.

Ensuite je souhaite remercier vivement le Dr Eric Robinet, le premier à m'avoir « donné ma chance » au laboratoire, pour effectuer mon stage de Master 1. Sans toi, je n'aurais pas passé les quatre années les plus importantes de ma vie de jeune chercheur au sein de cette équipe.

Je remercie encore plus vivement le Dr Christophe FERRAND, le deuxième à m'avoir fait confiance, et qui est devenu mon directeur de thèse. Merci de m'avoir laissée « toucher » à ce sujet si important pour toi qu'est le deltaCD20. Merci pour ton apprentissage, tes conseils, ta grande disponibilité, et surtout pour l'autonomie et la confiance que tu m'as accordées. Ces années passées, à vitesse grand V, à travailler avec toi ont forgé mon caractère.

Je souhaite remercier le Pr Pierre-Simon Rohrllich pour son apprentissage murin et ses conseils avisés. Merci, PSR, pour les inoubliables « cytotox » faites ensemble, toujours accompagnées de bonnes blagues et bien évidemment pour les longs moments passés à t'attendre !

Je voudrais également remercier le Pr Christophe Borg pour ses conseils pertinents mêlés parfois de quelques remontrances. Tout cela m'a beaucoup fait avancer, même si j'ai « mauvais caractère ». Je remercie également le Pr Philippe Saas pour sa justesse et sa culture scientifique intarissable, et le Dr Olivier Odotevi pour sa bonne humeur et ses précieux conseils concernant ma présentation.

Je remercie du fond du cœur tous ceux de près ou de loin (mais surtout de près) qui m'ont accompagnée tant professionnellement que personnellement au cours de ces quatre années au labo. Voilà le moment tant attendu et je vais essayer de n'oublier personne...

Les premiers en date, pour ne pas dire les plus vieux : Pat, celle qui m'a tout appris au laboratoire et qui va me faire pleurer en partant ; Anne Dup', (qui se surnomme comme ça par ma faute) pour la biomol et tout le reste ; Tata Caro pour sa cuisine et sa gentillesse ; et ma Fanny, en particulier pour la Fashion week, mais en réalité bien plus que ça. Sans oublier Sabeha (ou la pro du cytomètre), mon modèle en matière d'éducation familiale ! Les garçons bien sûr, les premiers à m'avoir entraînée « au café » : je pense à Nico (parti du labo trop tôt) pour tes sales blagues ; JR (ou le plus mystérieux des génis de la manip') et Francis (l'ami des souris, qui m'a plus d'une fois rendu service) pour tout ce que l'on a fait ensemble pendant 4 ans. Ensuite Romain B, pour ta gaieté (dans les deux sens du terme) et tous les bons moments (vivement qu'on soit dans le même fuseau horaire !) ; Jérémy (alias la Mite) pour ta bonne humeur, tes bonnes blagues et le fait que tu sois mauvais perdant ! et Zohair, le plus dragueur du groupe (pour ne pas

dire qu'il a essayé de se taper toutes les filles du labo). Un grand merci bien sur à Jean-Paul (JPRM) pour les ficelles du Western blott et les truffes. Une pensée également pour David Chalmers (Chalmy) et son sale caractère.

Ensuite les « nouveaux » ou plus tardivement arrivés (pour certains déjà repartis), avec par ordre d'apparition : Charline V., ma compagne de galère d'immunothérapie (tiens bon !) et voisine (on se rappellera du 37 chemin des grands Bas) ; Erika (tu tries toujours les poivrons ?) qui ne fait jamais la bise ; Romain L. (alias Tic ou Tac je ne sais jamais) également adepte de la fashion week, comment vais-je faire sans toi ? viens vite me rejoindre aux U, best friend ; Yann (la Godette) pour tes précieuses connaissances, tes blagues pas toujours drôles, le badminton et ton adorable famille ; Etienne (la Daguindette) mon hémato de choc, ce fut un plaisir de travailler avec toi et de partager les joies du Western Blott et des hémopathies B (mes jambes ne sont pas si grandes que ça !) ; Bertrand (je viens réparer la photocopieuse), pour la déconnade et les bonnes bouffes (t'amènes du pinard ?) ; Clémentine (la pétillante relève, t'as intérêt à assurer !) qui, je n'en doute pas, fera du bon boulot, le deltaCD20 est entre de bonnes mains.

Ensuite les paupiettes de la fac, par ordre alphabétique (pour ne pas faire de jalouses) : Magalie (la Mag' ou la vieille), Sophie (ma dinde) et Stéphanie (la Steph') pour les midis à papotter de tout et de rien, à se plaindre du labo mais surtout à rire ; sans oublier leurs maris pour les bonnes soirées passées tous ensemble.

A vous, mes fidèles compagnons de fac et de labo devenus pour la plupart des amis, merci pour tout. Les mots me manquent pour vous dire à quel point ma vie va être différente sans vous et à quel point vous allez me manquer de l'autre côté de l'Atlantique. J'espère que vous serez nombreux à venir nous rendre visite et que la distance n'effacera pas ce qu'on a vécu ensemble.

Je pense ensuite et surtout à ma famille : mes parents, qui m'ont toujours soutenue et qui je l'espère, sont fiers de moi (un milliard de fois merci) ; ma sœur Adeline, Michel et mon petit Hugo ; ma belle-famille (au sens propre comme au sens figuré) pour tout ce qu'ils font pour moi. Une énorme pensée pour Domi et mamie, et mon pépé qui a éveillé en moi toute cette curiosité.

Les amis de longue date, avec en tête ma copine Charlotte (qui n'est pas très contente de me voir partir) et son mari, la fente ; la « bande à Basile », même s'ils n'ont pas toujours compris ce que je cherchais... avec Anais et Johan, Francky, Philou, Max et Gwen, Renaud, Antoine et Bérénice, Benj' et Marion, Stan et Julie, Gautier, Rémi, Marlou et Henna, Robin ; et mes copines de la fac de médecine Laurene, Judith et Eloise.

Et enfin, comme on dit « le meilleur pour la fin », je voudrais remercier de tout mon cœur et toute mon âme ma moitié, devenu mon mari, (je n'ai pas besoin de citer son nom) : tu m'as supportée au quotidien (pour le meilleur et pour le pire), tu m'as toujours soutenue même dans les moments difficiles de ma vie de thésarde et sans toi, je n'en serais surement pas là... des milliards de mercis ne suffiraient pas... je t'aime plus que tout (et tu me répondras : « moi plus » !)

Table des matières

Liste des figures et tableaux	17
Liste des abréviations.....	19
INTRODUCTION.....	23
Chapitre I : les lymphocytes B et leur implication en pathologie	25
1 Ontogénie des lymphocytes B	25
1.1 Différents stades de différenciation des lymphocytes B	25
1.2 Le récepteur à l'antigène des lymphocytes B.....	29
1.3 Activation et survie des lymphocytes B	31
1.3.1 Les types d'activation.....	32
1.3.2 Les différents types de lymphocytes B matures activés.....	34
2 Implication des lymphocytes B en pathologie.....	35
2.1 Les pathologies auto-immunes	35
2.2 Le rejet humoral.....	35
2.3 Les hémopathies B malignes	36
2.3.1 Classification.....	36
2.3.2 Traitements conventionnels avant l'ère du Rituximab.....	40
3 La molécule CD20 humaine	42
3.1 Le gène CD20	42
3.2 La protéine CD20	42
3.3 Fonction de la molécule CD20	44
3.4 Signalisation par CD20.....	45
4 Les anticorps monoclonaux anti-CD20	46
4.1 Généralités sur les anticorps monoclonaux	46
4.1.1 Activation du complément	46
4.1.2 Interactions IgG-Fc	46

4.1.3	Interaction IgG-FcR néonataux	47
4.2	Les anticorps monoclonaux anti-CD20	48
4.2.1	Classification	48
4.2.2	Mécanismes d'action des anticorps de type I et II	50
4.2.3	Modulation de l'expression de CD20.....	51
4.3	Le Rituximab	52
4.3.1	Mécanismes d'action <i>in vitro</i>	53
4.3.2	Mécanismes d'action <i>in vivo</i>	53
4.4	Rituximab et traitement des hémopathies B	55
4.4.1	Le Rituximab dans le traitement de la LLC	55
4.4.2	Le Rituximab dans les lymphomes de haut grade.....	55
4.4.3	Le Rituximab dans les lymphomes indolents.....	56
4.5	Rituximab et autres pathologies	56
4.5.1	Traitement des pathologies auto-immunes.....	56
4.5.2	Implication dans le rejet humoral.....	57
4.5.3	Traitement de la GvHD	57
4.6	Résistances au traitement par Rituximab.....	58
4.6.1	Résistances liées aux mécanismes de cytotoxicité.....	58
4.6.2	Modulation de l'expression de CD20.....	60
4.6.3	Influence du microenvironnement tumoral	62
4.7	Effets indésirables du traitement par Rituximab	62
4.7.1	Neutropénie	62
4.7.2	Infections.....	63
4.8	Les nouveaux anticorps anti-CD20	64
4.8.1	Les anticorps de seconde génération.....	64
4.8.2	Les anticorps de troisième génération.....	65

Chapitre II : utilisation du modèle CD20/Rituximab en thérapie génique.....	68
1 La thérapie génique.....	68
1.1 Généralités.....	68
1.2 Le système HSV-tk/GCV.....	68
1.3 Les systèmes utilisant des molécules pro-apoptotiques.....	69
1.4 Le système CD20/Rituximab.....	70
2 Les lymphocytes T CD3 ⁺ CD20 ⁺	71
2.1 Chez les donneurs sains.....	71
2.2 En pathologie.....	71
Chapitre III : épissage alternatif et cancer.....	73
1 ARN messager et épissage constitutif.....	73
1.1 Généralités.....	73
1.2 Le spliceosome.....	74
1.2.1 Formation du spliceosome.....	75
1.2.2 Réaction d'épissage.....	76
2 Epissage alternatif.....	76
2.1 Les différents types d'épissages alternatifs.....	77
2.2 Conséquences de l'épissage alternatif.....	78
2.3 Critères d'inclusion/exclusion des exons.....	79
2.3.1 La taille des exons.....	79
2.3.2 Le choix des sites d'épissage.....	80
2.4 Régulation de l'épissage alternatif.....	80
2.4.1 Les séquences <i>cis</i> régulatrices.....	80
2.4.2 Les facteurs <i>trans</i> régulateurs.....	83
2.4.3 Implication de la structure secondaire du pré-ARNm sur l'épissage.....	86
2.4.4 Régulation de l'épissage alternatif par les modifications des histones.....	86
2.5 Epissage alternatif et cancer.....	87

Chapitre IV : immunothérapie anti-tumorale.....	89
1 Apprêtement et présentation des antigènes.....	89
1.1 Le HLA de classe I et la voie cytosolique.....	90
1.1.1 Structure du HLA-I.....	90
1.1.2 Voie cytosolique d'apprêtement de l'antigène.....	90
1.1.3 L'immunoprotéasome.....	91
1.1.4 Formation du complexe HLA-I/peptide.....	92
1.2 Le HLA de classe II et la voie endocytaire.....	93
1.2.1 Structure du HLA-II.....	93
1.2.2 Voie endosomale d'apprêtement des antigènes.....	94
1.2.3 Formation du complexe HLA-II/peptide.....	94
1.3 La voie de présentation croisée.....	95
1.4 Voie de présentation endogène par des molécules de classe II.....	96
2 Rôle des lymphocytes T dans la réponse anti-tumorale.....	97
2.1 Activation des lymphocytes T.....	97
2.2 La réponse anti-tumorale.....	98
3 Les antigènes de tumeurs.....	99
3.1 Identification de nouveaux antigènes de tumeurs.....	99
3.1.1 Approche biochimique.....	100
3.1.2 Approche génétique.....	100
3.1.3 Approche d'immunologie inverse.....	100
3.1.4 Approche sérologique (SEREX).....	101
3.2 Classification des antigènes de tumeurs.....	101
4 Immunothérapie passive.....	103
4.1 Transfert adoptif de lymphocytes infiltrant la tumeur.....	103
4.2 Transfert adoptif de lymphocytes spécifiques d'un complexe HLA/peptide.....	104
4.3 TCR transgéniques.....	104

5	Immunothérapie active.....	106
5.1	Vaccination peptidique	106
5.2	Vaccins à base de protéines	107
5.3	Vaccins à base d'ADN	107
5.4	Vaccins utilisant des cellules	107
5.4.1	Utilisation de cellules tumorales	107
5.4.2	Utilisation de cellules dendritiques	108
	<i>Rationnel de la thèse</i>	110
	RESULTATS	114
	<i>Données publiées</i>	116
	Article 1.....	118
	CD3 ⁺ CD20 ⁺ cells may be an artifact of flow cytometry: comment on the article by Wilk et al.	118
	Article 2.....	122
	Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cells malignancies coding for a novel protein associated to Rituximab resistance	122
	<i>Données non publiées</i>	132
1	Mise en évidence de l'immunogénicité de la protéine Δ CD20 chez la souris.....	137
1.1	Matériel et méthodes	137
1.1.1	Immunisation des souris.....	137
1.1.2	Cytotoxicité au ⁵¹ Cr.....	137
1.1.3	Elispot IFN γ murin.....	137

1.2	Résultats.....	138
2	Mise en évidence de l'immunogénicité de la protéine Δ CD20 chez l'homme.....	142
2.1	Matériel et méthodes	142
2.1.1	Génération de CTL spécifiques de Δ CD20.....	142
2.1.2	ELISA TNF α	143
2.2	Résultats.....	143
2.2.1	Génération de CTL par utilisation de cellules dendritiques.....	143
2.2.2	Génération de CTL par stimulation de PBMC.....	146
	DISCUSSION / PERSPECTIVES	148
	Existence d'une population de LT CD3 ⁺ CD20 ⁺	150
	Caractérisation d'un nouvel épissage alternatif du gène CD20 humain et implication dans les résistances au RTX.....	152
	Δ CD20 : cible potentielle en immunothérapie anti-tumorale	156
	BIBLIOGRAPHIE	160

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Facteurs de transcription impliqués dans la lymphogenèse B.	26
Figure 2 : Différents stades de développement des lymphocytes B chez la souris.	28
Figure 3 : Différenciation des lymphocytes B chez l'homme.	29
Figure 4 : Schéma représentant l'organisation des gènes du BCR.	30
Figure 5 : Schéma représentant la structure du BCR.	30
Figure 6 : Signalisation par le BCR (en partie).	31
Figure 7 : Schéma de la rate (A) et de la réaction des centres germinatifs au sein des follicules de la rate (B).	33
Figure 8 : Différents stades de différenciation des lymphocytes B et lymphomagenèse.	36
Figure 9 : Diagnostic différentiel d'une lympho-prolifération B exprimant le CD19.	40
Figure 10 : Schéma du gène CD20 (MS4A1).	42
Figure 11 : Représentation schématique de la molécule CD20.	43
Figure 12 : Structure et fonction d'un anticorps de type IgG.	48
Figure 13 : Développement des anticorps monoclonaux anti-CD20.	50
Figure 14 : Schéma simplifié des trois mécanismes principaux d'action du RTX.	52
Figure 15 : A. Profil des séquences consensus au site d'épissage 5', au site de branchement et au site d'épissage 3'. B. Schéma représentatif des principaux acteurs de l'épissage.	74
Figure 16 : Schéma de l'assemblage du spliceosome.	75
Figure 17 : Différents types d'épissage alternatif.	78
Figure 18 : Modèle d'activation de l'épissage par une ESE.	81
Figure 19 : Modèle de l'inhibition de l'épissage par recouvrement des protéines hnRNPA1 et une ESS.	82
Figure 20 : Régulation de l'épissage alternatif par les protéines SR.	85
Figure 21 : Structure schématique du protéasome 26S.	92
Figure 22 : Structure schématique du CMH de classe I et de classe II.	93
Figure 23 : Voies de présentation de l'antigène par les cellules dendritiques.	95

Figure 24 : Schéma chronologique du développement de l'immunothérapie anti-tumorale. .	99
Figure 25 : Génération de LT spécifiques d'un antigène par transfert de TCR.	105
Figure 26 : Résultats de l'algorithme SYFPEITHI concernant la protéine Δ CD20.....	135
Figure 27 : Séquence des peptides spécifiques de Δ CD20.....	135
Figure 28 : Sites de clivage prédictifs de la protéine Δ CD20 par le protéasome (logiciel PProC).	136
Figure 29 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé suite à une immunisation avec différents peptides spécifiques de Δ CD20.....	138
Figure 30 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé après clonage des CTL spécifiques du peptide RMS.	139
Figure 31 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé suite à une immunisation avec le peptide RMS spécifique de Δ CD20 avec deux peptides « helper » différents.....	140
Figure 32 : ELISPOT IFN γ	141
Figure 33 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé après clonage des CTL spécifiques du peptide RMS.	141
Figure 34 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé suite à une stimulation avec des DC chargées avec le peptide RMS spécifique de Δ CD20 chez des donneurs sains HLA-A2.	144
Figure 35 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé suite à une stimulation avec des DC chargées avec le peptide RMS ou BMLF1 chez des donneurs sains HLA-A2.....	145
Figure 36 : Sécrétion d'IFN γ par des LT stimulés par des DC chargées en peptide 20-mer spécifique de Δ CD20.....	158
Tableau 1 : Séquences amino-acidiques de la boucle extra-cellulaire de la molécule CD20 humaine et murine et de constructions issues de ces séquences avec différentes mutations...	45
Tableau 2 : Classification des anticorps anti-CD20 selon leur capacité à fixer la molécule CD20 chimérique.....	45
Tableau 3 : Anticorps anti-CD20 de seconde et troisième génération.....	63
Tableau 4 : Exemples d'antigènes tumoraux humains pour les différentes catégories.....	96

Liste des abréviations

A

AA : Acide Aminé

ADCC : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

AID : Cytidine Désaminase induite par l'activation

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

B

BCR : Récepteur à l'antigène de la cellule B

E-EBV : cellule B transformée par le virus de l'EBV

BMZ : lymphocytes B de la Zone Marginale

C

CD : Cluster de Différenciation

CDC : Cytotoxicité Dépendante du Complément

CDR : Région Déterminante Complémentaire

CG : Centres Germinatifs

CGM : Cellules génétiquement modifiées

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CSR : Class Switch Recombination : commutation isotypique

CTL : Lymphocytes T Cytotoxiques

D

Δ CD20 : forme tronquée de CD20

DC : Cellules dendritiques

E

EBV : Epstein-Barr virus

ESE : Séquence Exonique activatrice (Enhancer)

ESS : Séquence Exonique inhibitrice (Silencer)

F

Fab : Fragment de liaison à l'antigène d'un anticorps

Fc : Fragment constant des anticorps

Fc γ R : Récepteur γ au Fc

FcRn : Récepteur néonataux au Fc

FDC : Cellules Dendritiques Folliculaires

G

GCV : Ganciclovir

GM-CSF : Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

GvHD : Graft versus Host Disease : maladie du Greffon contre l'hôte

H

HDAC : Histones DésACétylases

HLA : Antigènes des Leucocytes Humains

hnRNP : RiboNucléoProtéases hétérogènes nucléaires

HSV-tk : Thymidine kinase du virus Herpès Simplex

I

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ISE : Séquence Intronique activatrice (Enhancer)

ISS : Séquence Intronique inhibitrice (Silencer)

ITAM : Motif Activateur des Immunorécepteurs à Tyrosine

ITIM : Motif Inhibiteur des Immunorécepteurs à Tyrosine

K

KO : Knock-Out

L

LB : Lymphocytes B

LAL : Leucémie Aigue Lymphoblastique

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LNH : Lymphomes Non Hodgkiniens

LPS : Lypopolysaccharide bactérien

LT : Lymphocytes T

M

MS4A : Membrane Spanning 4 domain Subfamily A

N

NeoR : Gène de résistance à la néomycine

P

Pb : paire de base

PBL : Leucocytes du sang périphérique

PBMC : Cellules Mononucléées du sang périphérique

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PLC : Phospholipase C

O

ORF : Open Reading Frame : cadre de lecture ouvert

R

RC : Rémission Complète

RE : Réticulum Endoplasmique

RTX : Rituximab

S

SHM : Mutations HyperSomatiques

SnRNP : petites RiboNucléoProtéases nucléaires

SR : protéines riches en Sérine/arginine

T

TAA : Antigènes Associés aux Tumeurs

TAP : Transporteur Associé au Protéasome

TCR : Récepteur à l'antigène de la Cellule T

TIL : Lymphocytes Infiltrant la Tumeur

TLR : Toll-Like Récepteur

TNF : Tumor Necrosis Factor

INTRODUCTION

Chapitre I : les lymphocytes B et leur implication en pathologie

Les lymphocytes B (LB, du nom de la bourse de Fabricius, qui est l'organe spécialisé dans leur production chez les oiseaux, ou pour *bone marrow*, la moelle osseuse où les LB se développent en partie chez l'homme) représentent 10 à 15% des lymphocytes circulants. Ils synthétisent les immunoglobulines (Ig) : celles dites de surface sont ancrées dans les lymphocytes B matures et vont constituer le récepteur à l'antigène de la cellule B : le BCR ; et celles solubles, encore appelées anticorps, seront sécrétées en réponse à un antigène. Ces cellules, responsables de la réponse immunitaire humorale, sont fortement impliquées dans les pathologies auto-immunes et sont également à l'origine de pathologies lymphomateuses malignes.

1 Ontogénie des lymphocytes B

1.1 Différents stades de différenciation des lymphocytes B

La différenciation des cellules B, à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH), se déroule dans la moelle osseuse. Les LB obtenus sont alors des cellules dites « immatures naïves » et seuls les LB fonctionnels (sélection positive) et non auto-réactifs (sélection négative) migreront de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires : c'est la tolérance centrale. Dans les organes lymphoïdes secondaires, a lieu la maturation de ces LB en cellules mémoires/effectrices et il existe également une tolérance périphérique.

De nombreux facteurs de transcription interviennent au cours du développement des LB¹. Comme présenté dans la figure 1, le facteur Ikaros intervient très tôt dans la régulation de l'expression de gènes spécifiques de la lignée B. PU.1, un autre facteur interviendrait plutôt dans la bifurcation entre développement myéloïde et lymphoïde B. Le facteur E2A n'est pas nécessaire à l'expression d'Ikaros, PU.1 et Gfi1 mais est requis pour l'expression d'EBF, Pax5 et pour le « programme » spécifique des LB. Il interviendrait aussi bien précocement dans la lymphogenèse B qu'au niveau de la maturation des LB au niveau des centres germinatifs². Pax5 se caractérise, quant à lui, par un facteur majeur d'engagement et de maintien de la lignée B et des régulations épigénétiques du gène de Pax5 sont à l'origine de

ces effets ³. Enfin EBF régule de nombreux gènes de la lignée B et comme Pax5 est exprimé plus tardivement que les autres facteurs de transcription.

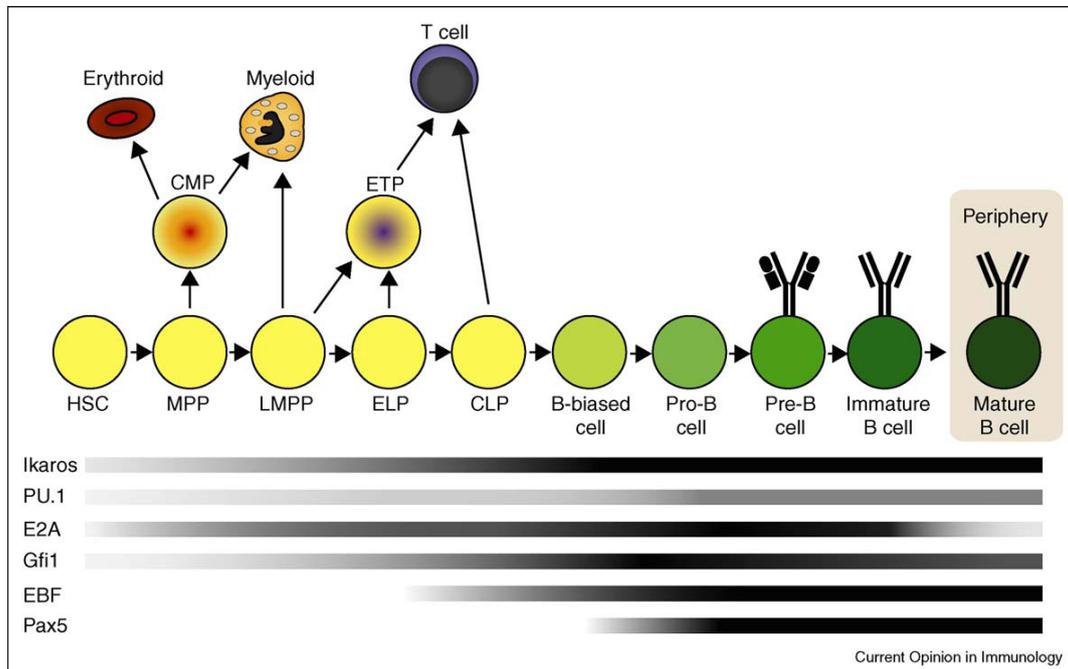


Figure 1 : Facteurs de transcription impliqués dans la lymphogenèse B.

D'après Ramirez et al., Current Opinion in Immunology, 2010 ¹.

Les différents stades de différenciation des LB sont bien caractérisés chez la souris et sont décrits précisément figure 2. Ils sont déclinés en stade pro/pré BI, en stade pré-BII qui peut se subdiviser lui-même en deux, en stade B immature, en stade B transitionnel et enfin en stade B mature comprenant plusieurs types de LB ⁴.

Le stade pro/pré BI : la cellule B à ce stade, possède encore le marqueur de CSH qu'est le CD34 et déjà des marqueurs plus spécifiques de la lignée B comme CD19 (qui persistera jusqu'au stade de différenciation plasmocytaire) et le marqueur CD117 (c-kit). Ces cellules n'expriment pas CD20 et ne possèdent qu'un « pro- récepteur » à l'antigène. Leur engagement dans la lignée B peut être annulé par l'ablation du gène Pax5.

Le stade pré-BII : la progression vers le stade pré-B se caractérise par la disparition du CD34 et du CD117 et la présence de la plupart des marqueurs caractérisant les LB (dont le CD20). Ce stade est également associé à l'activation des systèmes enzymatiques responsables des réarrangements des gènes des Ig [enzymes RAG (Recombination Activating Gene) 1 et 2] à l'origine de la synthèse d'une chaîne lourde et la cellule B possède alors un pré-BCR. Seules

les cellules qui possèdent ce pré-récepteur vont proliférer et on parle alors de pré-BCR « checkpoint ».

Stade B immature : les cellules, après une phase d'expansion, deviennent plus petites et sont capables de synthétiser les chaînes légères des Ig et celles-ci s'associent aux chaînes lourdes pour former les Ig de classe IgM qui constituent le BCR exprimé à la surface des cellules B (voir paragraphe sur le BCR). Ces cellules se caractérisent également par l'expression du CD93 (récepteur à la protéine du complément C1q). Seuls les LB ayant un BCR fonctionnel reçoivent des signaux de survie (sélection positive) et vont proliférer. Les cellules sélectionnées positivement vont alors migrer de la moelle osseuse vers la rate chez la souris pour compléter leur maturation ⁵. A ce stade, avant le départ de la moelle osseuse, il existe une sélection contre l'auto-réactivité, appelée sélection négative, visant à détruire par apoptose les LB reconnaissant des antigènes du soi, c'est la tolérance centrale. De plus, lorsque les LB quittent la moelle osseuse, ils deviennent « sensibles » aux signaux de survie induit par BAFF (pour B-cell Activating Factor). Cette molécule de la famille du TNF, encore appelée BLyS, interagit avec son récepteur, BAFF-R présent à la surface des LB ⁶. Ce facteur joue un rôle primordial dans la survie et la maturation des LB murins.

LB transitionnels : à ce stade ces cellules peuvent être subdivisées en trois groupes, appelés T1, T2 et T3 chez la souris ⁷. Tous les LB dits « de transition » expriment le CD93, alors que les LB matures ne l'expriment plus, et présentent des IgM mais également des IgD. De manière intéressante, les LB T1 (qui sont CD23⁻ IgM^{hi} IgD⁻) sont retrouvés dans la moelle osseuse, le sang et la rate mais pas dans les ganglions lymphatiques ; alors que les LB T2 (qui sont CD23⁺ IgM^{hi} IgD^{hi}) sont retrouvés uniquement dans la rate ⁵.

Ces LB vont pouvoir se différencier en LB matures naïfs de trois types : LB de la zone marginale (BMZ), LB B1 et LB B2 ou folliculaires.

Ces connaissances, obtenues chez la souris, ont permis d'étudier le développement des LB chez l'homme. La différenciation des LB dans la moelle osseuse chez l'homme est très proche de celle décrite ci-dessus chez la souris. Par contre au niveau périphérique, des différences sont observées entre les deux espèces et les connaissances sont plus limitées chez l'homme.

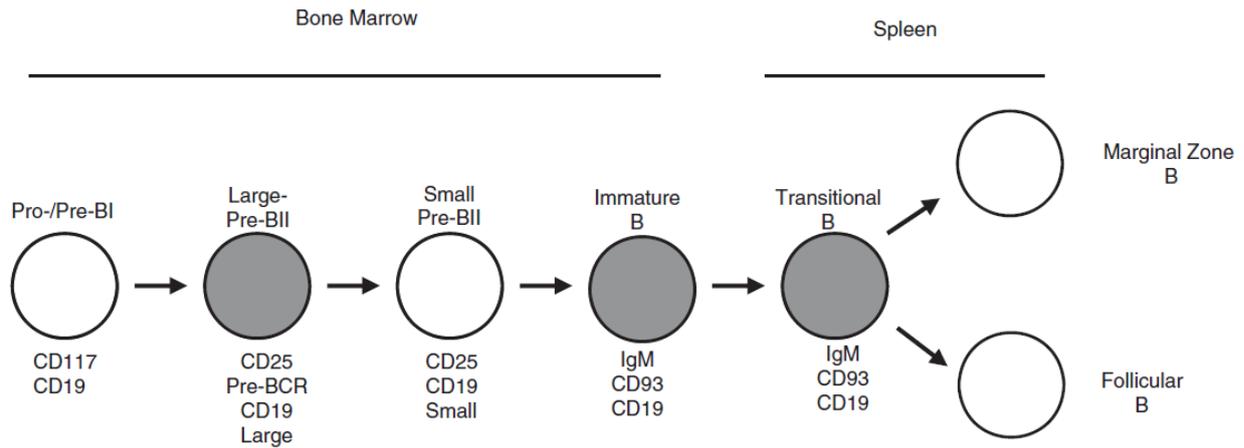


Figure 2 : Différents stades de développement des lymphocytes B chez la souris.

D'après Tussiwand et al., European Journal of Immunology, 2009 ⁴.

Chez l'homme, les différents stades pro-B, pré-BI, pré-BII et LB immatures sont en effet retrouvés. Les différents marqueurs exprimés par ces sous-populations sont détaillés figure 3 ⁸. De manière intéressante, la molécule CD20 est présente à tous les stades à partir du stade pré-BII mais n'est plus exprimée sur les plasmocytes.

Les LB immatures et les LB matures naïfs (caractérisés par la présence d'IgD), vont sortir de la moelle osseuse et sont retrouvés dans le sang périphérique. Ils vont alors circuler par la circulation sanguine et lymphatique vers les organes lymphoïdes secondaires à la recherche de leur antigène.

Les LB dits transitionnels ne sont pas clairement définis chez l'homme et leur existence est controversée. Cependant, une étude a mis en évidence des populations B très proches des LB transitionnels murins ⁵.

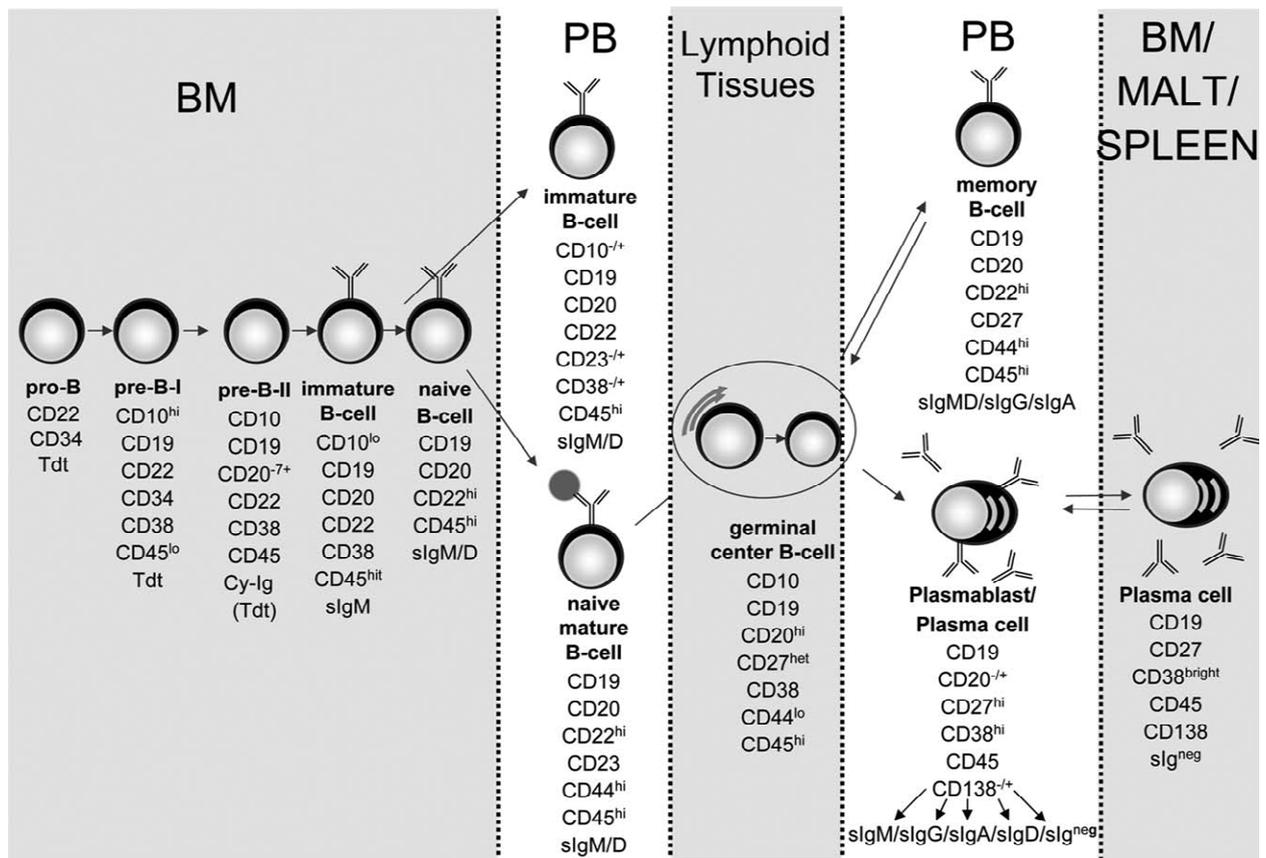


Figure 3 : Différenciation des lymphocytes B chez l'homme.

D'après Perez-Andres et al., Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2010⁸.

La classification est effectuée selon les caractéristiques phénotypiques des différentes sous-populations.

1.2 Le récepteur à l'antigène des lymphocytes B

La structure des Ig est commune aux anticorps et au récepteur B au niveau des régions qui constituent le domaine extracellulaire du BCR.

Ce domaine est formé de deux chaînes lourdes ou H (pour *Heavy*) et de deux chaînes légères ou L (pour *Light*). Chacune de ces quatre chaînes sera caractérisée par une région variable V (extrémité N-terminale) qui est le site de liaison à l'antigène⁸, et par une région constante C (extrémité C-terminale). Les régions variables vont différer au niveau de régions hypervariables ou CDR (Complementary Determining Region) 1, 2 et 3 qui sont en contact avec l'antigène. Chez l'homme, les gènes codant pour les chaînes H sont situés sur le chromosome 14 (locus IGH) et pour les chaînes L sur les chromosomes 2 et 22 (loci IGκ et IGλ) (figure 4). Les régions variables des chaînes lourdes sont le produit de l'association de 3 gènes V (V_H, D_H et J_H) alors que les régions variables des chaînes légères ne sont le produit

que de 2 gènes (V_L et J_L). Les régions constantes C sont codées par un gène constant (C_μ , C_δ ...). Les chaînes légères peuvent être d'un isotype soit κ soit λ alors que les chaînes lourdes sont de type μ (pour les IgM). Tous les LB matures expriment à leur surface des IgM, parfois des IgD (dont la partie constante de la chaîne lourde est de type δ)⁹.

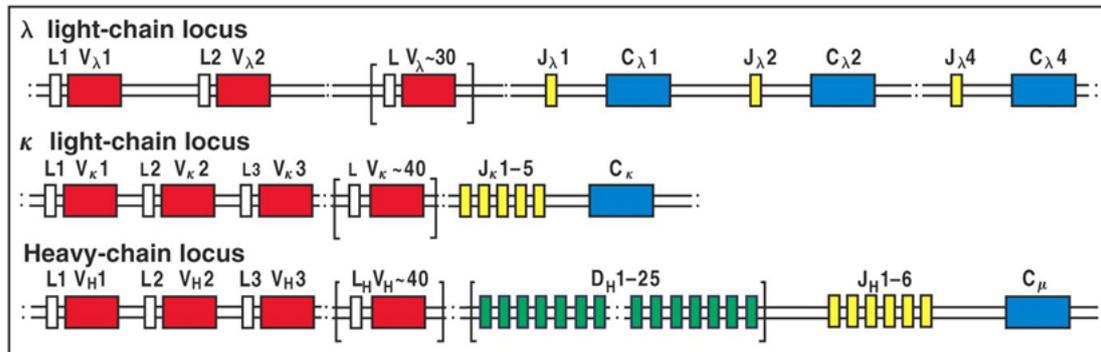


Figure 4 : Schéma représentant l'organisation des gènes du BCR.
(Immunobiology, Garland Science).

Le BCR est donc formé des deux chaînes lourdes ou H et des deux chaînes légères ou L associées entre elles par des ponts disulfures ; d'un domaine transmembranaire permettant l'ancrage à la membrane et d'un court domaine cytoplasmique COOH-terminal. Enfin, un hétérodimère nécessaire à la transduction du signal¹⁰, est associé au récepteur B : il est composé de molécules $Ig\alpha$ (CD79a) et $Ig\beta$ (CD79b) possédant un large domaine cytoplasmique avec des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) (figure 5).

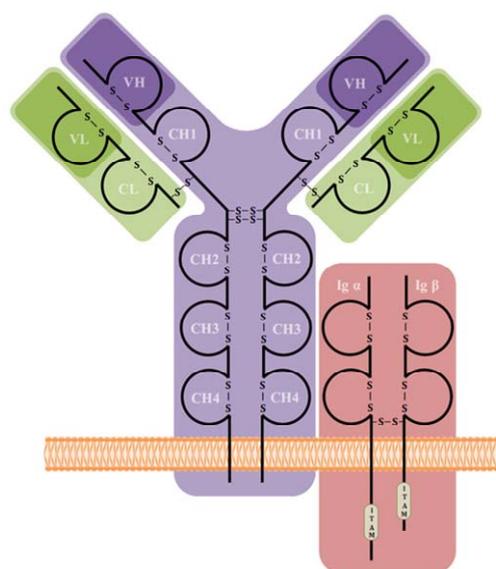


Figure 5 : Schéma représentant la structure du BCR.
D'après le site internet : www.courspharma.com. (site consulté le 21 avril 2010).

La fixation de l'antigène sur le BCR initie la phase d'activation du LB : cette liaison entraîne l'agrégation des récepteurs qui vont alors s'associer au sein de radeaux lipidiques (constitués de sphingolipides et de cholestérol) pour former des micro-domaines. L'antigène va alors être internalisé par le BCR. La transduction du signal peut alors avoir lieu puisque la machinerie de signalisation est présente au sein de ces radeaux : les molécules CD19 et CD20 se retrouvent ainsi au voisinage de la tyrosine kinase Syk et des kinases de la famille Csk (pour C-terminal Src kinases) Lck, Lyn et Fyn ce qui entraîne l'initiation de la transduction du signal. Des voies de signalisation sont activées par ce phénomène telle que la voie de la phospholipase C γ 2 (PLC, hydrolyse des phospholipides) et des kinases telles que Vav, Blnk et Btk sont impliquées dans la propagation du signal ¹¹ (figure 6).

1.3 Activation et survie des lymphocytes B

La survie du LB mature naïf passe nécessairement par la rencontre avec l'antigène, ceci de manière spécifique par son BCR. Les antigènes captés par les LB matures sont, pour la plupart, de nature protéique et ils peuvent être soit solubles soit particulaires. Ces LB matures naïfs vont donc circuler par la voie sanguine et lymphatique vers les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate et plaques de Peyer). L'avenir du LB à court terme est le suivant : mort cellulaire en l'absence d'antigène ou activation si rencontre avec l'antigène. Deux types d'activation sont possibles : l'activation T-indépendante et l'activation T-dépendante.

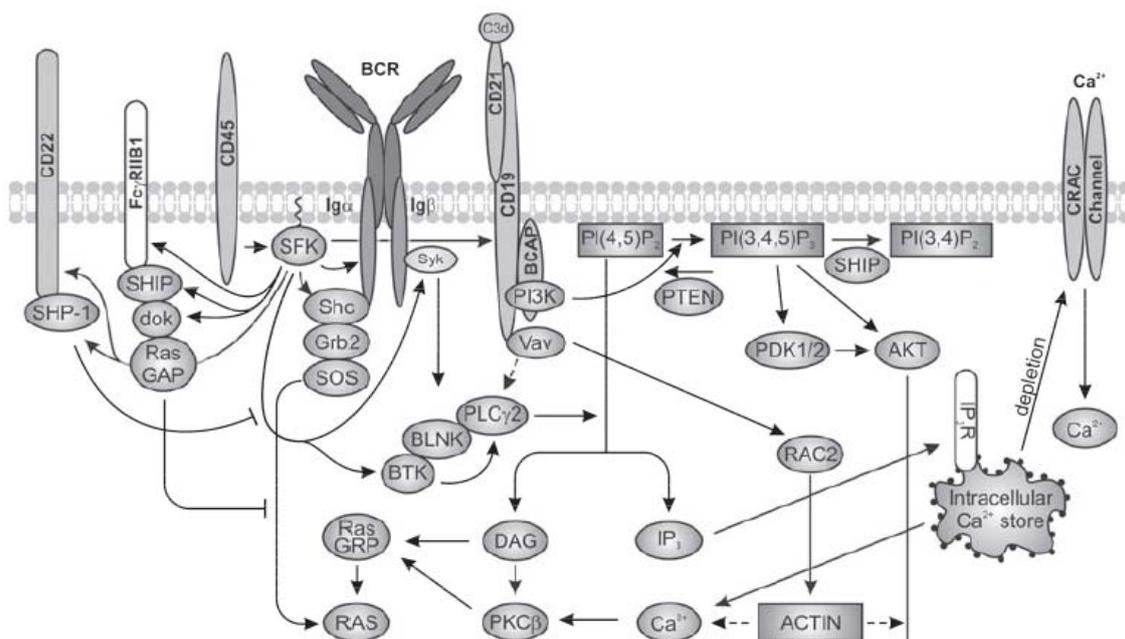


Figure 6 : Signalisation par le BCR (en partie).

Modifiée d'après Makay et al., Immunological Reviews, 2010 ¹².

1.3.1 Les types d'activation

1.3.1.1 Activation T-dépendante

Les antigènes exogènes dits « T-dépendants » sont typiquement des protéines (bactéries, cellules...). Les LB reconnaissent des épitopes conformationnels des antigènes grâce à leurs différents récepteurs, puis vont internaliser et dégrader ces antigènes. Ensuite des peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II vont être présentés aux lymphocytes T (LT) CD4⁺. Dans ce cas, le LB est considéré comme une cellule présentatrice d'antigène (CPA) professionnelle, même si cette capacité est limitée du fait de sa forte spécificité. Ce type de réponse est à l'origine d'une mémoire immunitaire.

Différents couples de molécules interviennent au cours de cette interaction B-T notamment le couple CD40/CD40L et B7/CD28. Ceci aboutit à l'activation bidirectionnelle des LB et des LT et le LB va former des follicules appelés centres germinatifs (CG). Dans ces CG, il existe un contact privilégié entre LB, LT et cellules dendritiques folliculaires (FDC) et c'est le siège d'une prolifération lymphocytaire B majeure (figure 7). C'est également dans les CG, suite à la rencontre avec l'antigène, qu'ont lieu deux modifications géniques du LB afin de modifier son BCR : l'hypermutation somatique et la commutation de classe (ou commutation isotypique). La commutation de classe permet le passage de la classe IgM en IgD, IgG, IgA et IgE ceci par changement de la chaîne lourde des Ig. L'hypermutation somatique permet, quant à elle, la modification de l'affinité du BCR pour l'antigène par mutation des régions variables des Ig. Ces deux modifications requièrent l'enzyme AID (activation-induced cytidine deaminase)¹³.

1.3.1.2 Activation T-indépendante

Les antigènes dits « T-indépendants » sont pour la plupart des polysaccharides bactériens mais peuvent être également de l'ADN.

Ces antigènes vont entraîner l'activation des LB uniquement s'ils sont capables de se fixer sur le BCR. La réponse à ces antigènes peut induire une commutation isotypique mais n'induit en général pas de réaction de CG ni de mémoire immunitaire¹⁴.

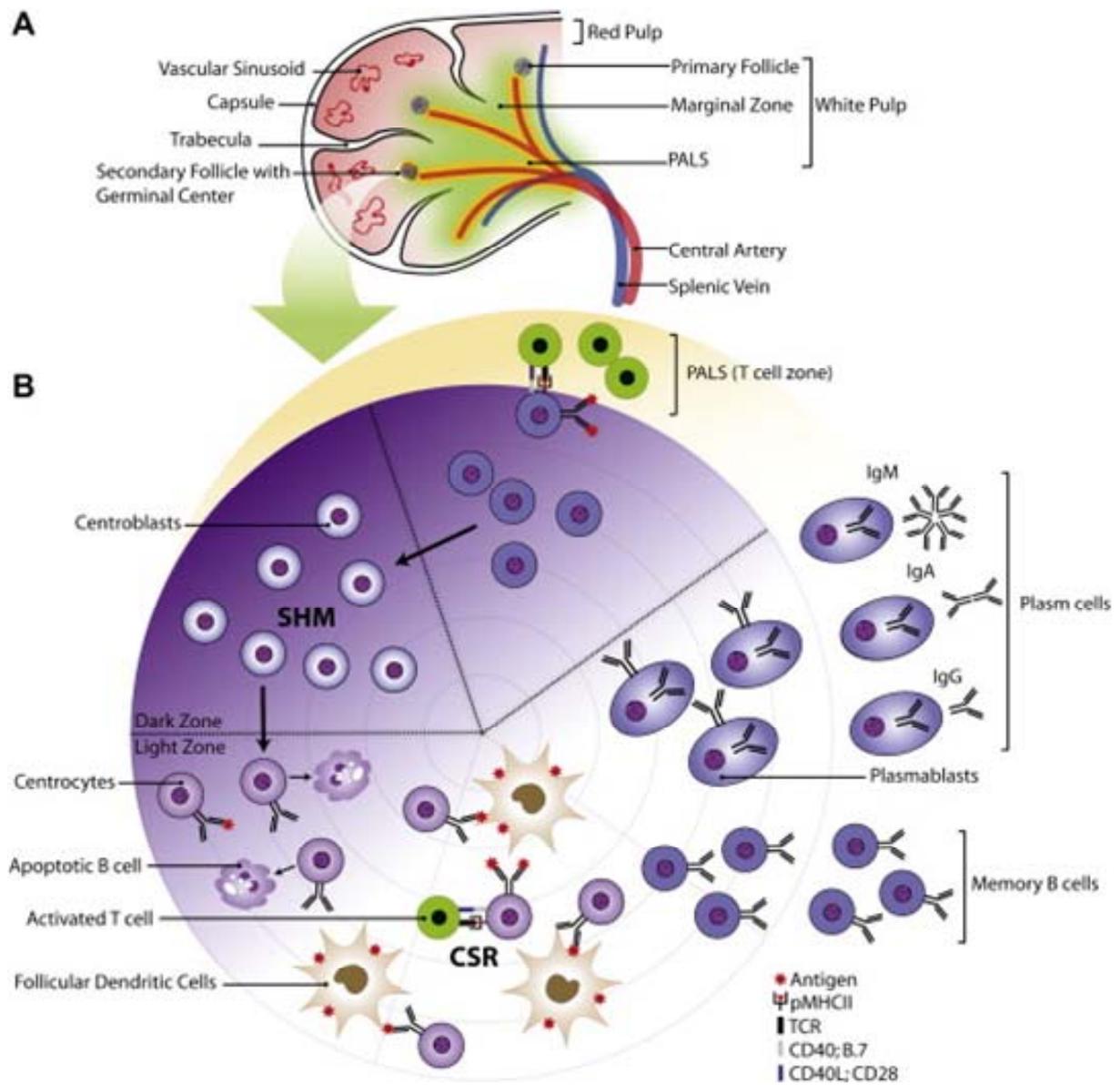


Figure 7 : Schéma de la rate (A) et de la réaction des centres germinatifs au sein des follicules de la rate (B).

D'après Vale et Schroeder, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010¹⁴.

Les CG sont localisés dans les follicules secondaires. Ils sont séparés en deux zones distinctes : la zone sombre et la zone claire. La zone sombre est le lieu des mutations hypersomatiques (SHM) alors que la zone claire est le lieu des commutations isotypiques (CSR) et de la formation des cellules sécrétrices d'anticorps (plasmocytes) et de cellules mémoires. Il en est de même pour les CG des ganglions lymphatiques.

1.3.2 Les différents types de lymphocytes B matures activés

1.3.2.1 Les LB de type B1

Les LB appelés B1, sont capables de produire des anticorps d'une manière indépendante des LT. Ces cellules sont caractérisées par l'expression du CD5 et un niveau élevé d'IgM de surface et contribuent à assurer l'immunité des muqueuses. On les retrouve notamment au niveau péritonéal. Ces cellules ont surtout été caractérisées chez la souris et peu chez l'homme et on peut noter la présence de deux sous-populations : B1-a et B1-b¹⁵. Les cellules B1-a contribueraient plutôt à une réponse immunitaire de type innée alors que les cellules B1-b favoriseraient l'immunité adaptative¹⁶.

1.3.2.2 Les LB de type B2 ou « folliculaires »

La principale localisation de ces cellules est la zone B des organes lymphoïdes secondaires où ces LB vont former des CG suite à la rencontre avec l'antigène et les LT. Ainsi l'activation de ces cellules par le BCR, CD40 et les récepteurs Toll-like (TLR) va conduire à leur différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps à longue durée de vie, à l'origine d'une mémoire immunitaire¹⁵.

1.3.2.3 Les LB de la zone marginale (BMZ)

Ces cellules sont capables de se différencier en plasmocytes à courte durée de vie en absence d'activation par le BCR. Ces cellules peuvent également être impliquées dans le transport d'antigènes vers les follicules ou encore dans les réponses B T-dépendantes¹⁵.

2 Implication des lymphocytes B en pathologie

2.1 Les pathologies auto-immunes

Historiquement, les cellules B n'étaient pas considérées comme ayant une fonction régulatrice majeure dans le développement de l'auto-immunité. Depuis, la dérégulation de la fonction des LB semble importante dans l'induction d'une cassure dans la tolérance favorisant le développement de pathologies auto-immunes, pas uniquement par la présence d'auto-anticorps (produits par des plasmocytes auto-réactifs) mais également par une dérégulation de multiples aspects de l'immunité cellulaire¹⁷. Les LB auto-réactifs peuvent apparaître aux différents stades de différenciation de la cellule B : du stade pré-B au stade plasmocytaire et mémoire¹⁸.

Ces pathologies sont diverses et les LB auto-réactifs reconnaissent de manière anormale différents « antigènes » du soi : l'ADN double brin et les nucléosomes dans le lupus systémique érythémateux¹⁸, les érythrocytes dans l'anémie hémolytique auto-immune, une métallo-protéase (ADAMTS13) dans le purpura thrombotique thrombocytopénique...¹⁹.

2.2 Le rejet humoral

Les rejets de greffe de rein peuvent être classés en deux groupes : le rejet cellulaire ou le rejet médié par les anticorps (dit humoral), bien que de nombreux rejets aient des phénotypes mixtes avec différents composants cellulaires et humoraux²⁰. L'hétérogénéité du rejet dépend de la présence de différentes cellules de l'hôte infiltrant le greffon : LT, LB, NK, macrophages et éosinophiles.

La présence de LB CD20⁺ infiltrant le greffon est corrélé avec un phénotype de rejet récalcitrant aux traitements conventionnels et avec un risque augmenté de la perte du greffon²¹⁻²³. Deux « compartiments » cellulaires B sont à l'origine de ce rejet :

- une population CD27⁺CD79⁺CD20⁺ (phénotype mémoire/activé) qui suite à des expositions chroniques à de faibles taux d'antigènes du donneur, deviennent de très bonnes cellules présentatrices de ces antigènes et vont ainsi être à l'origine d'un rejet cellulaire agressif médié par les LT CD4⁺²⁴.

- une population de plasmocytes matures CD138⁺ et de plasmoblastes CD38⁺ à l'origine du rejet humoral. Ces cellules sont capables de sécréter des anticorps donneur-spécifique à l'origine d'une activation du complément, ce qui se caractérise par un dépôt du composant C4d du complément au sein du greffon²⁵.

2.3 Les hémopathies B malignes

Le terme « hémopathie maligne » regroupe les leucémies, les lymphomes et les myélomes. Ce type de pathologies est caractérisé par une prolifération cellulaire anormale, cancéreuse. Ne seront développés ici que les leucémies et les lymphomes B.

2.3.1 Classification

Une classification très détaillée existe, établie par l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) et la dernière en date est la 4ème classification parue en 2008 (WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Swerdlow et al. IARC presse, 2008). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux hémopathies dérivées des LB et notamment les leucémies et les lymphomes B, dont les principaux types sont détaillés ci-dessous et illustrés figure 8.

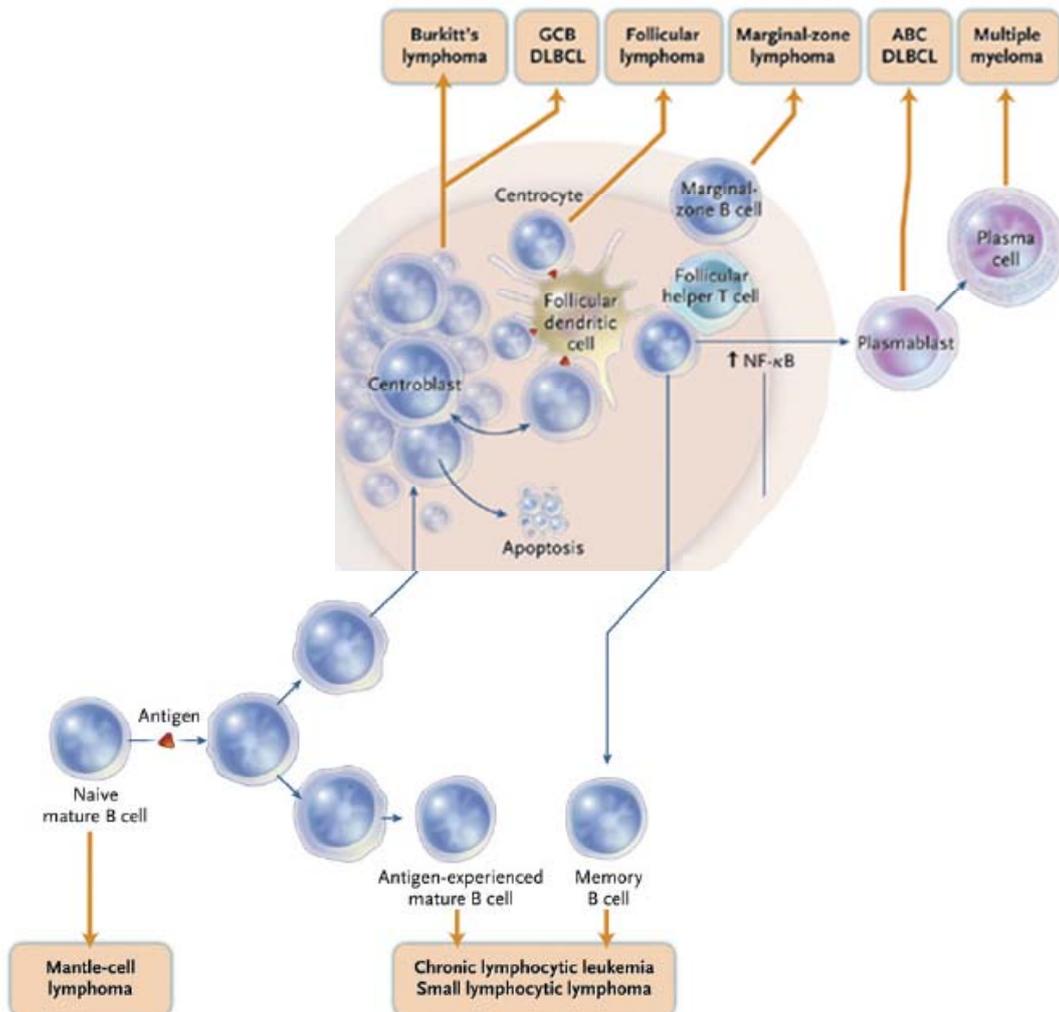


Figure 8 : Différents stades de différenciation des lymphocytes B et lymphomagenèse.
Modifiée d'après Lenz et Staudt, The New England Journal of Medicine, 2010²⁶.

2.3.1.1 Les leucémies B

Les leucémies B se caractérisent par une prolifération monoclonale d'une population plus ou moins mature de LB et 2 types se distinguent selon la nature aiguë ou chronique de la maladie.

2.3.1.1.1 La leucémie lymphoïde chronique (LLC)

La LLC est la plus fréquente des leucémies de l'adulte (incidence 3/100000 cas) et 2/3 des patients ont plus de 60 ans. La majorité des patients présentent une maladie asymptomatique, et en l'absence de bénéfices d'un traitement précoce en terme de survie, les patients sont traités lorsque les symptômes apparaissent (grossissement des ganglions, cytopénie...). Les traitements classiques basés sur une thérapie palliative entraînent une réponse chez 40 à 60% des patients ²⁷.

Cette pathologie présente une prolifération de cellules B matures qui expriment les molécules CD19 et CD20 et de manière anormale CD5 (généralement présent sur les LT) et CD23. Ces cellules expriment faiblement le BCR à leur surface, et ceci est caractéristique des LLC. Les LB tumoraux présentent de manière fréquente des anomalies chromosomiques (telles que des délétions (13q14), (11q22.3)...) et l'accumulation de ces anomalies serait à l'origine du développement symptomatique de la maladie ²⁸. Différents sous-types de LLC existent et sont biologiquement distingués par le statut mutationnel de la partie variable de la chaîne lourde des Ig : IgV_H ²⁹. Les patients ayant un statut IgV_H non muté ont une surexpression de ZAP70 avec une augmentation de signalisation par le BCR et ainsi ont une plus grande fréquence d'instabilités génomiques à l'origine d'une progression rapide de la maladie. Également un défaut d'apoptose est mis en cause dans la LLC avec la surexpression de protéines anti-apoptotiques de type Bcl-2 ³⁰.

2.3.1.1.2 La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) B

Cette pathologie est caractérisée par la prolifération de LB immatures et est nettement plus fréquente chez l'enfant que chez l'adulte, même si un pic d'incidence de LAL est retrouvé après 60 ans. La classification franco-américano-britannique (FAB) toujours utilisée, a défini trois types de LAL : L1, L2 et L3. La présence d'anomalies chromosomiques (translocations) est également retrouvée dans ce type de leucémie, comme par exemple dans les LAL à chromosome de Philadelphie (environ 1/3 des LAL de l'adulte), qui sont particulièrement agressives. Des facteurs génétiques sont mis en cause dans la genèse de cette

pathologie mais des facteurs environnementaux interviennent également. D'ailleurs l'augmentation de l'incidence de cette pathologie a été mise en corrélation avec l'élévation du niveau de vie.

Les gènes impliqués dans la genèse de la LAL sont peu nombreux : on compte les réarrangements TEL-AML1, MLL, BCR-ABL et E2A-PBX1 ³¹.

2.3.1.2 Les lymphomes B

On distingue deux types de lymphomes : les hodgkiniens et les non-hodgkiniens.

2.3.1.2.1 Les lymphomes hodgkiniens

Ce type de lymphome, encore appelé maladie de Hodgkin, voit son incidence augmentée rapidement, laissant suggérer des causes environnementales. Cette pathologie est caractérisée par la présence de grandes cellules appelées « cellules de Reed-Sternberg » et l'infection par le virus de l'Epstein-Barr (EBV) est retrouvée dans environ 50% des cas ³².

2.3.1.2.2 Les lymphomes non hodgkiniens (LNH)

Ces sont les hémopathies B dont l'incidence est la plus élevée et celle-ci augmente avec l'âge des sujets. Selon le profil évolutif de la maladie, les LNH se distinguent en deux groupes : les lymphomes agressifs ou de haut grade et les lymphomes indolents.

Dans les lymphomes B agressifs, on retrouve principalement :

- les lymphomes diffus à grandes cellules, qui sont les plus communs des lymphomes (30 à 40% des nouveaux cas diagnostiqués). Les traitements (avant l'ère du Rituximab, RTX) permettaient de traiter environ 50% des cas.

Selon un profil d'expression génique différentiel, on peut subdiviser ce type de lymphome en trois sous-classes : le sous type GCB (pour germinal center B-cell-like), le sous type ABC (pour activated B-cell-like) et le sous type PBML (pour primary mediastinal B-cell lymphoma). Ils diffèrent également au niveau de la présentation clinique ou encore dans leur processus de transformation ²⁶.

- les lymphomes de Burkitt, retrouvés sous trois formes : la forme endémique liée à l'infection par l'EBV et touchant principalement les enfants africains ; la forme liée au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et une forme sporadique, rare, pouvant toucher les adultes occidentaux. Ce type de lymphomes représente 2% des syndromes lymphoprolifératifs

et touche préférentiellement les sujets masculins. Environ 80% des cas sont traités efficacement par chimiothérapie.

Ce lymphome est généralement associé à une translocation du gène c-myc souvent provoquée par l'EBV ³³.

Les lymphomes B indolents représentent un groupe de lymphomes incurables, avec une présentation initiale peu agressive mais avec un risque de récurrence élevée au cours de l'évolution de la maladie ³⁴. Ce groupe comprend :

- les lymphomes folliculaires qui représentent environ 70% des lymphomes B indolents et 25% des LNH ³⁵. L'introduction du RTX a augmenté de manière importante la survie globale des patients dans ce type de lymphomes (87% versus 74% de survie globale à 4 ans dans une étude comparant le RTX associé ou non au traitement classique ³⁶).

Le clone lymphocytaire à l'origine de la maladie est originaire des CG, il exprime typiquement CD20 et CD10 mais pas CD5. Il est à noter le rôle important de la translocation t(14 ;18) et la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans la genèse du lymphome folliculaire ³⁷.

- les lymphomes à cellules du manteau, plus rares et avec un pronostic plus péjoratif que les autres lymphomes indolents (car plus agressifs). Il n'y a pas de traitement standard pour cette maladie incurable et les traitements intensifs augmentent la durée de la rémission mais pas la survie globale des patients ³⁸.

Ces cellules tumorales, issues du manteau folliculaire des ganglions, expriment CD5 et dans 50 à 70% des cas sont caractérisés par une translocation t(11 ;14) impliquant le gène Bcl-1, ce qui se traduit par une surexpression de la cycline D1 ³⁹.

- les lymphomes à cellules de la zone marginale tels que les lymphomes du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (ou M.A.L.T.) ou les lymphomes de la zone marginale splénique. Ces derniers représentent 2% des hémopathies lymphoïdes. Environ 1/3 des patients ne sont pas traités au début de la maladie et ils ont un taux de survie de 88% à 5 ans. Suite au développement symptomatique (splénomégalie, cytopénie), le but du traitement est de contrôler la maladie mais il n'est pas curatif ⁴⁰.

- les lymphomes lymphoplasmocytoïdes (ou maladie de Waldenström) qui sont peu communs. L'introduction du RTX a augmenté de manière importante le taux de réponse des patients dans ce type de lymphomes (94% versus 67% dans une étude comparant le RTX associé ou non au traitement classique ⁴¹).

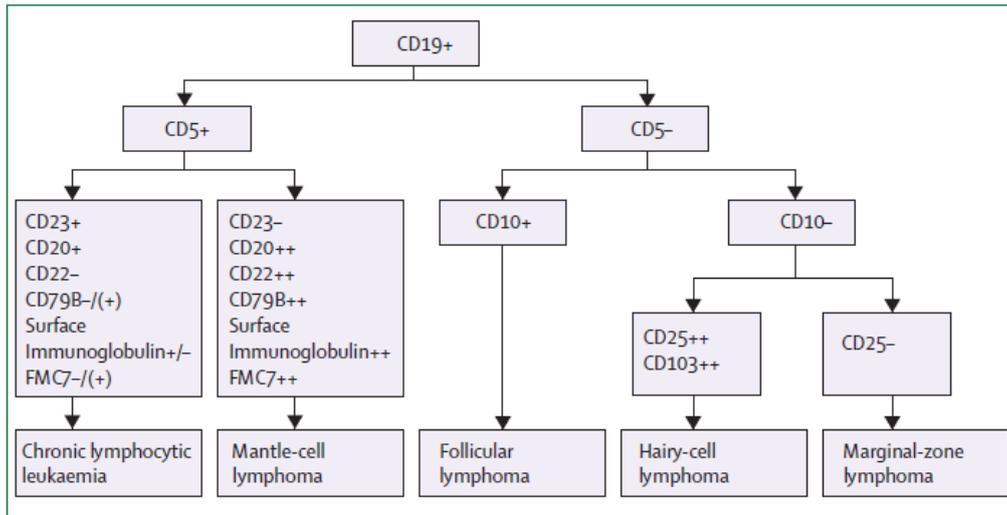


Figure 9 : Diagnostic différentiel d'une lympho-prolifération B exprimant le CD19.
D'après Dighiero et al., *Lancet*, 2008³⁰.

2.3.2 Traitements conventionnels avant l'ère du Rituximab

Les anticorps monoclonaux ont certes révolutionné le traitement des LNH et de la LLC mais d'autres traitements ont été et sont encore utilisés aujourd'hui, seuls ou en combinaison avec le RTX.

2.3.2.1 Les agents cytotoxiques

Les agents alkylants représentés par le chlorambucil et le cyclophosphamide, associés ou non aux corticoïdes, ont constitué jusqu'au milieu des années 1980 le standard du traitement des lymphomes indolents et en particulier du lymphome folliculaire⁴² mais également de la LLC⁴³.

De nombreuses associations ou poly-chimiothérapies existent et nous noterons plus particulièrement :

- l'association CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone) qui a été et est très largement utilisée dans le traitement de divers lymphomes indolents et de haut grade tels que les lymphomes diffus à grandes cellules⁴⁴.

- la poly-chimiothérapie de type CVP (cyclophosphamide, vincristine et prednisone) notamment dans les lymphomes folliculaires avancés⁴⁵.

L'addition d'anthracyclines dans le régime de type CHOP a suscité l'enthousiasme grâce aux meilleurs taux de réponse obtenus. Elle n'a cependant pas prolongé le délai jusqu'à la progression de la maladie par rapport à la chimiothérapie de type CVP⁴⁶.

2.3.2.2 Les analogues des purines

Les analogues des purines, dominés par la Fludarabine, ont représenté une nouvelle classe de chimiothérapie largement étudiée. Dans un essai randomisé de patients porteurs de lymphomes indolents et naïfs de traitement, le taux de rémission complète (RC) est plus important avec la Fludarabine seule qu'avec la combinaison CVP⁴⁷. Egalement, ce traitement a montré des résultats supérieurs aux agents alkylants chez des patients atteints de LLC⁴⁸.

2.3.2.3 L'interféron alpha

Dès les années 1980, l'interféron alpha (IFN α) s'est avéré être une arme efficace notamment dans le lymphome folliculaire⁴⁹. L'addition de ce traitement aux chimiothérapies conventionnelles chez des patients naïfs de traitement pouvait prolonger la durée de rémission et la survie⁵⁰ mais son profil de toxicité a atténué fortement ses bénéfices potentiels.

2.3.2.4 La greffe de CSH

La greffe de CSH permet de traiter diverses hémopathies malignes dont les hémopathies B, en condition autologue ou allogénique après conditionnement, afin de remplacer les cellules à l'origine de la maladie par des cellules saines. Selon le type d'hémopathie et le stade de la maladie, le conditionnement et le type de greffe vont changer.

Alors que la chimiothérapie intensive suivie d'une autogreffe de CSH s'est imposée dans les lymphomes en rechute ou réfractaires, notamment dans les lymphomes folliculaires⁵¹, la greffe de CSH reste, elle, très controversée dans les lymphomes du manteau⁵². Dans le cas de la LLC, ce type de traitement s'est orienté vers un conditionnement atténué et une allogreffe afin de bénéficier de l'effet anti-tumoral⁵³.

La greffe allogénique présente des avantages par rapport à l'autogreffe : greffon sans tumeur, disparition théorique du risque de leucémie secondaire, effet allogénique anti-tumoral... Mais les inconvénients de l'allogreffe ont rapidement contrebalancé l'enthousiasme initial : difficultés de recrutement d'un donneur compatible, complications infectieuses, mortalité liée à la toxicité et maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). L'étude rétrospective la plus grande comparant greffe allogénique et autogreffe rassemble 2047 autogreffes et 231 allogreffes pour des lymphomes de bas grade⁵⁴. Les résultats ont montré que l'allogreffe a certes une toxicité beaucoup plus importante que l'autogreffe mais avec un risque de rechute moins important, témoignant d'un effet allogénique curateur certain.

3 La molécule CD20 humaine

La molécule CD20, identifiée B1 à l'origine, a été découverte en 1980 comme un marqueur phénotypique des lymphocytes B⁵⁵. L'expression de CD20 se fait précocement au niveau du stade pré-B, le reste au cours du développement des LB et est perdue au niveau des cellules de différenciation terminale : les plasmocytes⁵⁶. De manière intéressante, cette molécule est exprimée sur la majorité des lymphomes B normaux ou malins, ce qui en fait une cible de choix dans le traitement de ces pathologies.

3.1 Le gène CD20

Le gène CD20 humain (MS4A1) est localisé sur le chromosome 11 en région q12 et comprend 8 exons. Il appartient à la famille de gènes MS4A (pour Membrane Spanning 4A)⁵⁷. Les composants de cette famille, au nombre de 26, sont des complexes oligomériques de surface impliqués dans les transductions de signaux⁵⁸.



Figure 10 : Schéma du gène CD20 (MS4A1).

D'après NCBI, Gene ID: 931, www.ncbi.nlm.nih.gov. (site consulté le 29 octobre 2010).

3.2 La protéine CD20

L'ARN pré-messager de CD20 a une taille de 14.95 kb et il a été identifié différents sites d'épissage dans sa région 5' non traduite aboutissant à trois transcrits de taille différente^{59,60}. Les différents transcrits codent pour la protéine CD20 d'un poids moléculaire de 33kDa. Par Western blotting et immuno-précipitation, trois isoformes (33, 35 et 37 kDa) de la protéine sont détectées, ne correspondant pas aux variants épissés mais à des modifications post-transcriptionnelles par phosphorylation⁶¹.

Cette protéine possède une région très hydrophobe comprenant quatre domaines transmembranaires, une région extracellulaire formant une boucle et une région intracellulaire ou cytoplasmique (figure 11)⁶⁰. 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 structure⁶².

La partie intracellulaire comporte les extrémités C et N-terminales et est riche en résidus thréonine et serine qui peuvent être phosphorylés en réponse à une stimulation de la cellule B ^{63,64}. Malgré des résultats contradictoires, il semblerait que la protéine CD20 ne soit pas glycosylée ⁶⁵.

Au niveau de la boucle extracellulaire (environ 40 acides aminés (AA) entre les domaines transmembranaires 3 et 4) se trouvent divers épitopes de reconnaissance par des anticorps monoclonaux anti-CD20. Deux résidus sont importants : l'alanine en position 170 et la proline en position 172 (motif AxP) ; la mutation de ces résidus entraîne la perte de la reconnaissance ⁶⁶. Ceci sera traité dans la partie sur les anticorps monoclonaux. Il existerait une potentielle seconde boucle, située entre les domaines transmembranaires 1 et 2, boucle hautement conservée dans les membres de la famille MS4A. L'existence de cette boucle est controversée : l'équipe de Julie Deans montre qu'il n'y a pas de digestion autre que celle de la grande boucle ⁶² alors qu'un autre groupe montre que certains anticorps anti-CD20 reconnaissent des peptides correspondant à la région de la petite boucle ⁶⁷.

De récentes études de cristallographie à partir de protéines recombinantes ont montré la présence d'un pont disulfure entre les résidus cystéine 167 et 183 ^{68,69}. Ce pont disulfure étant présent dans de nombreux membres de la famille MS4A, ceci prouve donc l'importance de ce pont pour le maintien de la structure extracellulaire de CD20 ⁵⁸.

Différentes techniques ont été utilisées pour montrer que CD20 pouvait être présente sous forme d'homo-multimère à la surface cellulaire et en particulier sous forme de tetramère ⁷⁰. De plus la molécule CD20 est constitutivement associée aux radeaux lipidiques ⁷¹ et peut interagir, au sein de ces domaines, avec de nombreuses autres molécules telles que les molécules du CMH, CD40 et surtout avec le BCR ^{72,73}.

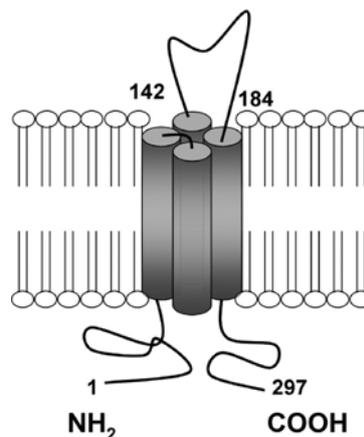


Figure 11 : Représentation schématique de la molécule CD20.

D'après van Marteen T. and Hagenbeek A., Seminars in Hematology, 2010 ⁷⁴.

3.3 Fonction de la molécule CD20

Malgré 30 années d'études intensives, la fonction de la molécule CD20 est encore mal connue et reste non élucidée à ce jour. Le ligand de cette molécule n'étant pas connu, il est nécessaire d'utiliser la liaison d'anticorps monoclonaux anti-CD20 pour explorer sa fonction ; de plus les souris knock-out (KO) pour CD20 ne présentent que de subtiles différences dans le phénotype des LB^{75,76} ce qui rend difficile la caractérisation de sa fonction.

Une hypothèse serait que la protéine CD20 fonctionne comme une molécule d'activation ou de différenciation cellulaire B et interviendrait dans la progression du cycle cellulaire. En effet, la fixation de différents anticorps entraîne des modifications de la prolifération cellulaire et certains entraînent même l'arrêt de croissance des LB⁷⁷.

Egalement, d'importants travaux s'intéressent à la molécule CD20 en tant que canal calcique ou intervenant dans la modulation des flux calciques des LB. En effet, cette protéine serait impliquée dans le transport inter-membranaire du calcium puisque l'expression de CD20 dans des cellules CD20-négatives entraîne un flux de calcium dans ces cellules^{78,79}. De plus, la fixation d'anticorps sur CD20 conduit à une augmentation de conductance du calcium dans les LB. Mais il n'a pas été clairement montré que CD20 était un canal calcique proprement dit et des études plus récentes montrent que CD20 serait impliqué dans l'entrée de calcium dans la cellule par des canaux cationiques dits « capacitifs » (ou SOC pour Store-Operated Cation) suite à l'engagement du BCR⁷⁹ et ainsi que le signal généré par la liaison d'un anticorps sur CD20 intervient grâce à l'association avec le BCR et au « détournement » de la voie de signalisation du BCR⁷³. Des travaux d'une autre équipe vont également dans ce sens et ont montré que CD20 était physiquement associé avec le BCR et que cette association était perdue suite à la signalisation par le BCR^{66,70}.

Malgré une grande homologie de séquence entre les molécules CD20 murine et humaine, des différences importantes existent au niveau des AA laissant envisager une fonction différente des deux protéines⁸⁰.

3.4 Signalisation par CD20

La signalisation par la molécule CD20 a, bien sûr, été étudiée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. La fixation de ces anticorps sur la boucle extracellulaire de CD20 génère des signaux transmembranaires à l'origine d'une cascade de signalisation associée à la voie dépendante des tyrosine-kinases. Les effets de cette signalisation sont la phosphorylation de CD20 ou encore la régulation de l'expression d'oncogènes tels que c-myc et b-myb⁸¹.

Au moment de la fixation de ces anticorps, CD20 va se relocaliser dans les radeaux lipidiques qui sont de véritables « plateformes de signalisation cellulaire »⁸². En effet la molécule CD20 va se retrouver dans un micro-domaine privilégié, au contact d'autres molécules, entre autres la protéine Cbp (pour C-terminal Src kinase-binding protein) et bien sûr le BCR. Et comme précisé dans le paragraphe précédent, la signalisation par CD20 va « détourner » la signalisation du BCR (figure 6) et ainsi va entraîner l'activation de kinases : les Csk telles que Lyn, Fyn et Lck qui vont phosphoryler Cbp et ainsi induire l'activité kinase de cette dernière afin de propager le signal en amont⁸³. Dans les lignées B, le cross-linking de CD20 active Csk et Cbp entraînant l'activation par phosphorylation des PLC C- γ 1 et γ 2 (comme pour la signalisation par le BCR) ayant pour conséquence un influx de calcium augmenté, une augmentation de l'expression de Fas et l'activation de la caspase-3 induisant la mort cellulaire par apoptose⁸⁰.

4 Les anticorps monoclonaux anti-CD20

4.1 Généralités sur les anticorps monoclonaux

L'utilisation de ces anticorps en thérapeutique anticancéreuse a été évoquée pour la première fois par Paul Ehrlich il y a plus d'un siècle. Puis les avancées technologiques concernant les hybridomes en 1975 ont permis la production d'anticorps monoclonaux. Ces anticorps sont des anticorps qui présentent des régions variables spécifiques d'un épitope. Produits dans un premier temps chez la souris, ils se sont montrés immunogènes chez l'homme et depuis des anticorps chimériques, humanisés ou totalement humains ont été développés⁸⁴.

Les anticorps se déclinent en 5 classes en fonction de leur chaîne lourde. En immunothérapie anticancéreuse ce sont les IgG les plus utilisées, nous ne développerons donc pas les autres classes.

Les anticorps peuvent être séparés en 2 sous-unités fonctionnelles : le fragment de liaison à l'antigène (Fab) qui contient les régions variables et le fragment constant (Fc) qui permet le recrutement des différents effecteurs du système immunitaire. En effet le fragment Fc va pouvoir recruter le complément, se fixer au récepteur Fc des cellules effectrices (FcγR pour les IgG) et aux FcR néonataux (FcRn) (figure 12)⁸⁴.

4.1.1 Activation du complément

Les IgG, en particulier les IgG1 et IgG3, sont capables d'activer la voie classique du complément. La liaison de deux ou plusieurs molécules d'IgG à la surface de la cellule cible va permettre le recrutement du composant du complément C1q par le fragment Fc et ce avec une forte affinité. La conséquence de cette fixation est l'activation du complexe enzymatique C1r et des protéines du complément en aval. Le résultat de cette cascade est la formation de pores dans la membrane cellulaire par le complexe d'attaque membranaire (MAC) et ainsi la lyse de la cellule cible^{85,86} : c'est la cytotoxicité dépendante du complément (CDC).

4.1.2 Interactions IgG-Fc

Les IgG à la surface de la cellule tumorale permettent la reconnaissance de cette cible par les cellules effectrices du système immunitaire qui possèdent les FcγR. Les FcγR peuvent transduire des signaux activateurs via les motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) et des signaux inhibiteurs via les motifs ITIM

(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs). Ces deux motifs sont présents au niveau cytoplasmique et associés à de nombreux récepteurs. Différents types de FcγR se distinguent et nous noterons principalement :

- FcγRIIb (encore appelé CD32), qui est le principal récepteur inhibiteur.
- FcγRI (CD64) et FcγRIIIa (CD16), qui sont eux les principaux récepteurs activateurs. FcγRI est un récepteur de haute affinité, exprimé sur les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les éosinophiles et les neutrophiles. FcγRIIIa est exprimé principalement par les lymphocytes « natural killer » (NK), les DC, les macrophages et les mastocytes.

L'expression du FcγRIIIa est requise pour la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) médiée par les NK ⁸⁷. La fixation de ce récepteur sur la partie Fc de l'IgG, elle-même fixée sur la cellule tumorale va permettre l'activation du lymphocyte NK et l'utilisation de ses enzymes, perforine et granzymes, pour aboutir à la lyse cellulaire. L'ADCC étant un mécanisme important de l'action de nombreux anticorps en thérapie anticancéreuse, des études sont réalisées afin de modifier le fragment Fc pour augmenter l'affinité avec le FcγRIIIa et ainsi promouvoir l'ADCC ⁸⁸.

La fixation des récepteurs Fc présents sur les phagocytes sur la partie Fc de l'IgG fixée à la cellule tumorale va entraîner également une phagocytose Fc-dépendante qui va induire une dégradation lysosomiale de la cellule tumorale.

Suite à cette dégradation, des peptides tumoraux associés au CMH de classe II pourront être présentés, via les cellules présentatrices d'antigènes, à des LT CD4⁺ induisant ainsi leur activation. De plus il existe un phénomène de présentation croisée où les peptides tumoraux sont présentés via le CMH de classe I et ainsi vont activer les LT CD8⁺ cytotoxiques ⁸⁴. L'immunité adaptative est donc activée afin d'éliminer spécifiquement les cellules tumorales.

4.1.3 Interaction IgG-FcR néonataux

Les FcRn sont différents des FcR et se rapprochent des molécules du CMH I. Ces récepteurs sont présents à la surface des cellules endothéliales vasculaires et ils peuvent lier à la fois les IgG et l'albumine. Leur rôle principal est le transfert passif de l'immunité humorale de la mère à son fœtus ⁸⁹ mais ils interviennent également de manière importante dans la maintenance des IgG dans le sérum, d'où une demi-vie importante de cet isotype. L'interaction IgG-FcRn peut être utile en thérapeutique et des efforts sont faits pour augmenter cette interaction afin de maintenir un niveau élevé d'anticorps dans le sérum ⁹⁰.

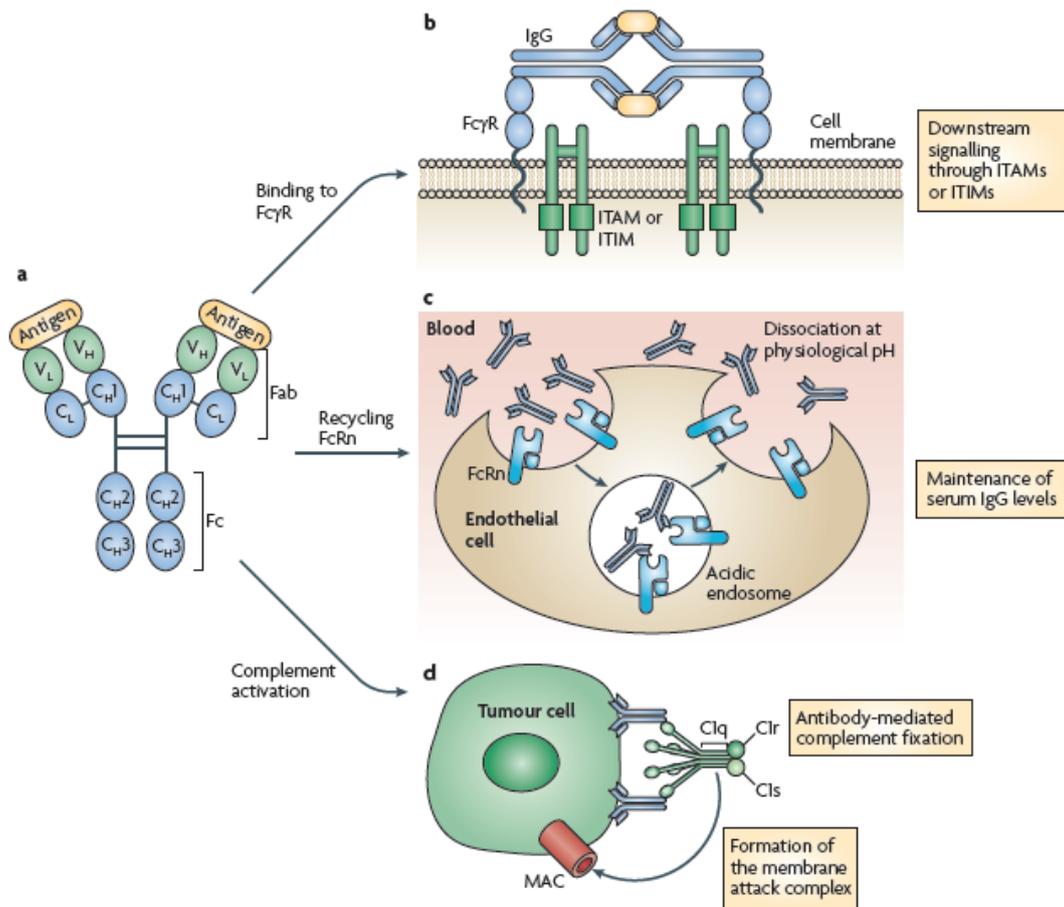


Figure 12 : Structure et fonction d'un anticorps de type IgG.
 D'après Weiner L. et al., *Nature reviews Immunology*, 2010⁸⁴.

4.2 Les anticorps monoclonaux anti-CD20

4.2.1 Classification

Tous les anticorps anti-CD20 n'agissent pas de la même manière. Avec un nombre grandissant d'anti-CD20 développés, une classification s'est imposée et celle-ci est basée sur la fixation de l'anticorps à la molécule CD20 ou encore les différentes propriétés de ces anticorps. Dans un premier temps, quatre groupes ont été identifiés en se basant sur la capacité des anticorps à se lier à une molécule CD20 chimérique comprenant la large boucle extracellulaire murine et le motif critique de liaison AxP humain⁶⁶. Le groupe I ne contient qu'un anticorps, qui est incapable de reconnaître la molécule CD20 chimérique. Les groupes II et III comprennent les anticorps qui reconnaissent cette molécule avec une intensité faible ou modérée ; et le groupe IV qui contient la majorité des anticorps (dont le RTX) qui peuvent se lier fortement à la construction. Un cinquième groupe a également été identifié, comprenant ceux dont la fixation ne nécessite pas la reconnaissance du motif AxP⁶⁷.

CD20 construct	Extracellular loop mutations*
Hu	KISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCY
#6	-----S-S-----
Mu	TL-----RR-EL-QTSK--VD--D---S-S-----N
D	TL-----RR-EL-QTSK--VD--D---S-P-----N
C	TL-----RR-EL-QTSK--VD--D---A-P-----N

Tableau 1 : Séquences amino-acidiques de la boucle extra-cellulaire de la molécule CD20 humaine et murine et de constructions issues de ces séquences avec différentes mutations.

D'après Polyak M. and Deans J., Blood 2002⁶⁶.

La première séquence correspond à celle de la boucle extracellulaire CD20 humaine (Hu) et la troisième à la séquence de la boucle murine (Mu). Le motif humain « A en position 170 et P en position 172 » est critique pour la reconnaissance des anticorps anti-CD20. La molécule chimérique utilisée pour la classification de ces anticorps est la construction C. Les traits noirs dans les séquences correspondent aux AA non modifiés par rapport à la séquence humaine.

Group	AxP reactivity	Antibody designation	Homotypic aggregation	CD20 translocation
I	None	CAT 13.6E12 ⁶	–	++++
II	Weak	2H7 ⁶ , 1C0-165 ²	–	++++, ++
		AT80 ²	++++	++++
III	Intermediate	1F5 ⁶ , B-H20 ² , MEM-97 ²	–	+++
IV	High	B1 ⁶ , Bly1 ²	++++	–
		Rituxan ³	++	++++
		NK1 ² , PDR78 ² , F4B1366 ¹ , LT20 ⁵ , L27 ⁵ , CAT 13.7H8 ²	–	+++ to ++++

Tableau 2 : Classification des anticorps anti-CD20 selon leur capacité à fixer la molécule CD20 chimérique.

D'après Polyak M. and Deans J., Blood 2002⁶⁶.

De manière fonctionnelle, ces anticorps anti-CD20 peuvent être divisés uniquement en 2 groupes : type I et type II. Ceux de type I (comme le RTX) entraînent une relocalisation de CD20 au niveau des radeaux lipidiques alors que ceux de type II (comme le tositumomab ou B1) ne le font pas ⁸². Cette redistribution de CD20 a un impact sur les propriétés de fixation et les fonctions effectrices des anticorps qui conditionnent leur « succès thérapeutique ».

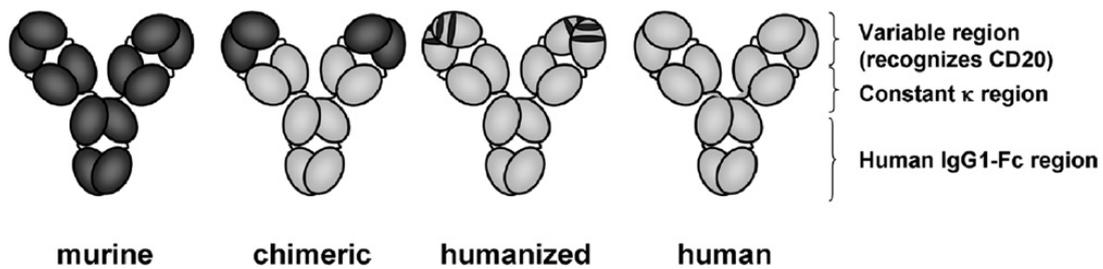


Figure 13 : Développement des anticorps monoclonaux anti-CD20.

D'après van Meerten T. and Hagenbeek A., Seminars in Hematology 2010 ⁷⁴.

4.2.2 Mécanismes d'action des anticorps de type I et II

4.2.2.1 Mécanismes d'action *in vitro*

La majorité des anticorps anti-CD20 générés jusqu'à aujourd'hui sont de type I et leur principale caractéristique est le fait qu'ils activent le complément et ainsi engendrent la CDC ⁹¹. Cette propriété serait directement corrélée à la relocalisation de CD20 dans les radeaux lipidiques suite à la fixation de l'anticorps, probablement par une meilleure capture du composant du complément C1q ⁹². Les anticorps de type II, eux, sont plutôt inefficaces pour induire la CDC mais pourrait induire plus de lyse directe de la cellule cible ⁹³.

Cette lyse directe (qui est une forme de mort cellulaire programmée) est dépendante de la molécule cible et de sa signalisation et pas uniquement de l'anticorps utilisé. Ce type de lyse a beaucoup été discuté pour les anticorps de type I comme le RTX. La fixation de ces anticorps pourrait entraîner une apoptose caspase-dépendante *in vitro* lorsqu'il y a « cross-linking » par des anti-anticorps ou des conjugués multimériques d'anticorps mais ceci reste hypothétique *in vivo* ⁹⁴. En ce qui concerne les anticorps de type II, ceux-ci peuvent lyser la cellule directement, sans cross-linking et selon une voie non apoptotique indépendante des caspases. Cette lyse est corrélée à l'adhésion homotypique des cellules B, requière le cholestérol et implique la relocalisation des mitochondries (donc nécessite de l'énergie) au voisinage du contact cellule-cellule ⁹⁵. Ce type de mort cellulaire programmée implique des lysosomes,

n'est pas régulée par les protéines anti-apoptotiques et peut donc outrepasser les voies classiques de survie cellulaire tumorale ⁹⁶.

Les deux types d'anticorps sont capables d'engendrer une phagocytose efficace ainsi qu'une ADCC.

Les différences de mode d'action entre les anticorps de type I et II sont encore difficilement expliquées et le challenge est de définir la relation structure/fonction pouvant expliquer la réponse divergente pour la CDC et la lyse directe alors que les taux d'ADCC sont identiques pour les anticorps de type I et II. Des résultats très récents de co-cristallisation utilisant la tomographie des protéines de l'industrie GlycArt (Suisse) peuvent nous aider à comprendre ces différences. Brièvement, la fixation des anticorps de type I induit une configuration dite « ouverte » de CD20 (comme lorsqu'elle intervient dans le flux calcique) alors que la fixation de ceux de type II (qui n'induisent pas rapidement de flux calcique) entraînerait une configuration fermée de CD20 ⁹⁶.

4.2.2.2 Mécanismes d'action *in vivo*

Les différences mises en évidence *in vitro* entre les deux types d'anticorps anti-CD20 ont été retrouvées dans de nombreuses études mais leur importance est moins bien définie *in vivo*. Pour les anticorps de type I et II, des expériences de xénogreffe démontrent une bonne protection contre la croissance tumorale malgré des mécanismes d'action différents. Les anticorps de type I semblent être dépendants du complément *in vivo* alors que ceux de type II génèrent une protection anti-tumorale via un mécanisme Fc-indépendant (probablement la mort cellulaire programmée) ⁹⁷⁻⁹⁹.

Depuis des modèles murins ont été développés, notamment des modèles de déplétion des LB soit par des anti-CD20 murins ⁷⁶ soit par des anti-CD20 humains dans des souris transgéniques. Ces modèles ont démontré que les deux types d'anticorps sont dépendants des interactions Fc-FcR des macrophages et que ni le complément ni la lyse directe ne jouent un rôle prépondérant dans cette déplétion B ⁹⁶.

4.2.3 Modulation de l'expression de CD20

Quelques études chez l'homme ont reporté une internalisation de CD20 suite à la fixation d'un anticorps anti-CD20 ¹⁰⁰, mais les résultats restent contradictoires. L'analyse des cellules issues des souris transgéniques pour CD20 révèle que les anticorps de type I, mais pas de type II, induisent une modulation antigénique de CD20 à la surface des LB, *in vitro* et *in*

in vivo. Ceci a pour conséquences une diminution de la lyse des LB par interaction Fc-FcR et une diminution de la demi-vie de l'anticorps puisque non-fixé à sa cible ⁹⁶. Face à ces résultats discordants, l'équipe de Stephen Beers a utilisé un essai de quantification simultanée du niveau d'anticorps à la membrane et dans le cytoplasme. Ils ont ainsi pu mettre en évidence une hétérogénéité des cellules issues de tumeurs humaines dans leur capacité à internaliser CD20 lors de la fixation d'un anticorps de type I. Les auteurs concluent que, comme les LB sains humains et murins, certains types de cellules B malines (LLC et lymphomes du manteau) sont capables de moduler leur expression de CD20 alors que certaines cellules sont plus résistantes à la perte de CD20 à la surface (lymphomes folliculaires et lymphomes diffus à grandes cellules) ¹⁰¹.

Il existe un autre mécanisme de modulation antigénique appelé « shaving » et ce processus sera plus amplement détaillé.

4.3 Le Rituximab

Le RTX (Mabthera®, Roche ou Rituxan®, Genetech) est un anticorps chimérique monoclonal de type IgG1 et a été accepté par la « Food and Drug Administration (FDA)» en 1997. Cet anticorps anti-CD20 de type I a d'abord été approuvé pour le traitement des LNH en rechute ou réfractaires. Aujourd'hui, il est très largement utilisé dans le traitement de diverses hémopathies B, parfois en première ligne de traitement, et également pour le traitement d'autres pathologies telles que les maladies auto-immunes. Les trois mécanismes principaux aboutissant à la lyse des LB sont la CDC, l'ADCC et la mort cellulaire programmée et ils ont été démontrés *in vitro* et *in vivo*.

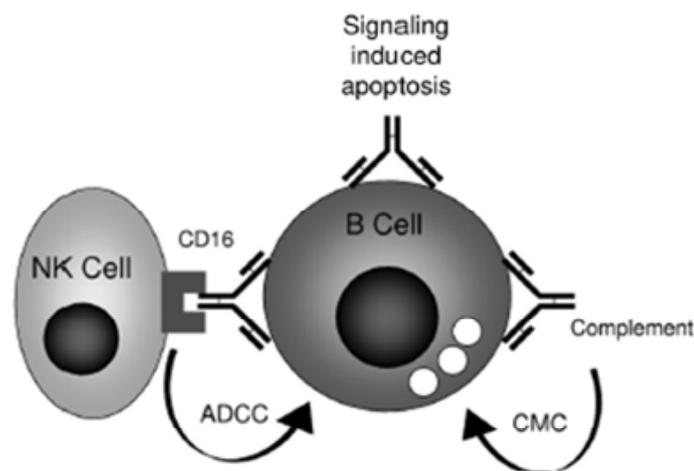


Figure 14 : Schéma simplifié des trois mécanismes principaux d'action du RTX.
Modifiée d'après Weiner, *Seminars in Hematology* 2010 ¹⁰².

4.3.1 Mécanismes d'action *in vitro*

En ce qui concerne la CDC, l'expression des molécules inhibitrices du complément (CD55 et CD59) sur les LB malins, corrèle avec la mesure de la lyse par le complément *in vitro*^{103,104}. Les cellules issues de lymphomes folliculaires sont plus sensibles que d'autres (lymphomes du manteau, lymphomes à grandes cellules) à la lyse par le RTX¹⁰⁵. La source de complément utilisée dans ces études est du sérum humain, mais ceci ne rend pas compte de l'importance du complément dans l'activité anti-tumorale du RTX *in vivo*, au niveau notamment des ganglions lymphatiques ou autres sites extra-circulatoires.

Pour l'ADCC, les modèles *in vitro* utilisent des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) comme source de cellules effectrices (notamment les NK) pour l'interaction Fc-FcR à l'origine de l'ADCC¹⁰³. Dans ces modèles, le RTX induit la lyse de lignées de lymphomes mais les conditions ne sont pas physiologiques (ratios cellules effectrices/cellules cibles, utilisation l'interleukine 2 (IL-2) pour activer les cellules effectrices). De plus, il a été montré l'importance du récepteur CD16 sur l'activation des NK et que les cytokines produites par les NK peuvent augmenter l'ADCC médiée par les autres effecteurs¹⁰².

Enfin, en l'absence de cellules effectrices, le RTX est capable d'induire, de manière variable, la mort de lignées malignes B *in vitro*¹⁰⁶. Cette voie utilisant la signalisation de CD20 nécessite un « cross-linking » du RTX et dépendrait de la réorganisation de CD20 au sein des radeaux lipidiques¹⁰⁷. Les changements qui ont pu être observés suite à la fixation du RTX incluent l'inhibition de la protéine MAP-kinase p38, de la voie de NFκB, des kinases ERK1/2 et de la voie anti-apoptotique faisant intervenir Akt¹⁰⁸. Une étude très récente décrit d'ailleurs que le RTX inhibe la cascade de signalisation du BCR et agit sur la relocalisation du BCR dans les radeaux lipidiques¹⁰⁹. D'une manière générale, ces études *in vitro* contribuent à dire que la mort induite par la signalisation, suite à la fixation du RTX, participe aux effets anti-tumoraux et est synergique avec les thérapies cytotoxiques¹¹⁰.

4.3.2 Mécanismes d'action *in vivo*

Un grand nombre de modèles murins tumoraux suggère que l'activité anti-tumorale du RTX est dépendante du complément^{98,99}. Ceci est confirmé par l'abolition de l'effet thérapeutique du RTX lorsque le complément est déplété par du venin de cobra. Mais ces modèles utilisent le RTX chez la souris, ce qui requière une interaction entre la cellule cible, une IgG humaine et le complément murin. L'utilisation d'anticorps modifiés avec une affinité

moindre pour le complément chez les rongeurs permet de diminuer la réaction liée à l'injection du RTX sans effet majeur sur l'activité anti-tumorale ¹¹¹.

A partir des études cliniques, l'observation a été faite que le complément est activé chez seulement une partie des patients et elle corrèle avec la toxicité liée à l'injection du RTX (qui se traduit chez les patients par de la fièvre, des frissons) ¹¹². De plus aucune corrélation n'a été faite entre l'expression des protéines inhibitrices du complément et la réponse clinique au RTX ¹¹³.

En ce qui concerne l'ADCC, l'importance de ce mécanisme *in vivo* a été montrée dans un modèle murin utilisant des souris KO pour la chaîne commune au FcγR. Dans ces souris, il n'y a pas d'effet du RTX contrairement à des souris sauvages ¹¹⁴. De plus, l'effet de l'anticorps est augmenté dans des souris KO pour le FcγRIIb, récepteur inhibiteur, montrant ainsi bien l'importance de l'interaction Fc-FcR dans l'activité anti-tumorale du RTX ¹¹⁵.

D'un point de vue clinique, l'évidence que l'ADCC est un mécanisme important dans la réponse au RTX provient d'études de l'association entre le polymorphisme du FcγRIIIa (CD16) et la réponse au RTX. Le CD16 homozygote pour la valine en position 158 (VV) a une meilleure affinité pour le RTX que le CD16 avec une phénylalanine à la même position (VF ou FF) ¹¹⁶. De plus les patients atteints de lymphomes folliculaires ayant le génotype VV ont une meilleure réponse au RTX que les autres génotypes ¹¹⁷.

Quant à un effet anti-tumoral direct du RTX *in vivo*, quelques études reportent de manière indirecte ce phénomène. L'injection de RTX dans le liquide cébrospinal de patients atteints de lymphomes du système nerveux central (SNC) induit des réponses anti-tumorales alors que l'on sait que le SNC est dépourvu de complément et de cellules effectrices capables d'ADCC ¹¹⁸. De plus, le RTX fonctionnerait en synergie avec les chimiothérapies dans différents types d'hémopathies B ^{119,120}. Une des hypothèses serait que la chimiothérapie rend plus sensibles les cellules tumorales à la lyse directe par le RTX ou que le RTX favoriserait la sensibilisation des cellules aux agents cytotoxiques.

Ces différents mécanismes ne sont pas indépendants et il existe des interactions *in vivo* avec des effets synergiques ou antagonistes ¹⁰². Par exemple le complément peut agir directement sur l'activation des LB et avoir un effet inhibiteur sur la fonction des NK ¹²¹. Il a été montré récemment que l'activation de ces cellules NK et l'ADCC induite par le RTX étaient inhibées par le composant du complément C3b ¹²² et que la déplétion du complément augmentait l'ADCC induite par le RTX dans un modèle murin ¹²³.

4.4 Rituximab et traitement des hémopathies B

4.4.1 Le Rituximab dans le traitement de la LLC

La LLC a surtout été traitée de manière palliative avec des agents alkylants mais ces stratégies de traitements cytotoxiques n'ont jamais apporté de résultats (concernant les taux de RC) similaires à ceux obtenus dans d'autres pathologies telles que les lymphomes agressifs. Le RTX a donc été utilisé puisque les LLC expriment CD20, seul ou en association à la chimiothérapie. Les premières études ont montré une modeste efficacité du RTX seul dans les LLC en rechute ^{124,125}, mais cette efficacité a été augmentée par la suite avec de plus fortes ou de plus nombreuses doses. Les explications possibles sont l'expression diminuée de CD20 sur les LLC ¹²⁶, l'altération des fonctions immunitaires innées ¹²⁷ et les caractéristiques pharmacocinétiques différentes comparées aux lymphomes ¹²⁸.

Le RTX a des effets synergiques avec des agents de chimiothérapie utilisés classiquement dans le traitement de la LLC et des LNH. Des études de phase II et III avec différentes combinaisons de chimiothérapie avec le RTX ont montré des progrès intéressants dans le traitement de la LLC ^{27,129,130}. Un des éléments limitant du RTX dans ce type de pathologie, est la réapparition de LB tumoraux circulants suite à de fortes concentrations de RTX dans le sang et ces LB expriment très peu CD20. Plutôt que l'internalisation de CD20, le mécanisme de « shaving » serait en cause ²⁷ et sera détaillé plus précisément.

4.4.2 Le Rituximab dans les lymphomes de haut grade

La combinaison CHOP a été pendant longtemps le traitement standard des LNH de haut grade. L'addition du RTX a permis d'augmenter le taux de réponse et la survie des patients. La première étude utilisant le RTX seul dans des lymphomes intermédiaires et de haut grade réfractaires a montré une activité importante du RTX ¹³¹. Après ces résultats encourageants, d'autres études randomisées ont été réalisées avec le RTX en combinaison à la chimiothérapie chez des patients atteints de lymphomes diffus à grandes cellules. Notons notamment une étude pivot du Groupe d'Etude des Lymphomes Adultes (GELA) comparant CHOP et R-CHOP (RTX+CHOP). Dans cette étude, l'association R-CHOP entraîne une augmentation significative de la survie globale et du nombre de réponses complètes ¹³², mais également à plus long terme, de la survie sans progression et sans maladie ¹³³. Egalement au bout de 10 ans, les patients traités par R-CHOP ont une survie globale à 43,5% versus 27,6% pour le bras

CHOP¹³⁴, laissant suggérer les bénéfices de l'association avec le RTX dans le traitement de cette pathologie.

De manière plus générale, l'inclusion du RTX en traitement de première ligne des lymphomes agressifs, a largement augmenté les taux de réponse, la progression sans maladie et la survie globale des patients atteints de lymphomes agressifs CD20⁺¹³⁵.

4.4.3 Le Rituximab dans les lymphomes indolents

Le traitement des lymphomes indolents a énormément changé avec l'introduction du RTX. Alors qu'il n'y avait pas vraiment de traitement défini de première ligne, le RTX est devenu le composant standard du traitement des lymphomes folliculaires¹³⁶ avec une survie globale augmentée¹³⁷. Les premières études ont utilisé le RTX seul et la toxicité était inférieure à celle d'une chimiothérapie simple pour une efficacité similaire¹³⁸. Ensuite, des études ont utilisé le RTX en combinaison avec la chimiothérapie. Dans les lymphomes indolents et en particulier les folliculaires, quatre grandes études ont comparé les associations RTX-chimiothérapie avec les chimiothérapies seules (R-CHOP versus CHOP, R-CVP versus CVP...) et ont montré une augmentation des RC et de la survie des patients traités avec RTX^{36,139-141}. De plus, l'utilisation du RTX en traitement de maintenance a été étudiée puisque les lymphomes folliculaires sont caractérisés par des rechutes récurrentes. Des résultats intéressants ont déjà été obtenus avec une amélioration de la progression sans maladie par ce type de maintenance¹⁴².

Quelques études se sont intéressées à l'effet du RTX dans les lymphomes du manteau en rechute^{131,143} et une étude randomisée a évalué la chimiothérapie avec et sans RTX, montrant un gain en terme de réponse globale et de RC pour le bras avec RTX¹⁴⁴.

4.5 Rituximab et autres pathologies

4.5.1 Traitement des pathologies auto-immunes

Le traitement par RTX a été largement étudié dans les pathologies auto-immunes afin d'éliminer les LB responsables de l'auto-immunité. Avec des résultats encourageants dans la thrombocytopénie immune, l'utilisation du RTX a été explorée dans d'autres pathologies telles que l'anémie hémolytique auto-immune, l'arthrite rhumatoïde et le purpura thrombocytopénique thrombotique, caractérisées par la présence d'auto-anticorps pathologiques. Malgré le manque d'études clinique randomisées, les résultats semblent suggérer un rôle bénéfique du RTX. Suite à l'injection, une déplétion rapide des LB circulants

a lieu, se traduisant par une diminution significative des auto-anticorps pathologiques circulants. Le compartiment des LT serait également modifié par ce type de traitement.

Par contre les plasmocytes à longue durée de vie, n'exprimant pas CD20, ne semblent pas être affectés par le RTX, puisque le niveau d'IgG ne diminue que très peu même après un traitement répétitif par RTX. D'un point de vue pratique, l'incidence des effets secondaires est basse mais les doses et la durée du traitement sont encore à améliorer¹⁹.

4.5.2 Implication dans le rejet humoral

Le RTX, en tant qu'anti-CD20, va dépléter les LB naïfs et les plasmoblastes et réduire de manière transitoire la production d'anticorps ; mais comme nous l'avons évoqué précédemment, il est peu efficace pour les plasmocytes à longue durée de vie qui n'expriment pas CD20. Une première étude dans le rejet aigu de greffe de rein a montré la faisabilité et la non-toxicité d'une association entre RTX et traitements classiques¹⁴⁵. D'autres études reportent que le RTX tue les LB CD20⁺ circulants et intra-greffon et que ce traitement permet de résoudre de manière efficace le rejet rénal cellulaire aigu¹⁴⁶, et de manière partiellement efficace le rejet chronique. Quelques complications infectieuses sont à noter et la dose de RTX utilisée (basée sur celle des lymphomes) devrait peut-être être adaptée pour ce type de pathologie. De plus, très peu d'études reportent la repopulation des différentes sous-populations B circulantes après traitement par RTX dans le rejet humoral¹⁴⁷.

4.5.3 Traitement de la GvHD

Le rôle des LB dans la GvHD a longtemps été négligé par rapport à celui des LT et est encore mal connu à ce jour. Des expériences chez la souris ont montré que la déplétion des LB de la souris donneuse engendrait une incidence moindre de GvHD aiguë¹⁴⁸.

Des patients atteints de GvHD aiguë et réfractaires aux traitements classiques ont été traités par RTX avec succès¹⁴⁹ et une réponse complète a été observée pour les 3/3 patients. De plus des études récentes montrent également que la déplétion des LB par le RTX est efficace en prévention de la GvHD aiguë^{150,151}. Concernant la GvHD chronique, elle est associée à une homéostasie perturbée des LB et les greffons riches en LB corrélaient avec un risque accru de GvHD pour le patient¹⁵². Le traitement de cette pathologie par le RTX a été montré comme efficace dans plusieurs cas et dans quelques petites études cliniques¹⁵³.

4.6 Résistances au traitement par Rituximab

Le traitement par RTX ne tue pas toutes les cellules B malignes et après un certain temps, les cellules ayant survécu semblent être résistantes aux thérapies suivantes par RTX, alors que dans la plupart des cas, ces cellules expriment toujours CD20¹⁵⁴. Différents mécanismes de résistances au RTX sont évoqués : réduction de l'efficacité de l'ADCC ou de la CDC, facteurs protecteurs du microenvironnement tumoral ; et le RTX ne va pas avoir la même efficacité selon que les cellules tumorales sont dans le sang périphérique ou dans les tissus (ganglions, rate). De plus, certaines cellules résistantes n'expriment plus CD20, soit de manière définitive soit de manière temporaire (phénomène de « shaving », mutations, modifications épigénétiques...).

4.6.1 Résistances liées aux mécanismes de cytotoxicité

La cytotoxicité induite par le RTX est dépendante des mécanismes immunitaires. Elle est initiée par la reconnaissance du complexe RTX/CD20/LB par les FcγR des cellules effectrices (NK et macrophages) à l'origine de l'ADCC, et par le composant C1q du complément à l'origine de la CDC. Suite à la reconnaissance par le C1q, la voie classique du complément est activée et se traduit par le dépôt de fragments C3 sur la cellule B, lié à la pénétration dans la membrane cellulaire des complexes MAC¹⁵⁵. Il a été montré dans la LLC, où les niveaux d'expression de CD20 sont faibles, que les cellules circulantes ne sont pas tuées par le RTX mais sont recouvertes de fragments C3¹⁵⁶ et que des cellules effectrices ont des récepteurs permettant de reconnaître les cellules recouvertes et ainsi induire leur mort¹⁵⁷. D'autre part, il a été montré que le dépôt de fragments C3 pouvait interférer avec la reconnaissance de la partie Fc du complexe RTX/CD20/LB par le CD16 du NK (blocage de l'accès) et ainsi inhiber la réaction d'ADCC¹²². Il est donc très important de bien connaître les effets cytotoxiques du RTX dans les différents compartiments (sang versus tumeur) afin d'améliorer le traitement de ces différentes pathologies, notamment avec les nouveaux anticorps anti-CD20. Il ne faut pas non plus négliger le rôle fondamental des cellules effectrices du système immunitaire dans l'efficacité du traitement par RTX et qui vont pouvoir être « dépassées » à un certain moment par le nombre de complexes LB/RTX.

4.6.1.1 Réduction de l'ADCC

Il a été reporté dans la littérature que le mécanisme d'ADCC pouvait être saturé. En effet les cellules NK, principales médiatrices de l'ADCC, ne vont pas pouvoir tuer toutes les cellules B recouvertes de RTX. Une cellule NK pourrait tuer, au mieux, quatre complexes LB/RTX¹⁵⁸. De plus la fixation du CD16 (FcγRIIIa) sur les LB opsonisés par le RTX va entraîner une internalisation des complexes avec le CD16, qui ne sera ainsi plus disponible à la surface du NK pour tuer d'autres LB¹⁵⁹. Une étude *in vivo* a même montré qu'après ADCC par le NK, la réexpression du CD16 à la surface et la restauration de la cytotoxicité requièrent au minimum 24 heures¹⁶⁰. De plus un autre mécanisme à l'origine d'une diminution de l'ADCC est la présence d'un polymorphisme pour le FcγRIIIa. Comme détaillé précédemment, les patients hétérozygotes (valine en position 158) ont un récepteur CD16 de moins bonne affinité et donc ont une réponse de type ADCC moins efficace que les homozygotes¹¹⁷. Enfin le dépôt de fragments C3 du complément, évoqué juste avant, est également à l'origine d'une ADCC réduite¹²².

4.6.1.2 Réduction de la CDC

Le système de cytotoxicité par le complément peut lui aussi être saturé suite au traitement par RTX. Par exemple dans la LLC, où la densité de LB tumoraux peut être très élevée dans le sang, l'activité du complément est déplétée dans le sérum suite à l'injection¹⁵⁶ et malgré que les cellules soient saturées par le RTX (en injectant des doses importantes), la CDC est inefficace. Chez un patient atteint de LLC ayant une densité de cellules tumorales circulantes moyenne, le titre du complément n'a été restauré qu'une semaine plus tard suivant l'injection et après la deuxième cure de RTX (dans un traitement de 4 cures à une semaine d'intervalle), le titre est resté bas jusqu'à plus d'un mois après. Ceci a été observé chez d'autres patients et le temps de restauration du titre de complément reste variable selon les patients. Une alternative à ce problème serait l'injection de plasma fraîchement décongelé comme source de complément pour augmenter la CDC induite par le RTX¹⁶¹.

Un autre mécanisme induisant une résistance à la CDC est l'augmentation de l'expression, à la surface de la cellule, de protéines inhibitrices du complément (CD55 et CD59)¹⁶². Le blocage de ces protéines, notamment par des anticorps neutralisants, a montré une meilleure activité anti-tumorale du RTX¹⁶³.

4.6.2 Modulation de l'expression de CD20

4.6.2.1 Mécanisme de « shaving »

De fortes concentrations de cellules B opsonisées par le RTX peuvent saturer les mécanismes effecteurs, telles que l'ADCC et la CDC, comme nous venons de le décrire. Les complexes LB/RTX vont ainsi être soumis à un processus alternatif : la réaction de « shaving » qui signifie littéralement rasage. Ce phénomène a d'abord été décrit dans d'autres systèmes en tant que modulation antigénique ¹⁶⁴. Au cours de ce processus, le RTX et la molécule CD20 sont « enlevés » de la cellule sans que celle-ci ne soit tuée ; cette réaction est médiée par des FcγR présents sur des cellules effectrices ¹⁶⁵. Ce processus ressemble au phénomène de trogocytose, qui a été documenté pour les LB, les LT, les neutrophiles et les NK ¹⁶⁶.

Les macrophages pourraient réaliser à la fois de la phagocytose des LB tumoraux et à la fois, grâce à leur FcγRI, du shaving de complexes RTX/CD20. Les LB ainsi non tués n'expriment plus CD20 et ne seront donc plus la cible du RTX ¹⁶⁷.

Certains auteurs suggèrent que dans le cas de LLC avec une forte densité de cellules tumorales circulantes, la première infusion de RTX (30 mg) va saturer les capacités de phagocytose, d'ADCC par les NK et voir, dans de nombreux cas, celles du complément. Certaines cellules tumorales vont être tuées, d'autres cellules de LLC vont venir dans la circulation depuis d'autres compartiments, vont être opsonisées par le RTX mais les mécanismes effecteurs saturés ne sont pas en mesure de tuer ces cellules. Ainsi les macrophages et les monocytes, via le FcγRI, vont reconnaître ces cellules et seront en mesure d'effectuer le shaving. Ces cellules vont pouvoir proliférer avant que CD20 ne soit ré-exprimé à la surface et passer outre le traitement par anti-CD20 ¹⁶⁸. Ainsi il peut être intéressant, notamment dans la LLC, de traiter les patients avec de plus faibles doses de RTX mais plus souvent ¹⁶⁹.

4.6.2.2 Mutations du gène CD20

Il a également été observé, chez certains patients, une perte permanente de l'expression de CD20 après traitement par RTX, notamment dans les tumeurs de patients atteints de lymphomes B. Cette perte pourrait être due à la prolifération d'un clone CD20 négatif (obtenu suite à une mutation par exemple) ¹⁷⁰. Les mutations peuvent en effet expliquer la perte d'expression de CD20 et ainsi la non-efficacité du RTX. Des travaux récents ont montré la présence de mutations du gène CD20 à différentes localisations (délétions C-terminales,

mutations au niveau transmembranaire...). Il serait ainsi possible que les mutations au niveau de la partie codant pour la région C-terminale de la protéine CD20 soient associées à la rechute et/ou résistance des patients au RTX ¹⁷¹. Malheureusement, une autre étude portant sur une cohorte de patients atteints de lymphomes diffus à grandes cellules (264 biopsies au diagnostic et 15 à la rechute), n'a pas montré de corrélation entre la présence de mutations au niveau de l'épitope de reconnaissance du RTX et la rechute ¹⁷².

4.6.2.3 Mécanismes épigénétiques

Une autre explication à la perte de l'expression de CD20 pourrait être due à des phénomènes épigénétiques. En effet une équipe a montré que le traitement de cellules CD20 négatives d'un patient par un agent modulant l'acétylation des histones (Trichostatin A), restaurait à la fois l'ARNm et l'expression à la surface de CD20 ¹⁷³. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude utilisant cette fois-ci un agent déméthylant (le 5-aza-2'-deoxycytidine) pour le traitement de cellules de patients toujours CD20 négatives *in vitro* ¹⁷⁴; laissant suggérer une implication partielle de mécanismes épigénétiques dans les résistances au RTX.

Ainsi, des études préliminaires portent sur l'association entre le RTX et des drogues modulant l'épigénétique, telles que les inhibiteurs d'histones désacétylases (HDAC), afin d'améliorer le traitement des patients résistants. Une première étude a ainsi montré *in vitro* et *in vivo* le bénéfice d'une telle association qui se traduit par une augmentation de l'apoptose induite par le RTX ¹⁷⁵. Une seconde étude plus récente montre que l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC, en augmentant l'expression de CD20, va augmenter l'activité CDC du RTX *in vitro* ¹⁷⁶.

4.6.2.4 Implication du protéasome

Des travaux de l'équipe de Czuczman laissaient suggérer des mécanismes à la fois pré-transcriptionnels et post-transcriptionnels à l'origine d'une modulation de l'expression de CD20 suite au traitement par RTX. Ils ont ainsi pu montrer que le système ubiquitine-protéasome était en partie impliqué dans les mécanismes de résistance au RTX, avec une dégradation partielle de la protéine CD20 en C terminal. Grâce à des inhibiteurs du protéasome, l'expression de CD20 a pu être augmentée avec pour conséquence une restauration partielle de la CDC ¹⁷⁷.

Malheureusement, des études plus récentes montrent que l'expression de CD20 est en fait régulée par deux systèmes de dégradation : le système ubiquitine-protéasome et le système lysosome/autophagosome et que l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome, tels que le Bortezomib, n'a pas l'effet escompté sur les résistances au RTX^{178,179}. Le Bortezomib est pourtant utilisé dans le traitement de diverses hémopathies B en association avec le RTX et d'autres molécules^{180,181}.

4.6.3 Influence du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral (ou stroma) peut également apporter une protection contre l'activité anti-tumorale du RTX au sein des tissus. C'est un mécanisme dominant de résistance au RTX¹⁸² et cibler cet élément peut s'envisager comme une stratégie thérapeutique d'intérêt dans le traitement des hémopathies B matures¹⁸³.

4.7 Effets indésirables du traitement par Rituximab

En plus de l'effet immédiat lié à l'injection du RTX assez fréquemment observé chez certains patients (fièvre, frissons, rash cutané...), des conséquences de l'utilisation du RTX à plus long terme existent. Nous parlerons principalement de la neutropénie¹⁸⁴ et des infections associées au RTX¹⁸⁵.

4.7.1 Neutropénie

La neutropénie associée au RTX arrive souvent plusieurs mois après l'administration de l'anti-CD20. Cette neutropénie dite « tardive » est encore mal connue et plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cet effet du RTX.

De nombreuses équipes ont reporté cette neutropénie¹⁸⁶⁻¹⁸⁹ et il est difficile de conclure quant à l'incidence de cet effet indésirable, notamment à cause des différents traitements associés au RTX. Les différentes hypothèses mécanistiques qui pourraient expliquer cette pathologie sont :

- la production d'anticorps anti-neutrophiles
- la suppression des neutrophiles par les lymphocytes granulaires larges (LGL)¹⁹⁰
- plus récemment, la perturbation de l'homéostasie des granulocytes médiée par une interaction complexe entre les LB et une chémokine : SDF-1¹⁸⁴.

La chémokine SDF-1 (ou CXCL12) a un rôle central à la fois dans la sortie des neutrophiles de la moelle osseuse et dans la lymphopoïèse B précoce. La sortie des neutrophiles est régulée par l'interaction entre SDF-1 produite par les cellules stromales et son récepteur CXCR4 présent à la surface des cellules hématopoïétiques¹⁹¹. Au niveau de la lymphopoïèse B, SDF-1 initierait la division et la migration de la lignée B¹⁹². Ces observations suggèrent que les concentrations de SDF-1 peuvent être perturbées par la rapide déplétion des LB par le RTX, ce qui causerait la sortie excessive des neutrophiles de la moelle osseuse¹⁸⁴.

4.7.2 Infections

Le RTX pourrait induire un risque augmenté d'infections, même si, comme pour la neutropénie, il est difficile de quantifier ce risque, à cause des facteurs et autres traitements associés au RTX (immunosuppresseurs, chimiothérapie...).

Comme nous l'avons déjà précisé, le RTX n'induit pas de diminution du niveau d'Ig puisqu'il ne tue pas les plasmocytes qui n'expriment pas CD20. Le traitement par RTX devrait donc avoir un impact faible sur le risque de survenue de complications infectieuses. Malgré cela, des infections à la suite du traitement par RTX ont été observées, suggérant une complexité de la réponse immune, et l'effet spécifique du RTX dans ces infections reste éluéif¹⁸⁵.

Différentes infections ont été clairement associées au RTX : ce sont les infections globales¹⁹³, la réactivation du virus de l'hépatite B^{194,195} et des leuco-encéphalopathies multifocales progressives¹⁹⁶.

Dans le cas de la réactivation du virus de l'hépatite B, cela se produit suite à la chimiothérapie utilisée dans le traitement des hémopathies B. Les conséquences de cette réactivation sont des hépatites aiguës et des défaillances hépatiques fulminantes¹⁹⁷. Cette complication est augmentée lorsque le RTX est associé à la chimiothérapie¹⁹⁸⁻²⁰⁰.

Le risque d'infections associées au traitement par RTX est possiblement augmenté pour les pneumonies à *Pneumocystis jirovecii*^{201,202}, les encéphalites à entérovirus^{203,204}, les pathologies liées aux CMV²⁰⁵...

4.8 Les nouveaux anticorps anti-CD20

Le RTX peut être considéré comme le représentant des anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-CD20 de première génération de type I contrairement au tositumomab, anticorps murin, représentant des anticorps de type II. Différents anticorps sont aujourd'hui développés et seront dits de seconde ou de troisième génération ⁷⁴ et sont répertoriés dans le tableau 1.

4.8.1 Les anticorps de seconde génération

Les anticorps de seconde génération sont de type IgG1, humanisés ou totalement humains. Malgré que les anticorps anti-anticorps chimériques contre le RTX soient rarement retrouvés chez des patients, les anti-CD20 humanisés peuvent prévenir un tel phénomène.

4.8.1.1 Ofatumumab (Arzerra, *Genmab*)

Cet anticorps anti-CD20 est entièrement humain. C'est un anticorps de type I généré à partir de souris transgéniques pour les Ig humaines. Cet anticorps reconnaît un épitope différent de celui du RTX : l'ofatumumab reconnaît la petite boucle de CD20 localisée à proximité de la membrane. Cet anticorps est plus efficace en terme d'activation du complément ²⁰⁶ et d'activation de l'ADCC médiée par les NK et ce pour les deux allotypes du FcγRIIIa. Les premières études ont montré la faisabilité de l'utilisation de cet anticorps ainsi que des réponses intéressantes au traitement, dans la LLC réfractaire ou en rechute ²⁰⁷ et dans les lymphomes folliculaires réfractaires et en rechute, préalablement traités par RTX ²⁰⁸.

4.8.1.2 Veltuzumab (hA20, IMMU-106, *Immunomedics*)

Cet anticorps de type I est un anticorps monoclonal anti-CD20 de type IgG1 humanisé. Comparé au RTX, un seul acide aminé diffère dans la région CDR3-V_H, ce qui augmente son activité anti-tumorale *in vitro* ⁴². Ces mécanismes d'action sont similaires à ceux du RTX ^{209,210}. La première étude utilisant cet anticorps a montré l'absence de toxicité importante et des résultats efficaces chez des patients atteints de LNH, ceci avec des doses d'anticorps faibles. Des études de phase I/II ont ensuite montré des résultats intéressants chez des patients atteints de LNH avec un taux de réponse globale à 44% ²¹¹. Par contre dans la LLC, il semblerait que les doses soient à optimiser pour atteindre les objectifs ⁷⁴.

4.8.1.3 Ocrelizumab (PRO70769, rhuH27, *Genentech /Roche /Biogen Idec*)

Cet anticorps est dérivé de l'anti-CD20 murin 2H7 qui a été humanisé par différentes techniques de recombinaison. C'est un isotype IgG1 et il est classé dans les anticorps de type I. Comparé au RTX, il reconnaît un épitope différent mais englobant l'épitope du RTX sur la large boucle extracellulaire de CD20, et l'ocrelizumab montre une ADCC bien supérieure à celle du RTX et une CDC inférieure. Le traitement par ce nouvel anticorps montre également moins de réaction à l'injection qu'avec le RTX, probablement due à la diminution de la CDC ²¹². Dans une étude de phase I/II, avec des patients ayant des lymphomes folliculaires en rechute ou réfractaires et prétraités par RTX, le traitement par ocrelizumab est bien toléré et le taux de réponse est de 36% ²¹².

4.8.2 Les anticorps de troisième génération

Les anticorps de troisième génération sont des IgG humanisées et ont leur région Fc modifiée pour une meilleure performance de ces anticorps dans l'activation des différentes fonctions effectrices.

4.8.2.1 PRO131921 (*Genentech*)

La modification de l'ocrelizumab résulte en la génération d'un anticorps avec une affinité meilleure pour le FcγRIIIa et ainsi une meilleure ADCC. Cette nouvelle version, appelée PRO131921, a été testée dans une étude de phase I/II chez des patients atteints de LNH indolents en rechute ou réfractaires et les premiers résultats montrent une assez bonne tolérance et une efficacité clinique chez ces patients prétraités par RTX ⁷⁴.

4.8.2.2 AME-133 (LY2469298, *Applied Molecular Evolution*)

Cet anticorps de type I est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1. La sélection des CDR de cet anticorps est basée sur l'augmentation de l'affinité pour CD20 par une procédure de mutagenèse. De plus la région Fc a été modifiée pour augmenter l'affinité pour le FcγRIIIa et ainsi une ADCC augmentée, comparée à celle du RTX ²¹³. L'efficacité clinique de cet anticorps est en cours dans une étude de phase I/II dans le traitement des LNH.

4.8.2.3 GA101 (RO5072759, Glycart Biotechnology /Genentech /Hoffmann-La Roche /Biogen Idec /Chugai Pharmaceutical)

Cet anticorps anti-CD20 est humanisé et contrairement aux autres anticorps de nouvelle génération, c'est un anticorps de type II. Cet anticorps a été optimisé pour une meilleure possibilité d'induction de l'apoptose et pour une meilleure affinité pour les FcγRIII humains. Cette affinité est en effet environ 50 fois meilleure, ceci grâce à la modification de la région Fc par glycosylation (plus précisément par α fucosylation) ²¹⁴.

In vitro, le GA101 montre une activité antiproliférative supérieure à celle du RTX, dans différentes lignées de lymphomes du manteau par une voie non-apoptotique. Une lyse directe est évoquée avec adhésion homotypique et médiation par des lysosomes. Ceci doit être dû aux propriétés de fixation différentes entre les deux anticorps, le GA101 se liant de manière plus large sur CD20, les signaux cellulaires en aval peuvent être différents ⁷⁴.

De plus, le GA101 est meilleur que le RTX en terme de déplétion des cellules B par cytotoxicité directe ou faisant appel à des cellules effectrices et ce, dans des essais cellulaires et des essais de déplétion sur sang total. Dans de modèles de xénogreffes murines de lymphomes, le GA101 montre une meilleure activité anti-tumorale et chez des primates non-humains, il montre également une meilleure déplétion des LB dans les tissus lymphoïdes (ganglions, rate) ²¹⁴. Les résultats de la première étude de faisabilité du GA101 chez des patients atteints de LNH difficiles à traiter montrent des résultats prometteurs et un traitement assez bien toléré ²¹⁵. En attendant confirmation par les études de phase II, ces premiers résultats laissent présager l'utilisation du GA101 comme nouvel anticorps thérapeutique dans les pathologies B.

4.8.2.4 EMAB-6 et LFB-R603 (LFB)

Deux autres anticorps anti-CD20 ont été développés par le LFB et sélectionnés pour leur capacité à activer de manière importante les NK par le FcγRIII.

Le premier anticorps appelé EMAB-6 est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 et a été sélectionné *in vitro* pour sa glycosylation particulière. Il contient en effet peu de résidus fucose et galactose dans sa partie Fc, comparé au RTX. Cet anticorps comporte une affinité accrue pour le FcγRIII et ainsi l'ADCC médiée par les NK et les macrophages est augmentée, ceci a été montré à partir de prélèvements de patients atteints de LLC ²¹⁶.

Le deuxième anticorps appelé LFB-R603 est également un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 et c'est en fait la « version améliorée » du EMAB-6. Cet anticorps comporte donc un profil de glycosylation particulier à l'origine d'une meilleure affinité pour le FcγRIII et ainsi une ADCC accrue ²¹⁷. En effet, pour des concentrations moindres, le LFB-R603 est plus efficace que le RTX *ex-vivo*. Cet anticorps a été approuvé par la FDA en 2010 pour le traitement de la LLC et est actuellement en phase I/II d'étude clinique en Europe pour la même pathologie.

Antibody (generation)	Antibody Specificity			Activity (compared to rituximab)			Additional Features (compared to rituximab)	Clinical Trials*	References
	Type	Isotype	CDR	CDC	ADCC	Apoptosis			
Tositumomab (1st)	II	IgG2A	Murine	-	=	++	Bound to radioisotopes	Bound to radioisotopes: NHL	9, 73, 75
Ofatumumab (2nd)	I	IgG1	Human	+++	=	=	- Binds the small extracellular part of CD20 - Completely human - Slower off-rate	Phase I/II: RA, FL, CLL, WM, RRMS Phase III: CLL, FL, DLBCL	10, 76-83
Ocrelizumab (2nd)	I	IgG1	Humanized	=	=/+	=	Binds a different but overlapping epitope compared to rituximab	Phase I, II, III: RA NHL Phase III: SLE Phase II: RRMS	69, 91, 92
Veltuzumab (2nd)	I	IgG1	Humanized	=/+	=	=	Slower off-rate	Phase I/II: CLL, NHL, ITP	84-90
PRO131921 (3rd)	I	IgG1	Humanized	=	++	=	Enhanced affinity for FcγRII	Phase I/II: CLL, NHL	93, 94
AME-133 (3rd)	I	IgG1	Humanized	=	+	=	Enhanced affinity for CD20	Phase I/II: NHL	95, 96
GA101 (3rd)	II	IgG1	Humanized	-	+++	+++	- High affinity for FcγRII - Strong induction of apoptosis	Phase I/II: NHL	99-112

Abbreviations: CDR, complementary-determining regions; IgG, immunoglobulin; CDC, complement-dependent cytotoxicity; ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; RA, rheumatoid arthritis; FL, follicular lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; RRMS, relapsing remitting multiple sclerosis; WM, Waldenström's macroglobulinemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; SLE, systemic lupus erythematosus; ITP, idiopathic autoimmune thrombocytopenic purpura; NHL, non-Hodgkin lymphoma.
*Reference: www.clinicaltrials.gov.

Tableau 3 : Anticorps anti-CD20 de seconde et troisième génération.

D'après van Meerten T. and Hagenbeek A., *Seminars in Hematology* 2010 ⁷⁴.

Les nouveaux anticorps anti-CD20 sont référencés ici selon leur génération et la spécificité de l'anticorps. L'activité de ces anticorps est comparée à celle du RTX et ce au niveau de la CDC, de l'ADCC et de l'apoptose. De plus, les études cliniques concernant ces anticorps sont référencées. Seul l'anticorps LFB-R603 ne figure pas dans cette revue.

Chapitre II : utilisation du modèle CD20/Rituximab en thérapie génique

1 La thérapie génique

1.1 Généralités

La thérapie génique consiste en l'introduction d'un nouveau matériel génétique dans une cellule afin de modifier son phénotype et/ou sa fonction.

La première étude clinique avec des cellules génétiquement modifiées (CGM) a été menée en 1989 par Rosenberg *et al.*, où un gène de résistance à la néomycine a été inséré dans des LT humains infiltrant la tumeur (TIL) de patients atteints de mélanomes métastatiques, ceci afin de « traquer » ces TIL après leur réinjection ²¹⁸. Ensuite, d'autres études ont été menées dans de nombreuses pathologies afin de palier à la mutation d'un gène ou à des gènes manquants à l'origine de ces pathologies (immunodéficience sévère combinée liée à l'X ²¹⁹ ou liée à une déficience en adénosine désaminase ²²⁰, hémophilie...).

La thérapie génique permet donc le traitement de maladies d'origine génétique mais également est utilisée dans d'autres pathologies telles que les cancers ou encore les infections virales. Par exemple, des LT spécifiques d'un antigène (tumoral ou viral) modifiés par transfert de gène pour un nouveau récepteur (TCR), augmentant ainsi la réponse immunitaire contre les cellules tumorales ²²¹ ou les infections virales ²²², ont été utilisés (*cf.* chapitre IV).

Une autre application intéressante de la thérapie génique est l'introduction d'un gène dit « suicide » dans les LT d'un donneur dans le cadre d'une greffe de CSH, ceci afin de conserver les effets bénéfiques de ces LT allogéniques (l'effet anti-tumoral notamment) mais d'éliminer ces cellules dans le cadre d'effets délétères tels que la GvHD ²²³.

Dans notre laboratoire, une étude de phase I/II de thérapie génique dans le contexte de la greffe de CSH allogénique avait été initiée (étude TKO), utilisant le système HSV-tk ²²⁴.

1.2 Le système HSV-tk/GCV

Le système de gène suicide utilisant la thymidine kinase du virus Herpès Simplex (HSV-tk) est le plus efficace des systèmes et a été très largement utilisé dans les études cliniques ^{225,226}. Grâce à ce système, les cellules modifiées avec ce gène pourront être éradiquées spécifiquement par ajout de ganciclovir (GCV). Cette pro-drogue est un analogue de la thymidine qui va être phosphorylé par HSV-tk pour donner un métabolite toxique pour

la cellule. Les résultats des études cliniques ayant utilisé ce système ont montré que la GvHD pouvait être efficacement traitée par cette méthode.

Malgré cette efficacité, ce système a montré ses limites. Tout d'abord, la réactivation du cytomégalovirus (CMV) qui apparaît lors de greffe de CSH allogénique, est traitée par GCV ²²⁷ et dans ce cas, les CGM seront éliminées rapidement. De plus, lorsque les patients ont retrouvé une immunocompétence après greffe, des réponses immunes contre les LT exprimant HSV-tk ont été observées ²²⁸. Ces LT peuvent également être résistants au traitement par GCV, ceci suite à l'apparition d'une forme tronquée non fonctionnelle du gène HSV-tk ²²⁹. Enfin le GCV cible uniquement les cellules en cours de division.

Un des facteurs importants dans l'amélioration du système gène-suicide est le fait de pouvoir sélectionner/purifier les CGM avant de les administrer au patient et ainsi d'assurer le contrôle des cellules injectées. Dans cette optique, des gènes de sélection étaient associés au gène HSV-tk tels que le gène de résistance à la néomycine. Mais ce gène de sélection a lui aussi montré ses limites, puisque les cellules étaient sélectionnées par ajout d'antibiotique pendant 12 jours de culture *ex-vivo*, ce qui s'est traduit par la suite, par une toxicité et une perte d'allo-réactivité anti-EBV des cellules réinjectées au patient ²³⁰. Ainsi les gènes de sélection permettant un tri immuno-magnétique des cellules sont favorisés aujourd'hui. Depuis le système HSV-tk, plusieurs systèmes ont été étudiés et au laboratoire, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au système CD20/RTX.

1.3 Les systèmes utilisant des molécules pro-apoptotiques

D'autres systèmes précliniques ont été développés, utilisant notamment des molécules pro-apoptotiques telles que Fas et la caspase 9. Dans ce type de système, le gène de Fas ou de la caspase 9 est fusionné à celui d'un variant de la protéine FKBP (pour FK506 binding protein). L'ajout d'un agent chimique spécifique va induire la dimérisation des deux molécules, activant ainsi la voie de la mort par apoptose et permettant de tuer spécifiquement les LT transduits en cas de GvHD ²³¹.

L'équipe de Tim Clackson a utilisé le système Fas et a développé une drogue spécifique permettant la dimérisation appelée AP1903 ²³². Les auteurs ont ainsi pu montrer que le système Fas/AP1903 répondait à leurs attentes : une expression fonctionnelle dans les LT, une grande pureté des CGM, une stabilité du transgène et une bonne efficacité d'élimination des cellules avec de faibles concentrations de drogue. Mais la molécule Fas est la cible de

nombreux inhibiteurs de l'apoptose, tels que Bcl-2 et Bcl-XL souvent surexprimés au cours de la transformation maligne, et ainsi l'utilisation de cette molécule a montré ces limites ²³³.

Une autre équipe a ainsi proposé l'utilisation de la caspase 9 fusionnée à FKBP et a montré la fonctionnalité d'un tel système, tout en s'affranchissant des inconvénients du système Fas ²³³.

Dans le cas de ces deux systèmes (Fas et caspase 9), même si les drogues utilisées (AP1903 et AP20187) ont été testées et se sont avérées non toxiques, ces systèmes de lyse médiée par une dimérisation n'ont pas été utilisés dans des études cliniques ²²³. De plus ce type de système nécessite d'avoir en plus un gène de sélection, afin de purifier les CGM *in vitro* par tri immuno-magnétique notamment.

1.4 Le système CD20/Rituximab

Le système CD20/RTX comporte de nombreux avantages. Tout d'abord la molécule CD20 présente à la surface de LB est une molécule humaine ne déclenchant pas de réponse immune. Ensuite cette molécule membranaire, normalement non exprimée par les lymphocytes T, va permettre la sélection des CGM par un tri immuno-magnétique (qui existe en grade clinique) et ainsi éviter une trop longue période de culture *ex-vivo*, délétère pour la fonctionnalité des LT. Enfin et surtout, la molécule CD20 est la cible du traitement par RTX et de ce fait, un seul gène est utilisé à la fois comme gène de sélection et comme gène suicide ^{234,235}. De plus le RTX est actif sur toutes les cellules exprimant la molécule CD20, même les cellules qui ne sont pas en division.

Le meilleur moyen pour effectuer le transfert du gène CD20 est l'utilisation de vecteurs rétroviraux ou lentiviraux contenant ce gène (séquence codante) et les vecteurs généralement utilisés sont basés sur le virus de la leucémie murine de Moloney (MLV). Des études précliniques ont été réalisées avec ce type de vecteur et ont montré que les LT génétiquement modifiés pouvaient être sélectionnés de manière immuno-magnétiques et étaient ciblés par le RTX de manière efficace ²³⁶.

Une des complications théoriques de l'utilisation de ce système CD20/RTX, est l'immunodéficience induite puisque si le RTX est utilisé chez les patients, en cas de GvHD, toutes les cellules B (normales et génétiquement modifiées) de ce patient seront éradiquées. En général, la déplétion des LB n'induit pas de diminution des Ig dans le sérum des patients puisque les plasmocytes sécrétant les Ig n'expriment pas CD20, ce qui est en faveur de

l'utilisation du système CD20/RTX. De plus l'élimination des LB conjointement aux LT responsables de la GvHD peut avoir un effet positif sur le traitement de cette maladie^{237,238}.

Dans le cadre de l'utilisation de CD20 en thérapie génique, nous nous sommes intéressés à une population de LT CD3⁺CD20⁺ décrite dans la littérature²³⁹, afin d'évaluer l'impact de cette population sur l'approche de gène suicide.

2 Les lymphocytes T CD3⁺CD20⁺

L'expression de CD20 est normalement restreinte aux LB, mais une population de LT CD3⁺ exprimant cet antigène, a été décrite. Ceci a été montré pour la première fois en 1993 à partir de sang périphérique de donneurs sains, puis quelques cas de leucémies T CD20⁺ ont été reportés.

2.1 Chez les donneurs sains

Chez les donneurs sains, différents anticorps anti-CD20 ont été utilisés pour mettre en évidence la molécule CD20 à la surface des LT par technique de cytométrie en flux. Cette population exprime faiblement CD20 (on parle de CD20 low ou dim), contrairement aux LB qui ont une expression forte de CD20 (CD20 bright).

Ces LT CD3⁺CD20⁺ représentent environ 2,4±1,5% des lymphocytes du sang périphérique (PBL). Des expériences de blocage ont montré la spécificité de ce marquage CD20²³⁹. Une autre étude a ensuite confirmé qu'une telle population existait, et que ces cellules avaient une capacité diminuée à fixer les anticorps par rapport aux LB. De plus cette population augmenterait avec l'âge des patients et aurait un phénotype mémoire cytotoxique²⁴⁰.

2.2 En pathologie

Un cas de lymphome T CD20⁺ a été décrit en 1994 et selon les auteurs, cette lymphoprolifération serait bien dérivée d'une population T CD20⁺ saine et pas d'une modification de phénotype liée à la lymphogenèse.

Quelques autres pathologies de ce type ont été retrouvées par la suite mais restent très rares. En 2000, seulement 15 cas avaient été reportés et généralement l'expression (faible) de

CD20 était déterminée par immuno-histochimie ou cytométrie en flux. Les morphologies de ces pathologies peuvent être différentes : diffuse à grandes cellules, LAL ou encore LLC²⁴¹⁻²⁴⁴. Depuis peu d'études se sont intéressées à cette population T CD3⁺CD20⁺ saine et/ou pathologique. En 2009, l'équipe de Roland Jacobs s'est intéressée à cette population dans le cadre du traitement de l'arthrite rhumatoïde par RTX²⁴⁵. Les auteurs ont montré que la fréquence de cette population était de 1,6% (0,1-6,8%) des LT CD3⁺ totaux dans le sang périphérique de donneurs sains et que cette fréquence n'était pas augmentée chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde. De plus cette population est retrouvée à la même fréquence dans différents tissus ou organes (ganglions, thymus et foie) et est plus importante (5,3±1,6%) dans le liquide synovial issu de patients. De plus l'expression de CD20 dans ces LT a été vérifiée par quantification de l'ARNm de CD20 par PCR quantitative à partir de cellules triées.

Chapitre III : épissage alternatif et cancer

1 ARN messenger et épissage constitutif

1.1 Généralités

Chez les eucaryotes, l'ARN messenger (ARNm) est synthétisé par transcription de l'ADN génomique grâce l'ARN polymérase II. Dans une première étape, il résulte de cette transcription une molécule appelée ARN pré-messenger (pré-ARNm) correspondant à une copie simple-brin de l'ADN. Ce pré-ARNm subit différentes transformations dans le noyau avant de devenir une molécule plus petite qui est l'ARNm, laquelle est exportée dans le cytosol pour la traduction en protéine. Cette maturation consiste en l'acquisition d'une coiffe en 5', l'addition d'une queue poly(A) en 3', et l'excision d'une ou plusieurs parties du pré-ARNm et raboutage des autres parties les unes à la suite des autres (phénomène appelé épissage). Ces événements sont co-transcriptionnels^{246,247}.

À part quelques exceptions, les gènes de mammifères sont constitués de séquences interrompues traduites, appelées « exons », qui sont entrecoupées de séquences non traduites appelées introns. Ces derniers sont excisés du pré-ARNm afin que les exons puissent être raboutés les uns à la suite des autres afin de former l'ARNm : c'est l'épissage.

Tous les exons ne servent pas à la traduction en protéine. En effet, il existe des séquences appelées UTR (UnTranslated Region), situées en 5' avant le codon initiateur de la traduction et situées en 3' après le codon de terminaison de la traduction et qui sont constituées d'un ou plusieurs exons sur l'ARNm.

Dans les introns, il existe à la jonction avec les exons des séquences conservées appelées consensus d'épissage servant à l'excision des introns et au raboutage des exons²⁴⁸. Ces sites sont conservés (sites canoniques) et sont appelés (figure 15) :

- site donneur ou site 5' en aval de l'exon (jonction exon/intron) représenté généralement par le di-nucléotides GU
- site accepteur ou site 3' en amont de l'exon (jonction intron/exon) représenté généralement par le di-nucléotides AG
- site de branchement représenté par le nucléotide A situé dans une région riche en pyrimidine à une trentaine de nucléotides en amont du site accepteur²⁴⁹.

La reconnaissance des sites d'épissage et les étapes couplées d'élimination des introns et de re-ligature des exons sont réalisées par un complexe appelé « spliceosome ».

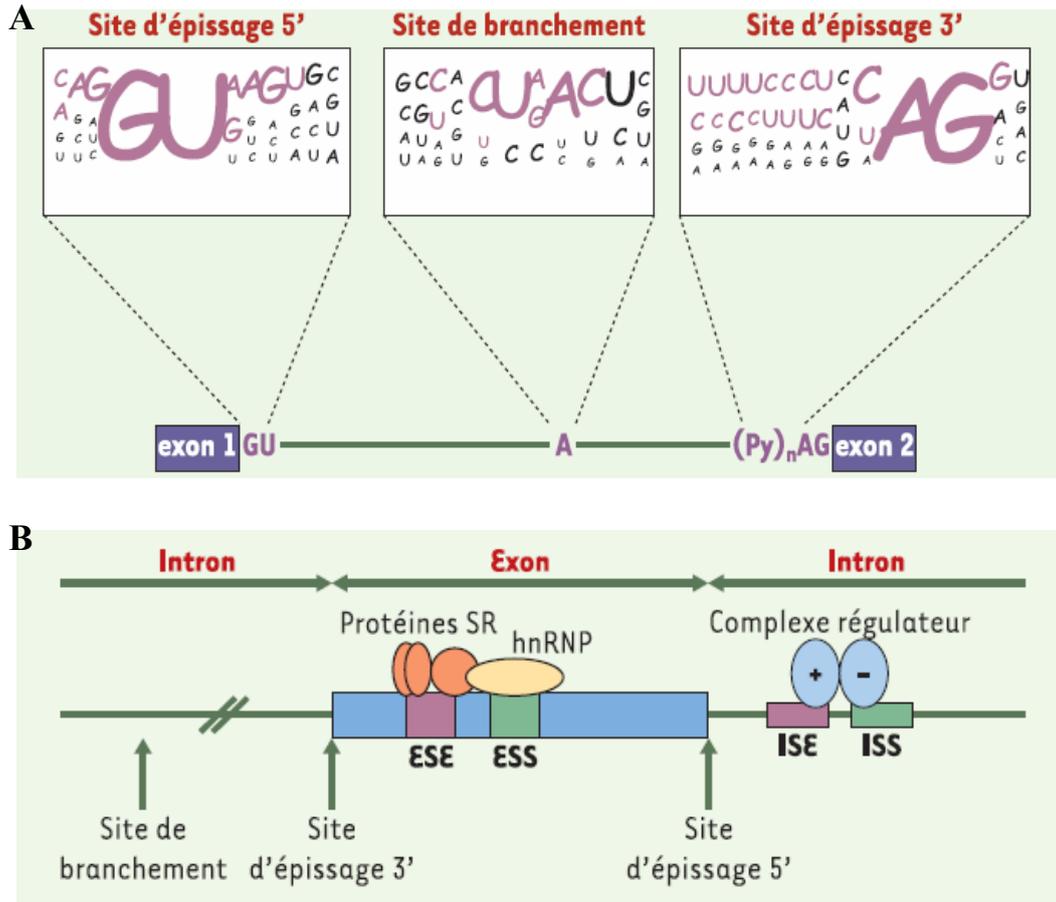


Figure 15 : A. Profil des séquences consensus au site d'épissage 5', au site de branchement et au site d'épissage 3'. B. Schéma représentatif des principaux acteurs de l'épissage.

D'après Corcos L. et Solier S., Médecine/Sciences, 2005²⁵⁰.

En A, à chaque position, la fréquence des 4 nucléotides A, C, G et T est représentée par la taille des caractères.

1.2 Le spliceosome

Le spliceosome est composé de quelques sous-unités RNP, appelées petites ribonucléoprotéines nucléaires riches en uridine (uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins, UsnRNP ou snRNP), et d'un nombre de facteurs d'épissage non-snRNP (small nuclear RiboNucleoProteins). Les snRNP sont composées d'une molécule d'ARN (snRNA) complexée à 7 protéines Sm et à quelques autres protéines spécifiques.

La majorité des snRNP spliceosomales, U1, U2, U4, U5 et U6 sont responsables de l'épissage de la majorité des introns de l'ARN pré messager^{251,252}.

1.2.1 Formation du spliceosome

La formation initiale du spliceosome implique l'engagement de l'interaction de U1 snRNP avec le site 5' d'épissage pour former le complexe d'engagement ou complexe E suivi du recrutement de U2 snRNP au point de branchement formant ainsi le pré-spliceosome ou complexe A. Une tri-snRNP U4/U6.U5, dans laquelle les snRNA U4 et U6 sont appariés, est donc stablement liée pour donner le complexe B qui ne contient pas encore le centre catalytique. Pour que l'activation catalytique du spliceosome soit effective, le complexe B doit subir un changement structural drastique impliquant la dissociation inter-molécule des hélices d'ARN U4-U6 et la formation d'un réseau d'interaction entre U6, U2, et le pré-ARNm, constituant ainsi une partie du cœur catalytique du spliceosome. Avant ces réarrangements, U1 snRNP doit se dissocier du site 5' d'épissage. Le complexe B activé devient la première étape catalytique d'épissage, générant le complexe C. Le complexe C intervient dans la deuxième étape catalytique après laquelle le complexe post-spliceosomal contenant l'intron est démantelé et l'ARN produit est libéré²⁵² (figure 16).

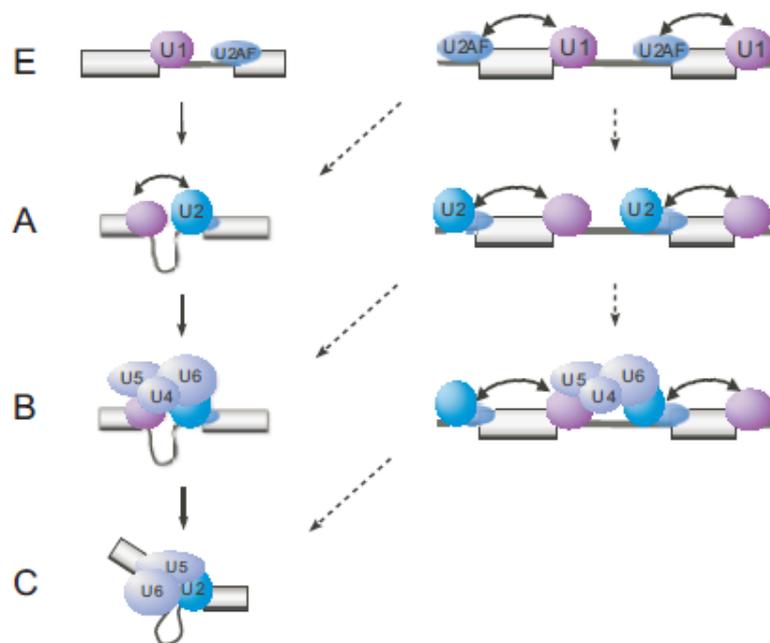


Figure 16 : Schéma de l'assemblage du spliceosome.

D'après House A. and Lynch K., The Journal of Biological Chemistry, 2008²⁵³.

1.2.2 Réaction d'épissage

À partir du complexe A, la réaction d'épissage est dépendante de l'hydrolyse de l'ATP et elle consiste en deux étapes de trans-estérification réalisées uniquement par le complexe C. Lors de la première réaction, l'atome d'oxygène en 2' de l'adénosine du point de branchement de l'intron, par une attaque nucléophile, forme un lien avec l'atome phosphate qui lie l'exon 5' et l'intron, déplaçant le lien de l'exon 5' et formant une structure en « lasso » intron/exon 3' intermédiaire. La seconde trans-estérification, l'atome oxygène du groupe hydroxyle 3' naissant de l'exon 5' par une attaque nucléophile, forme un lien avec l'atome phosphate qui lie l'intron et l'exon 3', déplaçant le lien de l'intron en « lasso » et joignant l'exon 5' et 3' pour former l'ARNm^{254,255}.

La réaction d'épissage est réalisée par environ 70 protéines snRNP différentes et environs 200 protéines non-snRNP. Parmi ces protéines, quelques-unes peuvent avoir un rôle d'hélicase, d'ATPase, de GTPase, de protéine kinase... et peuvent être importantes pour les interactions protéine-protéine ou pour les interactions protéines-ARN^{256,257}.

2 Epissage alternatif

L'épissage alternatif consiste en l'obtention de plusieurs ARNm à partir du même pré-ARNm. Cela consiste plus précisément en une régulation différentielle des sites d'épissage d'un ou plusieurs motifs d'un ARNm selon le type cellulaire et/ou l'état de différenciation de la cellule et/ou en réponse à l'environnement extracellulaire. Par conséquent, il se distingue de l'épissage constitutif qui consiste en une régulation identique et constante des sites d'épissages mais les deux mécanismes utilisent le spliceosome.

C'est ainsi qu'il a été identifié plusieurs isoformes protéiques suite à l'épissage alternatif à partir d'un seul gène (contenant un ou plusieurs motifs alternatifs). D'ailleurs, environ 70-80% des gènes humains semblent coder pour plusieurs isoformes d'épissage selon les stades de développement et le type de tissu^{258,259}. Et d'après des données récentes, 70 à 88% des événements d'épissage alternatif changeraient la nature de la protéine et seulement 19% conduiraient à la production de protéines tronquées²⁵⁰.

2.1 Les différents types d'épissages alternatifs

L'épissage alternatif contribue à expliquer la grande diversité de l'information génétique en incluant ou non un motif alternatif sur un ARNm. Il existe plusieurs types d'épissages alternatifs, décrits ci-dessous et illustrés figure 17²⁶⁰.

- Inclusion/exclusion d'un exon interne en cassette : les exons sont flanqués de séquences introniques (d'où exon interne en cassette). Selon si les sites d'épissage externes d'un exon sont actifs (inclusion) ou inactifs (exclusion), il y a alors inclusion ou exclusion respectivement de cet exon. C'est le type d'épissage alternatif le plus fréquent.

- Sites d'épissage alternatif en 5' : il y a compétition entre les sites 5' au sein d'un même exon. L'épissage alternatif concerne ici le site donneur avec pour conséquence l'inclusion totale ou le raccourcissement de l'exon.

- Sites d'épissage alternatif en 3' : il y a compétition entre les sites 3' au sein d'un même exon. Dans ce cas, l'épissage alternatif concerne le site accepteur avec pour conséquence l'inclusion totale ou le raccourcissement de l'exon. Les sites d'épissage alternatif en 5' ou 3' sont aussi assez fréquents.

- Rétention d'intron ou défaut d'épissage : inactivation d'un couple externe à l'exon de sites d'épissage 5' et 3'. Le site 5' d'un exon et le site 3' d'un autre exon voisin sont inactifs, ce qui entraîne la rétention de l'intron sur l'ARNm.

- Des exons mutuellement exclusifs : ce phénomène implique la compétition entre des paires de sites d'épissage mutuellement exclusives. Lorsqu'un exon est inclus, un autre est exclu et lorsque ce dernier est inclus c'est le premier qui est exclu de l'ARNm.

- Promoteurs multiples : mécanisme aussi appelé « sites alternatifs d'initiation de la transcription » ou « promoteurs alternatifs ». Ce cas fait intervenir le choix du premier exon inclus sur l'ARNm.

- Sites alternatifs de polyadénylation : ceci fait intervenir le choix du dernier exon à inclure sur l'ARNm.

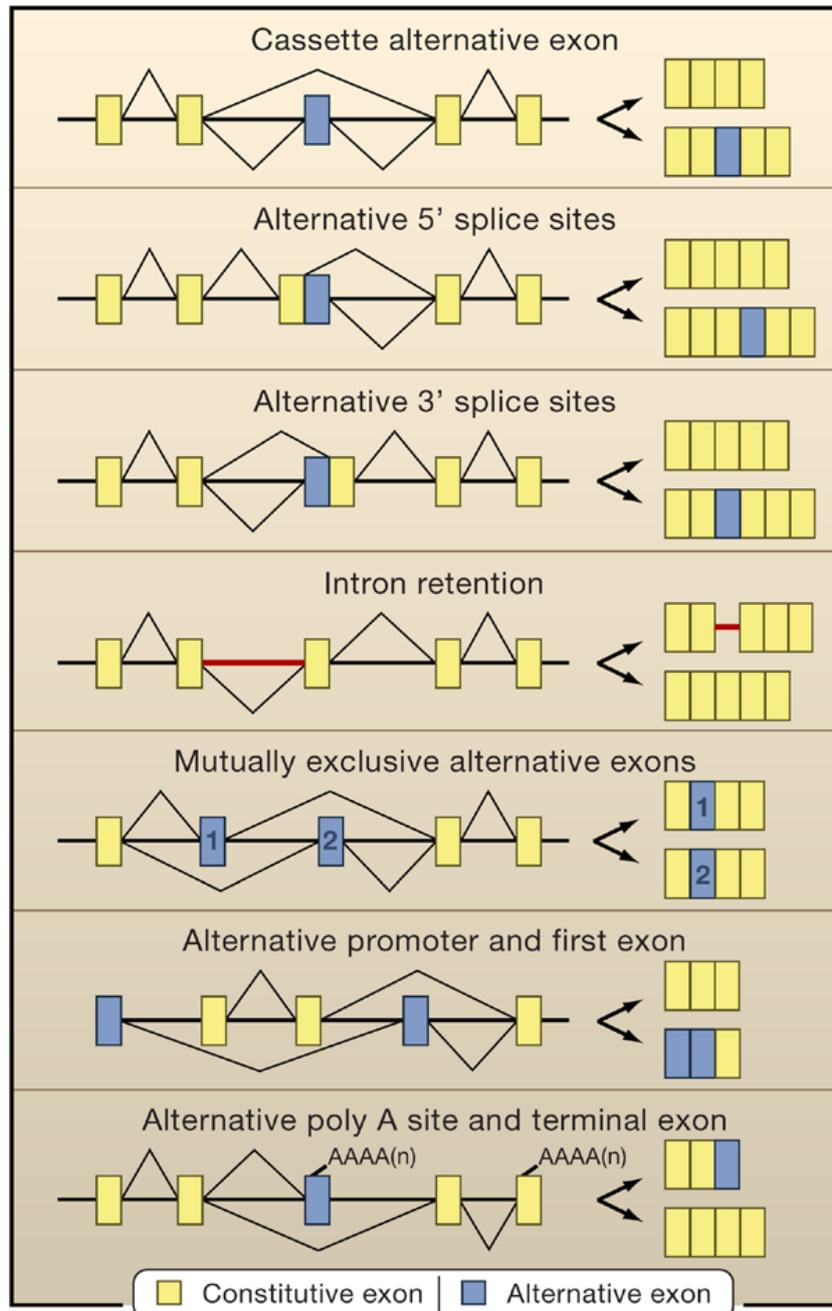


Figure 17 : Différents types d'épissage alternatif.

D'après Blencowe B., Cell 2006²⁶⁰.

2.2 Conséquences de l'épissage alternatif

Différents changements sont opérés sur l'ARNm lors d'un épissage alternatif.

- Différents cadres de lecture ouverts (ou ORF pour Open Reading Frame) : ceci a pour conséquence l'apparition de codons stops différents et donc de protéines différentes. C'est le cas lorsqu'un exon qui est alternatif n'est pas un multiple de 3 bases. Lorsque cet exon est

inclus sur l'ARNm, il y a alors changement du cadre de lecture, entraînant ainsi un changement de type de protéine (changements d'acides aminés) par apparition d'un codon stop différent situé en aval de l'exon alternatif.

- Apparition d'un codon stop : il s'agit ici de l'inclusion d'un exon alternatif sur l'ARNm possédant dans sa séquence un codon stop. Ce phénomène entraîne la traduction d'une protéine tronquée en C-terminal fonctionnelle ou non.

- Différents sites d'initiation de la traduction : l'exon possédant le site d'initiation AUG se situe sur un exon alternatif. Si l'exon possédant ce site d'initiation est localisé en aval, alors il pourra y avoir traduction d'une protéine tronquée en N-ter. Il peut y avoir ou non changement de cadre de lecture.

- Différents sites de terminaison de la traduction : lorsque le codon stop et le site de polyadénylation sont situés sur un exon alternatif. Cela entraîne la production de protéines tronquées ou allongées en C-ter.

Parmi les conséquences engendrées par l'épissage alternatif, on observe également, de multiples variants d'épissage à partir d'un seul gène²⁶¹. Cependant, l'exemple le plus notable est de loin le gène *Dscam* de *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), qui peut produire 38.016 isoformes.

Le choix des sites d'épissage apparaît donc primordial lors de l'épissage des pré-ARNm. Ce phénomène de reconnaissance des jonctions exon/intron requiert un contrôle en finesse afin que la cellule se comporte normalement aux différents stades de développement dans lesquels elle se situe.

2.3 Critères d'inclusion/exclusion des exons

Il existe plusieurs critères permettant l'inclusion d'un exon donné.

2.3.1 La taille des exons

Les exons internes chez l'homme ont une taille d'environ 120 nucléotides et moins de 5% sont plus grands que 250 nucléotides. D'après des analyses statistiques d'exons alternatifs en cassette, il a été montré que les exons alternatifs sont significativement plus courts que les exons constitutifs et que l'épissage alternatif est beaucoup plus fréquent dans les micro-exons (exon inférieur à 30 bases)²⁶².

2.3.2 Le choix des sites d'épissage

En effet, chez les mammifères, seuls les di-nucléotides AG (site accepteur) et GU (site donneur) sont conservés dans la séquence servant à la reconnaissance des jonctions exons/introns. Les nucléotides entourant ces di-nucléotides varient d'un site à l'autre. On caractérise les sites de deux manières : les sites forts d'épissage dont la séquence est proche de la séquence consensus ; les sites faibles d'épissage dont la séquence diverge du consensus. Il existe plusieurs sites d'épissage au niveau des jonctions exon/intron que l'on dénomme sites cryptiques, ces sites sont classés en fonction du site authentique (le plus utilisé par la machinerie d'épissage) ²⁶³.

Il existe également dans les gènes des faux sites d'épissage qui ne sont pas utilisés, appelés des « pseudo-sites d'épissages ». Ces sites sont plus abondants que les véritables dans les longs transcrits. De plus, beaucoup de pseudo-sites d'épissage 5' existent et correspondent à des sites réels. Dans ce cas, un facteur autre que la force intrinsèque du site doit probablement jouer un rôle dans la distinction entre site réel et pseudo-site ²⁶⁴.

Ce choix ne se limite donc pas à la force des sites d'épissages. En effet, il existe des séquences *cis* régulatrices (non canoniques) en amont ou en aval des sites, dans les exons et les introns, ainsi que des facteurs *trans* recrutés sur ces séquences *cis* régulatrices qui permettent un choix plus contrôlé des sites d'épissage alternatif (et d'épissage constitutif) par recrutement du spliceosome ²⁶⁵.

2.4 Régulation de l'épissage alternatif

2.4.1 Les séquences *cis* régulatrices

Ces éléments de séquences sont importants pour favoriser l'identification des sites d'épissage et pour distinguer les paires de sites d'épissage correctes de celles qui sont incorrectes ²⁶⁶. Ces séquences régulatrices se divisent en quatre catégories basées sur leur localisation et leur mode d'action. Elles peuvent être activatrices (enhancer) ou inhibitrices (silencer) et spécifiques des exons, elles sont alors désignées sous le nom de « Exonic Splicing Enhancer/Silencer » (ESE/ESS) ; ou des introns, et sont appelées « Intronic Splicing Enhancers/Silencers » (ISE/ISS). Elles jouent également un rôle important dans la régulation de l'épissage constitutif. Les séquences enhancer et silencer, précédemment détectées, tendent

à être courtes (environ 5-10 nucléotides de longueur) et se composent de séquences consensus relativement dégénérées qui sont reconnues par les domaines de liaison à l'ARN de divers facteurs lors des étapes les plus précoces de la formation du spliceosome. Ces facteurs incluent des membres de la famille des protéines SR et de la famille des ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins ou hnRNP), qui peuvent activer et réprimer la formation des réseaux d'interaction autour des exons et des introns participant ainsi à l'assemblage du spliceosome²⁶⁶.

2.4.1.1.1 Les séquences exoniques activatrices de l'épissage

Les premières expériences fonctionnelles réalisées *in vitro* ont montré que les séquences ESE étaient hétérogènes et qu'elles pouvaient être divisées en deux classes : une majorité qui était riche en purine, consistant en une courte séquence de 5-6 purines et une minorité qui n'était pas riche en purines appelée élément ACE (AC-rich enhancer).

Les plus généralement étudiées sont les séquences riches en purine, et qui sont liées entre autres par des membres de la famille des protéines SR. Beaucoup de travaux ont été réalisés avec les ESE qui activent les sites 3' ou 5' d'épissage par liaison des protéines SR²⁶⁷ (figure 18).

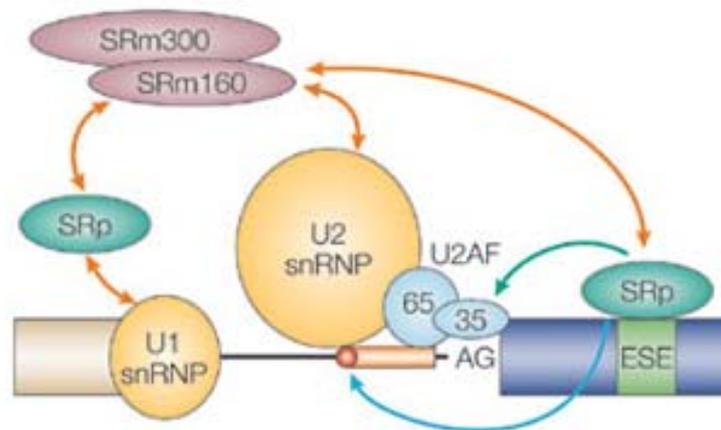


Figure 18 : Modèle d'activation de l'épissage par une ESE.

D'après Matlin A. et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005²⁶⁶.

Une protéine SR liée à l'ESE va recruter d'autres protéines (telles que U2AF35 et 65) ainsi que des co-activateurs (flèches oranges) afin d'activer l'épissage au niveau du site branchement.

2.4.1.1.2 Les séquences exoniques inhibitrices de l'épissage

Les mécanismes moléculaires par lesquels les ESS inhibent l'épissage commencent juste à être compris ²⁶⁸. En plus de leurs rôles connus ou présumés dans l'épissage constitutif, les ESS contribuent de manière significative à la régulation de l'épissage alternatif ²⁶⁹. La plupart des silenciers décrits sont les éléments introniques, mais plusieurs éléments ESS ont été rapportés. La protéine hnRNP I (mieux connue sous le nom de polypyrimidine-tract-binding protein (PTB)) et les protéines des familles hnRNP A/B et hnRNP H sont les facteurs les mieux caractérisés de l'inhibition ²⁷⁰ (figure 19).

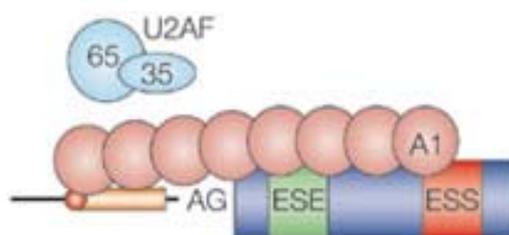


Figure 19 : Modèle de l'inhibition de l'épissage par recouvrement des protéines hnRNPA1 et une ESS.

D'après Matlin A. et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005 ²⁶⁶.

La distinction entre ESE et ESS, basée uniquement sur la séquence du motif, doit être affinée. En effet, ces séquences *cis* régulatrices peuvent avoir un effet positif ou négatif sur l'épissage en fonction de leur position dans l'exon ²⁷¹.

2.4.1.1.3 Les séquences introniques activatrices de l'épissage

Plusieurs éléments sont connus pour agir en tant qu'ISE, mais les protéines qui permettent leurs effets sont moins bien caractérisées que pour les ESE. Certaines ISE semblent être dépendantes des protéines SR alors que d'autres sont indépendantes de ces protéines. D'un point de vue mécanistique, au moins quelques ISE semblent être différentes des séquences ESE ²⁷². Les motifs principaux des ISE sont :

- les motifs poly-G, courts triplets de G qui sont surreprésentés dans les introns près des extrémités 3' et 5' des exons
- les motifs riches en uridine
- les motifs UG, qui sont reconnus par une famille de protéines appelées CELF ²⁷³
- les motifs UGCAUG, augmentant fortement l'épissage lorsqu'ils sont ciblés ²⁷⁴.

2.4.1.1.4 Les séquences introniques inhibitrices de l'épissage

Quelques éléments ISS sont liés par les mêmes protéines qui lient les ESS comme la protéine hnRNP A1. Dans ce cas, hnRNP A1 bloque l'assemblage d'U2snRNA au point de branchement²⁷⁴.

Comme pour les ISE, des motifs particuliers sont décrits comme étant des ISE :

- motifs riches en CU, qui impliquent la liaison de PTB, et sont souvent rencontrés au niveau des séquences riches en pyrimidines séparant le point de branchement et le site accepteur
- les motifs UG fonctionnent également comme répresseurs d'événements d'épissage en liant aussi les protéines CELF²⁷⁵
- les motifs UGCAUG qui peuvent eux aussi agir à la fois comme répresseur et comme activateur.

Un but important, autour de la définition des fonctions des événements d'épissage alternatif, est également de comprendre les mécanismes par lesquels ces séquences agissant en *cis* dans le pré-ARNm se combinent les unes avec les autres et avec des facteurs d'épissage agissant en *trans* pour définir des modèles globaux d'épissage.

2.4.2 Les facteurs *trans* régulateurs

Il existe deux grandes familles principales de facteurs agissant en *trans* : la famille des protéines SR, comportant un domaine riche en sérine et arginine, et les hnRNP. Cependant il existe aussi d'autres types de facteurs agissant en *trans*.

2.4.2.1 Les protéines SR

Les membres de la famille des protéines SR sont les régulateurs d'épissage les mieux caractérisés chez les mammifères. A ce jour, sept protéines SR classiques ont été identifiées chez l'homme : ASF/SF2, connue sous l'appellation SRp30a ; SC35, SRp30b ; SRp20 ; SRp75 ; SRp40 et SRp55. Elles ne sont pas toutes présentes chez tous les eucaryotes²⁶⁷ et il existe également des protéines SR additionnelles.

Les membres de la famille des protéines SR possèdent des motifs de séquences communs, dont un ou deux motifs de reconnaissance de l'ARN en N-terminal (RRM et RRMH), et un domaine riche en arginine/sérine en C-terminal appelé domaine RS (d'où la désignation protéines SR). Des protéines comportant un domaine RS ont été classées comme protéines

relatives aux SR. Elles peuvent inclure d'autres protéines de liaison à l'ARN et différentes enzymes²⁷⁶.

Chez les mammifères, alors que les RRM sont suffisants pour lier des séquences spécifiques d'ARN, le domaine RS des protéines SR et des protéines relatives aux SR, permettrait de faciliter l'assemblage du spliceosome grâce à des interactions protéine-protéine et est nécessaire pour activer l'épissage²⁶⁷. Les domaines RRM interviennent dans des interactions protéine-protéine et modulent l'activité d'épissage²⁷⁷.

Les protéines SR classiques ont un double rôle, elles interviennent dans l'épissage constitutif ainsi que dans l'épissage alternatif^{267,278}. Les protéines SR additionnelles interviennent quant à elles, dans la régulation positive et négative de l'épissage alternatif. Chaque protéine SR a un consensus de liaison bien que certains sites puissent être redondants ou chevauchants²⁶⁷. La fonction précoce des protéines SR dans la reconnaissance des sites d'épissage alternatif est probablement similaire à celle dans l'épissage constitutif. La liaison des protéines SR permet la sélection des sites 5' et 3' d'épissage proximaux par rapport aux sites distaux. Il apparaît à ce jour, de manière intéressante, que le domaine RS est important pour l'épissage constitutif mais pas pour l'épissage alternatif²⁷⁹.

Les protéines SR n'activent pas de la même façon les sites d'épissage en raison d'affinités d'interactions différentes avec les sites d'épissage 5' ou les ESE. Elles peuvent affecter de manière similaire la sélection des sites d'épissage 3'. Les protéines SR liées directement aux éléments *cis* agissent comme des stabilisateurs des composants du spliceosome et augmentent leur concentration locale²⁶⁷.

Les protéines SR sont sujettes à des régulations post-traductionnelles. En effet, les protéines SR sont phosphorylées sur les résidus sérine de leur domaine RS²⁸⁰. Cette phosphorylation influence la spécificité de liaison à l'ARN, l'activité d'épissage et la localisation subcellulaire des protéines SR et affecte leurs interactions²⁸¹.

Cette phosphorylation réversible est requise pour l'assemblage du spliceosome lors de l'épissage constitutif et alternatif. Cependant, l'hypo et l'hyper-phosphorylation du domaine RS inhibent l'activité d'épissage des protéines SR. Par conséquent une phosphorylation dynamique et appropriée est cruciale pour la réaction d'épissage²⁸² (figure 20).

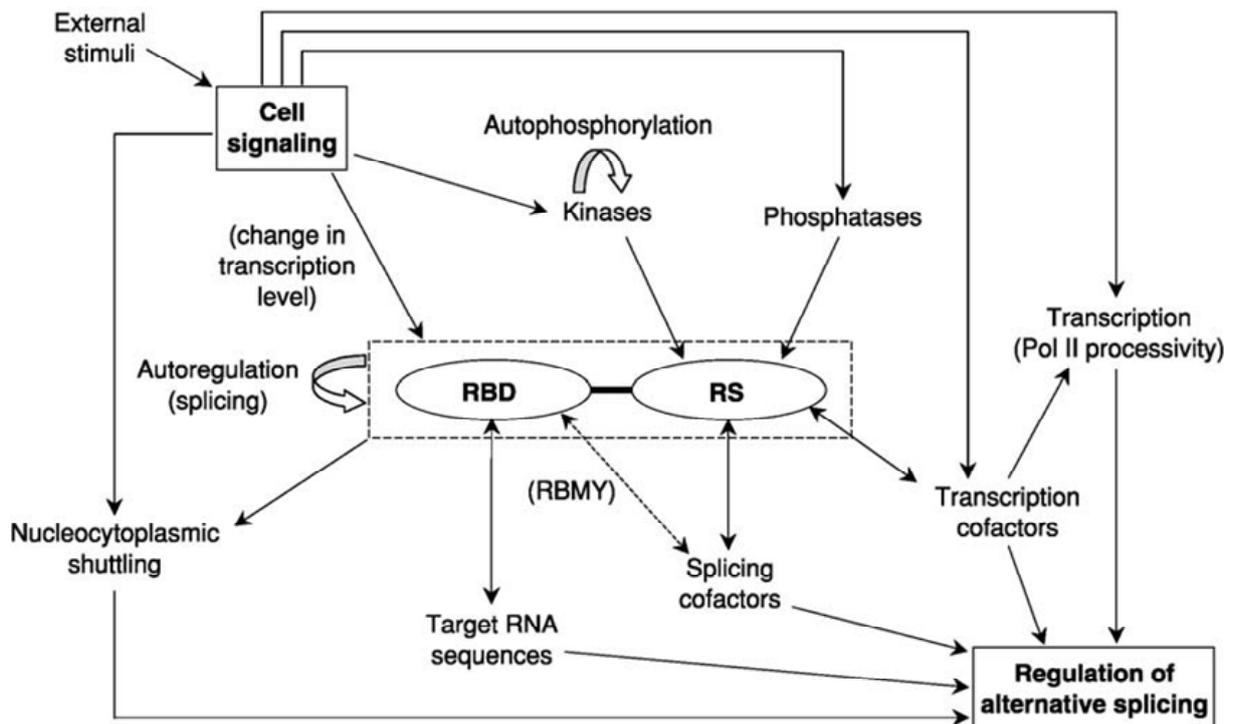


Figure 20 : régulation de l'épissage alternatif par les protéines SR.

D'après Bourgeois C.F., Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 2004²⁸³. Les protéines SR (représentées par leurs domaines de liaison à l'ARN (RBD) et leurs domaines RS) jouent un rôle central dans la signalisation cellulaire à l'origine de la régulation de l'épissage alternatif.

2.4.2.2 Les hnRNP

Le terme hnRNP a été inventé pour indiquer un groupe de protéines liées à l'ARN nucléaire de haut poids moléculaire (pré-ARNm ou ARN nucléaire hétérogène). Des protéines hnRNP étaient donc du point de vue fonctionnel, définies comme protéines les plus abondantes liées aux particules 40S des ribosomes²⁸⁴. Puisque la définition d'une protéine hnRNP ne reflète pas une activité ou une fonction biochimique précise autre qu'être associée aux ARNm précurseurs nouvellement synthétisés, il n'est pas surprenant que les protéines hnRNP montrent une diversité structurale importante. D'ailleurs, bien que plusieurs des protéines principales hnRNP aient été impliquées dans une variété de processus biologiques comprenant la biogénèse des télomères, la polyadénylation, la traduction, l'édition de l'ARN et la stabilité de l'ARNm, une fonction dans l'épissage a été documentée ou proposée pour plus de la moitié des protéines hnRNPs principales²⁸⁵.

Cette grande famille de protéines comporte notamment les protéines hnRNPA1 et A2, ayant un rôle positif sur l'épissage, et hnRNPI ou PTB qui fonctionne comme en tant que

répresseur de l'épissage dans quasiment tous les systèmes étudiés jusqu'à maintenant²⁶⁸. Les protéines hnRNP sont également la cible de régulations post-traductionnelles par phosphorylation²⁸⁶.

2.4.3 Implication de la structure secondaire du pré-ARNm sur l'épissage

Un grand nombre de protéines, liant l'ARN de façon spécifique, module l'assemblage du spliceosome. Plusieurs motifs de protéine qui lient l'ARN simple brin ont été identifiés, et ceux-ci sont généralement trouvés dans des facteurs d'épissage. Conformément à leur action dans un état simple-brin, un ensemble d'activateurs et d'inhibiteurs de l'épissage ont été confirmés par analyses bioinformatiques comme fonctionnant plus efficacement une fois placés dans une boucle que dans une tige d'une structure en épingle à cheveux. La formation et la stabilisation de la structure secondaire autour de tels éléments de régulation est donc un mécanisme potentiel pour modifier les effets sur l'épissage²⁸⁷.

2.4.4 Régulation de l'épissage alternatif par les modifications des histones

L'épissage des pré-ARNm se déroule de manière co-transcriptionnelle et l'on sait que le choix des sites est influencé par le taux d'élongation par l'ARN polymérase II, les complexes de remodelage de la chromatine et les inhibiteurs d'histones désacétylases²⁸⁸⁻²⁹⁰. De plus, des modifications des histones ont été retrouvées, en plus de leur localisation connue au niveau des introns, au niveau des exons^{291,292}. Ceci a encouragé l'équipe de Tom Misteli à prouver que les modifications des histones avaient un rôle dans l'épissage alternatif²⁹³. Ils ont ainsi pu montrer que des signatures distinctes de modification d'histones sont corrélées avec l'épissage, ceci pour un groupe de gènes humains, et que cette modification est à l'origine du choix des sites d'épissage. Pour cela, ils ont utilisé un modèle d'épissage alternatif qu'est le gène FGFR2 qui possède des exons mutuellement exclusifs et ont montré que les modifications des histones influencent le recrutement de régulateurs d'épissage via une protéine associée à la chromatine (un système adaptateur en quelque sorte). Pour un certain groupe de gènes dépendants de PTB, ce système concerne la tri-méthylation de l'histone H3 sur le résidu lysine en position 36 (H3-K36me3), une protéine adaptatrice MRG15 qui permet le recrutement de la protéine PTB. De plus les auteurs émettent l'hypothèse de l'existence d'autres combinaisons de ce type de système et des interactions physiques entre protéines associées à la chromatine et facteurs d'épissage ont déjà été reportées.

2.5 Epissage alternatif et cancer

Comme la concentration, la localisation et/ou l'activité des facteurs d'épissage alternatif sont connues pour modifier la sélection des sites d'épissage, il n'est pas étonnant de constater l'expression anormale d'ARNm dans les cellules tumorales par rapport aux cellules saines. De plus, il a été observé que ces facteurs d'épissage, les protéines régulatrices SR et les hnRNP notamment, sont surexprimés dans un grand nombre de types de cancers différents ou sous-exprimés dans d'autres ²⁹⁴. Ce phénomène peut contribuer directement ou indirectement au développement cancéreux, à la progression tumorale ou encore à la réponse au traitement. C'est ainsi qu'émerge depuis peu le concept d'un rôle des facteurs d'épissage dans le cancer.

Une étude récente montre que la surexpression d'un facteur d'épissage est à l'origine de la transformation maligne. En effet, le facteur SF2/ASF est surexprimé dans de nombreux types de tumeur et ceci affecte l'épissage alternatif de gènes suppresseurs de tumeurs et de kinases. Cette étude montre la preuve du concept que l'expression anormale des protéines de l'épissage peut avoir des propriétés oncogéniques ²⁹⁵.

Tout d'abord, le gène SFRS1 codant pour SF2/ASF est considéré comme un proto-oncogène. En effet, ce gène est activé dans de nombreux types de cancer et en particulier dans les tumeurs du sein. L'expression ectopique de cette protéine va induire la transformation de fibroblastes de rongeur et enfin, la restauration de l'expression de SF2/ASF inverse l'effet de transformation. Les mécanismes de cette transformation induite par ce facteur ont été étudiés. Le facteur SF2/ASF va notamment induire l'augmentation de l'inclusion de l'exon 12A du gène suppresseur de tumeur *BIN1*. Or la protéine BIN1 en tant que suppresseur de tumeur interagit avec la protéine c-Myc qui est un proto-oncogène. L'inclusion de cet exon empêche l'activité de BIN1 en bloquant la fixation sur MYC. D'autres gènes suppresseurs de tumeurs sont également la cible de SF2/ASF. De plus, SF2/ASF induit une isoforme oncogénique de la kinase S6K1. Cette kinase a pour fonction de phosphoryler la protéine S6 de la petite sous-unité ribosomale et ainsi de réguler la traduction. Elle intervient également dans la croissance cellulaire et l'apoptose. Deux isoformes de l'ARNm de cette kinase existent, codant pour deux protéines différentes dans la partie C-terminale. Il a été montré que la surexpression de SF2/ASF, mais pas celle d'autres protéines SR ou hnRNP, induit l'épissage alternatif de RPS6KB1 (S6K1) en faveur de l'isoforme 2 de l'ARNm. Ceci se vérifie au niveau protéique chez la souris et chez l'homme, et les cellules qui sur-expriment l'isoforme 2 vont former des colonies en agar. De plus l'extinction de l'expression de SF2/ASF *in vitro* et *in vivo* induit un arrêt de la croissance tumorale.

Ces résultats cumulés rendent bien compte du potentiel du facteur SF2/ASF dans la transformation et la maintenance tumorale²⁹⁵.

Une étude encore plus récente met en évidence que le facteur de transcription c-Myc induit la surexpression de trois protéines régulatrices hnRNP de l'épissage : PTB, hnRNPA1 et hnRNPA2. Ceci a pour conséquence de favoriser l'épissage alternatif de la kinase PKM vers l'isoforme 2. Cette kinase comprend deux isoformes : une exprimée normalement au niveau embryonnaire, PKM2, et qui est souvent ré-exprimée dans les cancers, qui a un rôle dans la glycolyse aérobie ; une autre présente chez l'adulte, PKM1, qui joue un rôle dans la phosphorylation oxydative. Le ratio PKM2/PKM1 peut être ainsi fortement augmenté dans les cancers et les auteurs ont corrélé, dans des gliomes humains, la surexpression de c-Myc, PTB, hnRNPA1 et hnRNPA2 avec l'expression de PKM2²⁹⁶.

Chapitre IV : immunothérapie anti-tumorale

1 Apprêtement et présentation des antigènes

Deux classes d'antigènes se distinguent :

- les antigènes dits endogènes, qui regroupent les antigènes anormaux du soi (protéines non fonctionnelles), les auto-antigènes (pour la tolérance), les antigènes correspondant à des germes intracellulaires (virus, bactéries, parasites), qui utilisent la machinerie de l'hôte pour se développer, et les antigènes tumoraux.
- les antigènes dits exogènes, qui comptent les antigènes solubles et particuliers issus de cellules, bactéries, agrégats...

Les molécules du CMH sont appelées HLA (Human Leucocyte Antigen) chez l'homme et H-2 (Histocompatibility 2) chez la souris. Chez l'homme, le système HLA est un ensemble de gènes localisés sur le chromosome 6 et ces gènes sont très polymorphiques à cause de différents allèles (ce sont les plus polymorphiques du génome humain)²⁹⁷.

Ces molécules sont le support moléculaire de la présentation des antigènes à la surface cellulaire. En effet, elles présentent une poche où se logent les peptides antigéniques. Il existe deux classes de CMH : le CMH de classe I (HLA-A, B et C pour les molécules classiques) est présent sur toutes les cellules nucléées alors que le CMH de classe II (HLA-DP, DQ et DR pour les molécules classiques) est présent uniquement sur les CPA professionnelles. Les CPA professionnelles sont les macrophages, les LB et les cellules dendritiques. Les antigènes vont ainsi pouvoir être « présentés » à la surface cellulaire et être reconnus par des LT spécifiques (CD8⁺ pour le classe I et CD4⁺ pour le classe II), qui possèdent des récepteurs à l'antigène (TCR), afin d'initier une réponse immunitaire contre l'antigène.

1.1 Le HLA de classe I et la voie cytosolique

1.1.1 Structure du HLA-I

Les molécules de classe I sont composées d'une chaîne lourde de 44 kDa qui comporte la variabilité allélique composée de 3 domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) ; d'une chaîne légère invariante ($\beta 2$ -microglobuline) associée à la chaîne lourde ; d'une partie intramembranaire et une courte queue cytoplasmique. Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment un sillon fermé dans lequel le peptide antigénique va venir se loger, comme nous pouvons le voir figure 22, et la stabilité entre la chaîne lourde et la $\beta 2$ -microglobuline va dépendre de la présence du peptide dans le sillon²⁹⁸. Les peptides venant se loger dans ce sillon sont courts (8 à 11 acides aminés (AA) mais le plus souvent 9).

1.1.2 Voie cytosolique d'apprêtement de l'antigène

Toutes les cellules nucléées exprimant le CMH-I (dont les CPA) peuvent réaliser l'apprêtement d'antigènes dits endogènes. Les protéines destinées à la dégradation et à la présentation par cette voie sont essentiellement des protéines nouvellement synthétisées présentant des erreurs traductionnelles ou post-traductionnelles²⁹⁹ ou des protéines virales. Cette dégradation est médiée par un complexe multi-catalytique : le protéasome 26S, composé du cœur catalytique qu'est le protéasome 20S et à chaque extrémité d'un protéasome 19S régulateur, comme présenté figure 21. Brièvement, les protéines vont être poly-ubiquitinilées par trois complexes enzymatiques au niveau du cytoplasme et ainsi vont être adressées au protéasome³⁰⁰. Le protéasome 19S va permettre la reconnaissance et la fixation de la protéine ubiquitinilée, l'élimination des molécules d'ubiquitine, le déploiement de la chaîne polypeptidique et l'activation du protéasome 20S. La protéine va ainsi être dégradée grâce aux différentes activités protéolytiques du 20S³⁰¹. Cette voie de dégradation cytosolique est la voie majeure de présentation des antigènes par les molécules du CMH-I, mais il existe d'autres systèmes de génération de peptides que sont l'immunoprotéasome, ou encore les aminopeptidases.

1.1.3 L'immunoprotéasome

Un autre type de protéasome existe : c'est l'immunoprotéasome qui est exprimé par les CPA et parfois par certaines cellules tumorales. En effet, il a été montré que l'IFN- γ altère qualitativement l'activité du protéasome en remplaçant des sous-unités du protéasome 26S pour former l'immunoprotéasome. Les sous unités $\beta 1$, $\beta 5$ et $\beta 2$ (dites IFN γ inducibles) deviennent respectivement LMP2, LMP7 et MECL-1. De plus l'IFN γ induit un activateur du protéasome appelé PA28 qui va pouvoir substituer un ou les deux complexes régulateurs 19S³⁰².

Il a été montré que le protéasome et l'immunoprotéasome pouvaient induire la production d'épitopes identiques dans la plupart des cas mais que certains épitopes ne sont produits que par l'un ou par l'autre. En effet, il a été montré que l'immunoprotéasome pouvait affecter négativement l'apprêtement d'épitopes dérivés d'antigènes de tumeurs. Dans cette étude *in vitro*, des CTL spécifiques d'antigènes de tumeurs sont incapables de lyser des LB transformés par le virus de l'EBV exprimant la protéine tumorale native, ceci étant dû à l'absence de clivage de certaines protéines tumorales par le protéasome dans les B-EBV. De la même façon, les DC exprimant l'immunoprotéasome pourraient être incapables de présenter les peptides d'intérêt aux CTL^{303,304}. Ceci a des conséquences importantes sur les approches d'immunothérapie, notamment dans le choix d'une vaccination peptidique plutôt qu'avec la protéine native.

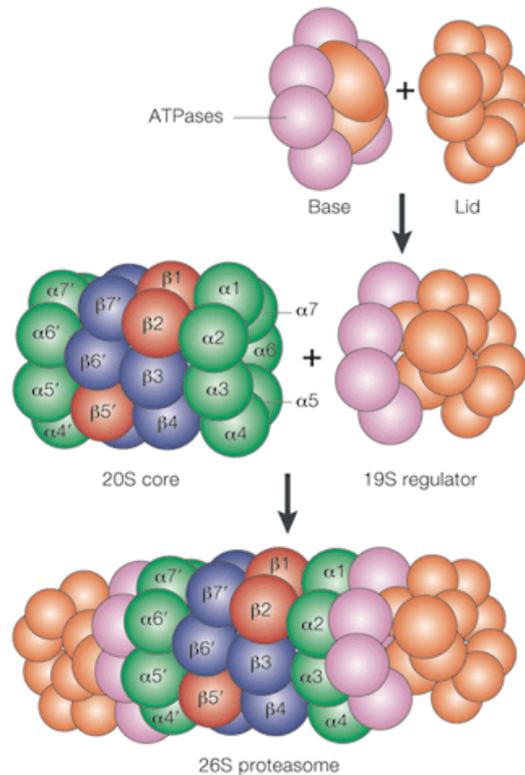


Figure 21 : Structure schématique du protéasome 26S.

D'après Kloetzel PM., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001 ³⁰².

Le protéasome 26S est composé du protéasome 20S comportant l'activité catalytique et de deux sous-unités régulatrices à chaque extrémité que sont les protéasomes 19S.

1.1.4 Formation du complexe HLA-I/peptide

Les peptides ainsi générés sont pris en charge par des protéines « heat-shock » (HSP70 et 90) et sont transportés dans le réticulum endoplasmique (RE) grâce aux transporteurs TAP (Transporters Associated with antigen Processing). Les transporteurs TAP sont sous forme d'un hétérodimère TAP1 et TAP2 et possèdent une spécificité de liaison pour les peptides présentant des résidus particuliers ³⁰⁵. Dans le RE, les peptides vont ensuite être associés aux molécules de HLA-I en cours de synthèse, elles-même associées à des protéines chaperonnes. Le peptide est en fait associé à la molécule de HLA-I partiellement repliée, encore complexée aux chaperonnes et à TAP. L'association peptide/HLA-I va permettre la fin du repliement de la molécule HLA-I et le tout est exporté dans des vésicules vers la membrane plasmique via le golgi ³⁰⁶. Le peptide ainsi présenté à la surface cellulaire des cellules cibles (cellules ayant des protéines anormales, cellules infectées par un virus...) va pouvoir être reconnu par un LT CD8⁺ qui va induire la lyse de cette cellule.

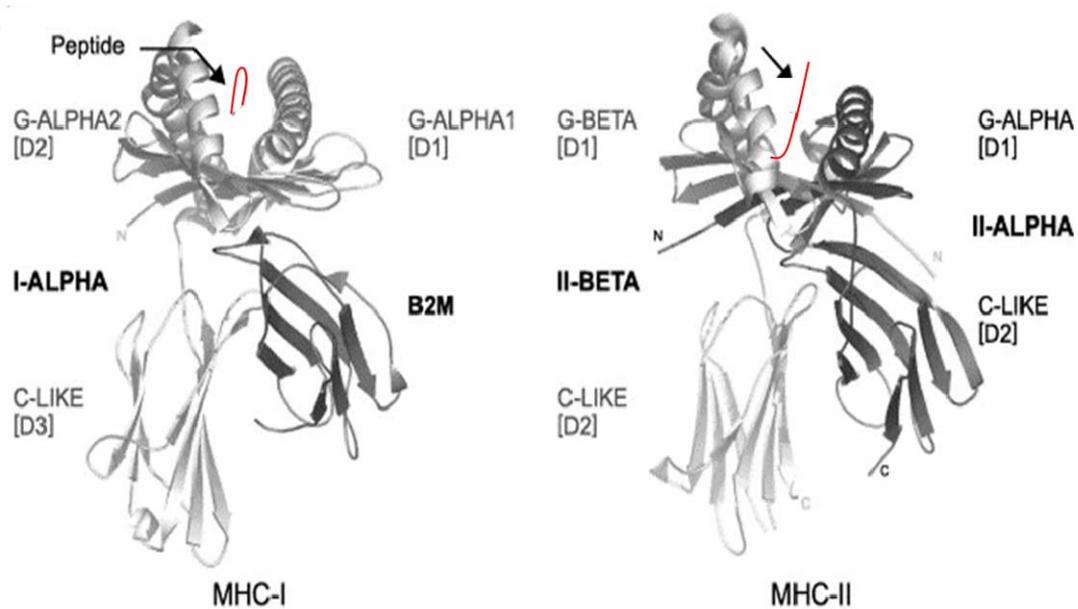


Figure 22 : Structure schématique du CMH de classe I et de classe II.

D'après IMGT (*ImMunoGeneTics information system*), <http://www.imgt.org>³⁰⁷ (site consulté le 20 aout 2010).

1.2 Le HLA de classe II et la voie endocytaire

1.2.1 Structure du HLA-II

Les molécules HLA de classe II sont des glycoprotéines transmembranaires de 55 à 60 kDa. Elles sont composées de deux chaînes associées de façon non covalente : une chaîne lourde α et une chaîne légère β . Chacune des chaînes comporte deux domaines extracellulaires N-terminaux (notes $\alpha 1/\alpha 2$ et $\beta 1/\beta 2$), chacun suivi d'une région transmembranaire puis d'un domaine C-terminal intra-cytoplasmique. Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ forment le sillon peptidique de la molécule HLA-II, qui est une cavité ouverte aux deux extrémités, comme représenté figure 22, et les peptides pouvant s'y loger sont d'une taille variant de 12 à 25 résidus³⁰⁸.

1.2.2 Voie endosomale d'apprêtement des antigènes

Les CPA professionnelles expriment le CMH de classe II en plus du CMH de classe I. Ces cellules sont capables de capter les antigènes exogènes grâce à leurs différents récepteurs (phagocytose, endocytose...) et sont également douées d'autophagie concernant des antigènes endogènes. Tous ces modes d'internalisation conduisent à la formation d'endosomes qui vont ensuite rejoindre la voie d'endocytose cellulaire avec la succession classique de vésicules ayant un pH de plus en plus acide (endosomes précoces, endosomes tardifs puis lysosomes)³⁰⁹. Ces différentes vésicules contiennent de nombreuses enzymes protéolytiques permettant la dégradation des protéines.

1.2.3 Formation du complexe HLA-II/peptide

Les peptides générés par la voie d'endocytose classique et qui vont être associés aux molécules de CMH-II ont une taille de 12 à 25 acides aminés avec une préférence pour 15 résidus. L'association du peptide au CMH-II peut se faire dans plusieurs compartiments cellulaires (avec des pH acides variés), ceci étant dépendant de l'affinité du peptide et de la complexité de la protéine. Ceci va donc pouvoir avoir lieu dans les endosomes précoces, tardifs, voir directement au niveau membranaire.

Brièvement, les molécules de CMH-II néo-synthétisées dans le RE vont être associées à la chaîne invariante Ii (protéine chaperonne impliquée dans l'assemblage et la stabilisation des deux chaînes de HLA-II et son transport) pour être transportées vers les endosomes. Dans les endosomes, la chaîne Ii est dégradée, des peptides temporaires appelés CLIP (Class II associated Invariant chain Peptides) sont toujours associés à la molécule jusqu'au démasquage du site où le peptide antigénique va venir se loger. Le complexe peptide/CMH-II stabilisé peut ainsi être exporté vers la membrane plasmique³¹⁰.

Le peptide ainsi présenté à la surface cellulaire des CPA par le CMH-II va pouvoir être reconnu par un LT CD4⁺ dit auxiliaire qui va informer d'autres effecteurs du système immunitaire de la présence de l'antigène.

1.3 La voie de présentation croisée

Les CPA sont capables de présenter des peptides issus d'antigènes exogènes dans des complexes peptides/CMH-I³¹¹. Ce mécanisme appelé « présentation croisée » permet aux CPA de présenter aux LT CD8⁺ des peptides issus des corps apoptotiques³¹², de cellules nécrotiques³¹³, de complexes immuns³¹⁴ ou encore d'exosomes³¹⁵ et ainsi d'induire une réponse cytotoxique contre ces antigènes. Ce type de présentation n'est pas réalisé par toutes les CPA, les cellules dendritiques CD8⁺ seraient les principales effectrices de ce mécanisme et ces cellules auraient une plus forte expression du CMH-I³¹⁶.

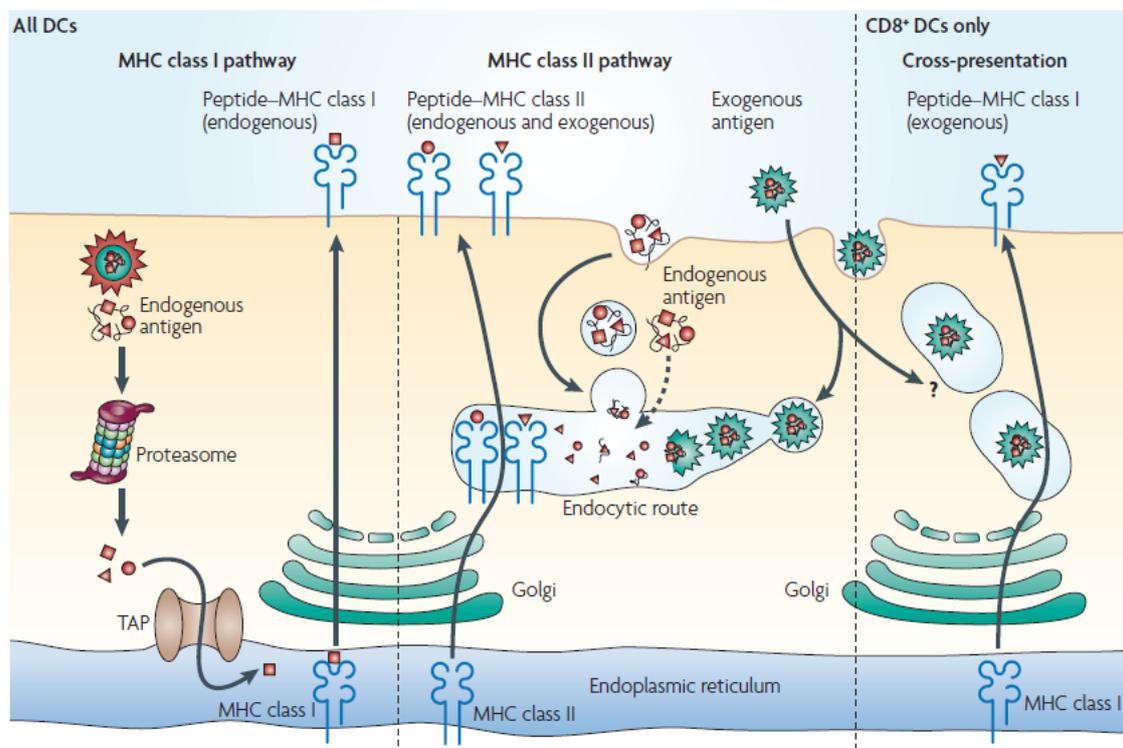


Figure 23 : Voies de présentation de l'antigène par les cellules dendritiques.

D'après Villadangos J. et Schnorrer P., Nature Reviews Immunology, 2007³¹⁶.

La voie classique de présentation des antigènes endogènes (MHC-I pathway) et la voie des antigènes exogènes (et parfois endogènes) (MHC-II pathway) sont réalisées par tous les types de cellules dendritiques. La présentation croisée (« cross-presentation ») est réalisée uniquement par une sous-population de cellules dendritiques qui sont CD8⁺ et concerne les antigènes exogènes.

Trois voies sont décrites pour la présentation croisée d'antigènes phagocytés :

- la voie cytosolique, où les antigènes sont transportés des phagosomes vers le cytosol par les protéines TAP, pour subir la voie de dégradation classique générant les peptides pour le CMH-I³¹⁷.
- la voie vacuolaire où les antigènes ne passent pas par la voie cytosolique mais sont dégradés par des enzymes protéolytiques³¹⁸.
- la voie dite du phagosome dans les DC et les macrophages. Ceci découlerait d'une fusion entre le RE et les phagosomes avec échange de matériel protéique mais ceci reste controversé^{319,320}.

Il est également intéressant de noter que « l'inverse » de la présentation croisée existe : des peptides issus de la dégradation de protéines endogènes peuvent être présentés avec le CMH-II.

1.4 Voie de présentation endogène par des molécules de classe II

Plusieurs études ont en effet montré que 20% des peptides présentés par les molécules de classe II sont issus de protéines endogènes³²¹. Ces protéines peuvent être d'origine cytosolique, nucléaire, mitochondriale ou membranaire. Plusieurs mécanismes seraient à l'origine de cette présentation dont le principal est l'autophagie³²².

La voie de l'autophagie permet d'importer des protéines cytosoliques du cytoplasme vers la membrane lysosomiale. Cette voie a été mise en cause pour la présentation d'auto-antigènes notamment³²³ mais est restreinte aux protéines ayant un signal d'adressage à la membrane lysosomiale.

Une autre voie également impliquée est celle de la macrophagie qui consiste en l'englobement de matériel cytosolique dans des autophagosomes qui vont ensuite fusionner avec les lysosomes. Cette voie a été mise en cause pour la présentation de peptides dérivés de protéines virales, du soi ou issus d'antigènes tumoraux³²⁴.

Enfin, en ce qui concerne les protéines sécrétées et transmembranaires, elles pourraient être traduites directement dans la lumière du RE pour s'associer ensuite avec les molécules HLA-II nouvellement synthétisées³²⁵.

2 Rôle des lymphocytes T dans la réponse anti-tumorale

Les LT jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire adaptative. Ils se différencient dans le thymus et acquièrent au cours de leur maturation, un récepteur spécifique du complexe CMH/peptide qui leur donnera leur spécificité.

Les CPA vont permettre la présentation d'antigènes tumoraux, sous forme de complexes HLA-peptide, aux LT naïfs qui vont ainsi être activés et différenciés en LT spécifiques de la tumeur, cytotoxiques CD8⁺ ou auxiliaires CD4⁺. Il est important de noter qu'à la fois les LT CD8⁺ et les LT CD4⁺ sont impliqués dans cette réponse anti-tumorale. En effet, les LT CD8⁺ (CTL) jouent un rôle essentiel dans l'initiation et le maintien d'une réponse immunitaire efficace de manière dépendante de la réponse auxiliaire CD4⁺ préalable.

2.1 Activation des lymphocytes T

Le récepteur à l'antigène de la cellule T (TCR) va permettre à cette cellule de reconnaître les antigènes présentés par les CPA sous forme de peptides liés au CMH. Ce sont les LT $\alpha\beta$ qui sont à l'origine de la réponse anti-tumorale.

Le TCR est un hétérodimère formé de deux chaînes glycopeptidiques : α et β . Chacune de ces chaînes est constituée de 2 domaines, dont la structure est très similaire à celle des Ig (voir chapitre 1) : un domaine variable et un domaine constant. De même, au niveau des régions variables se trouvent les régions variables CDR1 et CDR2 et hypervariable CDR3 à l'origine de la grande diversité de ces LT. Cette diversité est due aux réarrangements géniques et est à l'origine de ce que l'on appelle le répertoire T.

Le TCR est associé au complexe CD3, jouant un rôle important dans la transduction du signal. Selon le type de LT, Le complexe TCR/CD3 est associé à la protéine CD8 ou CD4, protéines membranaires qui vont interagir avec les complexes peptide/CMH, classe I pour CD8 et classe II pour CD4.

La signalisation déclenchée par l'engagement du TCR, appelée « premier signal », va permettre ensuite au LT de détecter continuellement la présence d'antigène. Cependant cela ne suffit pas pour induire l'activation fonctionnelle du LT. Il doit être poursuivi par un second signal délivré par les CPA grâce aux molécules de co-stimulation. Ceci va permettre la formation d'une synapse immunologique stable lors du contact entre le LT et la CPA, à l'origine de la prolongation de la signalisation par le TCR ³²⁶.

2.2 La réponse anti-tumorale

Les LT CD8⁺ sont les principaux effecteurs de la réponse anti-tumorale même si, comme nous l'avons déjà précisé, les LT CD4⁺ sont indispensables à l'efficacité de cette réponse. En effet, l'initiation de la réponse immunitaire anti-tumorale dépend de l'activation préalable de LT CD4⁺ par les CPA, qui vont permettre par la suite l'activation des CD8⁺ qui vont se différencier en cellules effectrices cytotoxiques : les CTL.

Les LT CD4⁺ sont également importants pour le maintien de la prolifération et des fonctions effectrices des CTL, notamment par la sécrétion de cytokines, et peuvent même activer directement les CTL³²⁷. Ces CTL, qui circulent dans l'organisme, vont pouvoir lyser les cellules tumorales présentant à leur surface les peptides associés aux molécules HLA-I. Pour cela, ils utilisent deux voies de cytotoxicité conduisant à la mort des cellules cibles : la voie perforine/granzyme et la voie de signalisation par les récepteurs de mort (notamment par la voie Fas/Fas Ligand).

La voie perforine/granzyme est une voie d'exocytose de granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes. Cette voie dépendante du calcium est induite après le contact entre la cellule tumorale et le CTL. La perforine va en fait créer des pores dans la membrane de la cellule cible et les granzymes, qui sont des sérine-protéases, vont pouvoir pénétrer dans la cellule et activer des voies apoptotiques conduisant à la mort de la cellule cible³²⁸.

Les CTL sont également capables d'induire la mort de la cellule cible par apoptose via les récepteurs de mort. Plusieurs récepteurs peuvent jouer un rôle dans cette cytotoxicité (TRAIL, DR3...) mais nous parlerons principalement de Fas. En effet, les CTL portent à leur surface le ligand de Fas (FasL) et les cellules cibles tumorales peuvent exprimer Fas. La liaison du ligand à son récepteur va permettre sa trimérisation pour former le complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) et induire l'apoptose de la cellule cible³²⁹.

3 Les antigènes de tumeurs

L'immunothérapie anti-cancéreuse a été documentée pour la première fois par William Coley en 1890 qui a observé des régressions tumorales suite à l'injection de lysats bactériens à des patients. Puis des anticorps et des lymphocytes spécifiques de tumeurs ont été mis en évidence dans le sang de patient et au sein de tumeurs³³⁰, et des antigènes exprimés par les cellules tumorales reconnus par le système immunitaire ont été identifiés : on parle d'antigènes associés aux tumeurs (TAA pour Tumor Associated Antigen).

Depuis, l'identification d'un nombre croissant de TAA grâce aux progrès des techniques et la meilleure compréhension du système immunitaire ont permis l'élaboration de plusieurs essais d'immunothérapie anticancéreuse, notamment dans le mélanome³³¹ (figure 24).

3.1 Identification de nouveaux antigènes de tumeurs

L'identification de nouveaux TAA n'aurait pas été possible sans les avancées technologiques de biologie moléculaire, biochimie et de génomique/protéomique (puces d'expression, spectrométrie de masse...) et le développement de modèles informatiques de prédiction d'épitopes³³². Classiquement, ces identifications sont basées sur l'analyse de la spécificité de LT spécifiques de tumeurs (analyse du répertoire T). Les premières identifications nécessitaient donc l'isolation de LT spécifiques des tumeurs chez des patients atteints de cancer (par exemple des LT infiltrant la tumeur, TIL) ou à la génération de tels LT *in vitro* avec des cellules tumorales.

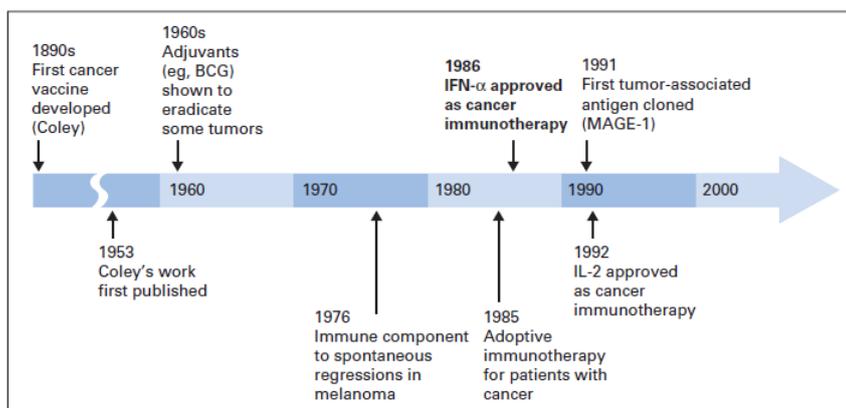


Figure 24 : Schéma chronologique du développement de l'immunothérapie anti-tumorale.

D'après Kirkwood et al., Journal of Clinical Oncology, 2008³³¹.

3.1.1 Approche biochimique

Cette approche a été mise au point par l'équipe de Hans-Georg Rammensee³³³. Elle nécessite l'obtention d'un clone T spécifique et l'identification du HLA restreignant la réponse. Les complexes HLA/peptide exprimés à la surface de la cellule tumorale sont immunoprécipités puis les peptides sont décrochés par une élution acide. Les peptides sont ensuite purifiés par HPLC, chargés sur des CPA et les peptides induisant une réponse sont séquencés en spectrométrie de masse.

Le premier antigène identifié par cette approche est l'antigène de différenciation mélanocytaire gp100³³⁴.

3.1.2 Approche génétique

Cette approche a été mise au point par l'équipe de Thierry Boon³³⁵ et permet d'identifier des antigènes de lignées tumorales reconnus par des LT CD8+. Plus récemment la méthode a été adaptée pour identifier des antigènes présentés par le HLA-II³³⁶.

Cette approche consiste à produire une banque d'ADN complémentaires (ADNc) à partir d'ARNm de cellules tumorales reconnues par un clone T. Cette banque est ensuite transfectée (sous forme de pools de 100 ADNc) conjointement à la molécule HLA restreignant le clone T dans des cellules d'intérêt (lignée ou CPA). La réponse du clone T est testée face à ces cellules transfectées et l'ADNc capable d'induire la réponse est isolé.

Cette technique a permis d'identifier l'antigène MAGE-1 dans le mélanome³³⁷.

3.1.3 Approche d'immunologie inverse

La majorité des épitopes connus à ce jour a été identifiée par cette approche. Cette technique est utilisée lorsqu'une protéine tumorale d'intérêt a été caractérisée et que l'on cherche à identifier une réponse immune contre cette protéine. Cette approche est basée sur la génération de LT *in vitro* par des peptides issus de cette protéine et sur la prédiction d'épitopes grâce à des modèles informatiques (BIMAS, SYFPEITHI...) faisant intervenir des algorithmes mathématiques.

L'inconvénient majeur de cette stratégie est de sélectionner des peptides qui ne sont pas naturellement présentés par les cellules tumorales et donc ne seront pas ciblés par une immunothérapie³³⁸. Il est donc indispensable de s'assurer que les LT spécifiques du peptide sont bien réactifs à la tumeur.

3.1.4 Approche sérologique (SEREX)

Les techniques d'interrogation de la réponse immune par SEREX (Serological identification of antigens by Recombinant Expression cloning) ont été développées et se basent sur l'identification de peptides reconnus par des anticorps présents dans le sang de patients atteints de cancer³³⁹.

Elle consiste à établir une banque d'ADNc à partir de la lignée tumorale, à exprimer cette banque dans des bactéries puis à cribler l'expression des protéines recombinantes avec le sérum du patient. Cette approche permet d'identifier des antigènes induisant une réponse humorale et cellulaire. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle n'est utilisable que dans le cas de titres élevés en anticorps dans le sérum.

3.2 Classification des antigènes de tumeurs

Les antigènes de tumeur sont divisés en plusieurs catégories³³² et certains de ces antigènes sont référencés dans le tableau ci-dessous (tableau 4) :

- les antigènes mutés, présents uniquement sur les cellules tumorales. Des mutations et/ou délétions au niveau de l'ADN ou des réarrangements chromosomiques sont à l'origine des ces protéines mutées/de fusion particulièrement immunogènes.
- les antigènes surexprimés sont des protéines normales du soi dont l'expression est augmentée dans les tumeurs.
- les antigènes de différenciation qui correspondent à des antigènes partagés par les cellules saines et les cellules tumorales dont elles dérivent (« tissu spécifique »).
- les antigènes « cancer testis » normalement exprimés dans les cellules germinales testiculaires ou les trophoblastes placentaires et retrouvés dans les cellules tumorales.
- les antigènes issus de tumeurs viro-induites par le virus de l'EBV et de l'HPV notamment.

gène/protéine	tumeur	référence
antigènes mutés ou protéines issues de transcrits de fusion		
MART-2	mélanome	Kawakami et al.
MUM-1	mélanome	Coulie et al.
Bcr/Abl	leucémie myéloïde	Wagner et al.
antigènes surexprimés		
HER-2/Neu	mélanome, cancer du sein et de l'ovaire	Fisk et al.
PSMA	cancer de la prostate	Corman et al.
p53	cancers "digestifs"	Umano et al.
antigènes "cancer-testis"		
CAMEL	mélanome	Aarnoudse et al.
MAGE-A1	mélanome	Traversari et al.
NY-ESO1	mélanome	Jäger et al.
antigènes de différenciation		
Ep-CAM	adénocarcinome	Nagorsen et al.
Gp100	mélanome	Bakker et al.
Melan-A/MART-1	mélanome	Coulie et al.
antigènes viraux		
EBV	lymphomes de Burkitt	Moss et al.
HPV	cancer du col de l'utérus	Hessing et al.

Tableau 4 : Exemples d'antigènes tumoraux humains pour les différentes catégories.

Ces antigènes dits endogènes vont être majoritairement associés au CMH-I par la voie classique d'apprêtement des antigènes et reconnus par les LT CD8⁺ induisant une réponse cytotoxique, puisque les cellules dont ils sont issus expriment le CMH-I. Mais certains épitopes de ces antigènes peuvent être reconnus par les CPA, associés au CMH-II et ainsi présentés aux LT CD4⁺ induisant une réponse auxiliaire ; et également certaines tumeurs, notamment les mélanomes et les cancers rénaux, expriment de manière anormale le CMH-II et vont ainsi pouvoir interagir directement avec les LT CD4⁺ ³⁴⁰.

4 Immunothérapie passive

L'immunothérapie passive comprend l'utilisation des anticorps monoclonaux dans le traitement des cancers et le transfert adoptif de LT spécifiques de tumeurs.

Nous ne reviendrons pas sur les anticorps monoclonaux, mais depuis le concept de Paul Erlich et les avancées technologiques, de nombreux anticorps spécifiques d'antigènes de tumeurs ont été développés. D'une part les anticorps conjugués à des isotopes radioactifs ou à des chimiothérapies ont fait largement leur preuve dans le traitement des hémopathies (par exemple le Rituximab ciblant CD20...). D'autre part, les anticorps non conjugués ciblant des récepteurs à des facteurs de croissance sont très utilisés dans le traitement des cancers non-hématologiques (par exemple le Trastuzumab ciblant HER2 pour Human Epidermal growth factor Receptor 2)⁸⁴.

Concernant le transfert adoptif de LT, cette approche consiste à sélectionner des LT réactifs à la tumeur, à les amplifier *in vitro* et à les réinjecter au patient³⁴¹. L'avantage de cette stratégie est qu'elle permet d'isoler les LT potentiellement réactifs contre la tumeur et de les amplifier afin d'obtenir une fonction anti-tumorale efficace. Ce type de stratégie a été initié dans le traitement des leucémies en rechute et des lymphomes associés à l'EBV³⁴² et dans le traitement des cancers métastatiques tels que les mélanomes³⁴³.

4.1 Transfert adoptif de lymphocytes infiltrant la tumeur

Il est connu que les TIL peuvent reconnaître les cellules tumorales de façon restreinte par le CMH³⁴⁴. Ces TIL sont rapidement obtenus à partir de métastases et leur amplification *in vitro* est possible. L'avantage de cette stratégie est qu'elle ne nécessite pas l'identification préalable d'antigènes de tumeur.

Une première étude dans le mélanome a été publiée en 1988³⁴⁵ et complétée en 1994³⁴⁶. Une autre étude, datant également de 1988, a utilisé les TIL pour le traitement de différents cancers de stade avancé³⁴⁷. Mais lors de ces essais, la capacité de reconnaissance de la tumeur par les TIL n'était pas évaluée. Des analyses rétrospectives ont montré une corrélation entre l'injection de TIL réactifs au mélanome autologue et la réponse clinique³⁴⁸. La capacité de migration de ces TIL au sein de la tumeur a pu être évaluée³⁴⁹, néanmoins la persistance de ces TIL en périphérie était extrêmement faible³⁵⁰.

Une étude très récente reporte la mise au point d'une nouvelle technique de culture de ces TIL *in vitro*, basée sur l'observation de meilleures réponses cliniques lorsque les TIL sont cultivés sur de courtes périodes. L'utilisation de ces TIL « jeunes » non sélectionnés et peu

cultivés a montré des résultats préliminaires convaincants, laissant envisager un avenir plutôt prometteur de cette stratégie ³⁵¹.

4.2 Transfert adoptif de lymphocytes spécifiques d'un complexe HLA/peptide

L'identification de nombreux antigènes tumoraux reconnus par les LT a permis le développement de stratégies de transfert adoptif de LT ciblant des antigènes spécifiques. Cette approche permet d'injecter un grand nombre de LT spécifiques générés par stimulation avec un peptide spécifique de l'antigène à cibler, et restreint pour un HLA.

Dans un premier temps, des clones de LT CD8⁺ spécifiques ont été injectés à des patients notamment dans le traitement du mélanome ^{352,353}. Les résultats de ces études montrent que ce type d'immunothérapie est réalisable dans le mélanome sans risque majeur pour le patient. Le rôle des LT CD4⁺ étant central, leur activité anti-tumorale directe et indirecte doit être utilisée pour améliorer les essais cliniques d'immunothérapie ³⁵⁴. Par exemple dans le cancer de l'ovaire, les LT CD4⁺ pourraient induire une réponse anti-tumorale ³⁵⁵. Une étude clinique dans le mélanome a montré une rémission prolongée chez un patient traité par un clone T CD4⁺ spécifique de l'antigène NY-ESO-1 ³⁵⁶. Ce résultat encourageant doit cependant être confirmé sur un nombre de patients plus important. Egalement des résultats préliminaires utilisant des peptides spécifiques de la survivine ont montré une réponse T CD4⁺ chez des patients atteints de différents cancers ³⁵⁷.

Un inconvénient majeur de cette stratégie réside principalement dans l'étape d'amplification *in vitro* des cellules. De plus, cette réponse cible généralement soit la voie CD8 soit la voie CD4. L'injection conjointe de clones CD8⁺ et CD4⁺ pourrait améliorer les résultats cliniques de ce type d'approche.

De plus le transfert adoptif de TIL associée à une lymphodéplétion des patients atteints de mélanome montre les meilleurs résultats rapportés avec ce type d'approche et pourrait être généralisé à d'autres types de cancers ³⁵⁸⁻³⁶⁰.

4.3 TCR transgéniques

Un LT (CD8⁺ ou CD4⁺) est spécifique d'un antigène grâce à son TCR qui possède deux chaînes : α et β . Les premières expériences de TCR transgéniques ont été effectuées dans le but de mieux comprendre la biologie du TCR ³⁶¹. Ensuite, l'impossibilité d'obtenir des TIL en grande quantité et fortement réactifs à la tumeur chez certains patients, a conduit l'équipe de Rosenberg à développer un modèle de transgénèse de cellules avec le TCR spécifique d'un

complexe peptide/HLA d'un antigène de mélanome. L'essai clinique qui en découle a permis de montrer la faisabilité d'une telle approche. Les lymphocytes injectés ont persisté plusieurs mois *in vivo* avec expression du transgène mais la fonctionnalité des LT CD8⁺ génétiquement modifiés n'a pas été évaluée ³⁶².

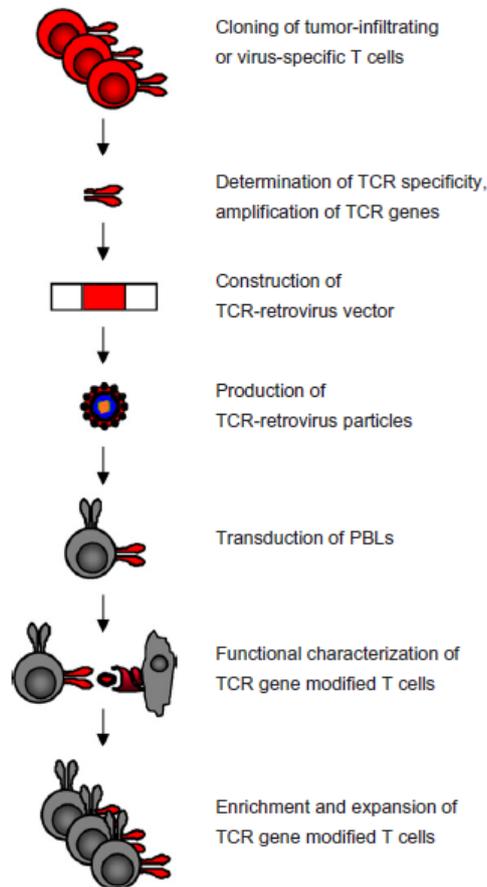


Figure 25 : Génération de LT spécifiques d'un antigène par transfert de TCR.

D'après Engels B and Uckert W, Molecular Aspect of Medecine, 2007 ³⁶³.

Cette étude a également permis de mettre en évidence certains obstacles à l'utilisation de ce type de transgènes, tel que l'appariement des chaînes α et β du transgène avec les chaînes natives du TCR. Des modifications de la conformation ou de la séquence des chaînes α et β permettent d'optimiser les TCR transgéniques. De plus il est important de sélectionner un TCR de forte avidité et de forte affinité. En ce qui concerne l'affinité, le problème est que les TCR trop affins sont détruits par sélection négative (afin de prévenir l'auto-immunité). L'utilisation de souris transgéniques pour le HLA pour générer des TCR spécifiques ou la mutagenèse *in vitro* du TCR permettent de remédier à ce problème ³⁶¹. Cette approche est applicable à de nombreux cancers, la seule limite reste l'identification d'antigènes immunogènes.

5 Immunothérapie active

Cette approche encore appelée « vaccination anti-tumorale » a pour objectif de stimuler le système immunitaire *in vivo*, par l'injection d'antigènes de tumeur sous différentes formes, dans le but d'éliminer la tumeur. Différentes stratégies ont été développées et les vaccins peuvent cibler un ou plusieurs antigènes ³⁶⁴.

5.1 Vaccination peptidique

La stratégie la plus communément utilisée est la vaccination peptidique utilisant des peptides immuno-dominants et sous-dominants (issus d'antigènes tumoraux) restreints pour un HLA particulier. Il est relativement aisé de faire synthétiser de grandes quantités de peptide de grade clinique et les séquences peptidiques peuvent être modifiées facilement, contrairement à la protéine. De plus, cette approche est beaucoup moins lourde et mieux tolérée par les patients que d'autres, mais il existe également des inconvénients. Premièrement, puisque les gènes codant pour les molécules du HLA sont très polymorphes, seuls les patients exprimant ce HLA seront ciblés par ce type de vaccination. Il est donc important d'identifier des épitopes capables de se lier sur un grand nombre de molécules HLA. Ensuite, la réponse immune induite restreinte à un épitope (représentée par le peptide utilisé pour l'immunisation) peut s'avérer insuffisante, l'ensemble des patients ne répondant pas au traitement. En effet, les premiers essais cliniques utilisant des peptides de classe I réalisés dans le mélanome, n'ont pas donné les résultats escomptés : aucun bénéfice clinique n'était observé malgré la présence de réponses CTL spécifiques ³⁶⁵. D'autres essais dans d'autres types de cancers ont été réalisés mais les réponses immunitaires induites sont rarement corrélées avec des bénéfices cliniques. Une hypothèse serait l'induction d'une tolérance des CTL spécifiques vis-à-vis de l'antigène représenté par un seul peptide. Afin de remédier à cela, des essais ont été réalisés avec de multiples peptides ³⁶⁶. Des essais ont également été développés avec des peptides classe I et II, afin d'activer aussi la voie auxiliaire par les CD4⁺ ou encore avec des peptides (courts ou longs) contenant à la fois un épitope T CD8⁺ et CD4⁺ ^{367,368}. Une étude intéressante a utilisé des peptides spécifiques de la zone de jonction de la protéine de fusion Bcr/abl afin de traiter des patients atteints de leucémie myéloïde chronique ³⁶⁹. Plusieurs peptides ont été utilisés, à la fois classe I et II mais les résultats cliniques n'ont pas été concluants. Une étude clinique de phase II utilisant le même principe a montré une réduction du nombre de transcrits Bcr/abl et une réponse clinique

moléculaire transitoire chez certains patients ³⁷⁰. Enfin, la longévité des complexes HLA-peptide *in vivo* n'est pas connue et l'affinité des peptides varie, ce qui peut affecter leur immunogénicité ³⁶⁴. Une alternative serait d'augmenter l'expression *in situ* de ces peptides antigéniques (protéine totale, ADN...).

5.2 Vaccins à base de protéines

L'utilisation d'antigène sous forme protéique présente l'avantage d'une immunisation avec plusieurs épitopes, sans contrainte de restriction HLA. Les DC vont présenter l'antigène choisi et ainsi les LT CD4⁺ et CD8⁺ sont activés. Peu d'essais cliniques sont répertoriés à l'heure actuelle ^{371,372}.

5.3 Vaccins à base d'ADN

Cette approche consiste à injecter des séquences d'ADN codant pour l'antigène tumoral d'intérêt en intramusculaire. L'ADN va ainsi être pris en charge localement (par les cellules musculaires ou les fibroblastes) et va permettre l'expression de la protéine d'intérêt dont l'expression serait prolongée, favorisant ainsi la réponse immunitaire. Ces sont les DC qui localement au niveau du site d'injection vont capter l'antigène puis le dégrader et le présenter aux LT dans les ganglions. L'inconvénient de cette approche est la faible immunogénicité de l'ADN nu chez l'homme comparé à chez la souris. Une alternative serait d'augmenter la dose d'ADN plasmidique, inclure la co-expression de molécules stimulatrices ou d'adjuvants moléculaires ³⁷³ ou encore améliorer les techniques d'injection et la transfection de cellules *in vivo*.

5.4 Vaccins utilisant des cellules

5.4.1 Utilisation de cellules tumorales

Une stratégie permettant de cibler le plus grand nombre d'antigènes possibles utilise des cellules tumorales totales irradiées ou des lysats cellulaires issus de cellules tumorales autologues ou allogéniques. L'avantage de cette approche est qu'elle permet de stimuler un vaste répertoire antigénique sans avoir à définir quels sont les antigènes qui induiraient la meilleure réponse anti-tumorale. De plus, les cellules tumorales sont une source d'antigènes contenant des épitopes à la fois pour les LT CD8⁺ cytotoxiques et pour les LT CD4⁺ helper. La présentation par les deux classes de CMH est importante pour la réponse anti-tumorale

globale et pour la génération de LT CD8⁺ mémoires via l'aide des CD4⁺ ³⁶⁴. Cette stratégie permet également de s'affranchir de la restriction HLA. Les premiers essais utilisant cette stratégie ont montré l'induction de réponses immunitaires chez des patients porteurs de mélanome ^{374,375} mais des essais plus récents sur un plus grand nombre de patients n'ont pas montré de bénéfices cliniques ^{376,377}.

5.4.2 Utilisation de cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont les CPA les plus efficaces du système immunitaire. La présentation des antigènes aux LT étant essentielle dans l'induction de la réponse anti-tumorale, l'utilisation d'une vaccination avec des cellules dendritiques semblait une stratégie prometteuse ³⁷⁸. Grâce au développement de la production en grande quantité de cellules dendritiques à partir de monocytes, des essais cliniques de vaccination utilisant ces cellules ont été possibles. Le premier essai a été réalisé en 1998 dans le cadre du traitement de mélanomes et les résultats obtenus paraissaient prometteurs ³⁷⁹. Les cellules dendritiques étaient soit chargées avec des peptides restreints pour un HLA soit chargées avec le lysat de la tumeur. Ensuite une autre étude utilisant uniquement des cellules dendritiques maturées avec le lysat tumoral autologue a montré une réponse complète chez certains patients ³⁸⁰. Avec plus de recul, d'autres essais de vaccination avec plus de patients ont montré peu ou pas de réponses cliniques objectives mais certaines ont mis en évidence une diminution de la progression tumorale quand une réponse contre plusieurs antigènes était observée ³⁸¹.

Rationnel de la thèse

Une des thématiques du laboratoire portait sur la modulation de l'alloréactivité après greffe de CSH par une approche de thérapie génique « gène suicide », afin de conserver uniquement les effets bénéfiques de la greffe de CSH et de s'affranchir, principalement, de la GvHD. Le gène de susceptibilité HSV-tk avait été utilisé au laboratoire pour transduire des LT et ainsi cibler spécifiquement ces cellules en cas de survenue de GvHD, mais ce modèle a montré ces limites. Afin d'optimiser cette approche, un autre modèle proposé au départ par Introna *et al.*²³⁴, a été étudié au sein de notre laboratoire. Ce modèle utilise les propriétés de la molécule CD20. En effet en tant que protéine membranaire exprimée par les LB, elle permet un tri magnétique des cellules T génétiquement modifiées (n'exprimant pas CD20); de plus elle est la cible d'un anticorps monoclonal, le RTX, permettant la lyse des cellules exprimant cet antigène.

A partir de cette thématique de l'utilisation du système CD20/RTX en thérapie génique, nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés à l'existence d'une population de LT exprimant la molécule CD20. En effet, la molécule CD20 normalement exprimée sur les LB, a été décrite, par quelques équipes seulement, comme étant présente sur un petit contingent de LT²³⁹. Nous avons donc étudié ces LT exprimant CD20 afin de caractériser cette population et déterminer à quel point elle pouvait interférer avec l'approche de thérapie génique. Cette population de LT CD3⁺CD20⁺ a été mise en évidence uniquement par cytométrie en flux chez des donneurs sains et quelques cas de leucémies CD3⁺CD20⁺ avaient été décrits dans la littérature^{241,242,382}.

Des résultats préliminaires au sein du laboratoire, avaient laissé suggérer que cette population n'en était peut-être pas une mais pouvait être un artefact technique observé en cytométrie en flux ; c'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser d'autres techniques afin de valider l'existence de cette population. Ces résultats ont fait l'objet d'un commentaire suite à la publication de Wilk *et al.*, Depletion of functionally active CD20⁺ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(12): p. 3563-71.

Dans un deuxième temps, afin d'établir des constructions vectorologiques (rétrovirales et lentivirales) avec le gène CD20 pour développer cette nouvelle approche gène suicide, un épissage alternatif de ce gène a été mis en évidence au laboratoire (nommé Δ CD20). C'est la première description de cet épissage alternatif du gène CD20. Celui-ci a été mis en évidence lors de l'amplification par PCR de la séquence codante (CDS) du gène CD20 à partir d'une lignée cellulaire lymphocytaire B, aboutissant à un produit de PCR de taille inattendue. Par

séquençage, il a été montré que le produit de cet épissage correspondait au gène CD20 mais avec une perte de 501 paires de bases (pb). Les sites caractéristiques d'un épissage alternatif ont été mis en évidence (site accepteur, site donneur et site de branchement) par des logiciels de prédiction des sites d'épissage et correspondaient bien au cadre de lecture du transcrit tronqué. Le cadre de lecture étant conservé suite à cet épissage, cela laissait envisager l'existence d'une protéine codée par cet ARNm tronqué.

Cet ARNm a ensuite été mis en évidence dans toutes les lignées lymphocytaires B dont nous disposions au laboratoire, mais pas dans les LB issus de donneurs sains (triés ou non, CD19⁺ ou CD20⁺). Nous nous sommes ensuite posé la question de l'impact de ce transcrit alternatif sur la transformation maligne.

Le travail rapporté dans cette thèse consiste donc en la caractérisation de cet ARNm Δ CD20 et en la mise en évidence de la protéine codée par cet ARNm. CD20 étant la cible du traitement par RTX, il était également intéressant d'évaluer l'impact de la présence de cet ARNm dans le cas de résistances au traitement, ceci *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats sont présentés dans la partie suivante sous la forme d'un article publié dans la revue *Blood* en 2010. L'originalité de cette découverte a permis également la publication d'un brevet en 2008 (N° FR08.06444), précocement dans l'avancement des travaux. Ce brevet contient la séquence modifiée au niveau du site d'épissage du gène CD20 sauvage (ne produisant plus de transcrit alternatif) et potentiellement utilisable dans les approches de thérapie génique ; les séquences des peptides chevauchant la zone de fusion et potentiellement immunogènes pour induire une réponse cytotoxique T et enfin les séquences des primers utilisables dans un essai de PCR quantitative en temps réel (quantification du transcrit alternatif dans le but de développer un test moléculaire).

La dernière partie des résultats concerne des données non publiées présentant une approche d'immunothérapie anti-tumorale ciblant la protéine Δ CD20. Cette protéine étant plus exprimée dans les hémopathies B et potentiellement impliquée dans les résistances au traitement par RTX, il nous a semblé intéressant de générer des LT spécifiques de Δ CD20 afin de les utiliser, à plus long terme, dans l'amélioration du traitement des patients réfractaires au traitement par RTX et/ou en rechute.

RESULTATS

Données publiées

Article 1

CD3⁺CD20⁺ cells may be an artifact of flow cytometry: comment on the article by Wilk et al.

Carole Henry, Abdulraouf Ramadan, Nicolas Montcuquet, Jean-René Pallandre,
Patricia Mercier-Letondal, Marina Deschamps, Pierre Tiberghien, Christophe
Ferrand, Eric Robinet.

Arthritis Rheum. 2010 Aug;62(8):2561-3

Résumé

Ce commentaire fait part d'observations concernant l'existence d'une population de LT CD3⁺CD20⁺ et fait suite à la publication de Wilk *et al.* ²⁴⁵.

Des travaux préliminaires au laboratoire avaient, comme dans la littérature, mis en évidence un faible pourcentage de cellules exprimant CD3 et CD20 chez les donneurs sains. Afin de mieux caractériser ces cellules, différentes expériences ont été réalisées et n'avaient pu aboutir concernant l'isolation, par tri immuno-magnétique ou par cytométrie en flux, de cette population de LT. Nous nous sommes donc intéressés à l'existence réelle de cette population.

Une étude de Wilk *et al.* a été publiée très récemment. Les auteurs ont mis en évidence cette population de LT chez les donneurs sains (dans le sang mais aussi à la périphérie) et ont montré la déplétion de cette population lors du traitement par RTX, chez des patients atteints de différentes pathologies. Ils se sont plus particulièrement intéressés à une pathologie : l'arthrite rhumatoïde et à l'implication de la population de LT CD20⁺ dans cette pathologie, suite à l'observation d'une population plus importante de ces LT dans le liquide synovial. Pour cela, différents points, phénotypiques et fonctionnels, ont été étudiés.

Certains points de divergence entre nos résultats et cette étude nous ont amené à commenter cet article. En effet, nous avons étudié la présence de doublets en cytométrie en flux, essayé de mettre en évidence ces cellules doublement positives par microscopie confocale et réalisé des expériences de dissociation (mécanique, chimique et enzymatique). Tous les résultats que nous avons obtenus sont en faveur de la présence de doublets de LB-LT pouvant correspondre à cette population.

However, the finding in our data set that higher MTXGlu₃₋₅ concentrations were not associated with lower DAS scores is more convincing than the summary comparison between the two centers shown in Dervieux and Kremer's Figure 1.

As noted by Dervieux and Kremer, we have previously shown that concomitant prednisone therapy increases MTXGlu₃₋₅ concentrations (3). While we agree that this may partly explain the proportion of patients with higher MTXGlu concentrations in our cohort, we would not want to over interpret this association when so many other variables may have an influence.

We agree that responses to MTX may differ early in the disease course, compared with its effects in those with longstanding disease or in those who have been receiving MTX for a prolonged period. As such, we noted in the title of our article that our cohort reflected patients who had received long-term MTX therapy. We suspect that there is an MTX-resistant RA population and that our cohort may have contained a significant proportion of such patients, but perhaps no more than might be expected in everyday practice. The best way to determine the relationship between MTXGlu_n concentrations and disease activity, and the clinical utility of measuring MTXGlu concentrations early in the course of MTX therapy, would be to undertake a long-term prospective clinical trial. Such a trial may be difficult, given the time required for MTXGlu_n to reach steady state, the quest for rapid disease control, and the tendency for rapid dosage escalation of MTX in RA patients.

We acknowledge that uncertainty remains in what is a complex nonlinear relationship between the effectiveness of methotrexate, the genetics of its metabolism and elimination, the role of folate supplementation, and the heterogeneous nature of the disease process. It is hoped that further investigation will clarify these matters and the clinical utility of measuring MTXGlu_n will be better defined. Unfortunately, we have not yet reached that point.

Lisa K. Stamp, FRACP, PhD
Murray L. Barclay, FRACP, MD
*University of Otago
and Christchurch Hospital*
John L. O'Donnell, FRACP, FRCPA
Peter T. Chapman, FRACP, MD
Christchurch Hospital
Christopher Frampton, PhD
*University of Otago
Christchurch, New Zealand*

1. Brooks AJ, Begg EJ, Zhang M, Frampton CM, Barclay ML. Red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in inflammatory bowel disease. *Ther Drug Monit* 2007;29:619-25
2. Prevo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44-8.
3. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, James J, Frampton CM, et al. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in patients with rheumatoid arthritis receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 2009; 60:2248-56

DOI 10.1002/art.27553

Ischemic heart disease and rheumatoid arthritis: comment on the article by Holmqvist et al

To the Editor:

We would like to clarify a statement quoted in the report by Holmqvist et al (Holmqvist ME, Wedren S, Jacobsson LT, Klareskog L, Nyberg F, Rantapaa-Dahlqvist S, et al. No increased occurrence of ischemic heart disease prior to the onset of rheumatoid arthritis: results from two Swedish population-based rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum* 2009;60:2861-9) describing the rheumatoid arthritis (RA) cohort from the Mayo Clinic. Holmqvist and colleagues state that the Mayo Clinic group assessed ischemic heart disease events occurring prior to fulfillment of the American College of Rheumatology (ACR) criteria in a cohort in which the majority of the patients, at the time of fulfillment of the ACR criteria, already had clinical disease for a considerable period of time.

This statement is incorrect. In fact, in our cohort of 603 incident RA patients, the time from the first patient-reported joint swelling (>1 swollen joint) to meeting the ACR criteria was less than a week in 69% of the patients (median <1 day). Eighty-nine percent met criteria within 6 months and 94% met criteria within 18 months of the first patient-reported joint swelling. Thus, patients in our cohort were identified early in their disease course, very similar to those in the Swedish Early Arthritis Register.

We appreciate the opportunity to offer this clarification regarding our cohort.

Sherine E. Gabriel, MD, MSc
Cynthia S. Crowson, MS
*Mayo Clinic College of Medicine
Rochester, MN*

DOI 10.1002/art.27556

Reply

To the Editor:

We are happy to learn that there is information about the duration of symptoms at the time of RA diagnosis in the cohort from the Mayo Clinic. With this information at hand, it is evident that the Mayo Clinic RA cohort is more similar to our early RA cohort in terms of the duration of symptoms at diagnosis than we had previously understood and that it also might be possible to assess cardiovascular risks in relation to the onset of RA symptoms.

Dr. Askling has received consultancies, speaking fees, and/or honoraria from Bristol-Myers Squibb and Wyeth (less than \$10,000 each).

Marie Holmqvist, MD
Karolinska Institutet
Johan Askling, MD, PhD
*Karolinska Institutet
and Karolinska University Hospital
Stockholm, Sweden*

DOI 10.1002/art.27527

CD3+CD20+ cells may be an artifact of flow cytometry: comment on the article by Wilk et al

To the Editor:

Wilk et al recently reported findings suggesting that rituximab treatment in rheumatoid arthritis is associated with

depletion of a small T cell subset expressing the CD20 B cell marker (1). Expression of the CD20 molecule by leukemic T cells has been demonstrated by immunohistochemistry (2–6), raising the question of whether these leukemic cells resulted from abnormal expression occurring during the malignant transformation process, or whether they resulted from the transformation of a small CD20+ T cell subset existing at a normal state. Several flow cytometry-based studies have shown the existence of a small compartment of CD3+CD20+ cells in normal donors (2,7,8). We became interested in using CD20 as a transgene to combine the selection and suicide gene functions (9–11), and thus we wished to determine the extent to which this small T cell subset could interfere with the suicide gene transfer approach. Accordingly, we sought to phenotypically and functionally characterize this T cell subset.

We first characterized the phenotype of these T cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 28 normal donors (mean \pm SEM age 44.6 ± 8.3 years [range

28–58]) and found, consistent with the reports by Wilk et al (1) and others (2,7,8), that CD3+CD20+ cells were present in the peripheral blood of normal donors, at frequencies ranging from 0.11% to 5.7% in our study (mean \pm SEM $2.2\% \pm 0.4\%$), with no correlation with donor age. Using samples from 10 normal donors, we compared the marker frequencies of such CD3+CD20+ cells with those of conventional CD3+CD20– cells. We observed significantly fewer CD8+CD4– cells ($15.0 \pm 1.8\%$ versus $30.8 \pm 2.2\%$; $P < 0.001$) in this small cell population, as well as significantly higher frequencies of both CD8+CD4+ cells ($9.1 \pm 2.4\%$ versus $2.4 \pm 0.4\%$; $P = 0.02$) and CD8–CD4– cells ($17.7 \pm 5.6\%$ versus $6.1 \pm 1.2\%$; $P = 0.03$). The frequency of CD8–CD4+ cells was not significantly different between CD3+CD20+ cells and CD3+CD20– cells ($58.2 \pm 4.9\%$ and $60.7 \pm 2.5\%$, respectively). CD3+CD20+ cells were also found to coexpress the CD19 B cell marker (Figure 1A).

Concerns regarding the nature of CD3+CD20+ cells

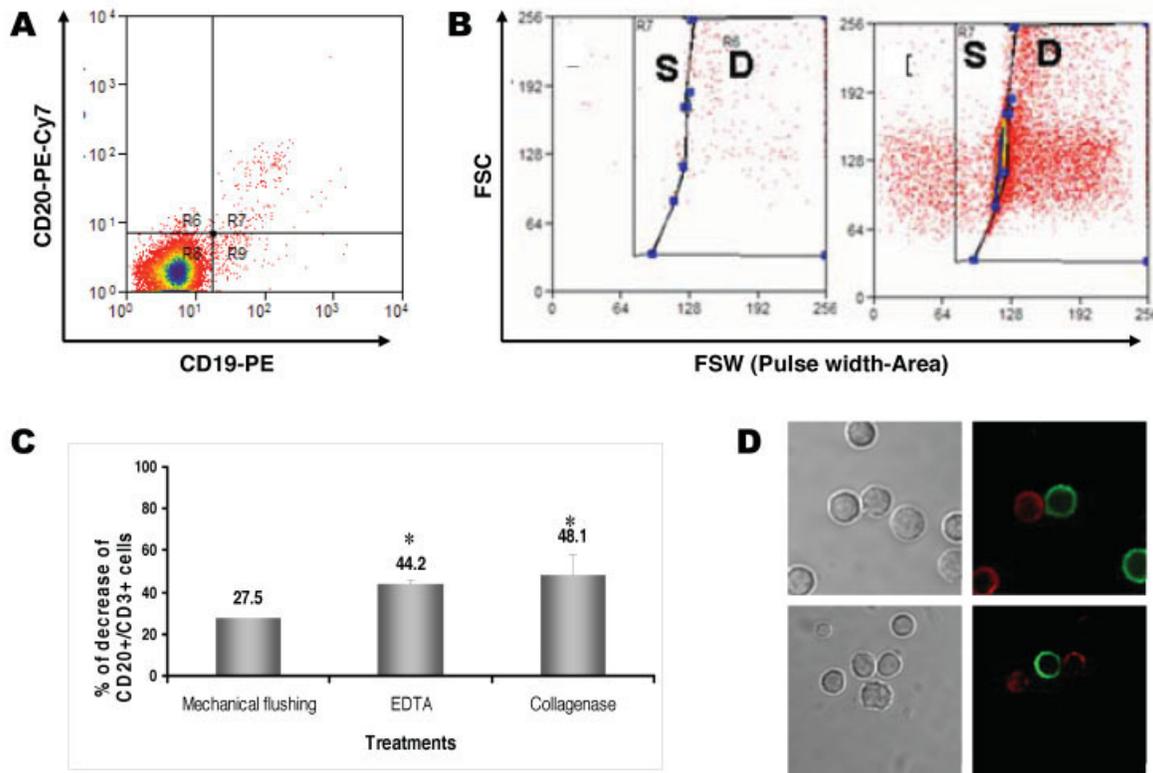


Figure 1. A, Coexpression of CD19 and CD20 by CD3+CD20+ cells. CD3/CD19/CD20 triple staining was performed on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and CD19/CD20 expression was analyzed by flow cytometry on gated CD3+ events. Data are from 1 representative donor of 15. PE = phycoerythrin. B, Flow cytometry dot plots (forward side pulse width [FSW] against forward side channel [FSC]) of CD3+CD20+ (left) and CD3+CD20– (right) events. The percentage of events in gate D (double cells) was 87% for CD3+CD20+ cells and 20% for CD3+CD20– cells. Gate S = single cells. Data are from 1 representative donor of 28. C, Percent decrease of CD3+CD20+ cells after different treatments. PBMCs from healthy donors were stained with fluorescent anti-CD3 and anti-CD20 monoclonal antibodies (mAb) (CD3-PC7; Beckman Coulter and CD20-APC; BD Biosciences) before and after mechanical, chemical, or enzymatic treatments, e.g., flushing through an 18-gauge syringe needle, EDTA treatment (2 mM, 15 minutes at 4°C), or collagenase treatment (30 minutes at 37°C). Values are the mean and SEM of 6 independent experiments. * = $P < 0.005$ versus untreated cells. D, Confocal microscopy illustrating double B and T cell associations. Staining was performed with anti-CD3 (red dye) and anti-CD20 (green dye) mAb. Results are from 1 representative donor of 3.

came from the fact that their cloning or expansion, after PBMC activation with soluble CD3 or CD3/CD28 monoclonal antibodies (mAb) in the presence of interleukin-2, was unsuccessful. Thus, we attempted to purify CD3+CD20+ cells before expansion, using various techniques. First, we tried to negatively select T cells by incubating PBMCs with a cocktail of antiglycophorin, CD14, CD16, CD56, and either CD19 mAb or biotinylated anti-human Ig mAb and antibiotin antibody, followed by Dextran magnetic beads. This negative T cell selection was followed by positive CD20 selection (StemSep; Stem-Cell Technologies) of the T cell fraction. We also performed Multisort positive selection assays (Miltenyi Biotec) targeting CD3+ cells, followed by positive selection of CD20+ cells. Finally, we tried to sort CD3+CD20+ cells by flow cytometry. All of these approaches were unsuccessful.

In fact, several independent observations support the possibility that CD3+CD20+ cells are flow cytometry artifacts resulting from cell doublets. First, when T cells were negatively sorted with a CD14, CD16, CD56, antiglycophorin, and anti-human Ig antibody cocktail, the CD3+CD20+ cells (median 1.5% [range 0.5–2.5%] of CD3+ cells in PBMCs, $n = 4$) were slightly enriched in the CD3- fraction (median 3.1% [range 0.5–3.2%]), but were strongly depleted in the CD3+ fraction (median 0.11% [range 0.06–0.13%]), possibly because they had been retained in the CD3- fraction by the anti-human Ig antibodies. Similar results were obtained with an antibody cocktail containing a CD19 mAb instead of an anti-Ig antibody.

Second, when PBMCs were gated on the basis of forward side channel (FSC) versus forward side pulse width in order to separate single cells from cell doublets, 87% of CD20+ T cells were identified as doublets, versus 20% of CD20- T cells (Figure 1B). Interestingly, the CD3+CD20+ cells were found by flow cytometry to be significantly ($P < 10^{-8}$ by paired *t*-test) larger than conventional T cells (CD3+CD20-) or B cells (CD3-CD20+), as evaluated by their mean FSC values (mean \pm SEM mean fluorescence intensity 157.7 ± 36.5 , 116.4 ± 16.5 , and 114.4 ± 16.8 for CD3+CD20+, CD3-CD20+, and CD3+CD20- cells, respectively).

Third, minimizing cell aggregation through mechanical flushing or chemical (EDTA) or enzymatic (collagenase) treatment of healthy donor PBMCs ($n = 6$) induced a decrease in the percentage of CD3+CD20+ cells (Figure 1C).

Fourth, we were unable to directly identify CD3+CD20+ double-positive cells by fluorescence microscopy or confocal microscopy, while doublets of CD3+CD20- and CD3-CD20+ cells were observed (Figure 1D) at frequencies similar to those found by flow cytometry for CD3+CD20+ cells.

Abnormal CD20 expression by leukemic T cells has been reliably observed by immunohistochemistry. In contrast, in our studies, CD3+CD20+ cells appeared to be a flow cytometry artifact resulting from T-B cell doublets. We suggest that the lower density of CD20 expression reported in the literature on CD3+CD20+ cells (1,2,7,8) could result from CD20 epitope masking or from CD20 modulation after T-B cell binding. Whether the formation of these doublets is an artifact occurring during staining or is a physiologic process remains to be determined. Therefore, we believe that investigators studying CD3+CD20+ cells in normal donors should be cautious in the interpretation of their data and consider the possibility that these cells are indeed artifactual.

Supported by a grant from the French Blood Agency (Etablissement Français du Sang).

Carole Henry, PhD
Abdulraouf Ramadan, PhD
Nicolas Montcuquet, PhD
Jean-René Pallandre, PhD
Patricia Mercier-Letondal, MD
Marina Deschamps, PhD
Pierre Tiberghien, MD, PhD
Christophe Ferrand, PhD
Eric Robinet, PhD
INSERM UMR645
Université de Franche-Comté
and Etablissement Français du Sang
Besançon, France

1. Wilk E, Witte T, Marquardt N, Horvath T, Kalippke K, Scholz K, et al. Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 2009;60:3563–71.
2. Quintanilla-Martinez L, Preffer F, Rubin D, Ferry JA, Harris NL. CD20+ T-cell lymphoma: neoplastic transformation of a normal T-cell subset. *Am J Clin Pathol* 1994;102:483–9.
3. Takami A, Saito M, Nakao S, Asakura H, Nozue T, Onoe Y, et al. CD20-positive T-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1998;102:1327–9.
4. Mohrmann RL, Arber DA. CD20-positive peripheral T-cell lymphoma: report of a case after nodular sclerosis Hodgkin's disease and review of the literature. *Mod Pathol* 2000;13:1244–52.
5. Yokose N, Ogata K, Sugisaki Y, Mori S, Yamada T, An E, et al. CD20-positive T cell leukemia/lymphoma: case report and review of the literature. *Ann Hematol* 2001;80:372–5.
6. Tamayose K, Sato N, Ando J, Sugimoto K, Oshimi K. CD3-negative, CD20-positive T-cell prolymphocytic leukemia: case report and review of the literature. *Am J Hematol* 2002;71:331–5.
7. Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry* 1993;14:196–204.
8. Storie I, Wilson GA, Granger V, Barnett D, Reilly JT. Circulating CD20dim T-lymphocytes increase with age: evidence for a memory cytotoxic phenotype. *Clin Lab Haematol* 1995;17:323–8.
9. Introna M, Barbui AM, Baccioni F, Casati C, Gaipa G, Borleri G, et al. Genetic modification of human T cells with CD20: a strategy to purify and lyse transduced cells with anti-CD20 antibodies. *Hum Gene Ther* 2000;11:611–20.
10. Serafini M, Manganini M, Borleri G, Bonamino M, Imberti L, Biondi A, et al. Characterization of CD20-transduced T lymphocytes as an alternative suicide gene therapy approach for the treatment of graft-versus-host disease. *Hum Gene Ther* 2004;15:63–76.
11. Henry C, Deschamps M, Rohrlich PS, Pallandre JR, Remy-Martin JP, Callanan M, et al. Identification of an alternative CD20 transcript variant in B cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. *Blood* 2010. E-pub ahead of print.

DOI 10.1002/art.27526

Reply

To the Editor:

Henry et al present data obtained from their analysis of CD3+CD20+ T cells. From their experimental results they conclude that our data on this cell population may have been caused by artifacts. One of the main points of objection raised by Henry and colleagues is that we might have analyzed doublets (aggregates of 2–3 cells) sharing all the surface mark-

Article 2

Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cells malignancies coding for a novel protein associated to Rituximab resistance

Carole Henry, Marina Deschamps, Pierre-Simon Rohrlich, Jean-René Pallandre,
Jean-Paul Rémy-Martin, Mary Callanan, Alexandra Traverse-Glehen, Camille
Grandclément, Francine Garnache-Ottou, Rémy Gressin, Eric Deconinck, Gilles
Salles, Eric Robinet, Pierre Tiberghien, Christophe Borg and Christophe
Ferrand.

Blood. 2010 Mar 25;115(12):2420-9

Résumé

Cet article décrit pour la première fois un épissage alternatif du gène CD20 humain, codant pour une nouvelle protéine (Δ CD20).

La molécule CD20 humaine est un marqueur spécifique des lymphocytes B, exprimée à la fois sur les cellules saines et leucémiques, du stade pré-B au stade plasmocyte. Cette protéine est la cible d'un anticorps monoclonal très utilisé en immunothérapie : le RTX. L'épissage alternatif du gène CD20 code pour un ARNm tronqué nommé Δ CD20. Cet ARNm est potentiellement lié à la transformation et/ou activation cellulaire. En effet, nous avons pu mettre en évidence qu'il est absent dans cellules issues de donneurs sains (PBMC triés ou non sur la base de l'expression de CD19 ou CD20 et cellules mononuclées de moelle osseuse) mais est présent dans différentes lignées tumorales B, dans des cellules B-EBV, et dans des B activés *in vitro* (B-Blastes) et *in vivo* (prélèvements de LB CD19⁺, issus d'amygdalectomies et fournis par le laboratoire du Pr Thierry Fest, Rennes). Egalement, un panel d'hémopathies issues de cellules B a été criblé et montre que cet ARNm est présent à différents niveaux selon le type d'hémopathies, ceci dans le sang périphérique, dans la moelle osseuse ou au sein des tumeurs.

La protéine codée par cet ARNm (le cadre de lecture étant conservé) a pu être mise en évidence par Western Blotting dans des lignées B et des prélèvements natifs d'hémopathies B. Cette protéine de 130 acides aminés serait déletée de la partie transmembranaire caractéristique de CD20. Des expériences de fractionnement subcellulaire ont d'ailleurs permis de confirmer cette hypothèse ainsi que d'évoquer une potentielle association entre les deux protéines, CD20 et Δ CD20 au niveau membranaire, potentiellement à l'origine de la modulation de l'expression de CD20 ou de sa localisation. Des expériences sont en cours afin de pouvoir vérifier ces hypothèses.

Grâce à un modèle de résistance au RTX établi *in vitro* au laboratoire sur des lignées B, nous avons montré une augmentation de l'ARNm et de la protéine Δ CD20 dans les lignées résistantes par rapport aux lignées témoins. Egalement des résultats probants ont été obtenus *in vivo* à partir de prélèvements de patients atteints d'hémopathies B et traités par RTX.

Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance

*Carole Henry,¹⁻³ *Marina Deschamps,¹⁻⁴ Pierre-Simon Rohrlach,^{1-3,5} Jean-René Pallandre,¹⁻³ Jean-Paul Rémy-Martin,¹⁻³ Mary Callanan,^{6,7} Alexandra Traverse-Glehen,⁸ Camille GrandClément,¹⁻³ Francine Garnache-Ottou,^{1-3,8} Remy Gressin,^{6,7} Eric Deconinck,^{1-3,7} Gilles Salles,⁸ Eric Robinet,⁹ Pierre Tiberghien,^{1-3,5} Christophe Borg,^{1-3,5} and Christophe Ferrand^{1-4,7}

¹Inserm, Unite Mixte de Recherche (UMR) 645, Besançon; ²Université de Franche-Comté, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 133, Besançon;

³Immuno-Molecular Therapeutics Laboratory, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté (EFS-BFC), Besançon; ⁴Clinical Biomonitoring Laboratory, EFS-BFC, Besançon; ⁵Oncology/Hematology Department, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Jean Minjot, Besançon; ⁶Inserm, UMR823, Université Joseph Fourier, Grenoble I, Grenoble; ⁷Groupe Ouest Est d'Etude des Leucémies et Autres Maladies du Sang (GOELAMS), Tours; ⁸Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR5239, Université Lyon I, Service d'Hématologie Lyon Sud, Lyon; and ⁹Inserm, U748, Interactions Virus-Hôte et Maladies du Foie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Human CD20 is a B-cell lineage-specific marker expressed by normal and leukemic B cells from the pre-B to the plasma-cell stages and is a target for rituximab (RTX) immunotherapy. A CD20 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (PCR) on B-cell lines cDNA yielded a short PCR product (Δ CD20) corresponding to a spliced mRNA transcript linking the exon 3 and exon 7 ends. We established here that this novel, alternatively

spliced CD20 transcript is expressed and detectable at various levels in leukemic B cells, lymphoma B cells, in vivo tonsil- or in vitro CD40L-activated B cells, and Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells, but not in resting CD19⁺- or CD20⁺-sorted B cells from peripheral blood or bone marrow of healthy donors. The truncated CD20 sequence is within the reading frame, codes a protein of 130 amino acids (~ 15-17 kDa) lacking

large parts of the 4 transmembrane segments, suggesting that Δ CD20 is a nonanchored membrane protein. We demonstrated the translation into a Δ CD20 protein which is associated with the membrane CD20 protein and showed its involvement in RTX resistance. Study of patient samples before and after RTX resistance or escape confirms our in vitro findings. (Blood. 2010;115:2420-2429)

Introduction

CD20 (MS4A1) is a 33- to 37-kDa nonglycosylated transmembrane (TM) phosphoprotein that is widely expressed throughout B-lymphocyte ontogeny, in normal or malignant B cells.¹ The 16-kb gene encoding human CD20, consisting of 8 exons, has been mapped to chromosome 11 (11q12-q13) and belongs to the MS4A (membrane spanning 4A) gene family localized within a cluster of related genes (MS4A1 to MS4A11).² Its transcription leads to 3 mRNA isoforms: a dominant 2.8-kb transcript, using exons 1 to 8; a second exon 1-spliced transcript shorter by 263 bp; and a third, minor 3.4-kb transcript,³ all encoding a full-length CD20 protein.

The CD20 protein consists of cytoplasmic N- and C-termini and 4 hydrophobic regions for anchoring the molecule in the membrane.⁴ A total of 3 isoforms have been identified, including a predominant 33-kDa molecule and 2 isoforms of 34.5 and 36 kDa, resulting from differential phosphorylation states (on serine and threonine residues) in relation to B-cell stimulation and proliferation.⁵ CD20 appears to play a role in Ca⁺⁺ conductance⁶ and is also involved in cell-cycle progression by interaction with src family kinases.⁷ Finally, CD20 circulating form has been identified in chronic lymphocytic leukemia (CLL), Hodgkin disease, or non-Hodgkin lymphoma (NHL), and in healthy persons.⁸

CD20 expression at the cell surface of malignant B cells makes it a target for monoclonal antibody (mAb) therapy. Rituximab

(RTX), the first US Food and Drug Administration (FDA)-approved mAb for clinical therapy, targets the CD20 antigen⁹ and leads to CD20-expressing B-cell depletion through different mechanisms^{9,10} (for review, see Cartron et al¹¹). Thus, RTX is widely used against B-cell malignancies and also for autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis,¹² steroid refractory chronic graft-versus-host disease (GVHD),¹³ or posttransplantation lymphoproliferative disease,¹⁴ and for treatment of refractory kidney transplant humoral rejection.¹⁵

Although its clinical effectiveness is uncontested, some factors, directly linked to CD20 gene expression or related to apoptotic signaling,¹⁶ may influence its clinical benefit and sometimes lead to RTX resistance. These factors include Fc γ RIII polymorphism,¹⁷ CD20 cell-surface expression level,^{18,19} CD20 distribution within the membrane lipid rafts,²⁰ the presence of a mutation/deletion in the CD20 coding region,²¹ epigenetic regulation of the CD20 gene,²² or CD20 protein phosphorylation rate.²³

Retroviral CD20 gene transfer was proposed as an alternative suicide gene therapy to improve the system of genetically modified T-lymphocyte adoptive transfers.²⁴⁻²⁶ Because transcriptional regulation through aberrant alternative splicing is an emerging mechanism involved in cancer progression²⁷ and was previously associated with resistance to transgenic T-cell depletion,²⁸ we analyzed CD20 transcriptional regulation in CD20-transduced cells.

Submitted June 24, 2009; accepted December 20, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, January 20, 2010; DOI 10.1182/blood-2009-06-229112.

*C.H. and M.D. contributed equally to this work.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

We identified a novel CD20 alternative mRNA (Δ CD20), demonstrating that this splice variant mRNA encodes a truncated protein and providing evidence that Δ CD20 is directly correlated with RTX resistance. Moreover, Δ CD20 splice mRNA was absent from normal B cells isolated from healthy donors and present in malignant B cells, making it a molecular marker of choice for diagnosis or molecular minimal residual disease follow-up.

Methods

Patients, cell lines, B-cell isolation, and purification

Human cell lines were obtained from the DSMZ or ATCC cell banks. Cells were maintained in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum added. We established Epstein-Barr virus (EBV)-transformed autologous lymphoblastic cell lines by coculturing peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with EBV-containing supernatant from the B95.8 EBV-producing cell line, as described.²⁹ CD19⁺-sorted B cells were activated with irradiated CD40L-transfected cells for 3 days or Pokeweed mitogen (Sigma-Aldrich). Cells were then split or fed with fresh medium until harvest at day 7. Human tonsil, peripheral blood, bone marrow, and lymph nodes and spleen were obtained, respectively, from clinical tonsillectomies, hematologic B-cell disease samples (B-CLL, B-acute lymphoblastic leukemia [ALL], follicular lymphoma [FL], mantle-cell lymphoma [MCL], diffuse large B-cell lymphoma [DLBCL], and marginal zone lymphoma [MZL]) for diagnostic assessment, clinical trial, or from a blood bank for the healthy PBMCs or bone marrow (BM) cells.

Informed consent for functional tests and genetic analysis was obtained from patients and healthy donors.

Human CD19⁺ or CD20⁺ cells were immunomagnetically purified using whole-blood CD19 or CD20 microbeads kits with an autoMACS (Miltenyi Biotec).

Molecular study: genomic DNA and RNA isolation, reverse-transcription and real-time PCR for mRNA quantification, and cycle sequencing

Genomic DNA was extracted using a standard salting-out method. Total cellular RNAs were extracted using the RNeasy Total RNA Isolation kit (QIAGEN), following manufacturer protocols. For qualitative PCR, 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed into cDNA as previously described.³⁰ Conventional full-length cDNA PCR amplification (flCD20-PCR) was performed from 2 μ L of cDNA using primers specific from the start (exon 3) and the stop codon (exon 8), respectively: Fw-hCD20-start (5'-ATGACAACCCAGAAATTC-3') and R-hCD20-stop (5'-TTAAGGAGAGCTGTCAITTTCT-3'). (Bold characters indicate start and stop codons, respectively).

For specific and more sensitive amplification (Δ CD20-PCR) of the identified splice variant, a primer Fw- Δ hCD20 (5'-GATGTCTTCACTGG/AACT-3') spanning the junction was used in combination with the R-hCD20 stop primer. PCR was performed using BIOTAQ polymerase (Bioline) in standard conditions. Annealing temperature was 58°C for both fl- and Δ CD20-PCR.

For CD20 mRNA transcript expression analysis, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed using pairs of primers to specifically amplify the full-length form of CD20, as follows: TQM-Fw-hCD20-wt (5'-GAGCCAATGAAAGGCCCTATT-3') and TQM-R-hCD20-wt (5'-AAGAAGCTTTGCGTGGGGCC-3'; complementary of the spliced region). For specific analysis of the spliced forms of mRNA CD20, a reverse primer TQM-R- Δ hCD20 (5'-AGCTATTACAAGTT/CCAGTG-3') spanning the junction was used in combination with the TQM-Fw-hCD20-wt. PCR products were revealed using a dual-labeled Fam/Tamra TaqMan probe: TQM-probe-hCD20 (5'-ATGCAATCTGGTCCAAAACCACTCTTCAGG-3'). To determine the sequence of the CD20 variant and of the site-directed mutated form (mutCD20), we performed cycle sequencing on a 3130 DNA analyzer, directly from PCR- or gel-purified products, in both directions using the Cycle Sequencing Kit Version 3.1 (Applied Biosystems).

Computational analysis: splice-site prediction and site-directed mutagenesis

We performed computer-assisted analysis for splice-site and branched-point prediction using NetGene2 (release 2.4)³¹ and NNsplice Version 0.9.³² We designed site-directed mutagenesis primers for acceptor site (AS) mutation using the online program QuikChange Primer Design Program (<http://www.stratagene.com/sdmdesigner/default.aspx>) from Stratagene.

Generation of plasmids and retroviral constructs, site-directed mutagenesis, and production of packaging cell lines

flCD20 and Δ CD20 forms were cloned into a pcDNA 3.1/CT-green fluorescent protein (GFP) vector (Invitrogen) for expressing a CD20/GFP fusion protein to study subcellular protein localization.

The degeneracy of the genetic code allowed a change of the third nucleotide of the AS codon at position 612, from CAG (Gln) to CAA (Gln). Primers used were G612A-Fw 5'-GATCTTTGCCTTCTTCCAAGAAGTT-GTAATAGCTGGC-3' and G612A-R 5'-GCCAGCTATTACAAGTTCTT-GGAAGAAGGCCAAAGATC-3'.

Finally, both these and the site-directed mutated form of the CD20 (mutCD20) were cloned into the retroviral pLXSN vector (Clontech). Supernatant was produced from the PG13 amphotropic packaging cell line.

Establishment of RTX resistance, immunophenotyping, and in vitro CDC assay

Establishment of RTX resistance was performed as previously described.³³ Briefly, Ramos and Raji B-cell lines (group N), adjusted to 10⁶ cells/mL, were serially (4 times) exposed for 24 hours to a low dose of RTX (0.5 μ g/mL) to generate the R1 group, or 3 times in the presence of escalating high doses of RTX (2 and 64 μ g/mL) for generating the R2 group. RTX exposure was done in the presence of 25% of newborn rabbit serum (NRS) or 50% human serum (HS) as a source of complement. Ficoll gradient centrifugation was applied after each RTX exposure to remove death cells. RTX was obtained from the Besançon Hospital Pharmacy Department.

We assessed resistance acquisition first by flow cytometric analysis, using a conjugated anti-CD20 antibody (mouse anti-human CD20 mAbs [IgG2b κ , clone 2H7]; BD Pharmingen) to visualize CD20 membrane expression change as a signature of the resistance, as described.²⁰ Further, we performed an in vitro complement-dependent cytotoxicity (CDC) assay. Briefly, cells were incubated with an increased dose of RTX for 1 hour at 37°C in the presence or absence of NRS. The cell lysis percentage was calculated by blue trypan cell counting and reported as follows: % cell lysis = [1 - (viable cells after RTX + 25% NRS exposure) / (viable cells before RTX + 25% NRS)] \times 100.

Experiments were performed 15 days after the last RTX exposure.

Confocal microscopy, slide preparation, and immunofluorescence staining and Western blotting

Cells were spread onto poly-L-lysine-coated slides (Sigma-Aldrich), fixed with paraformaldehyde 4%, and washed. After blocking with 20% fetal bovine serum and washing, cells were stained with the appropriate mAbs or directly visualized using GFP LASER excitation. Stacks of confocal images were collected with an FV1000 laser-scanning confocal microscope (Olympus). Cell nuclei were counterstained with DAPI.

For the Western blotting study, cells were lysed with sample buffer (2% SDS in 125mM Tris HCl, pH 6.8). Cytoplasm and membrane subcellular fractions were harvested after differential ultracentrifugation in adapted buffers; the presence or absence of subcellular-specific proteins by Western blot attested to subcellular separation. Proteins were extracted from 0.5 \times 10⁷ to 1 \times 10⁷ cells and by electrophoresis on 12.5% SDS-polyacrylamide gels and transferred to PDVF membranes (GE Healthcare).

The blots were then blocked for 1 hour in 6% milk before incubation with specific antibodies against human CD20 as follows: rabbit anti-human

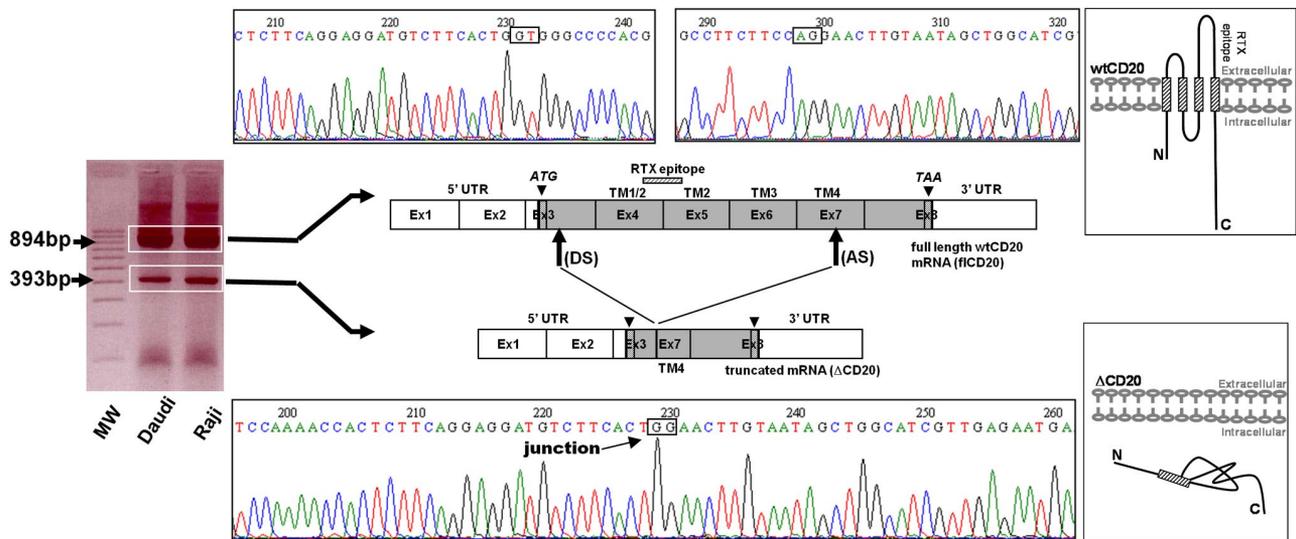


Figure 1. Identification of the Δ CD20 splice isoform mRNA. Agarose gel electrophoresis of full-length (fl) PCR of the CD20 coding sequence from the Daudi and Raji cell line cDNA. Sequencing electrophoregrams of both full-length wt and truncated (Δ CD20) CD20 forms, showing juxtaposed part of the end of exon 3 (Ex) and exon 7. Localization of splicing sites (DS indicates donor site; and AS, acceptor site) on the RNA sequence (Ex1 to Ex8; UTR indicates untranslated regions). Correspondence of CD20 protein segments is shown (TM indicates transmembrane domains), and RTX epitope localization is indicated on wtCD20 as a hatched box. A schematic figure of the intracellular putative Δ CD20 is given for comparison to the wt protein. MW indicates the 100-bp molecular marker. ATG and TAA indicate start and stop codons, respectively.

CD20 specific to the COOH-terminal region (Thermo Scientific), MS4A1 MaxPab mouse polyclonal antibody (B01; Abnova), RTX (Roche), or mouse polyclonal anti-human CD20 (7D1; AbD Serotec). Blotted proteins were detected and quantified on a bioluminescence imager and BIO-1D advanced software (Wilber-Lourmat) after incubating blots with a horseradish peroxidase-conjugated appropriate secondary antibody (Beckman Coulter). A synthetic CD20/GST 88-mer recombinant polypeptide and B-cell line known to express CD20 served as controls in every experiment.

Results

From alternative splicing, a novel isoform of human CD20 (Δ CD20) mRNA arises, devoid of the sequence coding for the 4 major TM domains

From the reverse transcription and PCR of full-length CD20 (flCD20) cDNA, synthesized from Raji or Daudi B-cell lines, using 2 primers respectively complementary of the start and stop codon regions, we observed a PCR product smaller (393 bp) than the expected size (894 bp; Figure 1). Sequencing analysis showed that the smaller transcript (Δ CD20) was identical to the wild-type (wt) MS4A1 sequence published in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank³⁴ (NM_021950.3), but lacked an internal 501-bp fragment, corresponding to part of exon 3 to part of exon 7. Therefore, the open reading frame remained conserved. This Δ CD20 splice form transcript differs from previously described 2.8- and 3.4-kb alternative dominant MS4A1 forms³ and from other known transcripts of the MS4A gene family. Furthermore, smaller PCR products we obtained from all of the screened B-cell lines were similar in length. In silico sequence analysis of the full-length CD20 sequence, using the NetGene2 and NNSplice Version 0.9 programs, showed putative donor ("GT," localized in exon 3) and acceptor ("AG," localized exon 7) sites, as well as a branched site ("A," nt 594 of the coding sequence), corresponding exactly to the open reading frame of the smaller transcript

Δ CD20. This deletion covered nucleotides 111 to 612 (from the +1 ATG nucleotide) and removed codons 37 to 204. Thus, this new in-frame cDNA encodes a putative novel isoform of CD20 (supplemental Figure 1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) lacking much of the 4 TM domains and the extracellular area. Consequently, the region of mRNA coding for the RTX epitope³⁵ is deleted, suggesting that RTX cannot target this truncated spliced Δ CD20 protein.

Δ CD20 mRNA is selectively expressed in different malignant or EBV-transformed B-cell lines, but not in resting B lymphocytes isolated from healthy donors

Having detected the new isoform of CD20 mRNA in Raji and Daudi, we decided to analyze Δ CD20 expression in other malignant B-cell lines. For this purpose, flCD20-PCR was performed in pre-B (n = 3), Burkitt (n = 3), B-ALL (n = 1), lymphoblastic (n = 1), plasmocytic (n = 3), EBV-transformed (n = 3), and T-CLL (n = 2) and T-ALL (n = 1) cell lines. In addition to the flCD20 transcript PCR products (894 bp), we detected Δ CD20 transcripts of PCR products (393 bp) in all screened malignant and EBV-transformed B-cell lines but not T-cell lines (Figure 2A). To confirm these results, we designed a PCR assay (Δ CD20-PCR) allowing specific and more sensitive detection of the spliced transcripts, using a forward primer spanning the splice junction. The expected 295-bp PCR product was detected in all previously screened B-cell lines. We confirmed specificity of the Δ CD20 RT-PCR assay by absence of amplification from T-cell line-derived cDNA and from a plasmid vector carrying the flCD20. As a control, each short PCR product was sequenced, enabling confirmation that each 393-bp amplicon corresponded to Δ CD20 (data not shown).

To determine whether this specific CD20 alternatively spliced form is expressed only in transformed B cells, we searched for the Δ CD20 isoform in cDNA synthesized from PBMCs (n = 7) and bone marrow mononuclear cells (BMMCs; n = 5) derived from healthy donors using both flCD20- and Δ CD20-RT-PCR. Moreover, we screened immunomagnetically CD20⁺-purified B cells,

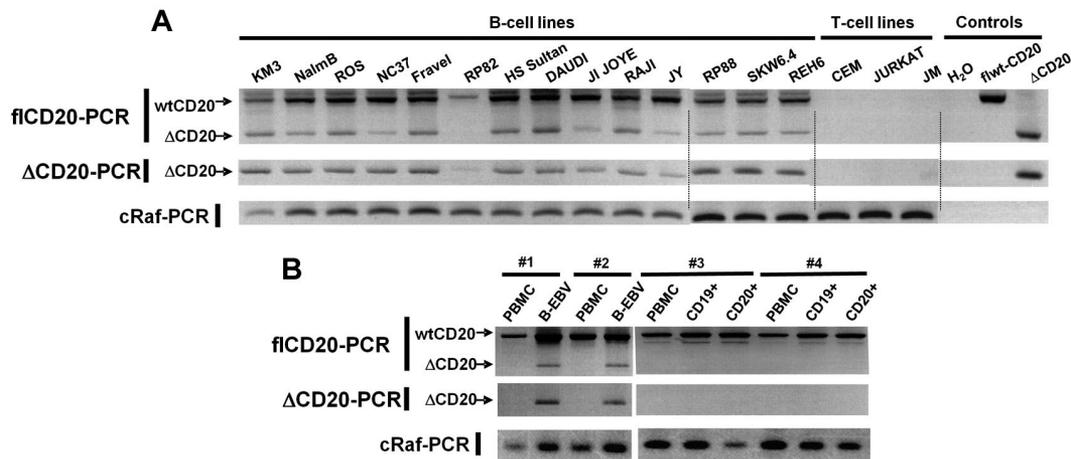


Figure 2. RT-PCR detection of the Δ CD20-spliced mRNA. Qualitative full-length RT-PCR (flCD20-PCR) and specific RT-PCR (Δ CD20-PCR) allowing detection, respectively, of both wt/ Δ or specific Δ forms of CD20. cRaf PCR amplified a control gene. flCD20 and Δ CD20 controls consisted of plasmids carrying the respective cloned sequences (A) on different B- and T-cell lines and (B) on in vitro B-EBV-produced cell lines and their respective PBMCs and on CD19⁺- or CD20⁺-purified cells from healthy donors and their corresponding PBMCs.

and because Δ CD20 may modulate CD20 cell-surface membrane expression, we also studied CD19⁺-purified B cells. We detected no alternative transcripts, even with the Δ CD20 PCR assay, either in BMMCs or in CD20⁺ and CD19⁺ PBMC-purified B cells (Figure 2B). In addition, we investigated Δ CD20 expression in B-EBV-transformed cell lines (n = 4; Figure 2B), in in vitro-activated B lymphocytes, and in CD19⁺ from tonsillectomy samples. All expressed the Δ CD20-spliced form. A kinetic study on B-EBV- or CD40L-activated B blasts revealed the truncated form of Δ CD20 all over the culture when stimuli were maintained. However, for B blasts, the signal decreased 72 hours after initial CD40L activation (data not shown).

Translation of in-frame Δ CD20 alternative transcript codes for a protein

In silico translation analysis show that splicing of the CD20 gene results in in-frame transcript coding for a Δ CD20 protein. Splicing affected a cysteine amino acid, implying an effect in a disulfide bond in a major part of the TM domain (5 amino acids of the TM4 domain remain) but not the phosphorylation sites. To explore this issue and to confirm the existence of the Δ CD20 protein, we used transfected 293T cells with a vector carrying wt and Δ -CD20 cDNA fused with the GFP sequence, allowing expression of wt and Δ -CD20/GFP fusion proteins, respectively, examined under confocal microscopy. We thus detected protein expression with either anti-CD20 Ab staining or after GFP excitation. As expected, while GFP signal was detected for both constructs, the anti-CD20 antibody, recognizing the deleted region, emitted fluorescence only for the full-length protein. The anti-CD20 antibody, specific to the C-terminus (C-term) region, recognized both complete and truncated Δ CD20 proteins (Figure 3A).

Using Western blot analysis with the C-term region anti-CD20 Ab, we detected, in addition to the expected size length (35-37 kDa) of the wtCD20, an additional signal at 15 to 17 kDa in all screened B-cell lines (Figure 3B left). The 15- to 17-kDa size length correlated with the putative coded protein translated from the Δ CD20 alternative transcript described above. Signal was detected only in B-cell lines (n = 4) but not in T-cell lines (n = 3). We also detected the same signal in 5 native samples

from patients with CLL (supplemental Figure 2) and MCL. More precisely, the 15- to 17-kDa signal split into 2 distinct bands, as generally detected for the wtCD20 protein; these bands correspond to different phosphorylation states, as previously described,²³ in which the smaller band is the unphosphorylated form. Remarkably, band intensity corresponding to the Δ CD20 protein phosphorylation status differed between cell lines, as illustrated in Figure 3B; the lower band was more intense for JY, the upper band was more intense for SkW 6-4 and Daudi, and the intensity remained similar in the ROS cell line.

For confirmation that the 15- to 17-kDa protein correlated with Δ CD20 transcript translation, we transduced a Raji cell line with a retroviral vector carrying the Δ CD20 cDNA sequence and obtained a significant 2.96-fold increase in signal at position 15 to 17 kDa, indicating again that the Δ CD20 mRNA encodes a protein (Figure 3B right). Interestingly, the signal intensity of the wtCD20 band decreased (fold change [FC], 0.68). Altogether, these results demonstrated that Δ CD20 alternative mRNA is translated into protein.

Finally, to demonstrate that the smaller product is not a breakdown product, we analyzed propidium iodide (PI⁺; death) versus PI⁻ (live) cells after RTX exposure. As reported in supplemental Figure 3, presence of Δ CD20 mRNA and protein was detected on both cell fractions.

Δ CD20 alternative transcripts are the source of the Δ CD20 protein with an abnormal intracellular compartmentalization

To confirm that the splice signals (donor site [DS] and AS) are the source of the Δ CD20 mRNA and protein, we modified the nucleotide sequence to delete one of these sites, the AS site, codon 612, from CAG (Gln) to CAA (Gln). Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis indicated that this new mutated protein is expressed and addressed at the membrane (Figure 4A). RT-PCR analysis, with fl- or Δ CD20-PCR assays, confirmed that a packaging cell line transfected with retroviral vector carrying mutCD20 did not generate splice Δ CD20 mRNA (Figure 4B). Confocal analysis of mutCD20/GFP fusion-transfected 293T cells revealed that the mutCD20 protein was expressed and recognized by both anti-CD20 antibodies (Figure 3A). We did not detect a signal at the

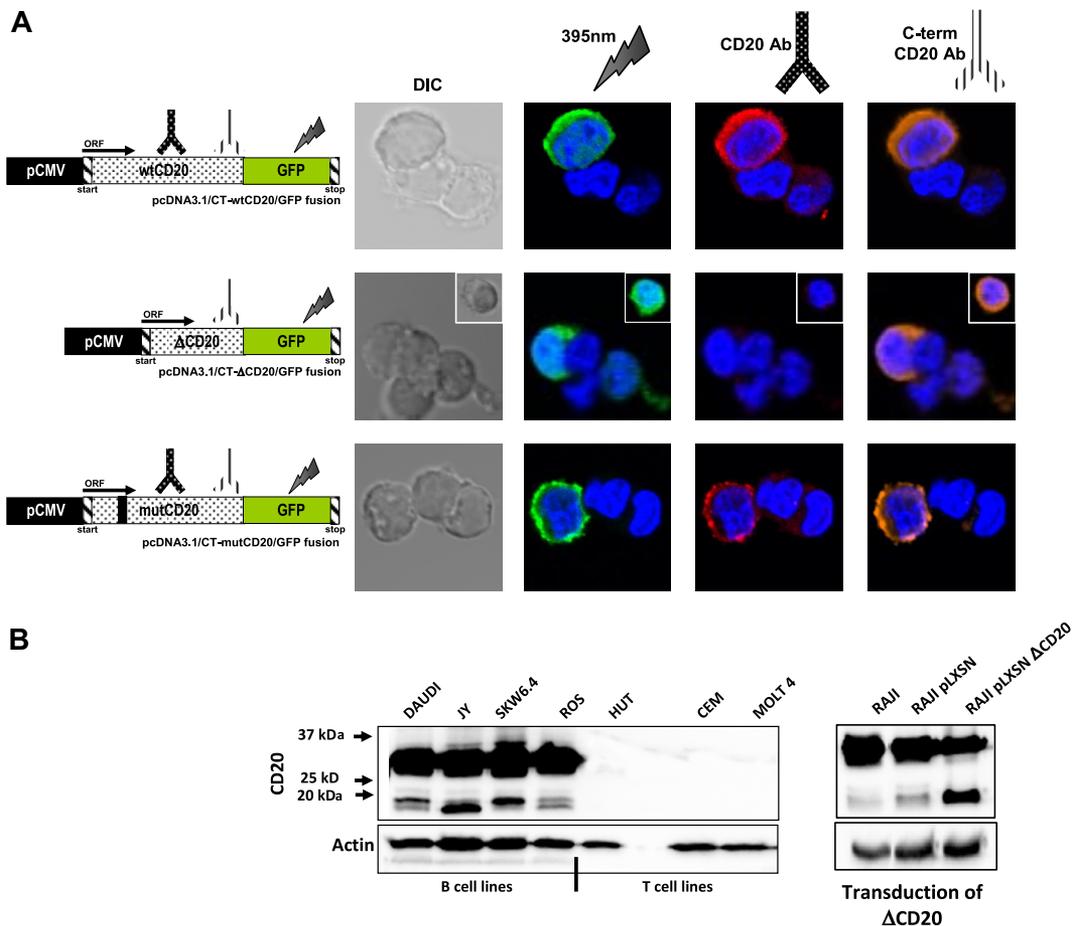


Figure 3. Δ CD20 protein expression. (A) Confocal microscopy analysis of wt and Δ CD20 protein expression, on 293T cells transfected with different constructs carrying flCD20, Δ CD20, or mutCD20 cDNA fused with a GFP sequence leading to the expression of a CD20/GFP fusion protein. Cells were imaged using a Fluoview FV1000 (Olympus) and were stained with DAPI (blue) for nuclear staining and also with either monoclonal anti-CD20 antibody (recognizing wt and mutCD20 forms; red), C-term anti-CD20 antibody (recognizing all CD20 forms; orange), or by GFP 385-nm excitation (green). wtCD20 and mutCD20-transfected cells show membrane staining according to the presence of the 4 transmembrane domains allowing anchoring, whereas Δ CD20/GFP staining is localized mainly within the cytoplasm and absent within the membrane. Simultaneous staining (intracellular and membrane) was achieved with an anti-C-term CD20 antibody. DIC indicates differential interference contrast; and ORF, open reading frame. Untransduced cells were used as controls. (B) Western blot (WB) analysis, after denaturing acrylamide electrophoresis, with anti-C-term CD20 antibody of whole-cell lysates from B- and T-cell lines (left) and a retrovirally transduced Raji cell line with a vector carrying the Δ CD20 cDNA (right). As expected, we detected a signal at position 33 to 35 kDa, corresponding to the wtCD20 protein isoforms (differentially phosphorylated), but also 2 additional bands at 15 to 17 kDa, corresponding to the size of the translated spliced mRNA. The 2 bands at position 15 to 17 kDa could correspond to different phosphorylation states of the Δ CD20 protein. Moreover, detection of an increased signal at the same size length after CD20 transduction confirmed that the smaller band is the product of the Δ CD20 mRNA translation. Antiactin WB on the whole-cell lysates was performed as controls.

expected 15- to 17-kDa size length using different packaging of PG13 clones and Western blot analysis with the C-term anti-CD20 antibody that recognizes the Δ CD20 protein, confirming the absence of translation of splice Δ CD20 protein. We did, however, still detect the truncated protein within wtCD20-transfected PG13 clones (Figure 4C). Overall, the mutagenesis results with the splice AS sequence confirmed that the splice signal is the source of the Δ CD20 mRNA and protein.

In silico translation of the in-frame Δ CD20 mRNA indicated that much of the 4 TM domains of the CD20 protein is deleted (5 amino acids remaining), signifying that the Δ CD20 may be a nonanchored protein. To address this issue, we performed Western blot analysis of different subcellular fractions of cytoplasm and membrane. As shown in Figure 4D for 4 B-cell lines, the Δ CD20 signal occurred in the membrane subfraction but not in the cytoplasm. Moreover, immunoprecipitation with an anti-wtCD20 antibody revealed by Western blot that the Δ CD20 protein coimmunoprecipitated, suggesting an association between Δ CD20 and wtCD20 protein (supplemental Figure 4).

The alternatively spliced Δ CD20 form is associated with resistance to RTX treatment

Although CD20 is the target of one of the most-used immunotherapy drugs in hematology, it is important to assess if the newly discovered Δ CD20 protein is involved in the response to treatment. To answer this question, we induced RTX resistance in Raji and Ramos B-cell lines by serial exposure to escalating doses of RTX (0.5-64 μ g/mL). Resistance acquisition was confirmed by in vitro CDC lysis assay and assessment of cell-surface staining of CD20 by FACS analysis. Cell lysis in the presence of RTX plus complement was 96%, 60%, and 52%, respectively, for native Ramos, R2-2, and R2-64, whereas it was close to 10% in the absence of complement. CDC assay showed also that the RTX resistance is established at least for 21 days after the last RTX exposure (supplemental Table 1).

Western blot analysis using the anti-C-term CD20 region antibody revealed increased signal at 15 to 17 kDa, corresponding to the Δ CD20 protein (Figure 5B) in relation to RTX

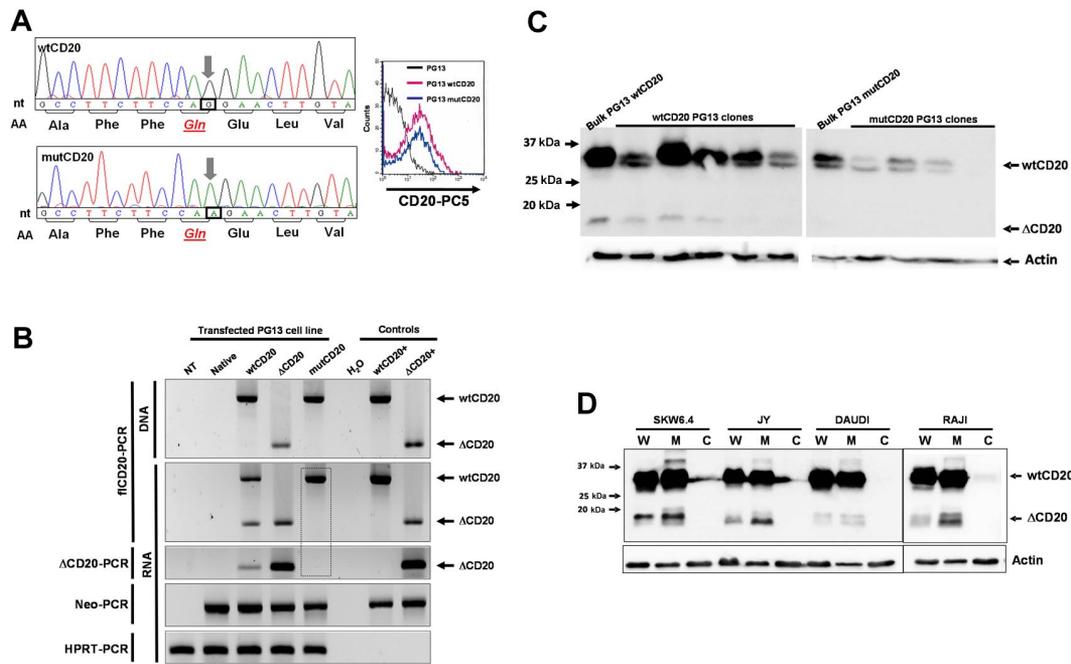


Figure 4. ΔCD20 alternative transcripts code for an intracellular ΔCD20 protein. (A) Site-directed mutagenesis was performed on the wtCD20 sequence, using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), according to manufacturer recommendations to kill the AS, with respect to the amino acid sequence. Left panel shows electropherograms after site-directed mutagenesis, confirming that the third nucleotide of the CAG codon (Gln) is replaced by an A nucleotide. Right panel shows cytometry detection of the mutCD20 protein with a monoclonal anti-CD20 antibody at the cell surface of transfected PG13 cells. (B) fICD20- or ΔCD20-PCR on DNA or cDNA of transfected PG13 packaging cell line with wtCD20, ΔCD20, or mutCD20 retroviral plasmids. Neo-PCR was performed to control cell transfection and hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase (HPRT)-PCR to confirm the absence of inhibitors of the PCR reactions. fICD20 and ΔCD20 plasmids were used as positive controls. The dashed box highlights the absence of ΔCD20 PCR products, even with the ΔCD20-specific PCR, after transfection of PG13 with the mut-CD20 construct. (C) Western blot analysis with the C-term anti-CD20 on cell lysates from the bulk cell population or isolated cloned PG13 cells transfected with constructs carrying wtCD20 or mutCD20 cDNA sequences. Absence of detection at 15 to 17 kDa confirms that the splice sequence is the source of the ΔCD20 protein expression. (D) Western blot analysis on whole protein lysate (W) or subcellular fractions as cytoplasm (C) and membrane (M) for 4 different B-cell lines using the C-term CD20 antibody.

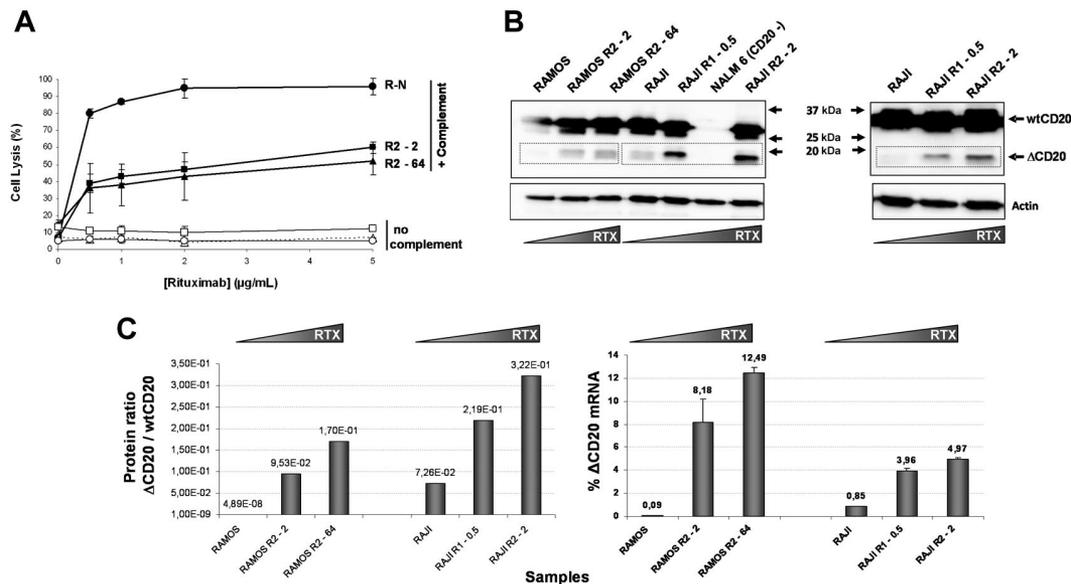


Figure 5. RTX resistance and ΔCD20 protein expression. (A) CDC lysis assay reporting the percentage of lysis of in vitro RTX-resistant established B cells plotted against an increasing dose of RTX. Both experiments (decrease of CD20 mean fluorescence intensity [MFI] and decrease of percentage of cell lysis) favored RTX-resistance establishment after repeated RTX exposure. Error bars indicate SE of 3 experiments. (B) Representative (of 3 experiments) Western blot (WB) analysis, using the C-Term anti-CD20 (recognizing wt and truncated CD20 proteins) on whole lysates from RTX-resistant B-cell lines. Antiactin WBs on the whole-cell lysates were performed as controls. Dashed boxes highlight an increase of immunoreactive signal generated by ΔCD20 protein. (C) Quantification of the WB immunoreactive ΔCD20 signal with the BIO-1D advanced software and normalized with actin signal. Results are reported as the protein ratio of ΔCD20/wtCD20 (left). RT-qPCR quantification of ΔCD20 transcripts expressed as follows: relative percentage of ΔCD20 = $(\Delta CD20 / wtCD20 + \Delta CD20) \times 100$. Mean of triplicate is reported (right panel).

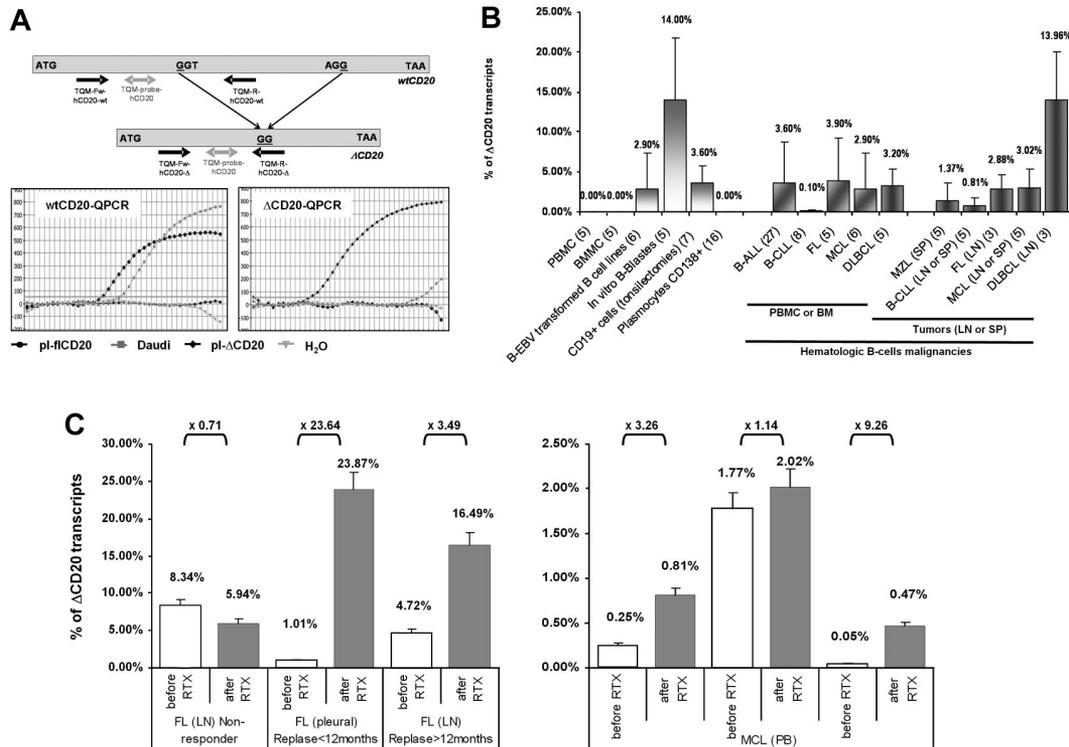


Figure 6. Quantification of the spliced Δ CD20 mRNA in activated B cells and hematologic malignancies, and illustration of clinical relevance through 2 cases. (A) Design of the RT-qPCR with schematic localization of primers and bifluorescent FAM/TAMRA TaqMan probe. Both PCRs (Δ CD20- and wtCD20-specific) were performed using an iCycler thermocycler (Bio-Rad) under standard TaqMan PCR conditions with the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Copy number of both forms of CD20 mRNA was assessed by comparison against serial plasmid dilutions carrying either the flCD20 or the Δ CD20 cloned cDNA. Representative qPCR curves confirming absence of cross-amplification between wtCD20- and Δ CD20-qPCR allowing, respectively, detection of both wtCD20 and Δ CD20 mRNA. (B) Δ CD20 mRNA quantification in normal PBMCs or BMMCs from healthy donors as well as in *in vitro* EBV-transformed B-cell lines, *in vitro*-generated B blasts, or in CD19⁺ cell-sorted cells from tonsillectomy samples and CD138⁺ plasmocytes from multiple myeloma. Quantification of Δ CD20 mRNA, performed in duplicate, in different normal (PBMCs or BMMCs) or hematologic B malignancies or tumor samples from lymph node (LN), spleen (SP), or pleural effusion (PL) was also reported. Number of cases analyzed for each normal or neoplasia cases are given in brackets in the sample's names of the x-axis. (C) RT-qPCR of CD20 transcripts on pre-rituximab (sensitive) and post-rituximab (resistant) primary cells. Left panel shows human samples (LN or PL) of patients (n = 3) with FL and treated with 3 or 4 courses of RTX. Among these 3 representative cases, 1 is a nonresponder to RTX, whereas the other 2 are early (< 12 months) or late (> 12 months) relapses. Right panel shows PB quantification on 3 patients with MCL (n = 3) from a clinical trial of the French GOELAMS group and treated with 4 courses of RTX (375 mg/m² of RTX). Fold changes (\times FC) are indicated. Δ CD20 transcript quantification is reported as relative percentage of Δ CD20: $R = (\Delta\text{CD20} / \text{wtCD20} + \Delta\text{CD20}) \times 100$. Error bars in panels B and C represent SE of RT-qPCR replicates.

exposure and independently of the complement source, human or newborn serum. This finding was also confirmed, in addition to Burkitt (Ramos or Raji), in pre-B (ROS) cell lines (supplemental Figure 5), and also by quantitative analysis of the signal in which the protein ratio of Δ CD20/wtCD20 signals similarly increased (Figure 5C left; supplemental Figure 5). Quantitative experiments at the mRNA level, using RT-qPCR assay, showed that the level of Δ CD20 mRNA transcripts increased with RTX exposure, in line with the Western blot experiments (Figure 5C right). Moreover, the protein ratio of Δ CD20/wt CD20 as well as the percentage of Δ CD20 mRNA correlated with RTX (5 μ g/mL) sensitivity (respectively, $R^2 = .9234$ and $R^2 = .9688$). Finally, Δ CD20 mRNA quantification was stable in different phases of the cell cycle (supplemental Figure 6). This important result might suggest that the portion of the B cells expressing Δ CD20 protein escaped RTX elimination.

Δ CD20 mRNA is found in activated B cells and in different human B-cell malignancies

To quantify the spliced form of CD20 in different B-cell malignancies, we designed an RT-qPCR assay allowing specific quantification of both flCD20 and Δ CD20 transcripts, assessed using respective reverse primers complementary to the deleted area or spanning the splicing junction (Figure 6A). A cross-amplification

experiment was performed from Daudi cDNA and plasmids carrying each form of transcript. flCD20-qPCR detected PCR product from Daudi (Ct = 18) and flCD20 plasmid (Ct = 12.7) but not from Δ CD20 plasmid, while Δ CD20 qPCR gave an amplification signal from Daudi (Ct = 34) and Δ CD20-plasmid (Ct = 11.8), but not from flCD20 plasmid. These results confirmed the specificity of both assays and showed that the Δ CD20 form is less abundant than the flCD20 (Ct_{wt} = 18 vs Ct _{Δ} = 34 in Daudi). Both assays have the same sensitivity of detection of one copy of target CD20 among one equivalent genome.

With this RT-qPCR assay, we quantified the Δ CD20 spliced form (expressed as relative percentage of total CD20 mRNA: $R = (\Delta\text{CD20}/\text{wtCD20} + \Delta\text{CD20}) \times 100$) in *in vitro* EBV-transformed B-cell lines ($2.9\% \pm 4.51\%$; n = 6) as well as in CD19⁺-sorted cells from tonsillectomy samples ($9\% \pm 2.2\%$; n = 7), *in vitro* B blast cells ($14\% \pm 7.8\%$; n = 5; Figure 6B) or Pokweed-activated B cells ($2.71\% \pm 1.48\%$; n = 2), without evidence of correlation with percentage of activated B cells (supplemental Figure 7). Interestingly, screening of a panel of B-cell hematologic malignancies in PB or BM showed that the spliced form is detectable at various levels. We found a mean of $3.6\% (\pm 5.1\%)$ in B-ALL (n = 27); $3.9\% (\pm 5.3\%)$ in FL (n = 5); $2.9\% (\pm 4.5\%)$ in MCL (n = 6); $3.2\% (\pm 2.2\%)$ in DLBCL (n = 5); and $0.1\% (\pm 0.2\%)$ in B-CLL (n = 8). In diagnosis tumor samples

(lymph nodes, spleen, or pleural effusion), quantification of the splice form of CD20 mRNA (mean \pm SE) showed, compared with BM or PB, a similar level as 2.8% (\pm 1.7%) in FL (n = 3), 3% (\pm 2.3%) in MCL (n = 5), 1.3% (\pm 2.3%) in MZL (n = 5), and 0.81% (\pm 0.8%) in CLL (n = 5), whereas there was a higher level in DLBCL (13.9% \pm 5.9%; n = 3; Figure 6B). Finally, RT-qPCR confirmed qualitative screening in which the spliced form was not detected in PBMCs (n = 5) or BMMCs (n = 5) from healthy donors as well as in CD138⁺ plasmacytes from multiple myeloma (n = 16; Figure 6B).

In addition, we quantified Δ CD20 mRNA on pre-RTX (sensitive) and post-RTX (resistant) primary cells from patients with FL (n = 3) or MCL (n = 3). We observed an increase of Δ CD20 mRNA in all cases of RTX escape (FC of \times 1.14 to \times 23.64; median, \times 3.38) except for the case of FL that did not initially respond to RTX treatment and where the Δ CD20 mRNA levels on post-RTX sample biopsies remain similar or slightly lower to the pre-RTX sample (FC [FC] = \times 0.71; Figure 6C).

Discussion

We describe here a new splice CD20 variant (Δ CD20) that differs from 2 previously reported variants and also from those identified in 2 genome-wide analyses describing different MS4A variants and their putative translated proteins.^{2,36} This novel Δ CD20 mRNA is expressed in-frame from the ATG start codon within exon 3 and fuses part of exon 3 to exon 7, leading to a coded protein lacking the extracellular domain (including the RTX epitope sequence³⁵) and much of the 4 TM-spanning domains.

We also provide here, for the first time, substantial evidence that this spliced Δ CD20 mRNA variant is naturally translated into a protein. Confocal microscopy and Western blot results on B-cell lines, using a C-term CD20 antibody, showed that in-frame mRNA Δ CD20 transcript codes for a putative protein of 15 to 17 kDa. Second, the 15- to 17-kDa signal band was consequently increased after transduction of the Raji cell line with a retroviral vector carrying the Δ CD20 cDNA sequence. We also demonstrated, with site-directed mutagenesis of the AS that results in an absence of splicing, that the CD20-spliced mRNA is the source of this new Δ CD20 protein. Interestingly, this mutated/corrected CD20 cDNA sequence may also be an interesting tool for gene suicide therapy using gene-modified T cells to modulate alloreactivity after BM graft.²⁵ To our knowledge, these results are the first demonstration that the Δ CD20 exists.

As shown after Raji cell transduction by a retroviral vector carrying the Δ CD20 cDNA, while Δ CD20 protein expression increased, wtCD20 protein expression decreased, suggesting a relation between the two. Moreover, Western blot on subcellular fractions showed that the Δ CD20 protein is harvested within the membrane compartment. In addition, anti-CD20 immunoprecipitation with an anti-CD20 antibody recognizing only the wtCD20 protein indicated an association of both proteins, Δ CD20/wtCD20, rather than an anchor by the remnant of the TM domains (5 amino acids).

A careful review of previous studies identifies reports of lower additional bands through Western blot using an anti-CD20 antibody, but none of these studies addressed these additional smaller molecular species as the product of the translation of a potential alternative Δ CD20 transcript. Czuczman et al²⁰ assigned this additional lower band to the light chains of IgM, while Kennedy et al,³⁷ in the case of a patient with CLL treated with RTX, concluded

that this lower band may have corresponded to a partial digestion product of the CD20 protein.²⁰

Although CD20 is the cell-surface target of the best-known immunotherapy (RTX) for treating B-cell malignancies or various autoimmune diseases, its function remains unclear. RTX is administered, with or without chemotherapy, for various CD20⁺ B-cell lymphoproliferative disorders. Despite the known efficiency of RTX, some patients with NHL exhibit poor or no clinical response to RTX monotherapy,³⁸ and repeated exposure leads to relapse/resistance to RTX therapy.

Many factors influence RTX response at the protein level.^{16,19,20,23,33} One interesting and important finding in the current work is that RTX resistance leads to increased Δ CD20 signal, suggesting that some CD20-expressing B cells persist despite RTX treatment. Many examples of gene-expression modulation by an associated mRNA variant have been reported in B cells.^{39,40} As shown here, after Western blot on the Δ CD20-transduced Raji cell line, Δ CD20 protein seemed to modulate wtCD20 expression, thus leading to reduced wtCD20 expression as evaluated on patient samples in DLBCL and correlated with inferior survival.⁴¹ The Δ CD20 protein may also interact with the wtCD20 protein and modulate CD20 reorganization within the lipid raft and contribute to the development of RTX resistance. Moreover, detection by Western blotting of 2 forms of the Δ CD20 protein may correspond to different states of phosphorylation, as previously described for the wtCD20 protein;^{5,23} this finding suggests that kinases and phosphatases may regulate the Δ CD20 protein. The fact that splicing does not affect remaining putative serine/threonine phosphorylation domains⁴² in the Δ CD20 protein supports this hypothesis. Furthermore, persistence of phosphorylation sites after splicing and thus potential activation of Δ CD20 protein through protein kinases make this molecule an indirect potential target for kinase inhibitors to improve treatment.

Molecular events have also been associated with response modulation or RTX resistance.^{21,41,43,44} More recently, deletions/mutations were described within the C-term region of the CD20,²¹ but no previous study identified the presence of this alternative Δ CD20 transcript. Thus, we report here another possible phenomenon of RTX resistance associated with CD20 gene splicing and Δ CD20 expression.

Finally, it is now well known that splice variants are differentially expressed in tumors,⁴⁵ and some are used as cancer biomarkers.⁴⁶ The initial phase of this study thus targeted investigation of hematologic B-cell malignancies for the presence or absence of the splice Δ CD20 alternative transcripts to assess its potential use in a molecular assay for monitoring disease. Δ CD20 transcripts were found and quantified at different levels in all screened malignancies, as well as in EBV-transformed B cells, in vitro B blasts, or B lymphocytes purified from tonsillectomies, but was not detected in PBMCs, BMMCs, plasmacytes, or purified CD19⁺- or CD20⁺-sorted cells from healthy donors. All of these observations and a low-versus-high level found respectively in chronic or acute diseases (CLL vs ALL) favor a relationship between the activation state of B cells and Δ CD20 presence rather than between a potential malignant transformation with Δ CD20 presence. Our designed RT-qPCR molecular tool, allowing Δ CD20 discrimination from the wtCD20 form, may help in investigations of B-cell lymphoproliferative disorders or in monitoring RTX treatment in cases of GVHD⁴⁷ or refractory kidney transplant rejection.^{15,48} Our data of Δ CD20 mRNA quantification before (sensitive) and after (resistant) RTX treatment in FL and MCL clinical cases provide

some interesting support for future investigation of both potential clinical approach and future evaluation in a larger cohort.

In addition to describing this new spliced CD20 transcript, there are many arguments that presence of the Δ CD20 protein related to RTX resistance constitutes a potential target for therapeutic issues⁴⁹ to improve efficiency of standard RTX treatment.¹¹ Splicing factors are differentially expressed in tumors,⁴⁵ thus constituting an interesting focus for therapeutic studies. The splicing signal may be modulated upstream by aiming for proteins involved in the splicing event or downstream by targeting the splicing products themselves. In our work, preliminary data from western blots with an antibody targeting the key and central splice factor ASF/SF2 revealed an increase in this factor in RTX resistance, making it a candidate for future therapies in B-cell lymphoproliferative disorders.

In other ways, more specific targeting of splice variants products at the mRNA or protein levels may be assessed respectively by RNA interference⁵⁰ or immunotherapy approaches. As reported, a clinical trial evaluation (EPIC Study)⁵¹ of peptide vaccination against a BCR-ABL e14a2 junctional peptide revealed the potential efficiency of this approach. Affinity-autoreactive cytotoxic T lymphocytes (CTLs) have already been described, especially against peptide CD19 or CD20 antigens.⁵² These different strategies could apply to the Δ CD20 protein. Based on our preliminary data for vaccination, in a transgenic murine model expressing human HLA, we have demonstrated that the splice junction area of the protein could be targeted to direct a specific CTL response, and that autoreactive CTLs against Δ CD20 peptide junctions exist in healthy people. These results support continued investigation of a vaccination immunotherapy approach or of a redirection of CD8⁺ T primary lymphocytes against Δ CD20 by T-cell receptor (TCR) transfer⁵² of our isolated anti- Δ CD20 T-cell clones. This potential should be evaluated in a murine model⁵³ to assess method efficiency.

In conclusion, we have demonstrated that a new, spliced CD20 mRNA variant codes for a novel, modified intracellular/submembrane CD20 protein correlated with RTX resistance, which may be targeted by in vivo autoreactive CTLs after immunization for improving standard RTX treatments. This alternative transcript may also be an interesting diagnostic, prognostic, or predictive molecular marker for monitoring B-cell malignant diseases, a possibility that requires evaluation in murine models as well as in larger cohorts of patients treated by RTX.

Acknowledgments

We thank Dr Delphine Sauce-Larsen and Dr Martin Larsen for providing the B blasts. We also thank Prof Thierry Fest (Rennes) and Dr Laurence Lode (Nantes) for supplying purified CD19⁺ cells from tonsillectomies and CD138⁺ plasmocytes from multiple myeloma samples, respectively. We thank Prof Françoise Berger (Lyon), Prof Bernadette Kantelip (Besançon), and Martine Chauvet (Grenoble) for preparing and providing samples and helpful discussion, and we thank Katy Billot for participating in this study while earning her Master 1 and Anne Duperrier and Claire Latruffe for their technical support.

C.H. received a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. This work was also supported by Inserm, the Ligue Contre le Cancer, Comité du Doubs, The Fondation de Transplantation, the Etablissement Français du Sang (EFS) national grant, and the associations Centpoursanglavie and Capucine (grant no. 2-2008).

Authorship

Contribution: C.H., M.D., and C.G. executed the molecular study, cloned the cDNA, expressed the protein, performed the vector constructs and the functional studies, and wrote the original draft of the manuscript; C.H., M.D., and J.-R.P. performed the immunofluorescence confocal microscopy analysis; C.H. and J.-P.R.-M. performed the Western blot analysis; P.-S.R., M.C., A.T.-G., R.G., E.D., and G.S. provided the clinical samples of hematologic B-cell malignancies and participated to the discussion; P.S.-R., F.G.-O., E.R., P.T., and C.B. contributed to improving the manuscript and gave final approval on the manuscript; and C.F. initiated and designed the study, participated in every step of the study, managed the whole project, and wrote the manuscript.

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

Correspondence: Christophe Ferrand, Laboratoire de Thérapeutiques Immuno-Moléculaires et Cellulaires des Cancers, Inserm UMR645/IFR133, Etablissement Français du Sang-Bourgogne/Franche-Comté, 1 Blvd Alexandre Fleming, 25020 Besançon cedex, France; e-mail: christophe.ferrand@efs.sante.fr.

References

- Algino KM, Thomason RW, King DE, Montiel MM, Craig FE. CD20 (pan-B cell antigen) expression on bone marrow-derived T cells. *Am J Clin Pathol*. 1996;106(1):78-81.
- Liang Y, Buckley TR, Tu L, Langdon SD, Tedder TF. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. *Immunogenetics*. 2001;53(5):357-368.
- Tedder TF, Klejman G, Schlossman SF, Saito H. Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J Immunol*. 1989;142(7):2560-2568.
- Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J*. 1988;7(3):711-717.
- Tedder TF, Schlossman SF. Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes. *J Biol Chem*. 1988;263(20):10009-10015.
- Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor: dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J Biol Chem*. 2008;283(27):18545-18552.
- Popoff IJ, Savage JA, Blake J, Johnson P, Deans JP. The association between CD20 and Src-family Tyrosine kinases requires an additional factor. *Mol Immunol*. 1998;35(4):207-214.
- Giles FJ, Vose JM, Do KA, et al. Circulating CD20 and CD52 in patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's disease. *Br J Haematol*. 2003;123(5):850-857.
- Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83(2):435-445.
- Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*. 1998;91(5):1644-1652.
- Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004;104(9):2635-2642.
- Edwards JC, Leandro MJ, Cambridge G. B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(4):824-828.
- Cutler C, Miklos D, Kim HT, et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2006;108(2):756-762.
- Verschuuren EA, Stevens SJ, van Imhoff GW, et al. Treatment of posttransplant lymphoproliferative disease with rituximab: the remission, the relapse, and the complication. *Transplantation*. 2002;73(1):100-104.
- Becker YT, Becker BN, Pirsch JD, Sollinger HW. Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant*. 2004;4(6):996-1001.
- Olejniczak SH, Hernandez-Illizaliturri FJ, Clements JL, Czuczman MS. Acquired resistance

- to rituximab is associated with chemotherapy resistance resulting from decreased Bax and Bak expression. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1550-1560.
17. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fcγ3 gene. *Blood*. 2002;99(3):754-758.
 18. Dworzak MN, Schumich A, Printz D, et al. CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. *Blood*. 2008;112(10):3982-3988.
 19. Jilani I, O'Brien S, Manshuri T, et al. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;102(10):3514-3520.
 20. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1561-1570.
 21. Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, et al. Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2523-2530.
 22. Tomita A, Hiraga J, Kiyoi H, et al. Epigenetic regulation of CD20 protein expression in a novel B-cell lymphoma cell line, RRBL1, established from a patient treated repeatedly with rituximab-containing chemotherapy. *Int J Hematol*. 2007;86(1):49-57.
 23. Sugimoto T, Tomita A, Shimada K, et al. Relationship between post-translational modification of CD20 protein and the responsiveness to rituximab treatment [abstract]. *Blood*. 2008;112:Abstract 2667.
 24. van Meerten T, Claessen MJ, Hagenbeek A, Ebeling SB. The CD20/alphaCD20 'suicide' system: novel vectors with improved safety and expression profiles and efficient elimination of CD20-transgenic T cells. *Gene Ther*. 2006;13(9):789-797.
 25. Serafini M, Manganini M, Borleri G, et al. Characterization of CD20-transduced T lymphocytes as an alternative suicide gene therapy approach for the treatment of graft-versus-host disease. *Hum Gene Ther*. 2004;15(1):63-76.
 26. Introna M, Barbui AM, Bambacioni F, et al. Genetic modification of human T cells with CD20: a strategy to purify and lyse transduced cells with anti-CD20 antibodies. *Hum Gene Ther*. 2000;11(4):611-620.
 27. Grosso AR, Martins S, Carmo-Fonseca M. The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Rep*. 2008;9(11):1087-1093.
 28. Garin MI, Garrett E, Tiberghien P, et al. Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Blood*. 2001;97(1):122-129.
 29. Ibisch C, Saulquin X, Gallot G, et al. The T cell repertoire selected in vitro against EBV: diversity, specificity, and improved purification through early IL-2 receptor alpha-chain (CD25)-positive selection. *J Immunol*. 2000;164(9):4924-4932.
 30. Ferrand C, Robinet E, Contassot E, et al. Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes: influence of the transduction/selection process and of ex vivo expansion on the T cell receptor beta chain hypervariable region repertoire. *Hum Gene Ther*. 2000;11(8):1151-1164.
 31. Technical University of Denmark Center for Biological Sequence Analysis. NetGene2 release 2.4. Available at: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>. Accessed July 25, 2007.
 32. University of California Berkeley Drosophila Genome Project. NNSplice v0.9. Available at: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html. Accessed August 27, 2003.
 33. Takei K, Yamazaki T, Sawada U, Ishizuka H, Aizawa S. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leuk Res*. 2006;30(5):625-631.
 34. National Center for Biotechnology Information (NCBI). GenBank. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>. Accessed March 25, 2005.
 35. Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M. The epitope recognized by rituximab. *Blood*. 2006;108(6):1975-1978.
 36. Liang Y, Tedder TF. Identification of a CD20-, FcεpsilonR1beta-, and HTm4-related gene family: sixteen new MS4A family members expressed in human and mouse. *Genomics*. 2001;72(2):119-127.
 37. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, et al. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol*. 2004;172(5):3280-3288.
 38. Davis TA, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol*. 2000;18(17):3135-3143.
 39. Renaudineau Y, Hillion S, Saraux A, Mageed RA, Youinou P. An alternative exon 1 of the CD5 gene regulates CD5 expression in human B lymphocytes. *Blood*. 2005;106(8):2781-2789.
 40. Iacobucci I, Lonetti A, Messa F, et al. Expression of spliced oncogenic Ikaros isoforms in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: implications for a new mechanism of resistance. *Blood*. 2008;112(9):3847-3855.
 41. 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):3773-3780.
 42. Riley JK, Sliwkowski MX. CD20: a gene in search of a function. *Semin Oncol*. 2000;27(6 suppl 12):17-24.
 43. Sar A, Perizzolo M, Stewart D, Mansoor A, Difrancesco LM, Demetrick DJ. Mutation or polymorphism of the CD20 gene is not associated with the response to R-CHOP in diffuse large B cell lymphoma patients. *Leuk Res*. 2009;33(6):792-797.
 44. Johnson NA, Leach S, Woolcock B, et al. CD20 mutations involving the rituximab epitope are rare in diffuse large B-cell lymphomas and are not a significant cause of R-CHOP failure. *Haematologica*. 2009;94(3):423-427.
 45. Kirschbaum-Slager N, Lopes GM, Galante PA, Riggins GJ, de Souza SJ. Splicing factors are differentially expressed in tumors. *Genet Mol Res*. 2004;3(4):512-520.
 46. Brinkman BM. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem*. 2004;37(7):584-594.
 47. Kapur R, Ebeling S, Hagenbeek A. B-cell involvement in chronic graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2008;93(11):1702-1711.
 48. Thauinat O, Patey N, Gautreau C, et al. B cell survival in intragraft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation*. 2008;85(11):1648-1653.
 49. Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R, Montuenga LM. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol*. 2007;8(4):349-357.
 50. Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(6):468-479.
 51. Rojas JM, Knight K, Wang L, Clark RE. Clinical evaluation of BCR-ABL peptide immunisation in chronic myeloid leukaemia: results of the EPIC study. *Leukemia*. 2007;21(11):2287-2295.
 52. Grube M, Rezvani K, Wiestner A, et al. Autoreactive, cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from normal B-cell differentiation antigens in healthy individuals and patients with B-cell malignancies. *Clin Cancer Res*. 2004;10(3):1047-1056.
 53. Daydé D, Ternant D, Ohresser M, et al. Tumor burden influences exposure and response to rituximab: pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling using a syngeneic bioluminescent murine model expressing human CD20. *Blood*. 2009;113(16):3765-3772.

Supplemental materials

Table S1, Henry *et al.*,

Table S1: Follow-up of RTX resistance establishment in 3 different cells lines, after exposure to different doses of RTX + Human (HS) or Newborn Rabbit Serum (NRS).

Cell lines	Source of complement for RTX exposure	RTX resistance establishment	% of cell lysis		
			Days post last RTX exposure		
			Day15	Day21	Day30
Ramos	---	R-N	100	100	100
	Human (HS)	R2-2	72	72	97
Ros	---	R-N	100	100	100
	Human (HS)	R2-2	70	70	95
	Newborn rabbit (NRS)	R2-2	66	70	98
SKW6.4	---	R-N	89	85	72
	Newborn rabbit (NRS)	R2-2	79	71	69
	Newborn rabbit (NRS)	R2-64	53	57	57
	Newborn rabbit (NRS)	R2-128	45	53	51

HS : human serum ; NRS : Newborn Rabbit Serum

R-N are normal cell lines, R2-2, R2-64, and R 2-128 are resistance cell lines after respectively 2, 64, and 128 µg/ml of Rituximab. % of cell lysis are reported from CDC assay performed with 10 g/ml of RTX + 25% of NRS.

Figure S1, Henry *et al.*

M	T	T	P	R	N	S	V	N	G	T	F	P	A	E	P	M	K	18
ATG	ACA	ACA	CCC	AGA	AAT	TCA	GTA	AAT	GGG	ACT	TTC	CCG	GCA	GAG	CCA	ATG	AAA	54
G	P	I	A	M	Q	S	G	P	K	P	L	F	R	R	M	S	S	36
GGC	CCT	ATT	GCT	ATG	CAA	TCT	GGT	CCA	AAA	CCA	CTC	TTC	AGG	AGG	ATG	TCT	TCA	108
L	E	L	V	I	A	G	I	V	E	N	E	W	K	R	T	C	S	54
CTG	GAA	CTT	GTA	ATA	GCT	GGC	ATC	GTT	GAG	AAT	GAA	TGG	AAA	AGA	ACG	TGC	TCC	162
R	P	K	S	N	I	V	L	L	S	A	E	E	K	K	E	Q	T	72
AGA	CCC	AAA	TCT	AAC	ATA	GTT	CTC	CTG	TCA	GCA	GAA	GAA	AAA	AAA	GAA	CAG	ACT	216
I	E	I	K	E	E	V	V	G	L	T	E	T	S	S	Q	P	K	90
ATT	GAA	ATA	AAA	GAA	GAA	GTG	GTT	GGG	CTA	ACT	GAA	ACA	TCT	TCC	CAA	CCA	AAG	270
N	E	E	D	I	E	I	I	P	I	Q	E	E	E	E	E	E	T	108
AAT	GAA	GAA	GAC	ATT	GAA	ATT	ATT	CCA	ATC	CAA	GAA	GAG	GAA	GAA	GAA	GAA	ACA	324
E	T	N	F	P	E	P	P	Q	D	Q	E	S	S	P	I	E	N	126
GAG	ACG	AAC	TTT	CCA	GAA	CCT	CCC	CAA	GAT	CAG	GAA	TCC	TCA	CCA	ATA	GAA	AAT	378
D	S	S	P	*														131
GAC	AGC	TCT	CCT	TAA														393

Figure S1: Nucleotide sequence and translation of the Δ CD20 transcript.

Figure S2, Henry *et al.*

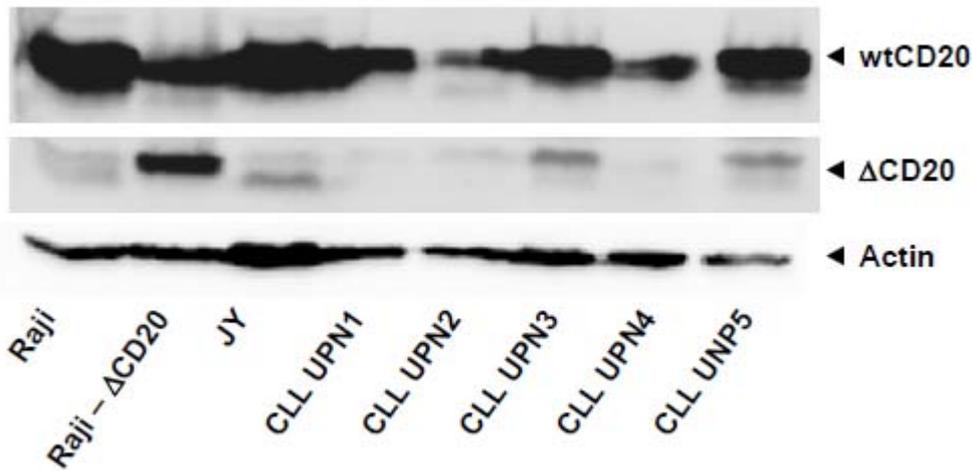


Figure S2: Western blotting on 5 (UPN1 to UPN5) primary CLL patient samples at diagnosis using the c-term anti-CD20 antibody.

Raji, Raji-ΔCD20 and JY cell lines are used as controls.

Figure S3, Henry *et al.*

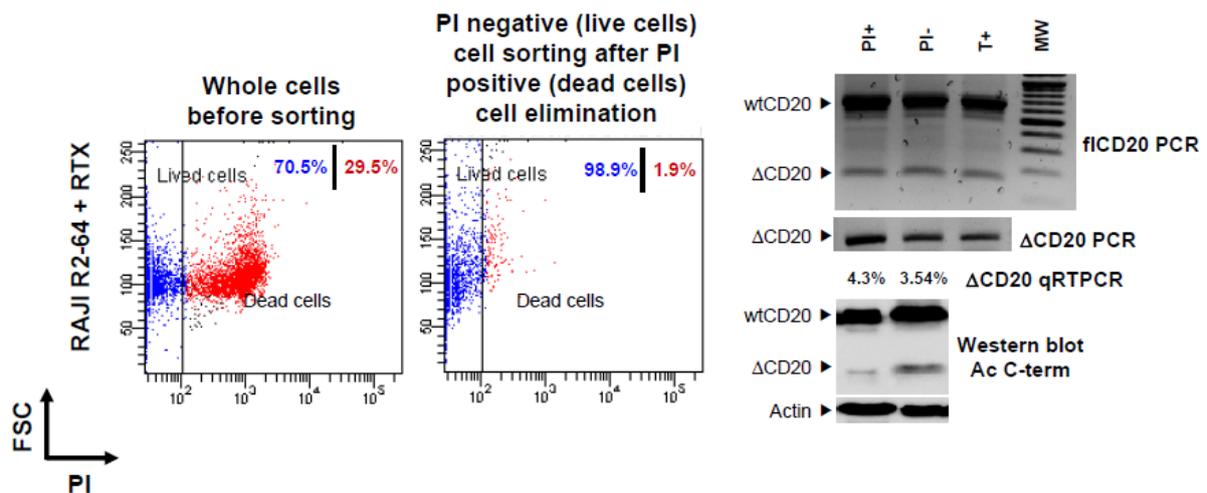


Figure S3. RT-PCR (fl- and Δspecific-CD20), qRT-PCR, western blotting of cells sorting according to propidium iodide staining allowing alive (PI⁻) and dead (PI⁺) cells separation of Raji R2-64 RTX resistant cell line.

Figure S4, Henry *et al.*

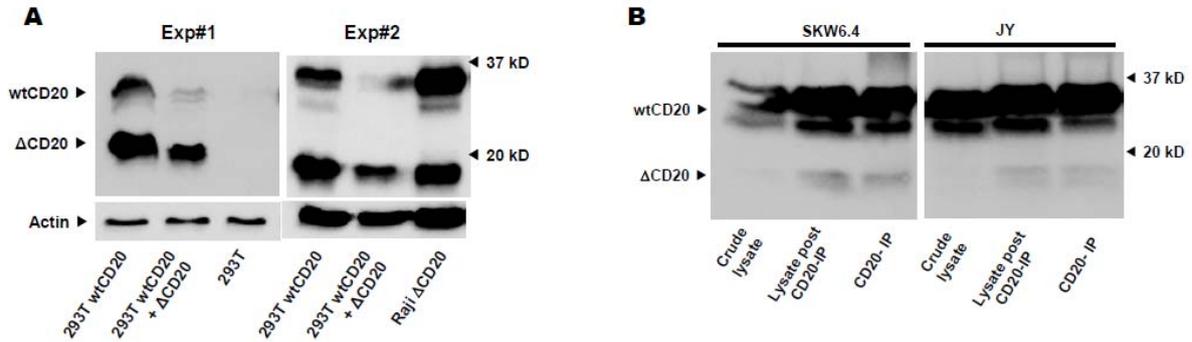


Figure S4: CD20-IP

(A) Two separate experiments and western blot analysis using the c-term anti-CD20 antibody of wtCD20 expressing 293T cells transduced or not with Δ CD20. 293T cells and Δ CD20-transduced-Raji cells were used as controls. (B) Immunoprecipitation (IP) using an anti-CD20 antibody specific of the wtCD20 protein (that doesn't recognize the Δ CD20) on two different SKW6.4 and JY B cell lines.

Figure S5, Henry *et al.*

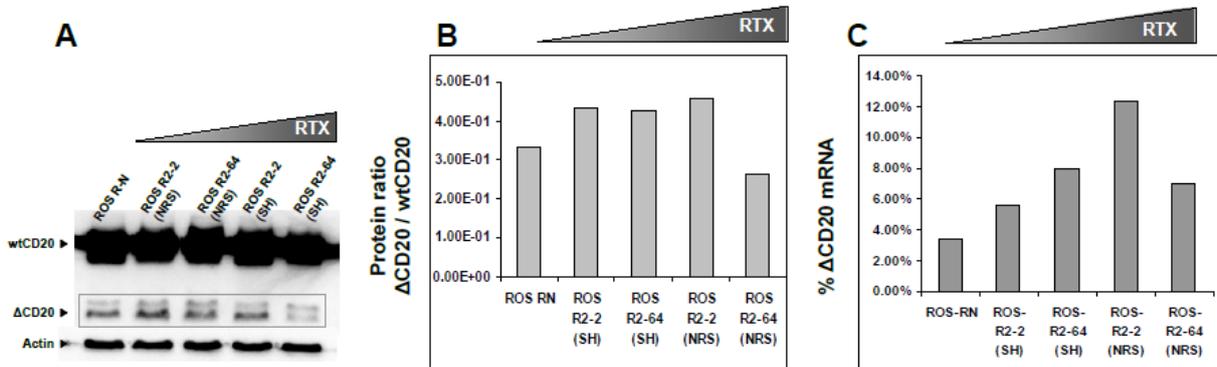


Figure S5: Δ CD20-ROS cell line.

(A) Western blot analysis, (B) signal protein ratio Δ CD20/wtCD20 and (C) Δ CD20 mRNA RT-qPCR quantification, of ROS cell line after RTX exposure (2 and 64 μ g/ml) with newborn rabbit (NRS) or human serum (HS) as a source of complement.

Figure S6, Henry *et al.*

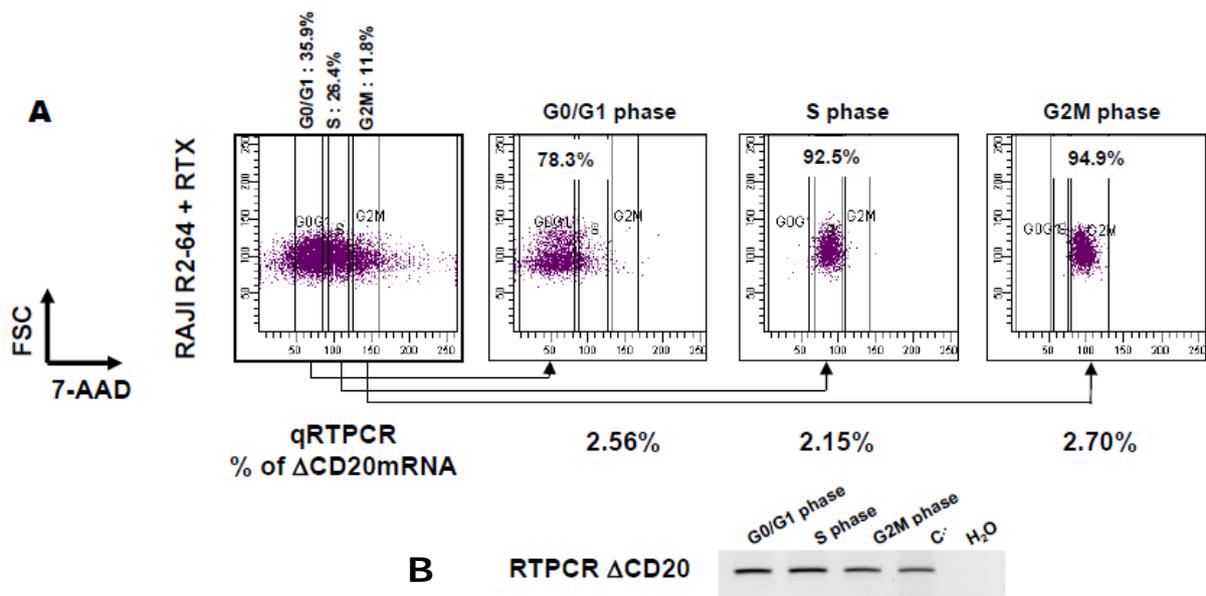


Figure S6: 7-AAD

(A) Cell sorting of different steps of the cellular cycle (G0/G1, S, and G2M) of SKW6.4 cell line according to the 7-AAD staining. Percentages of each fraction are provided before and after cell sorting. Percentages of Δ CD20 mRNA are given. (B) Agarose gel electrophoresis of Δ CD20-specific-RT-PCR products in different cell cycle phases.

Figure S7, Henry *et al.*

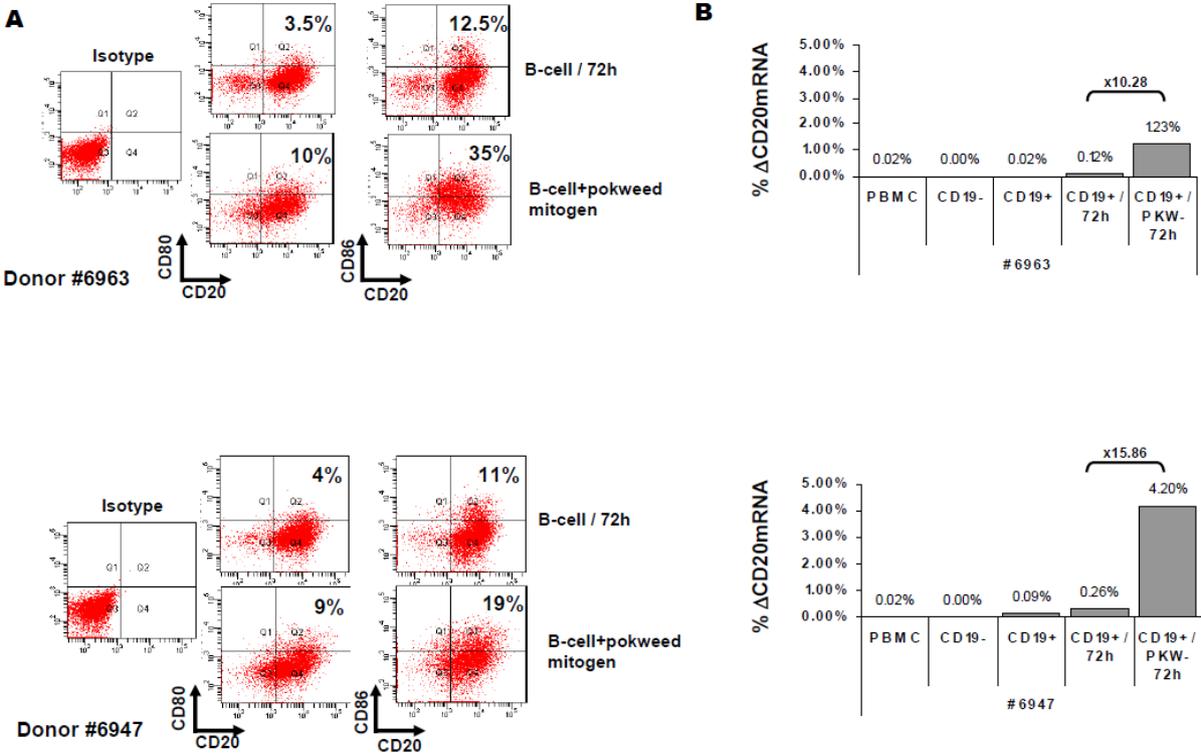


Figure S7: Pokweed mitogen activation of CD19⁺ sorted B cells (1.10^{E6} B cells/ml activated with 1μg/ml PWM) from 2 healthy donors.

(A) Cytometry analysis of CD80 and CD86 surface markers on activated or not B cells. Percentage of CD80⁺/CD20⁺ or CD86⁺/CD20⁺ B cells is given (B) Percentage of ΔCD20 mRNA assesses, at day 3 by qRT-PCR, on different fractions of primary B cells, as PBMC, CD19⁻, CD19⁺, CD19⁺ activated or not by PWM.

Données non publiées

Rationnel

Suite à la découverte de ce nouvel épissage alternatif du gène CD20 et à la mise en évidence d'une protéine codée par cet ARNm tronqué, nous nous sommes interrogés sur l'impact d'une telle cible en immunothérapie anti-tumorale.

En effet, nos résultats suggèrent un rôle de cette protéine (absente chez des donneurs sains) dans l'activation et/ou la transformation cellulaire ainsi que dans les résistances au traitement par RTX. L'objectif de cette stratégie serait donc de cibler la protéine Δ CD20, en tant qu'antigène de tumeur avec des LT spécifiques, afin d'éradiquer les cellules tumorales chez des patients réfractaires au traitement par RTX et/ou en rechute. La zone de fusion « exon 3 – exon 7 » produit une nouvelle séquence protéique potentiellement immunogène. Des travaux ont d'ailleurs montré que les zones de fusion protéiques issues de la traduction de transcrits de fusion Bcr/Abl^{369,370} ou de néo-peptides issus du protéasome³⁸³ sont immunogènes.

Afin d'évaluer la faisabilité d'une telle approche, il nous a fallu dans un premier temps, évaluer l'immunogénicité de cette protéine c'est-à-dire sa capacité à générer une réponse lymphocytaire T. L'identification d'épitopes, et notamment (compte tenu du rôle essentiel de la réponse CD8⁺ dans la réponse anti-tumorale) de ceux présentés par le HLA-I, a donc constitué une étape essentielle pour notre stratégie d'immunothérapie anti-tumorale.

L'immunogénicité de la protéine Δ CD20 a tout d'abord été évaluée par génération de CTL dans des souris transgéniques HLA-A2/DR1. Suite à des résultats positifs chez la souris, nous nous sommes intéressés à la présence de tels CTL chez l'homme. Ces travaux seront donc présentés en deux parties.

Le choix des séquences peptidiques susceptibles de constituer des épitopes présentés par une molécule du HLA-I donnée, peut s'effectuer, par l'analyse de la séquence de l'antigène grâce à des modèles de prédiction d'épitopes. Ces modèles sont basés sur des algorithmes mathématiques prenant en compte des résidus d'ancrage primaires et secondaires des peptides à une molécule de HLA définie.

« SYFPEITHI » est le premier algorithme de prédiction d'épitopes restreints à HLA-I, basé sur l'identification des résidus d'ancrage³²¹. Un deuxième algorithme appelé « BIMAS » est lui basé sur le demi-temps de dissociation des complexes HLA-I/peptide³⁸⁴.

Ainsi, à partir de la séquence en AA de Δ CD20, nous avons utilisé la base SYFPEITHI pour dessiner des peptides spécifiques de la zone de jonction de l'épissage alternatif (peptides

spécifiques uniquement de la forme Δ CD20), capables de se lier à HLA-A2. Deux peptides potentiellement immunogènes restreints pour HLA-A2 (score supérieur ou égal à 18) ont été mis en évidence grâce à cette base (figure 26) et 6 autres peptides chevauchant la zone de jonction ont été synthétisés (société Millegen, France, pureté >80%).

HLA-A*0201 nonamers									score
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
S	L	E	L	V	I	A	G	I	26
R	M	S	S	L	E	L	V	I	18
R	R	M	S	S	L	E	L	V	15
F	R	R	M	S	S	L	E	L	14
L	E	L	V	I	A	G	I	V	14
S	S	L	E	L	V	I	A	G	12
M	S	S	L	E	L	V	I	A	10
L	F	R	R	M	S	S	L	E	2

Figure 26 : Résultats de l’algorithme SYFPEITHI concernant la protéine Δ CD20.
<http://www.syfpeithi.de> ³²¹ (site consulté en novembre 2006).

Ces 8 peptides comportent 9 AA (on parle de 9-mer) consécutifs de l’antigène Δ CD20 et leur séquence est précisée ci-dessous (figure 27). De plus, nous avons pu mettre en évidence les sites de coupure par le protéasome dans la séquence de Δ CD20, ceci grâce à un outil prédictif de clivage par le protéasome : PAPProC (figure 28).

MTTPRNSVNGTFPAEPMKGP IAMQSGPKP LFRRMSSL/ELVIAGIV ENWKRTCSRPKSNIVLLSAE EKKEQT

Peptide N°1 : LFRRMSSL/E
Peptide N°2 : FRRMSSL/EL
Peptide N°3 : RRMSSL/ELV
Peptide N°4 : RMSSL/ELVI
Peptide N°5 : MSSL/ELVIA
Peptide N°6 : SSL/ELVIAG
Peptide N°7 : SL/ELVIAGI
Peptide N°8 : L/ELVIAGIV

Figure 27 : Séquence des peptides spécifiques de Δ CD20.

Une partie de la séquence en AA de la protéine Δ CD20, correspondant à la zone de jonction « exon 3-exon 7 » est présentée au-dessus de la figure. La zone de jonction, d’où sont issus les peptides, est précisée en bleu. Les peptides en rouge sont ceux potentiellement restreints par HLA-A2 selon SYFPEITHI. Les peptides seront ensuite toujours nommés par les trois premières lettres de leur séquence AA.

PAPROC - Results

Short output form

PAPROC predicts the following (54) proteasomal cleavages (made by **human proteasome type II**) in **deltahCD20** (130 amino acids):

1	MTTPRN S VNG TFP AE PMK GP
21	IAM Q S G P KPL FR RMSSL ELV
41	I AGI V E N EWRKTC SRPKSNI
61	VLL SAE EKK E Q TIEI K E E VV
81	G L TE T SS Q P KNE ED IEIPI
101	Q E E E E E E TE TNF PEP PQD Q E
121	SS PIENDSSP

Figure 28 : Sites de clivage prédictifs de la protéine Δ CD20 par le protéasome (logiciel PAPROC).

Les sites de clivage sont matérialisés par les barres rouges. La zone de jonction, d'où sont issus les peptides, est encadrée en rouge. <http://www.paproc.de/>^{385,386} (site consulté en novembre 2006).

1 Mise en évidence de l'immunogénicité de la protéine Δ CD20 chez la souris

1.1 Matériel et méthodes

1.1.1 Immunisation des souris

Les souris utilisées sont des souris transgéniques exprimant les molécules du CMH humain HLA-A2 et HLA-DR1 et qui sont KO pour le CMH murin (classe I et II)³⁸⁷. Ces souris nous ont été fournies par le Dr F. Lemonnier de l'institut Pasteur et élevées à l'animalerie de l'UMR645. Les souris sont immunisées avec des pools de 2 ou 3 peptides et reçoivent 2 injections à la base de la queue à 8 jours d'intervalle avec : 50 μ g de chaque peptide, 100 μ g de peptide « helper » (peptide 20-mer issu soit de pp65 du CMV séquence TPPAYRPPNAPIL, soit le peptide PADRE, qui est un peptide PAN-DR de séquence AKXVAAWTLKAAA avec X= cyclohexylalanine) le tout co-émulsifié avec de l'adjuvant incomplet de Freud. Sept jours après la 2^{ème} immunisation, les splénocytes sont restimulés *in vitro* avec 4 μ g/ml de chaque peptide séparément. Au 5^{ème} jour de culture, les populations qui répondent sont testées pour déterminer une cytotoxicité spécifique.

1.1.2 Cytotoxicité au ⁵¹Cr

Un essai de cytotoxicité classique en 4 heures est utilisé. Brièvement, les cellules cibles (RMAS-HHD chez la souris et T2 chez l'homme) sont chargées avec 4 μ g/ml du peptide à tester, ou d'un peptide témoin non-pertinent, marquées avec 100 μ Ci de ⁵¹Cr puis mises en contact pendant 4 heures avec les cellules effectrices d'intérêt (rapport cellules effectrices/cellules cibles = 30/1 ; 10/1 ; 3/1 et 1/1). Après incubation, 50 μ l de surnageant sont collectés, transférés dans des plaques spécifiques (Lumaplate, Perkin Elmer, France) et la radioactivité est mesurée dans un compteur γ . Le pourcentage de lyse spécifique est calculé selon la formule suivante : $[(\text{Libération de } ^{51}\text{Cr expérimentale} - \text{libération de } ^{51}\text{Cr spontanée}) / (\text{libération de } ^{51}\text{Cr maximale} - \text{libération de } ^{51}\text{Cr spontanée})] \times 100$.

1.1.3 Elispot IFN γ murin

Les splénocytes restimulés *in vitro* sont mis en culture pendant 16 heures avec des cellules cibles (RMAS-HHD) chargées avec 4 μ g/ml des différents peptides spécifiques de Δ CD20 et d'un peptide témoin (rapport cellules effectrices/cellules cibles = 5/2 et 1/2). Les puits sont réalisés en triplicate. La formation de spots correspondant aux cellules sécrétant

l'IFN γ est détectée selon les instructions du fournisseur (Diacclone, France). Les spots sont comptés sur un lecteur Axioskop 2 (Zeiss, France).

1.2 Résultats

Pour la première expérience d'immunisation, les souris ont été immunisées avec des pools de peptides spécifiques de Δ CD20, toutes avec le peptide « helper » pp65 et les groupes étaient constitués de quatre souris. Le groupe 1 a été immunisé avec les peptides LFR, RMS, LSS ; le groupe 2 avec les peptides FRR, SLE SSL et le dernier groupe avec les peptides RRM et LEL.

Les splénocytes ont ensuite été restimulés de manière peptide spécifique *in vitro* afin de trouver le ou les peptides spécifiques induisant une réponse cytotoxique CD8 et une partie des cellules est utilisée pour réaliser un test de cytotoxicité au ^{51}Cr , permettant la mise en évidence de CTL. Les cellules cibles utilisées sont des RMA-S-HHD (HHD étant une construction modifiée en $\alpha 3$ de HLA-A2) ³⁸⁸. Une réponse a été observée uniquement pour le peptide RMS (figure 29). Dans le groupe 1, pour trois souris sur quatre, une lyse (allant de 20 à 50%) est observée lors de l'expérience de cytotoxicité, lorsque les cellules cibles sont chargées avec le peptide RMS, alors qu'il n'y a aucune lyse avec un peptide témoin.

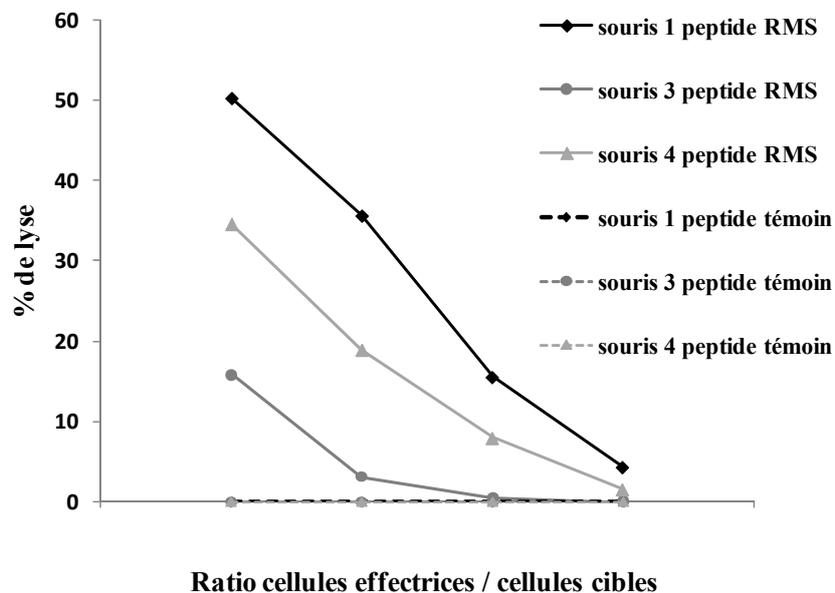


Figure 29 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé suite à une immunisation avec différents peptides spécifiques de Δ CD20.

Les cellules effectrices sont les splénocytes restimulés *in vitro* avec chaque peptide séparément et les cellules cibles sont des RMA-S-HHD. Ne figurent ici que les souris répondantes (souris 1, 3 et 4) pour le seul peptide induisant une réponse : le peptide RMS.

Les CTL spécifiques du peptide RMS ainsi mis en évidence, ont été clonés afin d'obtenir un ou plusieurs clones cytotoxiques.

Après clonage, seulement six clones potentiels ont été obtenus et ils ont été testés en cytotoxicité au ^{51}Cr afin d'évaluer leur spécificité. Seulement un clone s'est avéré cytotoxique (clone 1B11), mais vu le pourcentage de lyse observé figure 30 (moins de 25% pour la cible RMAS-HHD chargée avec RMS), il est fort probable que ce puits ne soit pas clonal.

Nous l'avons tout de même utilisé pour tester la reconnaissance « naturelle » de la protéine ΔCD20 par ces CTL. En effet, à défaut d'avoir une lignée tumorale HLA-A2 sur-exprimant ΔCD20 , nous avons utilisé une lignée B-EBV HLA-A2 (nous avons montré que les cellules transformées par l'EBV expriment la protéine ΔCD20) afin d'évaluer la reconnaissance de la protéine par les CTL. Les résultats présentés figure 30 montrent que les CTL ne tuent pas la lignée B-EBV de manière naturelle alors qu'ils lysent la même lignée B-EBV chargée en peptide RMS.

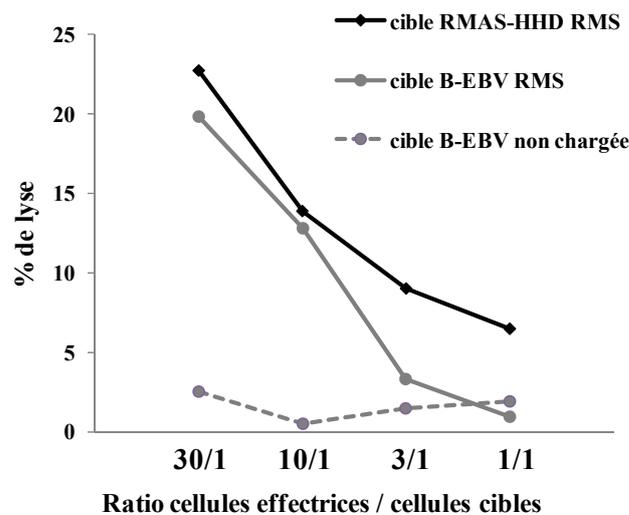


Figure 30 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé après clonage des CTL spécifiques du peptide RMS.

Les cellules effectrices sont les cellules issues du clone 1B11 et les cellules cibles sont soit des cellules RMAS-HHD soit des cellules de lignée B-EBV chargées ou non avec le peptide RMS.

Les cellules cibles utilisées expriment des taux variables de ΔCD20 , taux peut-être insuffisants pour induire une lyse des cellules. L'obtention d'une lignée tumorale HLA-A2 sur-exprimant ΔCD20 serait idéale pour montrer la potentielle reconnaissance de ΔCD20 par ces CTL.

En parallèle, afin de confirmer les résultats d'immunisation chez la souris HLA-A2/DR1, une deuxième expérience d'immunisation a été réalisée et cette fois-ci, les souris ont été immunisées uniquement avec le peptide RMS spécifique de Δ CD20. Deux groupes de quatre souris ont été constitués, chacun avec un peptide helper différent (pp65 ou PADRE) afin de comparer l'efficacité des deux peptides. Le groupe 1 comprend les souris 1 à 4 immunisées avec le peptide « helper » pp65 et le groupe 2, les souris 5 à 8 immunisées avec le peptide PADRE.

La présence de CTL spécifiques est ensuite testée par un test de cytotoxicité au ^{51}Cr avec des cellules RMA-S-HHD chargées avec le peptide RMS ou un peptide témoin. Une souris sur quatre a répondu pour chaque groupe (peptide helper pp65 ou PADRE), ce qui est peu et les réponses sont beaucoup plus faibles que lors de la première expérience d'immunisation. Les résultats sont présentés figure 31.

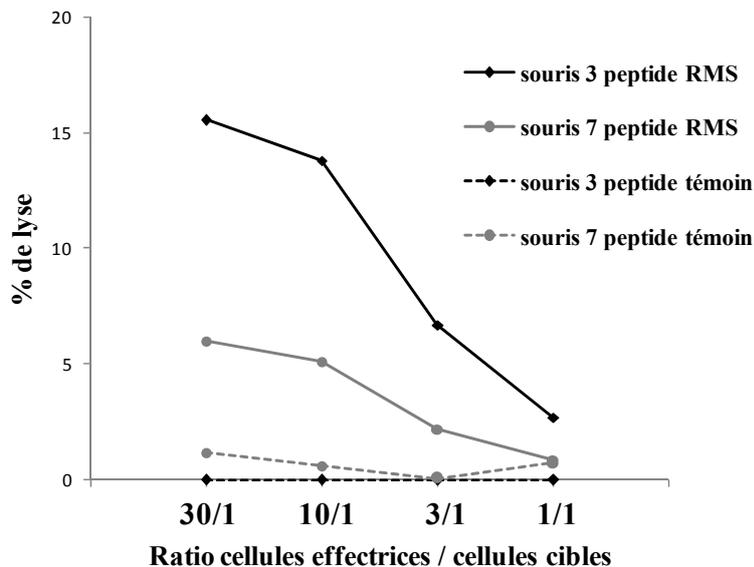


Figure 31 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé suite à une immunisation avec le peptide RMS spécifique de Δ CD20 avec deux peptides « helper » différents.

Les cellules effectrices sont les splénocytes restimulés in vitro avec le peptide RMS et les cellules cibles sont des RMA-S-HHD chargée avec RMS ou un peptide témoin. Ne figurent ici que les souris répondantes (souris 3 et 7).

De plus, la capacité de ces cellules à sécréter de l'IFN γ a été évaluée par la technique d'ELISPOT. Les cellules spécifiques du peptide RMS sécrètent bien de l'IFN γ en réponse à une cible (RMA-S-HHD) chargée avec le peptide. Les résultats présentés figure 32 indiquent le nombre de spots d'IFN γ pour $5 \cdot 10^4$ cellules effectrices ; le bruit de fond observé avec un peptide témoin est déduit.

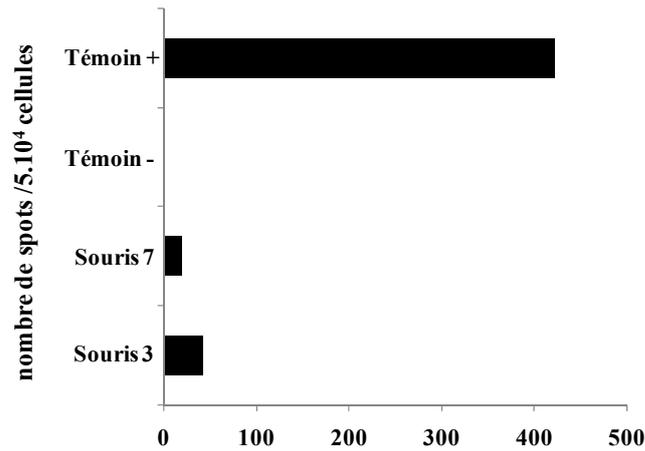


Figure 32 : ELISPOT IFN γ .

Les cellules effectrices sont les splénocytes restimulés in vitro avec le peptide RMS et les cellules cibles sont des RMA5-HHD chargées avec RMS ou un peptide témoin.

Les cellules obtenues à partir de ces deux souris ont été clonées, comme précédemment, afin d'obtenir une lignée T spécifique du peptide RMS. Deux clones ont été retenus provenant de deux souris différentes (figure 33).

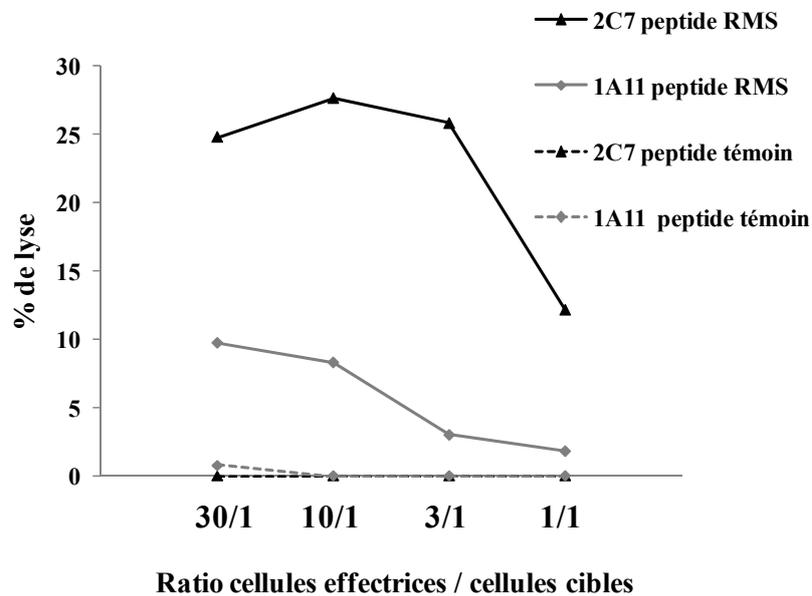


Figure 33 : Test de cytotoxicité au ⁵¹Cr réalisé après clonage des CTL spécifiques du peptide RMS.

Les cellules effectrices sont les cellules issues de clones (2C7 pour la souris 7 et 1A11 pour la souris 3) et les cellules cibles sont les cellules RMA5-HHD chargées avec RMS ou un peptide témoin.

2 Mise en évidence de l'immunogénicité de la protéine Δ CD20 chez l'homme

2.1 Matériel et méthodes

Deux méthodes différentes ont été utilisées afin de générer des CTL spécifiques de Δ CD20, l'une très coûteuse utilisant des DC chargées avec le peptide d'intérêt RMS, l'autre en stimulant directement les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) non triées avec ce même peptide.

2.1.1 Génération de CTL spécifiques de Δ CD20

Les PBMC proviennent de kits de cytophérèse issue de donneurs de l'EFS Bourgogne/Franche-Comté ayant signé un consentement pour l'usage de leurs cellules à des fins non thérapeutiques.

2.1.1.1 Utilisation de cellules dendritiques

Des PBMC issus de donneurs sains HLA-A2 ont été utilisées pour la génération de DC. Les DC dérivées de monocytes sont générées par la méthode d'adhérence des PBMC, puis culture pendant 5 à 6 jours dans du milieu RPMI 10% sérum humain additionné de 1000U/ml d'IL-4 et 100 ng/ml de GM-CSF (Peprotech, France). Ensuite ces DC sont maturées par ajout de 1 μ g/ml de LPS (Sigma, France) pendant 24 heures. Les cellules non adhérentes ou PBL, contenant les lymphocytes, sont récupérées à la fin de l'adhérence (avant l'ajout de cytokines) et sont congelées.

A J0, les DC maturées sont chargées avec 4 μ g/ml de peptide d'intérêt pendant 2 heures à 37°C puis sont mises en co-culture avec les PBL fraîchement décongelés avec un ratio DC/PBL de 1/40. A J1, 10 ng/ml d'IL-7 sont ajoutés et à J3, 100 U/ml d'IL-2. A J7 et J14, les cellules sont restimulées par ajout de DC chargées avec 4 μ g/ml de peptide. Ceci porte le nombre de stimulations à 3 en comptant la stimulation initiale. Les cytokines IL-7 et IL-2 sont ajoutées en alternance au cours des 14 jours.

2.1.1.2 Utilisation de PBMC

Des PBMC issus de donneurs sains HLA-A2 ont été utilisées. Brièvement, ces cellules sont distribuées dans des plaques 96 puits, à raison de 200.000 cellules/puits, en présence de 10 μ g/ml de peptide d'intérêt et de cytokines : 25U/ml IL-2 à J1 et J8 et 10ng/ml d'IL-7 à J3 et J10.

Dans les deux cas, les stimulations sont réalisées avec différents peptides :

- le peptide RMS (ayant généré une réponse chez la souris) pour la protéine d'intérêt Δ CD20
- un peptide EBV-9 mer restreint pour HLA-A2 (spécifique de la protéine BMLF1) disponible au laboratoire, de séquence GLCTLVAML, servant de témoin positif pour les donneurs EBV⁺
- un peptide HIV-9 mer, de séquence SLYNTVATL, comme témoin négatif.

2.1.2 ELISA TNF α

La capacité des CTL à sécréter du TNF α a été déterminée par la technique d'ELISA. Brièvement les cellules sont restimulées *in vitro* par mise en culture pendant 24 heures avec des cellules cibles (T2) chargées avec les différents peptides. La sécrétion de TNF α est détectée selon les instructions du fournisseur (Diaclone, France) et l'absorbance à 450nm est lue sur un lecteur Delfia (Perkin Elmer).

2.2 Résultats

Suite aux résultats obtenus avec les souris HLA-A2/DR1 et le peptide RMS spécifique de la protéine Δ CD20, nous avons voulu évaluer la présence de CTL spécifiques de ce peptide chez l'homme, à partir de donneurs sains HLA-A2.

2.2.1 Génération de CTL par utilisation de cellules dendritiques

Dans un premier temps, nous avons utilisé des DC (en tant que CPA professionnelles) chargées avec le peptide RMS afin de générer *in vitro* ces CTL. Ce protocole de stimulation était classiquement utilisé dans la littérature, c'est pourquoi nous l'avons choisi. La présence de CTL spécifiques a été évaluée environ cinq jours après la 3^{ème} stimulation par la technique de cytotoxicité au ⁵¹Cr décrite précédemment avec des cellules T2 (exprimant HLA-A2) comme cible.

La première expérience avec des DC a montré la présence de CTL spécifiques chez deux donneurs sur cinq testés (figure 34).

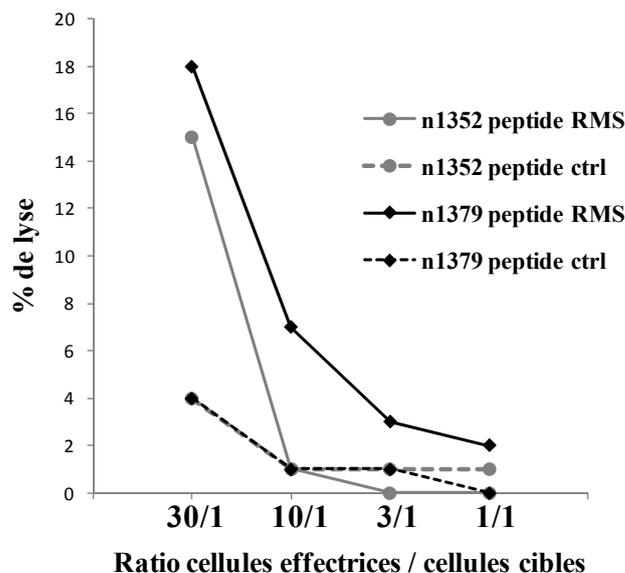


Figure 34 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé suite à une stimulation avec des DC chargées avec le peptide RMS spécifique de ΔCD20 chez des donneurs sains HLA-A2.

Les cellules effectrices sont les LT générés in vitro soit avec le peptide RMS soit avec le peptide HIV (servant de témoin négatif) ; les cellules cibles sont les T2 chargées avec l'un ou l'autre des peptides. Ne figurent ici que les deux donneurs répondants (n1352 et 1379) sur cinq donneurs testés.

Nous avons ensuite souhaité enrichir en CTL les cellules répondantes des différents donneurs, ceci par un tri immuno-magnétique CD8^+ , ceci avant de cloner ces cellules selon la méthode de dilution limite. Le clonage a été réalisé avec des feeders autologues et une stimulation dite « peptide spécifique ». Malheureusement, nous n'avons obtenu aucun clone.

L'expérience de stimulation a ensuite été réitérée de la même manière avec cinq autres donneurs sains. En plus, des stimulations avec un peptide EBV HLA-A2 ont été réalisées afin de valider les manipulations. Le peptide utilisé a été choisi car il était disponible au laboratoire, de plus c'est un peptide immuno-dominant. Il est issu de la protéine BMLF1 de l'EBV.

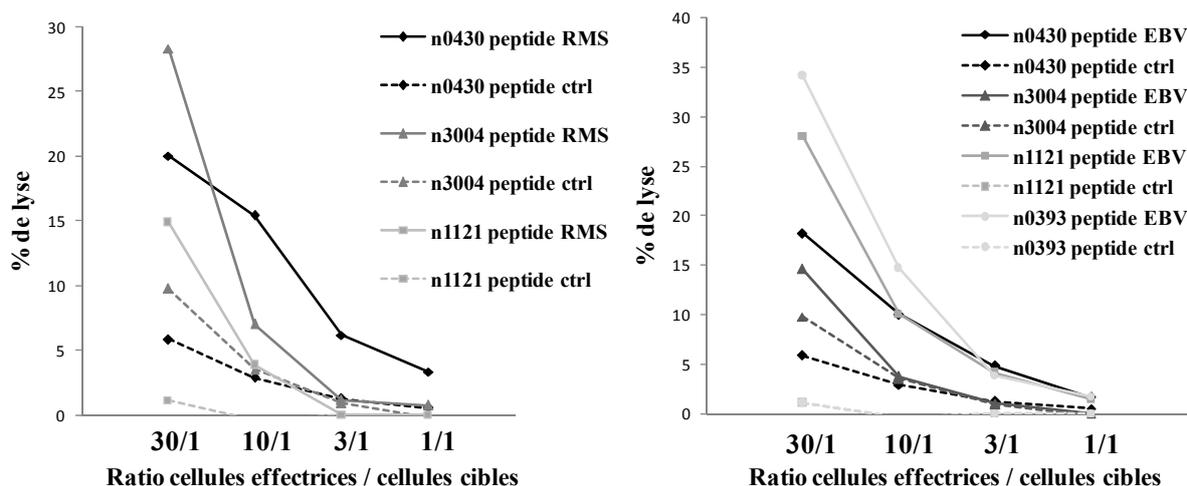


Figure 35 : Test de cytotoxicité au ^{51}Cr réalisé suite à une stimulation avec des DC chargées avec le peptide RMS ou BMLF1 chez des donneurs sains HLA-A2.

Les cellules effectrices sont les LT générés *in vitro* soit avec le peptide RMS soit avec le peptide BMLF1 soit avec le peptide HIV (témoin négatif); les cellules cibles sont les T2. Ne figurent ici que les deux donneurs répondants sur cinq donneurs testés : 3/5 pour RMS et 4/5 pour EBV.

Les résultats représentés figure 35 reproduisent ceux observés précédemment, c'est-à-dire la présence de CTL spécifiques de RMS chez 3 donneurs sains sur cinq. Egalement, pour quatre donneurs sur 5, une réponse EBV est observée pour le peptide testé BMLF1, attestant de la bonne méthode de stimulation des LT par les DC *in vitro*. De plus, pour le donneur n0393, où seule une réponse EBV est observée, nous pouvons conclure que l'absence de CTL spécifiques de RMS n'est pas due à un problème au cours de la manipulation *in vitro*.

Afin d'éviter de reproduire la mauvaise efficacité du clonage précédent, nous avons décidé pour cette expérience, de cloner directement les cellules répondantes des différents donneurs après le résultat de la cytotoxicité sans tri CD8^+ préalable. Le clonage a été réalisé quant à lui comme précédemment, avec des feeders autologues et une stimulation dite « peptide spécifique ». Nous avons réussi à amplifier des clones suite à cette immunisation, malheureusement, aucun ne s'est avéré cytotoxique envers une cible chargée avec le peptide RMS.

Nous avons souhaité poursuivre les expériences et nous nous sommes dirigés vers une stimulation directe de PBMC de donneurs sains avec les peptides, afin de passer outre la génération de DC coûteuse, délicate et plus longue.

2.2.2 Génération de CTL par stimulation de PBMC

Plusieurs essais ont été réalisés afin de mettre au point la technique et différents paramètres ont été modifiés, comme le choix du milieu de culture (RPMI 10% sérum humain versus X-VIVO 10% sérum humain), le nombre de stimulations...

Nous avons stimulé des PBMC de donneurs sains HLA-A2 dans un premier temps avec le peptide d'intérêt RMS (et en témoin positif le peptide EBV BMLF1). Nous avons choisi de mettre en évidence les cellules spécifiques de ce peptide par leur capacité à sécréter du TNF α et ce par une technique d'ELISA. Ceci pour deux raisons : tout d'abord car les stimulations sont réalisées sur peu de cellules et il serait difficile d'effectuer un test de cytotoxicité par relargage de ^{51}Cr ; de plus l'usage de la radioactivité ne se faisant pas au sein du laboratoire, il est plus facile de réaliser un test ELISA.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence des cellules sécrétant du TNF α en réponse à la stimulation par le peptide RMS et BMLF1 également.

Les puits répondants ont été clonés différemment par rapport aux expériences précédentes, afin d'optimiser l'obtention de clones spécifiques du peptide RMS. Nous avons utilisé comme feeders des PBMC allogéniques frais (les PBMC autologues étant congelés) pour avoir plus de CPA et une stimulation sans peptide mais avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de phytohémagglutinine (PHA). La spécificité des cellules obtenues après clonage sont également testées en ELISA TNF α .

Nous avons ainsi obtenu des clones spécifiques du peptide BMLF1 mais toujours pas de clones spécifiques du peptide RMS. Il semblerait que nous perdions les CTL spécifiques de RMS au cours du clonage. D'autres expériences sont ainsi en cours afin d'aboutir à l'isolation de CTL spécifiques de ΔCD20 .

DISCUSSION / PERSPECTIVES

Existence d'une population de LT CD3⁺CD20⁺

Le premier objectif de ce travail était de terminer une étude, débutée au laboratoire, concernant l'existence d'une population de LT exprimant CD20.

Ceci a fait l'objet d'un commentaire suite à la publication d'un article de Wilk *et al.* ²⁴⁵. Dans cette publication, les auteurs ont mis en évidence cette population de LT chez les donneurs sains et la déplétion de cette population lors du traitement par RTX, chez des patients atteints de différentes pathologies, dont l'arthrite rhumatoïde. Pour cela, différents points, phénotypiques et fonctionnels, ont été étudiés. Selon eux, les LT CD20⁺ n'exprimeraient pas d'autres marqueurs B comme CD19 et des expériences de blocage avec un anticorps CD20 non marqué attesteraient de la spécificité du marquage CD20 sur les LT. Ils ont également trié cette population par cytométrie en flux et réalisé différentes expériences fonctionnelles en comparant les LT CD3⁺CD20⁺ aux LT CD3⁺CD20⁻; malheureusement, la pureté des tris n'est pas mentionnée. Des contaminations par d'autres cellules ne sont donc pas à exclure.

Un autre point discutable dans ces travaux concerne l'évaluation de l'apoptose dans les différentes populations. En effet, le pourcentage de cellules apoptotiques au sein de cette population CD3⁺CD20⁺ est très nettement supérieur à celui observé dans les LT CD20⁻ et ce même lorsque les cellules sont au repos. Lorsque ces cellules sont activées, 90% de la population CD3⁺CD20⁺ est apoptotique. Les auteurs posent ainsi l'hypothèse de la mort par AICD (Activation Induced Cell Death) du fait de la forte activation de ces cellules, même si des LT CD3⁺ CD20⁺ activés de la même manière (en témoin) ne sont qu'à 20% apoptotiques. Malgré cela, les auteurs concluent donc bien à l'existence d'une telle population et à l'implication de cette population dans la pathogenèse de l'arthrite rhumatoïde car ces cellules qu'ils déclarent comme « hautement activées » secrètent des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans cette pathologie. De plus ces cellules auraient des fonctions régulatrices.

Les résultats que nous avons obtenus sont plutôt en faveur de la présence de doublets de LB-LT pouvant correspondre à cette population (impossibilité de tri, absence de cellules doublement positives en microscopie confocale, diminution du nombre de cellules doublement positives après dissociation chimique ou mécanique).

Mais l'équipe de Wilk *et al.* a exposé quelques arguments convaincants en faveur de l'existence de cette population de LT CD20⁺ dans une réponse faisant suite à notre commentaire.

Selon les auteurs, les LT CD3⁺CD20⁺ ne peuvent être des doublets, qui sont exclus de leurs analyses de cytométrie de manière systématique. De plus, cette population a été enrichie également par tri immuno-magnétique (pas uniquement par cytométrie en flux) et en éliminant bien les LB, dont la présence pourrait modifier les résultats.

Afin de confirmer leurs travaux, les auteurs ont utilisés une technique particulière de microscopie. Brièvement, les cellules vivantes sont immobilisées sur une puce microfluidique et observées en microscopie à épifluorescence. Les cellules peuvent être marquées avec différents anticorps et le marquage va pouvoir être observée cellule par cellule. Avec cette technique, les auteurs ont mis en évidence des cellules T CD3⁺ exprimant CD20 mais pas CD19, des cellules CD20⁺ n'exprimant pas CD3...

Ces résultats vont dans le sens de l'existence d'une telle population mais certaines données restent encore en suspens, par exemple comment expliquer que l'on ne retrouve plus ces LT CD3⁺CD20⁺ suite aux expériences de dissociation, ou encore le nombre très important de cellules apoptotiques retrouvées au sein de cette population. Ce point n'a d'ailleurs pas été discuté dans la réponse de Wilk *et al.*

De plus, la réelle implication de cette population *in vivo* reste à déterminer, notamment par l'utilisation de modèles murins de maladies inflammatoires.

Caractérisation d'un nouvel épissage alternatif du gène CD20 humain et implication dans les résistances au RTX

Le principal objectif de ma thèse était de caractériser un nouvel ARNm, issu d'un épissage alternatif du gène CD20, identifié précédemment au laboratoire.

Nous avons développé un essai de PCR qualitative spécifique des deux ARNm (sauvage et tronqué) et surtout un essai de PCR quantitative spécifique de ces deux formes. Ainsi, grâce à ces outils, nous avons pu mettre en évidence cet ARNm, nommé Δ CD20, dans des lignées tumorales B, dans des LB activés *in vitro* (B-blastes), des B transformés par le virus de l'EBV mais pas dans des LB issus de donneurs sains issus de PBMC ou de moelle osseuse. Egalement, cet ARNm tronqué a été trouvé, en quantité variable, dans toutes les hémopathies B issues de patients testées, tant au niveau sanguin qu'au niveau tumoral. Cet ARNm est donc bien la signature d'un état de transformation et/ou d'activation cellulaire.

Le cadre de lecture étant conservé au cours de l'épissage de CD20, une des principales questions était de savoir si cet ARNm codait pour une protéine. Ce travail met ainsi en évidence pour la première fois, la protéine Δ CD20 codée par cet ARNm.

Grâce à un anticorps commercial ciblant la partie C-terminale de CD20, la protéine Δ CD20 a en effet été détectée par Western blotting, à une taille attendue de 15-17 kDa, dans différents types de lignées et prélèvements d'hémopathies B. Ceci a également été confirmé par la transfection d'une lignée avec un vecteur codant pour Δ CD20 et par la mutagenèse dirigée du site accepteur de l'épissage.

Il serait intéressant d'avoir un anticorps monoclonal spécifique uniquement de la protéine Δ CD20, à des fins de recherche mais aussi de diagnostic (mise en évidence de la protéine dans des biopsies rénales, lors de rejet humoral, afin de vérifier que les LB persistant infiltrant le greffon sont ceux exprimant Δ CD20). Ainsi un anticorps est en cours de développement en partenariat avec la plateforme ITAC (Diaclone, GenProbe, France), soit par la méthode classique de fusion cellulaire (hybridome) ou par une approche de phage display, après immunisation de souris avec le peptide 20mer chevauchant la zone de fusion de CD20.

Concernant la localisation de cette protéine et la relation avec la protéine sauvage, plusieurs éléments intéressants ont été explorés. Tout d'abord, la protéine Δ CD20 ne devrait

pas se localiser à la membrane puisque la partie codant pour les domaines transmembranaires est déletée au cours de l'épissage. Des expériences de fractionnement subcellulaire et d'immuno-précipitation montrent que la protéine Δ CD20 est associée à la protéine CD20 sauvage au niveau membranaire alors que quand elle est seule, elle est retrouvée dans la fraction cytoplasmique. Connaissant les propriétés d'homo- et d'hétéro-dimérisation de la protéine CD20⁷⁰, il ne serait pas étonnant que les deux protéines puissent être associées. Les résidus impliqués dans ces oligomérisations ne sont pas connus (s'ils sont localisés au niveau de la partie transmembranaire ou extracellulaire, ils ne peuvent pas intervenir pour Δ CD20). Il nous est donc difficile de prouver cette association entre les deux protéines, même s'il a été montré que la protéine CD20 sauvage pouvait s'associer avec des protéines membranaires mais également cytosoliques⁶¹.

Cette association pourrait également être à l'origine d'une modulation de la fonction de CD20 par Δ CD20. Même s'il est difficile de statuer quant aux fonctions bien précises de la protéine CD20, son intervention dans la prolifération et la différenciation des LB a été démontrée⁷⁷. La protéine Δ CD20 est présente dans les LB activés et/ou transformés, mais nous ne savons pas si cette protéine est à l'origine d'un avantage de prolifération ou si c'est l'activation de la cellule qui est à l'origine de l'apparition de l'épissage et donc de cette protéine. La surexpression de Δ CD20 dans une lignée B, exprimant un niveau basal faible de cette protéine, n'induit pas de modification de la prolifération.

La protéine CD20 est également impliquée au niveau du flux calcique associé à la signalisation par le BCR⁷⁰. Il serait donc intéressant de poursuivre dans cette voie et d'évaluer l'impact de la présence de Δ CD20 sur le flux calcique.

Enfin, des expériences sont en cours, afin d'évaluer l'impact de l'expression importante de Δ CD20 au niveau de la relocalisation de CD20 sauvage dans les radeaux lipidiques. Ceci pourra également nous renseigner sur la fonction, puisque la molécule CD20 se relocalise dans les radeaux avec d'autres molécules lors de la fixation d'anticorps mimant le ligand de CD20^{71,79}.

La protéine CD20 étant la cible du traitement par RTX, la découverte d'un ARNm tronqué codant pour une protéine, ayant perdu l'épitope de reconnaissance au RTX, ne pouvait que nous conduire à étudier la relation entre cet ARNm (et la protéine Δ CD20) et les résistances au traitement par RTX. Ainsi nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'ARNm et de la protéine Δ CD20 dans des lignées résistantes au RTX induites *in vitro*,

ainsi qu'une augmentation du taux d'ARNm après traitement par RTX chez des patients atteints d'hémopathies B.

Il nous faut maintenant collecter un nombre plus important de prélèvements de patients atteints de diverses pathologies B et traités par RTX, afin de valider nos premiers résultats *in vivo*. Ainsi, grâce à l'essai de PCR quantitative spécifique, il pourrait être intéressant de suivre l'évolution du taux de transcrite Δ CD20 chez les patients traités par RTX, que ce soit dans les hémopathies B ou dans d'autres pathologies traitées par le RTX. Δ CD20 pourrait être considéré comme un bio-marqueur moléculaire comme le sont déjà d'autres variants issus d'un épissage alternatif³⁸⁹.

Egalement, nous sommes en train d'établir de nouvelles lignées résistantes ceci avec plusieurs anticorps anti-CD20 de nouvelle génération, et ceci soit par CDC ou par ADCC. Nous voudrions ainsi étudier l'impact de ces résistances sur l'ARNm et la protéine Δ CD20 et comparer les résultats avec ceux obtenus pour le RTX.

Les résistances au RTX sont expliquées à l'heure actuelle par différents mécanismes présentés dans l'introduction (polymorphisme Fc γ RIII, « shaving »...) dont beaucoup font intervenir des modulations d'expression de la protéine CD20 sauvage à la surface de la cellule^{100,177}.

De plus, l'implication de formes tronquées d'ARNm à l'origine de la modulation de l'expression des protéines sauvages a été relatée dans la littérature, notamment pour les gènes CD5³⁹⁰ et Ikaros³⁹¹ dans les LB. Il serait donc possible que la protéine Δ CD20 module l'expression de la forme sauvage.

Enfin, comme nous l'avons déjà évoqué, les régulations épigénétiques pourraient être à l'origine en partie des résistances au RTX, notamment lors de la perte d'expression de CD20¹⁷³ et certaines études combinent déjà traitement par RTX et par HDAC^{174,175}. Nous voudrions ainsi étudier l'impact de telles drogues sur les régulations épigénétiques à la fois de CD20 et de Δ CD20. Des expériences *in vitro* avec des lignées sont en cours et il serait intéressant de pouvoir mettre en évidence des mécanismes de régulation, expliquant notamment la modulation de CD20 par Δ CD20.

De plus, nous souhaiterions nous pencher sur les mécanismes à l'origine de la relation entre présence de Δ CD20 et activation et/ou transformation cellulaire et résistance au traitement par RTX ; dans le but de cibler Δ CD20 chez des patients réfractaires au traitement et/ou en rechute. Le concept « régulation de l'épissage alternatif et cancer » émerge peu à peu. Les facteurs d'épissage, notamment les protéines régulatrices SR et les hnRNP, sont

surexprimées dans un grand nombre de types de cancers différents ou sous-exprimées dans d'autres ²⁹⁴. Ce phénomène peut contribuer directement ou indirectement au développement cancéreux, à la progression tumorale ou encore à la réponse au traitement.

Ainsi, il serait intéressant de mettre en évidence les facteurs/protéines impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif de CD20 en relation avec le développement tumoral et les résistances au RTX.

Des résultats préliminaires montrent une augmentation de l'expression de SF2/ASF, élément clé de la régulation de l'épissage alternatif, par Western blotting dans les lignées résistantes au RTX induite *in vitro*. Ces résultats restent à confirmer et des expériences utilisant un siRNA ciblant cette protéine seraient nécessaires afin d'évaluer le rôle de SF2/ASF dans cet épissage.

Les analyses approfondies de cette nouvelle protéine Δ CD20 pourront en tous cas contribuer à mieux comprendre la véritable fonction de la protéine CD20.

Δ CD20 : cible potentielle en immunothérapie anti-tumorale

La dernière partie de mon travail consiste à développer une stratégie d'immunothérapie anti-tumorale ciblant la protéine Δ CD20.

Nous avons pu mettre en évidence des CTL spécifiques d'un peptide RMS issu de Δ CD20 dans un contexte HLA-A2, dans un modèle utilisant les souris transgéniques HLA-A2/DR1. Ce peptide issu de la zone de jonction de l'épissage est donc potentiellement spécifique de la protéine Δ CD20.

Nous avons testé ces CTL contre une lignée B-EBV et une lignée tumorale B HLA-A2 exprimant Δ CD20 à des taux variables, sans succès. Nous ne savons donc pas si le peptide RMS est naturellement apprêté et présenté à la surface des cellules.

Etant donné que le protéasome et l'immunoprotéasome peuvent présenter différemment les peptides, il était intéressant d'utiliser ces deux types de cibles (B-EBV et lignée tumorale B). En effet, dans certains cas, la maturation des antigènes est améliorée lorsqu'ils sont pris en charge par l'immunoprotéasome³⁹². L'IFN γ , notamment, induit la synthèse du complexe PA28 qui se lie à l'extrémité du protéasome 20S (à la place du régulateur 19S) et augmente l'activité d'hydrolyse des peptides³⁹³. L'immunoprotéasome est présent dans les LB transformés par le virus de l'EBV utilisés comme cibles et les lignées tumorales expriment en général le protéasome « classique ».

De plus, le traitement par un inhibiteur de certaines sous-unités catalytiques du protéasome (notamment par la lactacystine) est connu pour restaurer la présentation de certains antigènes, comme pour MAGE-3, et ainsi permettre aux CTL spécifiques de lyser les cellules tumorales exprimant la protéine³⁹⁴. Il serait intéressant de tester cette éventualité dans notre cas.

Une autre hypothèse est que la protéine Δ CD20 n'est pas assez exprimée dans les cellules cibles utilisées et il nous faudrait une lignée tumorale sur-exprimant la protéine Δ CD20, au moins pour montrer la présentation naturelle et la reconnaissance par les CTL spécifiques. Nous disposons d'une lignée B sur-exprimant Δ CD20 grâce à la transduction avec un vecteur rétroviral mais cette lignée n'est pas HLA-A2. Des expériences de transfection de ces cellules avec le vecteur HHD sont donc en cours ainsi que des expériences afin de sur-exprimer Δ CD20 dans la lignée tumorale B SKW6.4 qui est HLA-A2.

Nous envisageons également d'immuniser les souris HLA-A2/DR1 avec un plasmide lentiviral contenant Δ CD20. En effet, nous avons déjà tenté d'immuniser ces souris avec un plasmide d'expression contenant Δ CD20, dans le muscle tibial des souris préalablement stimulées par de la cardiotoxine mais aucune réponse n'a été observée. Ayant des problèmes d'extraction d'ADN plasmidique à partir des bactéries, nous avons émis l'hypothèse que l'ADN injecté n'était pas d'assez bonne qualité, chose que nous aurions dû vérifier.

Nous pensons également que la prise en charge de l'ADN de Δ CD20 n'a peut-être pas été assez efficace au niveau des cellules musculaires et qu'ainsi la protéine Δ CD20 n'a peut-être pas été prise en charge par les CPA. Avec l'injection d'un vecteur lentiviral aux souris HLA-A2/DR1, nous augmenterions l'immunogénicité par intégration du vecteur dans les cellules, à l'origine d'une meilleure présentation antigénique³⁹⁵.

Chez l'homme, nous avons également pu générer une réponse contre le peptide RMS en générant des DC à partir de donneurs sains HLA-A2 mais également directement en stimulant des PBMC avec ce même peptide.

De nombreuses expériences ont été réalisées, sur de nombreux donneurs sains, avec beaucoup de mise au point surtout pour la stimulation des PBMC. Malheureusement, nous n'avons jamais réussi à cloner ces cellules spécifiques du peptide RMS et donc potentiellement spécifiques de Δ CD20.

Une des explications possibles est que ces CTL sont de faible affinité, étant donné que la protéine Δ CD20 est présente dans les B activés et qu'une tolérance peut être acquise chez les donneurs sains vis-à-vis de cette protéine « du soi ». De plus, des expériences d'affinité sur des cellules T2 chargées avec le peptide RMS ont confirmé cette faible affinité du peptide RMS pour la molécule HLA-A2.

Afin de remédier à ce problème d'affinité, nous envisageons de faire synthétiser le peptide RMS avec une tyrosine en première position afin d'augmenter son affinité pour HLA-A2³⁹⁶ et générer ainsi de nouveau des CTL chez les donneurs sains HLA-A2.

Egalement, un peptide 20-mer spécifique de la zone de jonction de Δ CD20 a été synthétisé afin de générer, si possible, à la fois une réponse T CD8 et CD4. La séquence de ce peptide est la suivante : KPLFRRMSSLELVIAGIVEN. Ce peptide a été utilisé de la même manière pour les deux types de protocoles précédents. Les quantités de peptide sont juste plus importantes pour le 20-mer comparé au 9-mer (10 μ g/ml).

Concernant le protocole utilisant des DC, nous avons obtenu une réponse CD4 pour un donneur et une réponse CD8 pour un autre sur 5 donneurs HLA-A2 testés. Ces donneurs ont été testés en cytotoxicité et en production intracellulaire d'IFN γ , ceci pour évaluer à la fois la réponse CD8 et CD4. Les marquages sont présentés dans la figure ci-dessous. La suite des ces expériences est en cours.

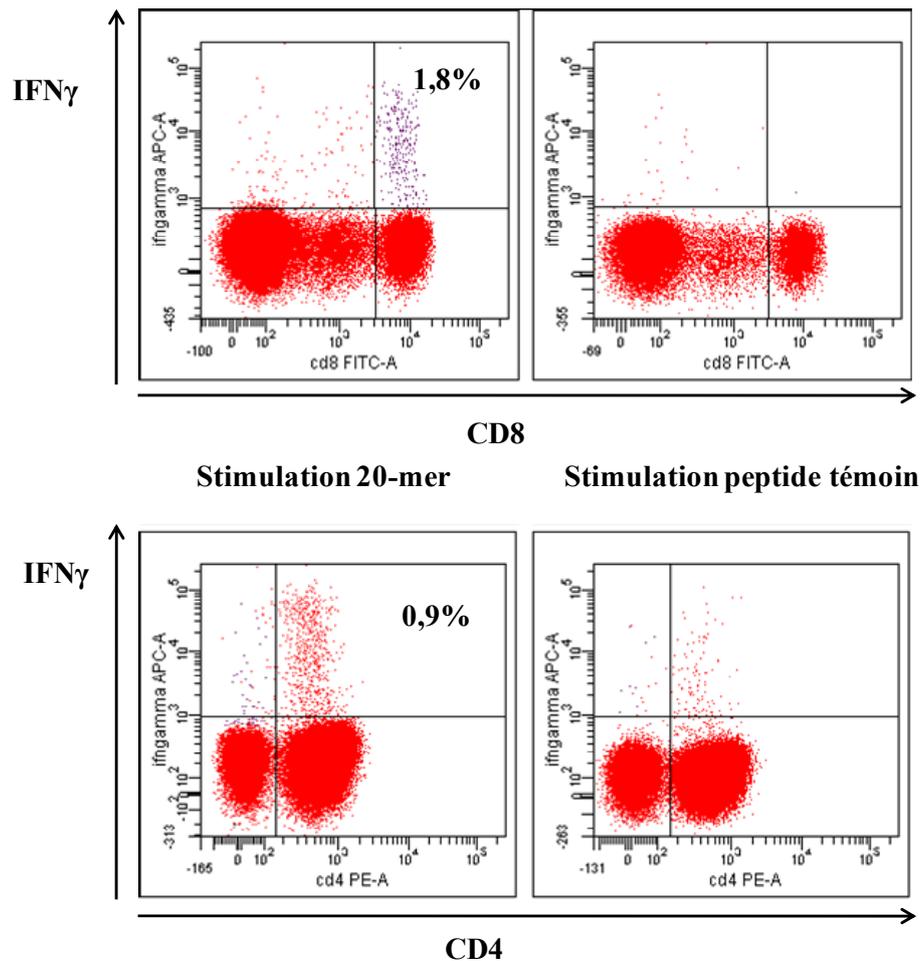


Figure 36 : Sécrétion d'IFN γ par des LT stimulés par des DC chargées en peptide 20-mer spécifique de Δ CD20.

La première partie de la figure présente les LT CD8⁺ d'un donneur sain HLA-A2 ayant répondu au peptide 20-mer mais pas au peptide témoin.

La deuxième partie présente des LT CD4⁺ d'un autre donneur sain HLA-A2 ayant répondu au peptide 20-mer mais pas au peptide témoin.

Pour les stimulations en PBMC, des CTL spécifiques ont également été mis en évidence après stimulation par le 20-mer. Toutes ces expériences sont en cours afin d'obtenir des clones spécifiques de la protéine Δ CD20. Nous souhaiterions ainsi étudier le répertoire de ces cellules ainsi que séquencer les régions CDR3. Et toujours pour répondre à la question de la présentation naturelle de la protéine Δ CD20, nous envisageons de transduire des DC autologues (pour un donneur dont nous possédons les CTL obtenus par stimulation peptidique) avec un vecteur contenant Δ CD20 et d'évaluer la reconnaissance de Δ CD20 par ces CTL.

Nous avons également débuté une analyse de la génération de CTL anti Δ CD20 chez des patients atteints d'hémopathies B réfractaires au traitement et/ ou en rechute. Des prélèvements de deux patients atteints de lymphomes folliculaires ont été recueillis pour le moment, et la génération de CTL a été effectuée selon le protocole PBMC stimulés avec le peptide 20-mer.

Nous avons obtenu une réponse spécifique avec le peptide 20-mer chez ces deux patients et nous avons obtenus quelques clones CD4⁺ spécifiques. Nous disposons du typage HLA de ces deux patients et nous pourrions réaliser des expériences afin de trouver la restriction des réponses observées.

Enfin, nous disposons d'un pentamère spécifique du peptide RMS couplé à un fluorochrome et nous voudrions comparer la présence de cellules spécifiques de ce peptide chez les patients atteints de diverses hémopathies B versus chez des donneurs sains. Nous espérons disposer bientôt d'autres prélèvements de patients atteints d'hémopathies B afin de poursuivre dans cette voie.

En conclusion, ces travaux ouvrent donc des perspectives quant à la mise en évidence d'une corrélation entre la présence de Δ CD20 et la réponse et/ou les résistances au traitement par RTX dans une grande cohorte de patients atteints de diverses hémopathies B. Ainsi il serait envisageable de suivre l'évolution du traitement par l'ARNm Δ CD20 et éventuellement de cibler la protéine, par exemple par une stratégie d'immunothérapie anti-tumorale.

D'autres axes plus mécanistiques et fondamentaux sont également ouverts comme la compréhension de la régulation de cet épissage et la corrélation avec l'oncogenèse des cellules ou encore le rôle de l'ARNm et de la protéine Δ CD20.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ramirez J, Lukin K, Hagman J. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr Opin Immunol*. 2010;22:177-184.
2. Kwon K, Hutter C, Sun Q, et al. Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity*. 2008;28:751-762.
3. Linderson Y, Eberhard D, Malin S, Johansson A, Busslinger M, Pettersson S. Corecruitment of the Grg4 repressor by PU.1 is critical for Pax5-mediated repression of B-cell-specific genes. *EMBO Rep*. 2004;5:291-296.
4. Tussiwand R, Bosco N, Ceredig R, Rolink AG. Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. *Eur J Immunol*. 2009;39:2317-2324.
5. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005;105:4390-4398.
6. Schneider P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:282-289.
7. Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, Rudd K, Shinton SA, Hardy RR. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol*. 2001;167:6834-6840.
8. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010;78 Suppl 1:S47-60.
9. Marchalonis JJ. Lymphocyte surface immunoglobulins. *Science*. 1975;190:20-29.
10. Schamel WW, Reth M. Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity*. 2000;13:5-14.
11. Harwood NE, Batista FD. Early events in B cell activation. *Annu Rev Immunol*, 2010;28:185-210.
12. Mackay F, Figgett WA, Saulep D, Lepage M, Hibbs ML. B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol Rev*, 2010;237:205-225.
13. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000;102:553-563.
14. Vale AM, Schroeder HW, Jr. Clinical consequences of defects in B-cell development. *J Allergy Clin Immunol*, 2010;125:778-787.
15. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:149-157.
16. Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*. 2004;21:379-390.
17. Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 2001;1:147-153.
18. Dorner T, Jacobi AM, Lipsky PE. B cells in autoimmunity. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:247.
19. Stasi R. Rituximab in autoimmune hematologic diseases: not just a matter of B cells. *Semin Hematol*, 2010;47:170-179.
20. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008;8:753-760.
21. Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew CE, 2nd, Gaston RS. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant*. 2005;5:2248-2252.
22. Tsai EW, Rianthavorn P, Gjertson DW, Wallace WD, Reed EF, Ettenger RB. CD20+ lymphocytes in renal allografts are associated with poor graft survival in pediatric patients. *Transplantation*. 2006;82:1769-1773.

23. Zarkhin V, Li L, Sarwal M. "To B or not to B?" B-cells and graft rejection. *Transplantation*. 2008;85:1705-1714.
24. Malynn BA, Romeo DT, Wortis HH. Antigen-specific B cells efficiently present low doses of antigen for induction of T cell proliferation. *J Immunol*. 1985;135:980-988.
25. Zarkhin V, Kambham N, Li L, et al. Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int*. 2008;74:664-673.
26. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*, 2010;362:1417-1429.
27. Jaglowski SM, Byrd JC. Rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*, 2010;47:156-169.
28. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910-1916.
29. Hamblin TJ, Orchard JA, Gardiner A, Oscier DG, Davis Z, Stevenson FK. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood*. 2000;95:2455-2457.
30. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2008;371:1017-1029.
31. Cobaleda C, Sanchez-Garcia I. B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin. *Bioessays*. 2009;31:600-609.
32. Diehl V. Hodgkin's disease--from pathology specimen to cure. *N Engl J Med*. 2007;357:1968-1971.
33. Klein G, Klein E, Kashuba E. Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010;396:67-73.
34. Ardeshtna KM, Smith P, Norton A, et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;362:516-522.
35. Montoto S, Lopez-Guillermo A, Ferrer A, et al. Survival after progression in patients with follicular lymphoma: analysis of prognostic factors. *Ann Oncol*. 2002;13:523-530.
36. Herold M, Haas A, Srock S, et al. Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J Clin Oncol*. 2007;25:1986-1992.
37. van Besien K, Schouten H. Follicular lymphoma: a historical overview. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:232-243.
38. Williams ME, Connors JM, Dreyling MH, et al. Mantle cell lymphoma: report of the 2010 Mantle Cell Lymphoma Consortium Workshop. *Leuk Lymphoma*, 2010 [Epub ahead of print]
39. Vandenberghe E. Mantle cell lymphoma. *Blood Rev*. 1994;8:79-87.
40. Bennett M, Schechter GP. Treatment of splenic marginal zone lymphoma: splenectomy versus rituximab. *Semin Hematol*, 2010;47:143-147.
41. Buske C, Hoster E, Dreyling M, et al. The addition of rituximab to front-line therapy with CHOP (R-CHOP) results in a higher response rate and longer time to treatment failure in patients with lymphoplasmacytic lymphoma: results of a randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Leukemia*. 2009;23:153-161.
42. Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, et al. Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol*. 1986;4:1470-1480.
43. Maddocks KJ, Lin TS. Update in the management of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2009;2:29.
44. Winokur SH. Practical approaches to the management of aggressive lymphomas in the community practice. *Semin Hematol*. 1987;24:41-44.

45. Marcus R, Imrie K, Solal-Celigny P, et al. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2008;26:4579-4586.
46. Coiffier B. [Contribution of anthracyclines in treatment of lymphoproliferative disorders]. *Pathol Biol (Paris).* 1987;35:75-78.
47. Solal-Celigny P, Brice P, Brousse N, et al. Phase II trial of fludarabine monophosphate as first-line treatment in patients with advanced follicular lymphoma: a multicenter study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 1996;14:514-519.
48. Johnson S, Smith AG, Loffler H, et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet.* 1996;347:1432-1438.
49. Rohatiner AZ, Gregory WM, Peterson B, et al. Meta-analysis to evaluate the role of interferon in follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005;23:2215-2223.
50. Fisher RI, Dana BW, LeBlanc M, et al. Interferon alpha consolidation after intensive chemotherapy does not prolong the progression-free survival of patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma: results of the Southwest Oncology Group randomized phase III study 8809. *J Clin Oncol.* 2000;18:2010-2016.
51. Rohatiner AZ, Nadler L, Davies AJ, et al. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma at the time of second or subsequent remission: long-term follow-up. *J Clin Oncol.* 2007;25:2554-2559.
52. Nabhan C, Ragam A, Bitran JD, Mehta J. Hematopoietic SCT for mantle cell lymphoma: is it the standard of care? *Bone Marrow Transplant,* 2010;45:1379-87.
53. Gribben JG. Stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:53-58.
54. Peniket AJ, Ruiz de Elvira MC, Taghipour G, et al. An EBMT registry matched study of allogeneic stem cell transplants for lymphoma: allogeneic transplantation is associated with a lower relapse rate but a higher procedure-related mortality rate than autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31:667-678.
55. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol.* 1980;125:1678-1685.
56. Nadler LM, Korsmeyer SJ, Anderson KC, et al. 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.* 1984;74:332-340.
57. Liang Y, Buckley TR, Tu L, Langdon SD, Tedder TF. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. *Immunogenetics.* 2001;53:357-368.
58. Ishibashi K, Suzuki M, Sasaki S, Imai M. Identification of a new multigene four-transmembrane family (MS4A) related to CD20, HTm4 and beta subunit of the high-affinity IgE receptor. *Gene.* 2001;264:87-93.
59. Tedder TF, Klejman G, Schlossman SF, Saito H. Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J Immunol.* 1989;142:2560-2568.
60. Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *Embo J.* 1988;7:711-717.
61. Tedder TF, McIntyre G, Schlossman SF. Heterogeneity in the B1 (CD20) cell surface molecule expressed by human B-lymphocytes. *Mol Immunol.* 1988;25:1321-1330.
62. Polyak MJ, Tailor SH, Deans JP. Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment. *J Immunol.* 1998;161:3242-3248.

63. Tedder TF, Schlossman SF. Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes. *J Biol Chem.* 1988;263:10009-10015.
64. Deans JP, Schieven GL, Shu GL, et al. Association of tyrosine and serine kinases with the B cell surface antigen CD20. Induction via CD20 of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 and PLC phospholipase C-gamma 2. *J Immunol.* 1993;151:4494-4504.
65. Oettgen HC, Bayard PJ, Van Ewijk W, Nadler LM, Terhorst CP. Further biochemical studies of the human B-cell differentiation antigens B1 and B2. *Hybridoma.* 1983;2:17-28.
66. Polyak MJ, Deans JP. Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood.* 2002;99:3256-3262.
67. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol.* 2006;177:362-371.
68. Ernst JA, Li H, Kim HS, Nakamura GR, Yansura DG, Vandlen RL. Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. *Biochemistry.* 2005;44:15150-15158.
69. Du J, Wang H, Zhong C, et al. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *J Biol Chem.* 2007;282:15073-15080.
70. Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J Biol Chem.* 2008;283:18545-18552.
71. Li H, Ayer LM, Polyak MJ, et al. The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts: antibody binding increases the affinity of the association through an epitope-dependent cross-linking-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2004;279:19893-19901.
72. Petrie RJ, Deans JP. Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J Immunol.* 2002;169:2886-2891.
73. Walshe CA, Beers SA, French RR, et al. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2008;283:16971-16984.
74. van Meerten T, Hagenbeek A. CD20-targeted therapy: the next generation of antibodies. *Semin Hematol*;47:199-210.
75. O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. Mice carrying a CD20 gene disruption. *Immunogenetics.* 1998;48:125-132.
76. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol.* 2004;16:119-129.
77. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today.* 1994;15:450-454.
78. Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol.* 1993;121:1121-1132.
79. Li H, Ayer LM, Lytton J, Deans JP. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J Biol Chem.* 2003;278:42427-42434.
80. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology.* 2002;107:176-182.
81. Golay J, Cusmano G, Introna M. Independent regulation of c-myc, B-myb, and c-myb gene expression by inducers and inhibitors of proliferation in human B lymphocytes. *J Immunol.* 1992;149:300-308.
82. Deans JP, Robbins SM, Polyak MJ, Savage JA. Rapid redistribution of CD20 to a low density detergent-insoluble membrane compartment. *J Biol Chem.* 1998;273:344-348.

83. Deans JP, Kalt L, Ledbetter JA, Schieven GL, Bolen JB, Johnson P. Association of 75/80-kDa phosphoproteins and the tyrosine kinases Lyn, Fyn, and Lck with the B cell molecule CD20. Evidence against involvement of the cytoplasmic regions of CD20. *J Biol Chem.* 1995;270:22632-22638.
84. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:317-327.
85. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20:34-50.
86. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:729-740.
87. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity.* 2006;24:19-28.
88. Lazar GA, Dang W, Karki S, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:4005-4010.
89. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:715-725.
90. Yeung YA, Leabman MK, Marvin JS, et al. Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. *J Immunol.* 2009;182:7663-7671.
91. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PW, Glennie MJ, Cragg MS. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica.* 2010;95:135-143.
92. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT, et al. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood.* 2003;101:1045-1052.
93. Ivanov A, Krysov S, Cragg MS, Illidge T. Radiation therapy with tositumomab (B1) anti-CD20 monoclonal antibody initiates extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-dependent cell death that overcomes resistance to apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2008;14:4925-4934.
94. Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood.* 2001;97:1392-1398.
95. Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, et al. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest.* 2009;119:2143-2159.
96. Beers SA, Chan CH, French RR, Cragg MS, Glennie MJ. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol.* 2010;47:107-114.
97. Cragg MS, Glennie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood.* 2004;103:2738-2743.
98. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol.* 2003;171:1581-1587.
99. Golay J, Cittera E, Di Gaetano N, et al. The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica.* 2006;91:176-183.
100. Jilani I, O'Brien S, Manshuri T, et al. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2003;102:3514-3520.
101. Beers SA, French RR, Chan HT, et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood.* 2010;115:5191-5201.
102. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol.* 2010;47:115-123.
103. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood.* 1994;83:435-445.

104. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. 2001;98:3383-3389.
105. Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003;101:949-954.
106. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*. 1998;91:1644-1652.
107. Semac I, Palomba C, Kulangara K, et al. Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells. *Cancer Res*. 2003;63:534-540.
108. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene*. 2007;26:3629-3636.
109. Kheirallah S, Caron P, Gross E, et al. Rituximab inhibits B-cell receptor signaling. *Blood*. 2010;115:985-994.
110. Vega MI, Huerta-Yepez S, Martinez-Paniagua M, et al. Rituximab-mediated cell signaling and chemo/immuno-sensitization of drug-resistant B-NHL is independent of its Fc functions. *Clin Cancer Res*. 2009;15:6582-6594.
111. Tawara T, Hasegawa K, Sugiura Y, et al. Complement activation plays a key role in antibody-induced infusion toxicity in monkeys and rats. *J Immunol*. 2008;180:2294-2298.
112. Zhou X, Hu W, Qin X. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *Oncologist*. 2008;13:954-966.
113. Weng WK, Levy R. Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2001;98:1352-1357.
114. Clynes R, Takechi Y, Moroi Y, Houghton A, Ravetch JV. Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:652-656.
115. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6:443-446.
116. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. 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*. 1997;90:1109-1114.
117. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gammaRIIIa gene. *Blood*. 2002;99:754-758.
118. Rubenstein JL, Fridlyand J, Abrey L, et al. Phase I study of intraventricular administration of rituximab in patients with recurrent CNS and intraocular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:1350-1356.
119. Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999;17:268-276.
120. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24:3121-3127.
121. Charriaut C, Senik A, Kolb JP, Barel M, Frade R. Inhibition of in vitro natural killer activity by the third component of complement: role for the C3a fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:6003-6007.

122. Wang SY, Racila E, Taylor RP, Weiner GJ. NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood*. 2008;111:1456-1463.
123. Wang SY, Veeramani S, Racila E, et al. Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model. *Blood*. 2009;114:5322-5330.
124. Ladetto M, Bergui L, Ricca I, Campana S, Pileri A, Tarella C. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody induces marked but transient reductions of peripheral blood lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia patients. *Med Oncol*. 2000;17:203-210.
125. Huhn D, von Schilling C, Wilhelm M, et al. Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98:1326-1331.
126. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol*. 1998;51:364-369.
127. Kay NE, Zarlring JM. Impaired natural killer activity in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with a deficiency of azurophilic cytoplasmic granules in putative NK cells. *Blood*. 1984;63:305-309.
128. Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 1998;9:995-1001.
129. Schulz H, Klein SK, Rehwald U, et al. Phase 2 study of a combined immunochemotherapy using rituximab and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:3115-3120.
130. Byrd JC, Peterson BL, Morrison VA, et al. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). *Blood*. 2003;101:6-14.
131. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*. 1998;92:1927-1932.
132. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346:235-242.
133. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. 2005;23:4117-4126.
134. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010;116:2040-5.
135. Zwick C, Murawski N, Pfreundschuh M. Rituximab in high-grade lymphoma. *Semin Hematol*. 2010;47:148-155.
136. Friedberg JW, Taylor MD, Cerhan JR, et al. Follicular lymphoma in the United States: first report of the national LymphoCare study. *J Clin Oncol*. 2009;27:1202-1208.
137. Fisher RI, LeBlanc M, Press OW, Maloney DG, Unger JM, Miller TP. New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:8447-8452.
138. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-2833.

139. Forstpointner R, Dreyling M, Repp R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2004;104:3064-3071.
140. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2005;106:3725-3732.
141. Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*. 2005;105:1417-1423.
142. Hochster H, Weller E, Gascoyne RD, et al. Maintenance rituximab after cyclophosphamide, vincristine, and prednisone prolongs progression-free survival in advanced indolent lymphoma: results of the randomized phase III ECOG1496 Study. *J Clin Oncol*. 2009;27:1607-1614.
143. Ghilmini M, Rufibach K, Salles G, et al. Single agent rituximab in patients with follicular or mantle cell lymphoma: clinical and biological factors that are predictive of response and event-free survival as well as the effect of rituximab on the immune system: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Ann Oncol*. 2005;16:1675-1682.
144. Herold M, Dolken G, Fiedler F, et al. Randomized phase III study for the treatment of advanced indolent non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and mantle cell lymphoma: chemotherapy versus chemotherapy plus rituximab. *Ann Hematol*. 2003;82:77-79.
145. Zarkhin V, Li L, Kambham N, Sigdel T, Salvatierra O, Sarwal MM. A randomized, prospective trial of rituximab for acute rejection in pediatric renal transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8:2607-2617.
146. Alausa M, Almagro U, Siddiqi N, Zuiderweg R, Medipalli R, Hariharan S. Refractory acute kidney transplant rejection with CD20 graft infiltrates and successful therapy with rituximab. *Clin Transplant*. 2005;19:137-140.
147. Zarkhin V, Chalasani G, Sarwal MM. The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance. *Transplant Rev (Orlando)*, 2010;24:67-78.
148. Schultz KR, Paquet J, Bader S, HayGlass KT. Requirement for B cells in T cell priming to minor histocompatibility antigens and development of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1995;16:289-295.
149. Kamble R, Oholendt M, Carrum G. Rituximab responsive refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:1201-1202.
150. Ratanatharathorn V, Logan B, Wang D, et al. Prior rituximab correlates with less acute graft-versus-host disease and better survival in B-cell lymphoma patients who received allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2009;145:816-824.
151. Christopheit M, Schutte V, Theurich S, Weber T, Grothe W, Behre G. Rituximab reduces the incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;113:3130-3131.
152. Panse JP, Heimfeld S, Guthrie KA, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell graft composition affects early T-cell chimaerism and later clinical outcomes after non-meloablative conditioning. *Br J Haematol*. 2005;128:659-667.
153. Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, von Bergwelt-Baildon MS. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;114:4919-4927.
154. Davis TA, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol*. 2000;18:3135-3143.

155. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344:1058-1066.
156. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, et al. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol.* 2004;172:3280-3288.
157. Helmy KY, Katschke KJ, Jr., Gorgani NN, et al. CR1: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell.* 2006;124:915-927.
158. Bhat R, Watzl C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS One.* 2007;2:e326.
159. Bowles JA, Weiner GJ. CD16 polymorphisms and NK activation induced by monoclonal antibody-coated target cells. *J Immunol Methods.* 2005;304:88-99.
160. Berdeja JG, Hess A, Lucas DM, et al. Systemic interleukin-2 and adoptive transfer of lymphokine-activated killer cells improves antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with relapsed B-cell lymphoma treated with rituximab. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2392-2399.
161. Taylor R. Fresh frozen plasma as a complement source. *Lancet Oncol.* 2007;8:370-371.
162. Takei K, Yamazaki T, Sawada U, Ishizuka H, Aizawa S. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leuk Res.* 2006;30:625-631.
163. Macor P, Tripodo C, Zorzet S, et al. In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab. *Cancer Res.* 2007;67:10556-10563.
164. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol.* 2006;176:2600-2609.
165. Beum PV, Lindorfer MA, Taylor RP. Within peripheral blood mononuclear cells, antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-opsonized Daudi cells is promoted by NK cells and inhibited by monocytes due to shaving. *J Immunol.* 2008;181:2916-2924.
166. Hudrisier D, Aucher A, Puaux AL, Bordier C, Joly E. Capture of target cell membrane components via trogocytosis is triggered by a selected set of surface molecules on T or B cells. *J Immunol.* 2007;178:3637-3647.
167. Daubeuf S, Lindorfer MA, Taylor RP, Joly E, Hudrisier D. The direction of plasma membrane exchange between lymphocytes and accessory cells by trogocytosis is influenced by the nature of the accessory cell. *J Immunol.* 2010;184:1897-1908.
168. Taylor RP, Lindorfer MA. Antigenic modulation and rituximab resistance. *Semin Hematol.* 2010;47:124-132.
169. Aue G, Lindorfer MA, Beum PV, et al. Fractionated subcutaneous rituximab is well-tolerated and preserves CD20 expression on tumor cells in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2010;95:329-332.
170. Kennedy GA, Tey SK, Cobcroft R, et al. Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *Br J Haematol.* 2002;119:412-416.
171. Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, et al. Identification of CD20 C-Terminal Deletion Mutations Associated with Loss of CD20 Expression in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2523-30.
172. Johnson NA, Leach S, Woolcock B, et al. CD20 mutations involving the rituximab epitope are rare in diffuse large B-cell lymphomas and are not a significant cause of R-CHOP failure. *Haematologica.* 2009;94:423-427.

173. Tomita A, Hiraga J, Kiyoi H, et al. Epigenetic regulation of CD20 protein expression in a novel B-cell lymphoma cell line, RRBL1, established from a patient treated repeatedly with rituximab-containing chemotherapy. *Int J Hematol.* 2007;86:49-57.
174. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood.* 2009;113:4885-4893.
175. Zhao WL, Wang L, Liu YH, et al. Combined effects of histone deacetylase inhibitor and rituximab on non-Hodgkin's B-lymphoma cells apoptosis. *Exp Hematol.* 2007;35:1801-1811.
176. Shimizu R, Kikuchi J, Wada T, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells. *Leukemia;*24:1760-1768.
177. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res.* 2008;14:1561-1570.
178. Bil J, Winiarska M, Nowis D, et al. Bortezomib modulates surface CD20 in B-cell malignancies and affects rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity. *Blood,* 2010;115:3745-3755.
179. Winiarska M, Bil J, Nowis D, Golab J. Proteolytic pathways involved in modulation of CD20 levels. *Autophagy,* 2010;6:810-812.
180. Romaguera JE, Fayad LE, McLaughlin P, et al. Phase I trial of bortezomib in combination with rituximab-HyperCVAD alternating with rituximab, methotrexate and cytarabine for untreated aggressive mantle cell lymphoma. *Br J Haematol,* 2010;151:47-53.
181. Agathocleous A, Rohatiner A, Rule S, et al. Weekly versus twice weekly bortezomib given in conjunction with rituximab, in patients with recurrent follicular lymphoma, mantle cell lymphoma and Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br J Haematol,* 2010;151:346-353.
182. Gong Q, Ou Q, Ye S, et al. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol.* 2005;174:817-826.
183. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood.* 2009;114:3367-3375.
184. Dunleavy K, Tay K, Wilson WH. Rituximab-associated neutropenia. *Semin Hematol,* 2010;47:180-186.
185. Gea-Banacloche JC. Rituximab-associated infections. *Semin Hematol;*47:187-198.
186. Dunleavy K, Hakim F, Kim HK, et al. B-cell recovery following rituximab-based therapy is associated with perturbations in stromal derived factor-1 and granulocyte homeostasis. *Blood.* 2005;106:795-802.
187. Voog E, Morschhauser F, Solal-Celigny P. Neutropenia in patients treated with rituximab. *N Engl J Med.* 2003;348:2691-2694; discussion 2691-2694.
188. Nitta E, Izutsu K, Sato T, et al. A high incidence of late-onset neutropenia following rituximab-containing chemotherapy as a primary treatment of CD20-positive B-cell lymphoma: a single-institution study. *Ann Oncol.* 2007;18:364-369.
189. Lai GG, Lim ST, Tao M, Chan A, Li H, Quek R. Late-onset neutropenia following RCHOP chemotherapy in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 2009;84:414-417.
190. Papadaki T, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Paterakis G, Phisphis M, Stefanoudaki-Sofianatou K. Evidence for T-large granular lymphocyte-mediated neutropenia in Rituximab-treated lymphoma patients: report of two cases. *Leuk Res.* 2002;26:597-600.

191. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003;19:583-593.
192. Egawa T, Kawabata K, Kawamoto H, et al. The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity*. 2001;15:323-334.
193. Aksoy S, Dizdar O, Hayran M, Harputluoglu H. Infectious complications of rituximab in patients with lymphoma during maintenance therapy: a systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2009;50:357-365.
194. Yeo W, Chan TC, Leung NW, et al. Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab. *J Clin Oncol*. 2009;27:605-611.
195. Hanbali A, Khaled Y. Incidence of hepatitis B reactivation following Rituximab therapy. *Am J Hematol*. 2009;84:195.
196. Carson KR, Evens AM, Richey EA, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood*. 2009;113:4834-4840.
197. Sekine R, Taketazu F, Kuroki M, et al. Fatal hepatic failure caused by chemotherapy-induced reactivation of hepatitis B virus in a patient with hematologic malignancy. *Int J Hematol*. 2000;71:256-258.
198. Tsutsumi Y, Kawamura T, Saitoh S, et al. Hepatitis B virus reactivation in a case of non-Hodgkin's lymphoma treated with chemotherapy and rituximab: necessity of prophylaxis for hepatitis B virus reactivation in rituximab therapy. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:627-629.
199. Ozgonenel B, Moonka D, Savasan S. Fulminant hepatitis B following rituximab therapy in a patient with Evans syndrome and large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2006;81:302.
200. Dillon R, Hirschfield GM, Allison ME, Rege KP. Fatal reactivation of hepatitis B after chemotherapy for lymphoma. *Bmj*. 2008;337:a423.
201. Kolstad A, Holte H, Fossa A, Lauritzsen GF, Gaustad P, Torfoss D. Pneumocystis jirovecii pneumonia in B-cell lymphoma patients treated with the rituximab-CHOEP-14 regimen. *Haematologica*. 2007;92:139-140.
202. Kumar D, Gourishankar S, Mueller T, et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia after rituximab therapy for antibody-mediated rejection in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis*. 2009;11:167-170.
203. Quartier P, Tournilhac O, Archimbaud C, et al. Enteroviral meningoencephalitis after anti-CD20 (rituximab) treatment. *Clin Infect Dis*. 2003;36:e47-49.
204. Ganjoo KN, Raman R, Sobel RA, Pinto HA. Opportunistic enteroviral meningoencephalitis: an unusual treatable complication of rituximab therapy. *Leuk Lymphoma*. 2009;50:673-675.
205. Lee MY, Chiou TJ, Hsiao LT, et al. Rituximab therapy increased post-transplant cytomegalovirus complications in Non-Hodgkin's lymphoma patients receiving autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2008;87:285-289.
206. Teeling JL, French RR, Cragg MS, et al. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2004;104:1793-1800.
207. Coiffier B, Lefebvre S, Pedersen LM, et al. Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood*. 2008;111:1094-1100.

208. Hagenbeek A, Gadeberg O, Johnson P, et al. First clinical use of ofatumumab, a novel fully human anti-CD20 monoclonal antibody in relapsed or refractory follicular lymphoma: results of a phase 1/2 trial. *Blood*. 2008;111:5486-5495.
209. Stein R, Qu Z, Chen S, et al. Characterization of a new humanized anti-CD20 monoclonal antibody, IMMU-106, and its use in combination with the humanized anti-CD22 antibody, epratuzumab, for the therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2868-2878.
210. Goldenberg DM, Morschhauser F, Wegener WA. Veltuzumab (humanized anti-CD20 monoclonal antibody): characterization, current clinical results, and future prospects. *Leuk Lymphoma*, 2010;51:747-755.
211. Morschhauser F, Leonard JP, Fayad L, et al. Humanized anti-CD20 antibody, veltuzumab, in refractory/recurrent non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II results. *J Clin Oncol*. 2009;27:3346-3353.
212. Morschhauser F, Marlton P, Vitolo U, et al. Results of a phase I/II study of ocrelizumab, a fully humanized anti-CD20 mAb, in patients with relapsed/refractory follicular lymphoma. *Ann Oncol*, 2010;21(9):1870-6.
213. Bowles JA, Wang SY, Link BK, et al. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood*. 2006;108:2648-2654.
214. Mossner E, Brunker P, Moser S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*, 2010;115:4393-4402.
215. Salles G, Morschhauser F, T L. Phase I study of RO5072759 (GA101) in patients with relapsed/refractory CD20+ non-Hodgkin lymphoma (NHL) [abstract]. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2009;114:1704.
216. de Romeuf C, Dutertre CA, Le Garff-Tavernier M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia cells are efficiently killed by an anti-CD20 monoclonal antibody selected for improved engagement of FcγRIIIA/CD16. *Br J Haematol*. 2008;140:635-643.
217. Le Garff-Tavernier M, Decocq J, de Romeuf C, et al. Analysis of CD16(+)CD56(dim) NK cells from CLL patients: evidence supporting a therapeutic strategy with optimized anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia*, 2010 [Epub ahead of print].
218. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 1990;323:570-578.
219. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000;288:669-672.
220. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 1995;270:475-480.
221. Ivanov R, Hol S, Aarts T, Hagenbeek A, Slager EH, Ebeling S. UTY-specific TCR-transfer generates potential graft-versus-leukaemia effector T cells. *Br J Haematol*. 2005;129:392-402.
222. Schaft N, Lankiewicz B, Drexhage J, et al. T cell re-targeting to EBV antigens following TCR gene transfer: CD28-containing receptors mediate enhanced antigen-specific IFNγ production. *Int Immunol*. 2006;18:591-601.
223. Lupo-Stanghellini MT, Provasi E, Bondanza A, Ciceri F, Bordignon C, Bonini C. Clinical impact of suicide gene therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hum Gene Ther*, 2010;21:241-250.
224. Tiberghien P, Cahn JY, Brion A, et al. Use of donor T-lymphocytes expressing herpes-simplex thymidine kinase in allogeneic bone marrow transplantation: a phase I-II study. *Hum Gene Ther*. 1997;8:615-624.

225. Contassot E, Ferrand C, Certoux JM, et al. Retrovirus-mediated transfer of the herpes simplex type I thymidine kinase gene in alloreactive T lymphocytes. *Hum Gene Ther.* 1998;9:73-80.
226. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science.* 1997;276:1719-1724.
227. Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1991;325:1601-1607.
228. Traversari C, Markt S, Magnani Z, et al. The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies. *Blood.* 2007;109:4708-4715.
229. Garin MI, Garrett E, Tiberghien P, et al. Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Blood.* 2001;97:122-129.
230. Sauce D, Bodinier M, Garin M, et al. Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes impairs their anti-Epstein-Barr virus potential through both culture-dependent and selection process-dependent mechanisms. *Blood.* 2002;99:1165-1173.
231. Bonini C, Bondanza A, Perna SK, et al. The suicide gene therapy challenge: how to improve a successful gene therapy approach. *Mol Ther.* 2007;15:1248-1252.
232. Thomis DC, Markt S, Bonini C, et al. A Fas-based suicide switch in human T cells for the treatment of graft-versus-host disease. *Blood.* 2001;97:1249-1257.
233. Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood.* 2005;105:4247-4254.
234. Introna M, Barbui AM, Bambacioni F, et al. Genetic modification of human T cells with CD20: a strategy to purify and lyse transduced cells with anti-CD20 antibodies. *Hum Gene Ther.* 2000;11:611-620.
235. Serafini M, Manganini M, Borleri G, et al. Characterization of CD20-transduced T lymphocytes as an alternative suicide gene therapy approach for the treatment of graft-versus-host disease. *Hum Gene Ther.* 2004;15:63-76.
236. van Meerten T, Claessen MJ, Hagenbeek A, Ebeling SB. The CD20/alphaCD20 'suicide' system: novel vectors with improved safety and expression profiles and efficient elimination of CD20-transgenic T cells. *Gene Ther.* 2006;13:789-797.
237. Cutler C, Miklos D, Kim HT, et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2006;108:756-762.
238. Carella AM, Biasco S, Nati S, Congiu A, Lerma E. Rituximab is effective for extensive steroid-refractory chronic graft-vs.-host-disease. *Leuk Lymphoma.* 2007;48:623-624.
239. Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry.* 1993;14:196-204.
240. Storie I, Wilson GA, Granger V, Barnett D, Reilly JT. Circulating CD20dim T-lymphocytes increase with age: evidence for a memory cytotoxic phenotype. *Clin Lab Haematol.* 1995;17:323-328.
241. Takami A, Saito M, Nakao S, et al. CD20-positive T-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1998;102:1327-1329.
242. Mohrmann RL, Arber DA. CD20-Positive peripheral T-cell lymphoma: report of a case after nodular sclerosis Hodgkin's disease and review of the literature. *Mod Pathol.* 2000;13:1244-1252.
243. Yokose N, Ogata K, Sugisaki Y, et al. CD20-positive T cell leukemia/lymphoma: case report and review of the literature. *Ann Hematol.* 2001;80:372-375.

244. Tamayose K, Sato N, Ando J, Sugimoto K, Oshimi K. CD3-negative, CD20-positive T-cell prolymphocytic leukemia: case report and review of the literature. *Am J Hematol.* 2002;71:331-335.
245. Wilk E, Witte T, Marquardt N, et al. Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum.* 2009;60:3563-3571.
246. Kornblihtt AR, de la Mata M, Fededa JP, Munoz MJ, Nogues G. Multiple links between transcription and splicing. *Rna.* 2004;10:1489-1498.
247. Sanford JR, Caceres JF. Pre-mRNA splicing: life at the centre of the central dogma. *J Cell Sci.* 2004;117:6261-6263.
248. Mount SM. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 1982;10:459-472.
249. Mount SM. Genomic sequence, splicing, and gene annotation. *Am J Hum Genet.* 2000;67:788-792.
250. Corcos L, Solier S. [Alternative mRNA splicing, pathology and molecular therapeutics]. *Med Sci (Paris).* 2005;21:253-260.
251. Will CL, Luhrmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:290-301.
252. Stark H, Luhrmann R. Cryo-electron microscopy of spliceosomal components. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2006;35:435-457.
253. House AE, Lynch KW. Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. *J Biol Chem.* 2008;283:1217-1221.
254. Jurica MS, Moore MJ. Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods.* 2002;28:336-345.
255. Brow DA. Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet.* 2002;36:333-360.
256. Kambach C, Walke S, Nagai K. Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. *Curr Opin Struct Biol.* 1999;9:222-230.
257. Jurica MS, Moore MJ. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell.* 2003;12:5-14.
258. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, et al. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science.* 2003;302:2141-2144.
259. Clark TA, Schweitzer AC, Chen TX, et al. Discovery of tissue-specific exons using comprehensive human exon microarrays. *Genome Biol.* 2007;8:R64.
260. Blencowe BJ. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell.* 2006;126:37-47.
261. Grabowski PJ, Black DL. Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2001;65:289-308.
262. Sorek R, Shamir R, Ast G. How prevalent is functional alternative splicing in the human genome? *Trends Genet.* 2004;20:68-71.
263. Haj Khelil A, Deguillien M, Moriniere M, Ben Chibani J, Baklouti F. Cryptic splicing sites are differentially utilized in vivo. *Febs J.* 2008;275:1150-1162.
264. Roca X, Sachidanandam R, Krainer AR. Intrinsic differences between authentic and cryptic 5' splice sites. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:6321-6333.
265. Zhang XH, Leslie CS, Chasin LA. Computational searches for splicing signals. *Methods.* 2005;37:292-305.
266. Matlin AJ, Clark F, Smith CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:386-398.
267. Graveley BR. Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna.* 2000;6:1197-1211.

268. Wagner EJ, Garcia-Blanco MA. Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3281-3288.
269. Smith CW, Valcarcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci.* 2000;25:381-388.
270. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* 2002;3:285-298.
271. Goren A, Ram O, Amit M, et al. Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences--The complex definition of enhancers and silencers. *Mol Cell.* 2006;22:769-781.
272. Hastings ML, Wilson CM, Munroe SH. A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA. *Rna.* 2001;7:859-874.
273. Timchenko LT, Timchenko NA, Caskey CT, Roberts R. Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1996;5:115-121.
274. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:291-336.
275. Gromak N, Matlin AJ, Cooper TA, Smith CW. Antagonistic regulation of alpha-actinin alternative splicing by CELF proteins and polypyrimidine tract binding protein. *Rna.* 2003;9:443-456.
276. Boucher L, Ouzounis CA, Enright AJ, Blencowe BJ. A genome-wide survey of RS domain proteins. *Rna.* 2001;7:1693-1701.
277. Dauksaite V, Akusjarvi G. The second RNA-binding domain of the human splicing factor ASF/SF2 is the critical domain controlling adenovirus E1A alternative 5'-splice site selection. *Biochem J.* 2004;381:343-350.
278. Fu XD. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *Rna.* 1995;1:663-680.
279. Zhu J, Krainer AR. Pre-mRNA splicing in the absence of an SR protein RS domain. *Genes Dev.* 2000;14:3166-3178.
280. Zahler AM, Lane WS, Stolk JA, Roth MB. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* 1992;6:837-847.
281. Mermoud JE, Cohen PT, Lamond AI. Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *Embo J.* 1994;13:5679-5688.
282. Prasad J, Colwill K, Pawson T, Manley JL. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol.* 1999;19:6991-7000.
283. Bourgeois CF, Lejeune F, Stevenin J. Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2004;78:37-88.
284. Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:289-321.
285. Krecic AM, Swanson MS. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:363-371.
286. van der Houven van Oordt W, Diaz-Meco MT, Lozano J, Krainer AR, Moscat J, Caceres JF. The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J Cell Biol.* 2000;149:307-316.
287. Hiller M, Zhang Z, Backofen R, Stamm S. Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition. *PLoS Genet.* 2007;3:e204.
288. Allo M, Buggiano V, Fededa JP, et al. Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16:717-724.
289. Batsche E, Yaniv M, Muchardt C. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13:22-29.

290. Schor IE, Rascovan N, Pelisch F, Allo M, Kornblihtt AR. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:4325-4330.
291. Andersson R, Enroth S, Rada-Iglesias A, Wadelius C, Komorowski J. Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. *Genome Res*. 2009;19:1732-1741.
292. Schwartz S, Meshorer E, Ast G. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16:990-995.
293. Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science*, 2010;327:996-1000.
294. Grosso AR, Martins S, Carmo-Fonseca M. The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Rep*. 2008;9:1087-1093.
295. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14:185-193.
296. David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*, 2010;463:364-368.
297. Morton CC, Kirsch IR, Nance WE, Evans GA, Korman AJ, Strominger JL. Orientation of loci within the human major histocompatibility complex by chromosomal in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:2816-2820.
298. Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC. Crystallization and X-ray diffraction studies on the histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-A28 from human cell membranes. *J Mol Biol*. 1985;186:205-210.
299. Wheatley DN, Grisolia S, Hernandez-Yago J. Significance of the rapid degradation of newly synthesized proteins in mammalian cells: a working hypothesis. *J Theor Biol*. 1982;98:283-300.
300. Goldberg AL, Rock K. Not just research tools--proteasome inhibitors offer therapeutic promise. *Nat Med*. 2002;8:338-340.
301. Sullivan JA, Shirasu K, Deng XW. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat Rev Genet*. 2003;4:948-958.
302. Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:179-187.
303. Morel S, Levy F, Burllet-Schiltz O, et al. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity*. 2000;12:107-117.
304. Chapiro J, Claverol S, Piette F, et al. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol*. 2006;176:1053-1061.
305. van Endert PM, Riganelli D, Greco G, et al. The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J Exp Med*. 1995;182:1883-1895.
306. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:369-396.
307. Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:209-212.
308. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*. 1994;368:711-718.
309. Lechler R, Aichinger G, Lightstone L. The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev*. 1996;151:51-79.
310. Rocha N, Neeffjes J. MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *Embo J*. 2008;27:1-5.

311. Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol.* 1999;1:362-368.
312. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1998;188:1359-1368.
313. Larsson M, Fonteneau JF, Somersan S, et al. Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001;31:3432-3442.
314. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, et al. Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med.* 1999;189:371-380.
315. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.* 2001;7:297-303.
316. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:543-555.
317. Kovacovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science.* 1995;267:243-246.
318. Rock KL. The ins and outs of cross-presentation. *Nat Immunol.* 2003;4:941-943.
319. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature.* 2003;425:402-406.
320. Burgdorf S, Scholz C, Kautz A, Tampe R, Kurts C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol.* 2008;9:558-566.
321. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics.* 1999;50:213-219.
322. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:7922-7927.
323. Zhou D, Li P, Lin Y, et al. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity.* 2005;22:571-581.
324. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science.* 2005;307:593-596.
325. Aichinger G, Karlsson L, Jackson MR, et al. Major histocompatibility complex class II-dependent unfolding, transport, and degradation of endogenous proteins. *J Biol Chem.* 1997;272:29127-29136.
326. Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:973-983.
327. Giuntoli RL, 2nd, Lu J, Kobayashi H, Kennedy R, Celis E. Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potentiate their proliferation, survival, and effector function. *Clin Cancer Res.* 2002;8:922-931.
328. Trapani JA, Jans P, Smyth MJ, et al. Perforin-dependent nuclear entry of granzyme B precedes apoptosis, and is not a consequence of nuclear membrane dysfunction. *Cell Death Differ.* 1998;5:488-496.
329. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 2009;30:180-192.
330. Itoh K, Platsoucas CD, Balch CM. Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor. *J Exp Med.* 1988;168:1419-1441.
331. Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC, et al. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol.* 2008;26:3445-3455.

332. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54:187-207.
333. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature.* 1991;351:290-296.
334. Cox AL, Skipper J, Chen Y, et al. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science.* 1994;264:716-719.
335. De Plaen E, Lurquin C, Lethe B, et al. Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods.* 1997;12:125-142.
336. Wang RF, Wang X, Atwood AC, Topalian SL, Rosenberg SA. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science.* 1999;284:1351-1354.
337. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991;254:1643-1647.
338. Ayyoub M, Migliaccio M, Guillaume P, et al. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur J Immunol.* 2001;31:2642-2651.
339. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:11810-11813.
340. Neller MA, Lopez JA, Schmidt CW. Antigens for cancer immunotherapy. *Semin Immunol.* 2008;20:286-295.
341. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:299-308.
342. Tey SK, Bollard CM, Heslop HE. Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol.* 2006;84:281-289.
343. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:666-675.
344. Muul LM, Spiess PJ, Director EP, Rosenberg SA. Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J Immunol.* 1987;138:989-995.
345. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med.* 1988;319:1676-1680.
346. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1159-1166.
347. Topalian SL, Solomon D, Avis FP, et al. Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study. *J Clin Oncol.* 1988;6:839-853.
348. Aebersold P, Hyatt C, Johnson S, et al. Lysis of autologous melanoma cells by tumor-infiltrating lymphocytes: association with clinical response. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83:932-937.
349. Pockaj BA, Sherry RM, Wei JP, et al. Localization of 111indium-labeled tumor infiltrating lymphocytes to tumor in patients receiving adoptive immunotherapy. Augmentation with cyclophosphamide and correlation with response. *Cancer.* 1994;73:1731-1737.
350. Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer. *Sci Am.* 1990;262:62-69.
351. Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, et al. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res;*16:2646-2655.

352. Yee C, Thompson JA, Byrd D, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:16168-16173.
353. Vignard V, Lemercier B, Lim A, et al. Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J Immunol*. 2005;175:4797-4805.
354. Wang LX, Shu S, Disis ML, Plautz GE. Adoptive transfer of tumor-primed, in vitro-activated, CD4⁺ T effector cells (TEs) combined with CD8⁺ TEs provides intratumoral TE proliferation and synergistic antitumor response. *Blood*. 2007;109:4865-4876.
355. Nesbeth YC, Martinez DG, Toraya S, et al. CD4⁺ T cells elicit host immune responses to MHC class II-negative ovarian cancer through CCL5 secretion and CD40-mediated licensing of dendritic cells. *J Immunol*, 2010;184:5654-5662.
356. Hunder NN, Wallen H, Cao J, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4⁺ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*. 2008;358:2698-2703.
357. Wang XF, Kerzerho J, Adotevi O, et al. Comprehensive analysis of HLA-DR- and HLA-DP4-restricted CD4⁺ T cell response specific for the tumor-shared antigen survivin in healthy donors and cancer patients. *J Immunol*. 2008;181:431-439.
358. Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:233-240.
359. Wrzesinski C, Paulos CM, Kaiser A, et al. Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *J Immunother*, 2010;33:1-7.
360. Eggermont AM. Immunotherapy: Vaccine trials in melanoma -- time for reflection. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:256-258.
361. Clay TM, Morse M, Lysterly HK. Redirecting cytotoxic T lymphocyte responses with T-cell receptor transgenes. *Expert Opin Biol Ther*. 2002;2:353-360.
362. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006;314:126-129.
363. Engels B, Uckert W. Redirecting T lymphocyte specificity by T cell receptor gene transfer--a new era for immunotherapy. *Mol Aspects Med*. 2007;28:115-142.
364. Chiang CL, Benencia F, Coukos G. Whole tumor antigen vaccines. *Semin Immunol*, 2010;22:132-143.
365. Cormier JN, Salgaller ML, Prevette T, et al. Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am*. 1997;3:37-44.
366. Noguchi M, Itoh K, Suekane S, et al. Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2-positive patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci*. 2004;95:77-84.
367. Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, et al. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:12837-12842.
368. Bijker MS, van den Eeden SJ, Franken KL, Melief CJ, van der Burg SH, Offringa R. Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur J Immunol*. 2008;38:1033-1042.
369. Maslak PG, Dao T, Gomez M, et al. A pilot vaccination trial of synthetic analog peptides derived from the BCR-ABL breakpoints in CML patients with minimal disease. *Leukemia*. 2008;22:1613-1616.

370. Jain N, Reuben JM, Kantarjian H, et al. Synthetic tumor-specific breakpoint peptide vaccine in patients with chronic myeloid leukemia and minimal residual disease: a phase 2 trial. *Cancer*. 2009;115:3924-3934.
371. Marchand M, Punt CJ, Aamdal S, et al. Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report. *Eur J Cancer*. 2003;39:70-77.
372. Davis ID, Chen W, Jackson H, et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10697-10702.
373. Xu GL, Zhang KQ, Guo B, et al. Induction of protective and therapeutic antitumor immunity by a DNA vaccine with C3d as a molecular adjuvant. *Vaccine*, 2010;28(44):7221-7.
374. Morton DL, Foshag LJ, Hoon DS, et al. Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Ann Surg*. 1992;216:463-482.
375. Hsueh EC, Essner R, Foshag LJ, Ye W, Morton DL. Active immunotherapy by reinduction with a polyvalent allogeneic cell vaccine correlates with improved survival in recurrent metastatic melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2002;9:486-492.
376. Faries MB, Morton DL. Therapeutic vaccines for melanoma: current status. *BioDrugs*. 2005;19:247-260.
377. Mitchell MS, Abrams J, Thompson JA, et al. Randomized trial of an allogeneic melanoma lysate vaccine with low-dose interferon Alfa-2b compared with high-dose interferon Alfa-2b for Resected stage III cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:2078-2085.
378. Grabbe S, Beissert S, Schwarz T, Granstein RD. Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today*. 1995;16:117-121.
379. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1998;4:328-332.
380. O'Rourke MG, Johnson M, Lanagan C, et al. Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother*. 2003;52:387-395.
381. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res*. 2001;61:6451-6458.
382. Quintanilla-Martinez L, Preffer F, Rubin D, Ferry JA, Harris NL. CD20+ T-cell lymphoma. Neoplastic transformation of a normal T-cell subset. *Am J Clin Pathol*. 1994;102:483-489.
383. Warren EH, Vigneron NJ, Gavin MA, et al. An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order. *Science*. 2006;313:1444-1447.
384. Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol*. 1994;152:163-175.
385. Kuttler C, Nussbaum AK, Dick TP, Rammensee HG, Schild H, Haderl KP. An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J Mol Biol*. 2000;298:417-429.
386. Nussbaum AK, Kuttler C, Haderl KP, Rammensee HG, Schild H. PProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics*. 2001;53:87-94.
387. Pajot A, Michel ML, Fazilleau N, et al. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *Eur J Immunol*. 2004;34:3060-3069.

388. Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med.* 1997;185:2043-2051.
389. Brinkman BM. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem.* 2004;37:584-594.
390. Renaudineau Y, Hillion S, Saraux A, Mageed RA, Youinou P. An alternative exon 1 of the CD5 gene regulates CD5 expression in human B lymphocytes. *Blood.* 2005;106:2781-2789.
391. Iacobucci I, Lonetti A, Messa F, et al. Expression of spliced oncogenic Ikaros isoforms in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: implications for a new mechanism of resistance. *Blood.* 2008;112:3847-3855.
392. Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med.* 2000;191:503-514.
393. Stohwasser R, Salzmann U, Giesebrecht J, Kloetzel PM, Holzhutter HG. Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem.* 2000;267:6221-6230.
394. Valmori D, Gileadi U, Servis C, et al. Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med.* 1999;189:895-906.
395. Rusakiewicz S, Dosset M, Mollier K, et al. Immunogenicity of a recombinant lentiviral vector carrying human telomerase tumor antigen in HLA-B*0702 transgenic mice. *Vaccine.* 2010;28:6374-6381.
396. Tourdot S, Scardino A, Saloustrou E, et al. A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *Eur J Immunol.* 2000;30:3411-3421.

