

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

**EA3842 « Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et
Résistance thérapeutique » CAPTuR**

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Biologie-santé Option : Immunologie-Oncologie

Présentée et soutenue par
Marine Aitamer

Le 15 décembre 2020

**Etude de la production de petites vésicules extracellulaires (dont
les exosomes) dans les Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B
(DLBCL), influence de la voie BDNF/TrkB et impact sur la
sensibilité des cellules tumorales aux anti-CD20**

Thèse dirigée par **Pr Danielle Troutaud**

JURY :

Président du jury

Pr Jean Feuillard, PU-PH, CNRS UMR7276, INSERM U1262, Université de
Limoges

Rapporteurs

Pr Hervé Ghesquières, PU-PH UFR de Médecine Lyon I et Service d'hématologie
Centre Hospitalier Lyon Sud

Pr Laurence Nieto, PR1 Equipe Microenvironnement, Cancer and Adipocytes -
Université de Toulouse

Examineurs

Dr Jessica Gobbo Centre de lutte contre le cancer Georges-François Leclerc de
Dijon et INSERM 1231 Equipe Lipides, Nutrition et Santé

Dr Hamasseh Shirvani Scientist Project Manager- Institut Roche for Research &
Translational Medicine



Je dédie cette these à Geoffroy,
Je dédie cette thèse à mes proches,
Je dédie cette thèse à Danielle.



Remerciements

Il me semble plus que nécessaire de devoir remercier toutes les personnes qui ont participé et qui m'ont aussi soutenu et aidé, de près comme de loin à l'élaboration de cette thèse.

Tout d'abord je souhaiterais remercier les différents membres du jury qui ont accepté de prendre du temps pour évaluer ce travail que j'ai mené durant ces 4 années : je remercie ainsi les rapporteurs de cette thèse, Mme le Professeur Laurence Nieto et M. le Professeur Hervé Ghesquières pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail par leur expertise en l'évaluant. Je remercie également les deux examinatrices, le docteur Jessica Gobbo et le docteur Hamasseh Shirvani de contribuer aussi à cette évaluation et par leurs questions à la publication des articles en lien avec ce travail. Je remercie également, M. le Professeur Jean Feuillard d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à remercier très sincèrement Mme le Professeur Marie-Odile Jauberteau, m'ayant permis d'effectuer ce travail de thèse dans le laboratoire qu'elle dirige. Je la remercie également pour son soutien, pour sa gentillesse et son écoute durant ma thèse. Je lui manifeste ici toute ma gratitude.

Maintenant je souhaite de tout cœur remercier ma directrice de thèse, le **Professeur Danielle Troutaud**, qui m'a donné toute sa confiance pour réaliser cette thèse et sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Danielle m'a vu grandir sur les bancs de la fac et je la remercie de m'avoir donné cette chance d'effectuer ce projet qui me tenait à cœur, apprendre le métier d'enseignant chercheur. Je tiens à la remercier pour sa disponibilité, son extrême gentillesse et pour son soutien constant. Elle a su me guider tout au long de cette thèse, m'apporter de précieux conseils et beaucoup d'aide. Au fil du temps, la confiance qu'elle m'accordait a forgé ma maturité scientifique. Elle a su transformer, développer et renforcer mes réflexions afin de préparer des bagages solides pour mon futur professionnel. Son optimisme permanent m'a permis de ne jamais baisser les bras, elle a toujours su être à l'écoute, me permettant de toujours me sentir en confiance. Je la remercie énormément pour le travail de correction qu'elle a fourni avec minutie sur ce manuscrit de thèse Sa très grande générosité et son implication dans notre travail de recherche mais aussi dans la vie du laboratoire montrent les grandes qualités humaines et professionnelles qu'elle possède. Je voudrais la remercier pour tout ce qu'elle m'a apportée et lui dire qu'à mes yeux c'est un modèle à suivre.

La suite logique de ces remerciements va à **Hafidha**. Elle m'a accompagnée et formée durant la grande partie de ma thèse et m'a été d'une aide précieuse. Je suis consciente de la chance que j'ai eu de pouvoir travailler en étroite collaboration avec elle. J'ai pu apprendre rapidement pleins de techniques et de notions essentielles au bon déroulement de ma thèse. Alors, je la remercie sincèrement pour son soutien, de m'avoir encouragée sans cesse et pour ses multiples conseils qui m'ont permis d'avancer. Elle est devenue bien plus qu'une encadrante, mais une amie. Merci pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble, merci pour tout Hafidha.

Bien évidemment, je tiens à remercier les services d'Hématologie Clinique et d'Anatomo-Pathologie pour leur collaboration essentielle à l'étude menée sur les échantillons de patients.

Et un très grand **MERCI aux patients** qui ont accepté que leur prélèvement de sang nous soient confiés pour mener à bien notre projet et sans l'accord desquels une partie de ce travail n'aurait pu se faire. Nous espérons que nos résultats seront d'utilité pour améliorer la vie d'autres patients dans l'avenir. Une grande pensée à toutes les personnes qui sont au combat contre la maladie.

Je remercie l'Institut Roche et la Région nouvelle Aquitaine qui ont accepté de collaborer avec nous et permis le financement d'une partie de ce projet de recherche, qui je l'espère nous apportera des pistes intéressantes pour l'avenir des patients atteints par cette pathologie.



Je remercie tous les statutaires de l'EA3842 : **Thomas et François**, ma petite pause du midi revigorante, je vous remercie pour tous les bons moments que l'on aura passés ensemble. Ah ouiii on en a eu des fous rires et cela m'a fait un bien fou. Je voudrais également vous remercier pour toutes les discussions « sérieuses », que nous avons eu, vous avez toujours été attentifs et de bons conseils, vous êtes des personnes chères à mes yeux. Merci pour votre bonne humeur permanente.

Merci à **Aurélie et Fifi**, pour les nombreuses heures passées à gérer les stocks et les commandes en plus de leurs heures de recherche. **Aurélie**, toujours souriante et de bonne humeur, c'était un réel plaisir de travailler à ses côtés. Je remercie **Fifi** pour sa patience et sa réactivité quand je venais le voir pour des commandes qui n'arrivaient pas. Merci à vous deux.

Je remercie **Fabrice**, pour son écoute, ses conseils pertinents et pour les discussions très enrichissantes que nous avons pu avoir. Je tiens également à le remercier pour sa bonne humeur et pour son importante implication au sein du laboratoire. Sans oublier **Serge, Mireille, Barbara et Gaëlle**.

Un très grand merci aux doctorants actuels, **Cécé, Elo, Axel, Aude** mais aussi aux anciens doctorants **Sabrina, Hugo, Amazigh, Niki, Hussein, Simon, Sophie**, pour leur gentillesse et pour ces nombreuses soirées passées au Leprechaun ou à l'irlandais 😊.

Bien évidemment je n'oublie pas **Seb** avec qui j'ai travaillé avant de commencer cette thèse, il m'a appris beaucoup durant cette année. Je le remercie pour son extrême gentillesse et son dévouement envers les autres. Je tiens aussi à remercier **Christophe** et tous ceux avec qui j'ai travaillé au sein du CBRS, et notamment **Cathy** pour toutes les fois où je l'ai sollicité pour m'aider à faire des réglages au cytomètre, je les remercie pour leur sympathie et pour tous les échanges que nous avons eu.

Cela fait maintenant quelques temps que nous avons commencé à travailler ensemble **Hussein** et moi, et je voulais le remercier pour sa bonne humeur, toujours souriant, plein d'entrain. Toujours disponible quand on a besoin de lui. Très compétent scientifiquement, toujours de bons conseils, c'est un réel plaisir de travailler à ses côtés.

Ma petite Audrey, bien sur qu'il fallait que je la remercie, toujours souriante, de bonne humeur, on l'entend rire à des kms. C'est une sacrée boule d'énergie, elle respire la joie de vivre. Nous avons fait réellement connaissance au moment de la formation animale et j'ai découvert une personne très intéressante, qui sait redonner du baume au cœur. Désormais c'est une amie, qui sait être à l'écoute et d'une extrême gentillesse. Merci Audrey.

Je tiens à remercier tout le corps enseignant avec qui je travaille et qui m'a accompagnée du mieux que possible dans le bon déroulement des enseignements que j'ai donné tout au long de ma thèse et de mon poste d'ATER. Mais aussi un grand merci aux personnels techniques qui supervisent avec beaucoup de rigueur les TPs.

A présent, je souhaite de tout cœur remercier la personne qui partage ma vie depuis maintenant un certain nombre d'années, **Geoffroy**. Je le remercie de m'avoir accompagnée et de m'avoir aidée à sa manière dans l'aboutissement de cette thèse, (même s'il pense que la biologie n'est pas une vraie science) Aaaaah ces physiciens alors !! Merci pour les milliers de repas préparés avec soins (et amour), pour sa générosité débordante envers moi et tout l'amour qu'il me porte. Je le remercie profondément pour son soutien permanent, de me faire rire et de supporter (de temps en temps) mon caractère de cochon quand je suis fatiguée et stressée. Je n'ai pas besoin d'écrire un roman, il sait déjà tout ce que je pense alors juste un grand MERCI à lui ❤️

👩 Les MEUFS : **Gab, Laure, Cécé, Gaumar**, bien évidemment je ne pouvais pas ne pas les remercier. Cela fait maintenant plus de 10 ans que nous nous connaissons. Nous nous sommes connues sur les bancs de la fac et nous avons grandi ensemble. Nous avons toutes eu des parcours différents, nous habitons dans des villes différentes mais nous sommes restées les mêmes. Je voudrais les remercier pour tout ce qu'elles m'ont apportées durant toutes ces années, pour tous les moments que nous avons passés ensemble, à rire, à pleurer, à tous nos week-ends et aux vacances que ce soit à la mer, à la montagne, en rando, au ski (et j'en passe) et à tous ceux que l'on passera après ce



confinement. J'aimerais simplement leur dire qu'elles me manquent et qu'elles sont bien plus qu'importantes à mes yeux.

Cam Cam, Clemtar Clemart clementgpauger Durifzer, et Tarek Habibi, babe, le roi du houmous, du vrai taboule, Toujours discrète sur mes sentiments, j'avais envie d'écrire quelques lignes vous concernant. En effet, c'est ici que je tiens de tout cœur à vous remercier d'avoir été plus que présent. Nous nous sommes connus en thèse mais j'ai l'impression que cela fait des années que l'on se connaît. Vous m'avez toujours soutenu dans tout ce que j'ai fait, que ce soit d'un point de vu professionnel ou personnel, alors je tenais à souligner tous les traits de caractères qui vous définissent et qui vous mettent en valeur pour une fois. Merci à vous, encore aujourd'hui, de me faire rire aux éclats, de me reconforter quand ça ne va pas, de m'écouter, de me conseiller, bref merci pour tout ce que vous êtes et pour tout ce que vous représentez, c'est-à-dire des amis chers qui méritent ces quelques mots, d'une très grande importance pour moi. Merci aux nombreux cafés pris dans la cafet, merci aux nombreuses soirées que nous avons passé ensemble en pilou pilou à manger gras devant une série et à discuter pendant des heures à n'en plus finir. Alors même si tout le monde ne le pense pas, je le dis ici, vous êtes de très belles personnes, avec un très grand cœur et je souhaite vous dire merci de faire partie de ma vie. **Cam Cam, maladroite au possible... rhooooo ça vaaaaaaa...**

😊 Je pense qu'elle est la personne la plus dévouée que je connaisse, en amour comme en amitié, tellement vraie, et authentique. Vraiment je suis si fière d'être son amie. Nos discussions sont toujours très enrichissantes, nous parlons toujours de pleins de sujets diverses et variés, c'est génial. Merci de refaire ma culture générale ahah. Je sais que notre amitié va perdurer dans le temps, c'est évident. Je vais donc m'arrêter là, tout le reste elle le sait déjà. **Clément, notre petite poubelle de table hihi**, toujours à l'écoute, âme sensible, très réfléchi, c'est toujours un plaisir de discuter avec lui. Sa patience inouïe m'impressionnera toujours autant, il est celui qui temporise les petits émois du groupe de temps en temps. Très cultivé, très attachant, toujours souriant, avec une très belle personnalité, je lui dirais simplement de ne pas changer et de rester comme il est. **Tarek, Habibi, mon petit libanais préféré**, je pourrais écrire tout un chapitre le concernant. Sa personnalité débordante fait de lui une personne si attachante. Toujours de bons conseils « beauté » et « scientifique » mais surtout, toujours là, présent pour moi. J'ai appris beaucoup de choses sur le Liban et j'ai hâte de partager cette partie de sa vie avec lui. Son franc parlé et son caractère de cochon font de lui une personne caractérielle mais finalement ce que l'on retiendra c'est sa très grande générosité envers ceux qu'il aime. Il sait me redonner le sourire, il sait aussi m'écouter et je tiens sincèrement à lui dire à quel point il m'est cher. Bien évidemment, je ne pouvais pas terminer ces remerciements sans évoquer tous ces moments de fous rire passés dans chacune des pièces de ce labo à faire des montages vidéo et des photos. A embêter Camille et Clément pendant qu'ils faisaient semblant de travailler sérieusement. Avec tout cela je pense que l'on va pouvoir faire quelques albums collecteurs de tous ces souvenirs hors normes. Un immense MERCI à tous les 3 d'avoir bouleversé ma vie.

Les copains : **Fanny, Soso, Guitou, Cyrielle, Cédric, Amandine, Le belge, Yasmine, Joseph, JB, Audrey, Mélo, Momo, Anne-Claire** je tenais à vous remercier pour ces nombreux moments que l'on a partagés et ce n'est pas près de s'arrêter. Je suis très reconnaissante de vous avoir rencontré il y a maintenant quelques années. Merci pour la bonne humeur permanente que vous m'apportez à chaque fois que l'on se voit.

Gwen, nous sommes amies depuis le lycée, depuis tout ce temps on se connaît, et tu as toujours répondu présente. On ne se voit que trop peu à mon goût mais sache que tu tiens une place importante pour moi alors je voulais te remercier d'avoir toujours été là depuis toutes ces années.

Enfin, je vais terminer ces remerciements par ma famille, **Papa, Mamie, Morgane Yohann, mes nièces** et tous les autres bien évidemment. Merci d'être là pour moi, de m'encourager même si vous ne comprenez pas toujours ce que je fais ^^. Mamie qui me demande toujours quand est ce que j'ai fini l'école ahah. Voilà, je voulais simplement les remercier de faire partie de ma vie.

Je m'excuse par avance auprès des personnes que j'ai oubliées, mais bien évidemment le cœur y est, vous vous en doutez.



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | |
| Droits d'auteurs..... | |
| Table des matières..... | |
| Abréviations..... | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Préambule | |
| Introduction | |
| I. De l'origine de la cellule B « protectrice » à la cellule B « agressive »..... | 1 |
| 1.1 De la moelle osseuse aux organes lymphoïdes périphériques : développement et maturation des lymphocytes B | 2 |
| 1.1.1. Développement dans la moelle osseuse et formation du « répertoire B » | 3 |
| 1.1.2. Phase Ag dépendante : Activation et maturation des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires..... | 4 |
| 1.2 Remaniements génétiques, développement B et lymphomes..... | 7 |
| II. Le lymphome diffus à grandes cellules B..... | 9 |
| 2.1 Présentation générale | 9 |
| 2.2 Origine et classification des DLBCL..... | 10 |
| 2.3 DLBCL NOS : lésions génétiques et profils d'expression moléculaire des GCB versus ABC..... | 13 |
| 2.3.1 Les altérations génétiques communes aux GCB et ABC | 14 |
| 2.3.2 Sous-type GCB « Germinal center B cell like »..... | 17 |
| 2.3.3 Sous-type ABC « Activated B Cell »..... | 20 |
| 2.3.4 Profils histologiques | 22 |
| 2.3.5 Révision de la classification : découverte de nouveaux sous-groupes | 23 |
| 2.4 Les traitements des DLBCL, et place de l'immunothérapie anti-CD20..... | 24 |
| 2.4.1 Du gène <i>MS4A1</i> à la protéine CD20 | 26 |
| 2.4.2 Mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression cellulaire du CD20 | 27 |
| 2.4.3 Les mécanismes de la déplétion des cellules B par les anti- CD20..... | 31 |
| 2.4.4 Les résistances au rituximab | 36 |
| 2.4.5 Evolution de l'immunothérapie anti-CD20 et nouvelles cibles | 40 |
| 2.5 Place des exosomes dans les DLBCL et les résistances thérapeutiques..... | 44 |
| III. Petites vésicules extracellulaires, exosomes et cancers, cas des DLBCL..... | 46 |
| 3.1 Généralités sur les vésicules extracellulaires..... | 46 |
| 3.2 La Biogénèse des exosomes | 49 |
| 3.2.1 Aspects morphologiques et dynamiques : de la maturation d'endosomes précoces à la formation de MVB et la libération des exosomes..... | 49 |
| 3.2.2 Mécanismes de la biogénèse des exosomes..... | 53 |



| | | |
|-------|---|-----|
| 3.3 | Processus de libération des exosomes | 59 |
| 3.4 | Composition biochimique des exosomes..... | 62 |
| 3.4.1 | Composition protéique..... | 63 |
| 3.4.2 | Composition lipidique | 64 |
| 3.4.3 | Composition en acides nucléiques..... | 66 |
| 3.5 | Mécanismes du transfert d'informations par les exosomes..... | 68 |
| 3.6 | Signification biologique des exosomes : aspect physiologique et physiopathologique..... | 70 |
| 3.7 | Exosomes et cancers | 71 |
| 3.7.1 | Régulation par les TEX du système immunitaire | 72 |
| 3.7.2 | Rôle des TEX dans la progression tumorale..... | 74 |
| 3.7.3 | Exosomes et résistances thérapeutiques..... | 75 |
| 3.7.4 | Utilisation des exosomes comme biomarqueurs et outils de diagnostic dans les cancers ? | 76 |
| 3.8 | Exosomes et DLBCL | 77 |
| | Résultats – Article 1 | 81 |
| | Résultats – Article 2 <i>en préparation</i> | 113 |
| | Discussion – Conclusion – Perspectives..... | 126 |
| | Références bibliographiques | 139 |
| | Annexes | 179 |
| | Résumé | |



Abréviations

| | |
|---|---|
| ABC : Activated B cell | CRP : Complement Regulatory Proteins |
| ABCA3 : ATP-Binding Cassette, subfamily A, member 3 | CREB : cAMP Response Element Binding |
| Ac : Anticorps | CSR : Class Switch Recombination |
| ADCC : Antibody-dependant cell mediated | DHF : Dihydroxyflavone |
| ADCP : Antibody Dependent Cell Phagocytosis | DLBCL : Diffuse Large B-Cell Lymphoma |
| ADN : Acide désoxyribonucléique | EBV : Epstein-Barr Virus |
| Ag : Antigène | ECM : Extracellular matrix |
| AID : Activation-induced cytidine deaminase | Erk : Extracellular signal-Regulated Kinases |
| AML : Acute myeloid leukemia | ESCRT : Endosomal Sorting Complexes Required for Transport |
| ARNm : Acide ribonucléique messenger | EV : Extracellular Vesicle |
| BAFF : B cell Activating Factor belong to TNF Family | EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2 |
| BCL 2/6/10 : B-cell lymphoma protein 2/6/10 | Fab : Fragment antigen binding |
| BCR : B-Cell Receptor | FDA : Food and Drug Administration |
| BDNF : Brain-derived neurotrophic factor | FOB : Follicular B cell |
| BLIMP : B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1 | GC : Germinal Center |
| B-NHL : Non-Hodgkin B cell Lymphoma | GCB : Germinal Center B cell |
| CARD : Caspase Recruiting Domain | GEP : Gene Expression Profiling |
| CBP : CREB-binding Protein | GELA : Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte |
| CDC : Cytotoxicité Dépendante du Complément | Grb2 : growth factor receptor bound protein 2 |
| CDKN : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor | GTP : Guanosyl tri-phosphate |
| CHOP : Cyclophosphamide, Hydroxychlorure de Doxorubicin, Vincristine, Prednisone | HAT : Histone Acétyltransférase |
| CLL : Chronic Lymphocytic Leukemia | HDAC : Histone Désacétylase |
| CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité | HD-PTP : His Domain PhosphoTyrosine Phosphate |
| CML : Chronic myelocytic leukemia | HIF : Hypoxia Inducible Factor |
| COO : Cell of origin | HMT : Histones méthyltransférases |
| CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène | IFN : Interferon |
| | Ig : Immunoglobuline |
| | IL : Interleukin |
| | ILV : Intraluminal Vesicles |
| | IRF4 : Interferon-regulatory factor 4 |
| | LB : Lymphocyte B |
| | LDH : Lactate Déshydrogénase |
| | LE : Late Endosomes |



LT : Lymphocyte T
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MDR : Multi-Drug Resistance
MDSC : Myeloid-derived suppressor cells
miRNA : MicroRNA
MMP2 : Matrix Metalloproteinase-2
MO : Moelle Osseuse
MS4A1 : Membrane Spanning 4-domain, groupe A, member 1
MSC : Mesenchymal Stem Cell
mTOR : Mammalian target of rapamycin
MUM1 : Multiple Myeloma 1
MVB : Multivesicular Bodies
NF- κ B: Nuclear Factor kappa B
NGF : Nerve Growth Factor
NHEJ : Non-Homologous End-Joining
NK : Natural Killer
NOS : Not Otherwise Specified
NT : Neurotrophin
NTSR3 : Neurotensin Receptor 3
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OS: Overall survival
p53 : Protéine 53
p75^{NTR} : p75 neurotrophin receptor
PCD : Programmed Cell Death
PD-L1 : Programmed Death Ligand 1
PE : Phosphatidyléthanolamine
PFS : Progression Free Survival
PI : Phosphatidylinositol
PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase
PKC : Protein Kinase C
PLC : Phospholipase C
PMA : Phorbol Myristate Acetate

PMEL : Pigment cell-specific type I integral membrane protein
PS : Phosphatidylsérine
PTEN : Phosphatase and Tensin homolog
RAG : Recombination-Activating Gene
R-CHOP : Rituximab - CHOP
RE : Réticulum Endoplasmique
Rsk : Ribosomal protein s6 kinase
SH : Src Homology
Shc : Src homology 2 domain containing
SHM : Somatic HyperMutation
siRNA : small interfering RNA
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
SOS : Son Of Sevenless
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
TCR : T-Cell Receptor
TEM : Tetraspanins-enriched microdomains
TEX : Tumor-derived exosomes
TK : Tyrosine Kinase
TLR : Toll Like Receptor
TME : Tumor Microenvironment
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRAF : TNF Receptor-Associated Factor
TRAIL : Tumor necrosis factor Related Apoptosis-Inducing Ligand
UBD : Ubiquitin-Binding Domain
VPA : Valproic Acid
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WHO : World Health Organization



Liste des figures

- Figure 1** : Développement des lymphocytes B (après la naissance)
- Figure 2** : Formation des centres germinatifs (GC) et principe de sélection des cellules B.....
- Figure 3** : Programme transcriptionnel du développement des lymphocytes B dans le centre germinatif.....
- Figure 4** : Apparition des divers types lymphomes à différents stades de la maturation des lymphocytes B.....
- Figure 5** : Evaluation immunophénotypique pour établir le diagnostic de DLBCL.....
- Figure 6** : Courbes de survie en fonction du groupe moléculaire de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL).....
- Figure 7** : Origine cellulaire et lésions génétiques associées aux différents sous-types de DLBCL.....
- Figure 8** : Dérégulation des fonctions de BCL6 dans les DLBCL.....
- Figure 9** : Altérations génétiques et conséquences sur les voies de signalisation cellulaires dans le sous-type GCB.....
- Figure 10** : Altérations génétiques et conséquences sur les voies de signalisation cellulaires dans le sous-type ABC.....
- Figure 11** : Algorithme de Hans permettant de classifier les DLBCL selon les sous-types GCB et non GCB.....
- Figure 12** : Marquage immunohistochimique de coupes de tissus de DLBCL.....
- Figure 13** : Les différents sous-groupes génétiques de DLBCL.....
- Figure 14** : Structure de la protéine CD20 et des sites de liaisons de 3 anti-CD20 utilisés dans l'immunothérapie des patients atteints de DLBCL.....
- Figure 15** : Vue schématique des partenaires interagissant avec le CD20 sur la membrane cellulaire et des différents mécanismes de régulation du gène MS4A1 dans les cellules B malignes.....
- Figure 16** : (A) Les différents mécanismes d'action des anti-CD20 (B) CDC : Activation de la voie classique du complément.....
- Figure 17** : Mécanismes de la modification de l'expression du CD20 et des résistances au rituximab.....



Figure 18 : Représentation schématique des différents types de vésicules secrétées à partir du bourgeonnement de la membrane plasmique, ou d'origine intracellulaire issues de la fusion de compartiments endosomiques multivésiculaires (MVB) avec la membrane plasmique.....

Figure 19 : Maturation des compartiments endosomaux suite au processus d'endocytose cellulaire.....

Figure 20 : Morphologie des endosomes et des lysosomes au sein de cellules HeLa observée en microscopie électronique.....

Figure 21 : Formation et devenir des corps multivésiculaires (MVB).....

Figure 22 : Assemblage schématique et interactions moléculaires de la machinerie ESCRT..

Figure 23 : Partenaires lipidiques dans la biogenèse des exosomes et microvésicules.....

Figure 24 : Mécanismes intracellulaires de biogenèse et de sécrétion des exosomes.....

Figure 25 : Composition globale des vésicules extracellulaires (EVs).....

Figure 26 : Mécanismes d'interaction des exosomes avec la cellule cible.....

Figure 27 : Rôle des Exosomes dans les cancers.....

Figure 28 : Représentation schématique de la thérapie ciblant les exosomes dérivés de DLBCL.

Figure 29 : Schéma des différents domaines constituant les neurotrophines.....

Figure 30 : Structure du récepteur TrkB.....

Figure 31 : Représentation schématique des principales voies de signalisation du récepteur TrkB.....

Figure 32 : Protocole de purification des small EVs.....



Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des Lymphomes à grandes cellules B et autres lymphomes B agressifs dans la classification révisée par l'OMS en 2016.....

Tableau 2 : Les différents anti-CD20 : Mécanismes cytotoxiques et aspects cliniques.....

Tableau 3 : Caractéristiques biologiques et physico-chimiques des différents types de vésicules retrouvées dans le milieu extracellulaire.....



Préambule

La problématique de ma thèse portait sur les mécanismes de survie et de résistance thérapeutique des cellules tumorales de Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B (DLBCL) et plus particulièrement sur le rôle des petites vésicules extracellulaires « small EVs », dont les exosomes dans ces processus. Dans ce contexte, la pertinence de régulations autocrines/paracrines réalisées par des facteurs de croissance originaux pour ces cellules tumorales, les neurotrophines, avait été préalablement démontrée notamment pour un de ces membres, BDNF et son récepteur TrkB. Mes travaux de recherche étaient basés sur la poursuite des études initiées par Hafidha Bentayeb, qui terminait sa thèse lors de mon arrivée au laboratoire, dans l'équipe CAPTuR (EA3842). Par la suite, elle a bénéficié d'un contrat post-doctoral et m'a encadrée en collaboration avec le Pr Danielle Troutaud.

J'ai également participé au cours de ma première année de thèse en 2018 à la finalisation des expérimentations d'un article portant sur l'évaluation d'un nouvel outil thérapeutique pour les DLBCL, de la famille des flavaglines. Ce travail, initié par Hafidha Bentayeb au cours de sa thèse, a ainsi été complété via notre collaboration. Les résultats ont mis à jour dans ces lymphomes B, une nouvelle cible thérapeutique sur laquelle se fixent les flavaglines, les prohibitines. Ces recherches, menées en parallèle de mes travaux de thèse, m'ont permis d'être deuxième auteur dans cet article qui a été publié en 2019 dans "Journal of Experimental & Clinical Cancer Research", dont j'ai inséré la première page en annexe de ce mémoire de thèse. Au cours de mes deuxièmes et troisièmes années de doctorat, et toujours en collaboration avec Hafidha Bentayeb, j'ai poursuivi et approfondi les différents objectifs de ma thèse. Le premier était d'étudier et de caractériser la sécrétion des « small EVs » (aspect quantitatif et qualitatif) par 5 lignées cellulaires représentatives des sous-types GCB et ABC, cette approche comparative n'ayant pas été décrite jusqu'alors. Le 2^e objectif était d'analyser, de façon comparative entre les différentes lignées, le rôle de ces « small EVs » dans l'échappement thérapeutique (immuno-thérapie, anti-CD20) *in vitro* (lignées de DLBCL), et de confirmer ce rôle *in vivo* sur un modèle murin de xéno greffe. De plus, nous avons recherché l'influence de l'activation du TrkB sur l'expression du CD20 cellulaire et sur le processus de sécrétion des « small EVs » ; ce travail a été fait en lien avec leur taux de CD20, et avec l'échappement aux anti-CD20 (rituximab). Pour cela, nous avons utilisé un agoniste de TrkB, le 7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF) ou son ligand physiologique, BDNF. A partir de juillet 2018, mes travaux de thèse se sont enrichis suite à la signature d'un contrat par ma directrice de thèse avec



l'Institut Roche (co-financement région Nouvelle Aquitaine) pour la réalisation du projet de recherches « ExoReBLy » (Exosomes and Resistance to immunotherapy in aggressive Non-Hodgkin B-cell Lymphomas). En effet, ce projet ajoutait un objectif de valorisation des résultats de ma thèse vers des applications translationnelles au bénéfice des patients atteints de ces cancers. Il s'agissait notamment d'aborder la signification clinique des « small Evs » dont les exosomes chez les patients atteints de DLBCL pour rechercher d'éventuelles corrélations entre l'expression du CD20 sur ces vésicules circulantes (purifiés à partir du plasma) et celle retrouvée dans les biopsies tumorales, et/ou les paramètres clinico-biologiques des patients; cette dernière question ouvrait la voie sur la possibilité d'utiliser les « small Evs » dont les exosomes comme des « biopsies liquides » pouvant être prédictifs de la réponse thérapeutique. De plus, il s'agissait aussi de réaliser des études à partir d'anticorps développés par l'Institut Roche qui sont soumis, comme le travail sur les patients, à une clause de confidentialité qui sera élargie à l'ensemble du mémoire de cette thèse. Cette dernière partie de ma thèse a bénéficié de l'acquisition, grâce aux financements de ce contrat, d'un appareil (NanoSight NS300, Malvern) de comptage et de caractérisation morphologique des préparations de vésicules extracellulaires par la technologie NTA (Nanoparticle Tracking Analysis). Cet appareil nous a permis de vérifier et valider l'enrichissement de nos échantillons biologiques (surnageants de cultures cellulaires et vésicules plasmatiques). L'ensemble des travaux hors contrat « ExoReBLy » ainsi que des premiers résultats du contrat m'ont permis d'être premier auteur d'un article prochainement soumis au journal British Journal of Cancer.

La nécessité de prolonger mes travaux de thèse par une 4^e année a pu être réalisée car j'ai pu bénéficier d'un poste d'ATER à la Faculté des Sciences et Techniques de Limoges, ce qui m'a permis aussi de découvrir le métier d'enseignant-chercheur dans son fonctionnement normal, partagé entre la recherche et l'enseignement. Au cours de cette période, et par l'encadrement de stages de M1 notamment, j'ai réalisé d'autres expériences préliminaires sur des régulateurs transcriptionnels et épigénétiques du gène *MS4A1* codant pour le CD20. Nous y reviendrons dans la discussion/perspectives à la fin de ce manuscrit de thèse.

Ce mémoire de thèse va débiter par une présentation bibliographique du contexte scientifique central de nos travaux, puis nous présenterons les résultats et la discussion de l'article principal de notre travail sur les « small EVs » dont les exosomes. En préambule et pour introduire cet article, nous avons choisi de faire une présentation sommaire des neurotrophines en lien avec une partie des résultats de l'article. Les données concernant le contrat ExoReBLy seront exposées dans un pré-article en construction, et nous finirons par une discussion/conclusion et les perspectives que nous envisageons à partir de l'ensemble des résultats.



Introduction

I. De l'origine de la cellule B « protectrice » à la cellule B « agressive »

Pour combattre de façon spécifique et ciblée un « agresseur » moléculaire ou cellulaire, les organismes vertébrés ont développé une immunité acquise ou adaptatrice (ou immunité spécifique) qui est constituée de cellules spécialisées appelées lymphocytes, les lymphocytes T et B. Ces cellules ont la capacité de détecter de façon très précise et spécifique ces « agresseurs » au niveau moléculaire ou antigène (Ag) et d'amener à leur élimination, tout en les discriminant des molécules et cellules du soi qu'elles tolèrent. Cette immunité spécifique se met en place suite à la mise en jeu rapide de l'immunité innée (naturelle ou non spécifique) première barrière défensive, car elle nécessite un délai de quelques jours pour être opérationnelle. En effet, afin d'assurer une protection la plus efficace, chaque individu produit en permanence des millions de lymphocytes T et B, tous différents par leur récepteur spécifique à l'Ag (TCR et BCR respectivement), définissant le « répertoire de reconnaissance T et B ». En contrepartie, la proportion de lymphocytes spécifiques à un Ag donné est très faible dans le « pool » total de lymphocytes circulants. Ainsi, la première étape de l'activation des lymphocytes T ou B consiste en une prolifération ou expansion clonale qui, par la réalisation de mitoses successives pendant 4 à 5 jours, va permettre d'augmenter de façon très importante le nombre de ces cellules spécifiques. Finalement les lymphocytes se différencieront en effecteurs, capables d'agir efficacement dans la réponse immunitaire et en cellules mémoires. **Les lymphocytes B (LB)** qui ont concerné mon travail de thèse, sont donc des cellules importantes de l'immunité adaptative. Comme tous les lymphocytes, après activation et prolifération, ces cellules B se différencieront en lymphocytes B mémoires assurant une protection durable contre l'antigène de départ, et en cellules effectrices, les plasmocytes, productrices d'anticorps. Les anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig) sont donc les effecteurs terminaux de cette immunité spécifique B appelée aussi immunité humorale ; ils permettront soit de neutraliser spécifiquement l'Ag lorsqu'il s'agit d'un Ag moléculaire et de favoriser son élimination par des cellules phagocytaires, soit d'induire la mise à mort de la cellule porteuse de cet Ag par activation d'un système de protéases appelé complément, ou via le recrutement et l'activation de cellules cytotoxiques (cellules NK notamment). Cependant, au cours des différentes étapes de sa formation et de son activation, la cellule B va subir plusieurs modifications génétiques pouvant à tout moment, comme nous allons le voir ensuite, déterminer **l'apparition d'un lymphome B** comme celui qui a fait l'objet de notre problématique de thèse.

1.1 De la moelle osseuse aux organes lymphoïdes périphériques : développement et maturation des lymphocytes B

La différenciation des lymphocytes B a lieu dès le stade embryonnaire et se déroule tout au long de la vie. A la naissance, les LB sont produits dans la moelle osseuse (MO) à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes. Le développement des lymphocytes B appelé aussi ontogenèse B s'effectue en plusieurs étapes très complexes marquées par les réarrangements séquentiels des gènes d'immunoglobulines et l'expression du récepteur membranaire à l'Ag ou BCR (B Cell Receptor, Ig membranaire) (Hardy and Hayakawa, 2001). Ces étapes sont orchestrées par la production par les cellules stromales mésenchymateuses, présentes dans l'environnement des précurseurs B, de cytokines (dont l'IL-7), chimiokines (dont CXCL12) et l'induction de facteurs de transcription cruciaux pour le développement B (dont PAX5) (Melchers, 2015) (*figure 1*).

Chaque lymphocyte B mature naïf (non activé) exprime à sa surface de 20 000 à 150 000 BCR (Mattila et al., 2013) tous de même spécificité antigénique. Le BCR, comme les Ig circulantes, est constitué d'un tétramère avec 2 chaînes lourdes identiques transmembranaires (μ ou δ le plus souvent) stabilisées par des ponts disulfures et associées dans leur partie extracellulaire par d'autres liaisons disulfures à 2 chaînes légères identiques (κ ou λ). Chaque chaîne lourde et légère est composée d'une région constante qui ne varie pas entre les cellules B, et d'une région variable qui varie donc d'un lymphocyte B à l'autre. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères configurent le site de liaison à l'Ag; ainsi chaque Ig membranaire ou circulante présente 2 domaines de liaison à l'Ag appelés fragments Fab (Fragment Antigen binding) et la partie constante des chaînes lourdes définit le fragment constant (fragment Fc) apportant de nouvelles fonctions effectrices à l'anticorps.

Les gènes des Ig sont répartis en 3 loci : les loci $Ig\kappa$ et $Ig\lambda$ codant les chaînes légères des Ig localisés chez l'homme sur les chromosomes 2 et 22 respectivement, et le locus IgH codant pour la chaîne lourde de l'Ig, présent sur le chromosome 14. Chaque locus contient dans sa conformation germinale une succession de gènes formant des segments de variabilité ou « V », des segments de diversité ou « D » (sur le locus IgH), des segments de jonction « J » et des segments constants « C ». Les combinaisons V(D)J codent pour les régions variables des Ig alors que les segments C codent pour la partie constante. Le nombre important de segments géniques V et, à un degré moindre ceux des segments D et J, permet de créer par le jeu de

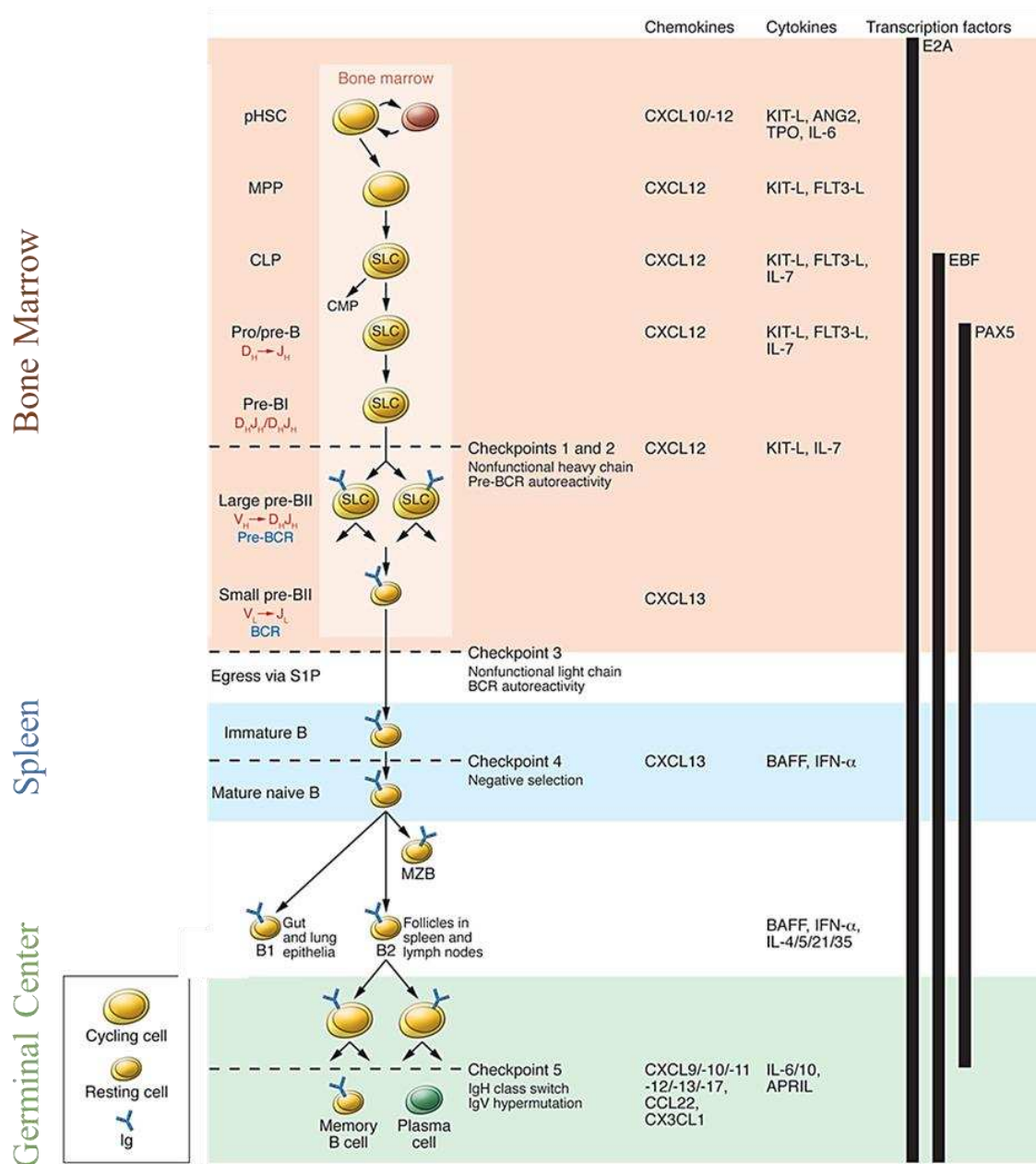


Figure 1 : Développement des lymphocytes B (après la naissance). L'ontogenèse B est divisée en deux phases principales : une phase précoce indépendante de l'antigène qui se déroule au niveau de la moelle osseuse et une phase tardive, dépendante d'une stimulation antigénique qui a lieu dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, comme la rate. Au cours de leur maturation, les LB subissent plusieurs réarrangements géniques pour configurer leur récepteur à l'Ag (BCR), associés à des processus de contrôle et de sélection (checkpoints) notamment pour éliminer des cellules B autoréactives avant de devenir des lymphocytes B matures ou effecteurs (plasmocytes, cellules B mémoires). Ces différentes étapes de maturation sont orchestrées et contrôlées par des chimiokines et des cytokines présentes dans leur environnement, déterminant l'activité de facteurs de transcription nécessaires au développement B (D'après (Melchers., 2015).

combinaisons au hasard entre les différents segments un très grand nombre de spécificités antigéniques.

Au cours de leur maturation, les LB subissent plusieurs étapes de sélection avant de devenir des lymphocytes B matures (LeBien and Tedder, 2008; Rolink et al., 2004). En effet, les LB vont être éduqués et contrôlés (checkpoints) à différents stades de leur développement afin qu'ils élaborent, par l'expression de leur BCR, un répertoire lymphocytaire B aussi diversifié que possible tout en étant tolérant aux molécules du « Soi ». Les stades de différenciation peuvent être divisés en deux phases : la phase indépendante des antigènes qui a lieu dans la moelle osseuse et la phase dépendante des antigènes qui a lieu à la périphérie dans les organes lymphoïdes secondaires (*figure 1*).

1.1.1. Développement dans la moelle osseuse et formation du « répertoire B »

La phase indépendante de l'antigène a lieu dans la moelle osseuse et implique une succession de réarrangements des gènes d'immunoglobulines. En effet, l'extraordinaire diversité du répertoire B, capable de reconnaître spécifiquement des millions d'Ag différents est d'abord créé pendant la formation des cellules B, suite aux événements de recombinaisons somatiques V(D)J codant une région variable complète et unique. Les recombinaisons V(D)J peuvent être divisées en 2 étapes : le clivage puis la réparation de l'ADN. Le clivage est initié notamment par les enzymes RAG1 et RAG2 (recombination-activating gene) exprimées spécifiquement dans les lymphocytes, et la réparation fait intervenir le processus de réparation des cassures par jointure d'extrémités non homologues NHEJ (non-homologous end-joining) (Wang et al., 2020). Tout d'abord un réarrangement D-J s'effectue dans le locus IgH d'une cellule dite pro-B, suivi du réarrangement d'un gène V au D-J préalablement réarrangé. Ces recombinaisons permettant le passage de la cellule pro-B à une cellule pré-B qui commence à exprimer à sa surface un premier BCR appelé pré-BCR. Cette cellule pré-B subit ensuite un réarrangement V-J dans le locus Igk, et si nécessaire dans le locus Igl. Dès lors, la cellule B exporte à sa membrane une Ig complète avec les 2 chaînes lourdes et légères du BCR (IgM(κ)), ce qui lui confère un signal de survie (sélection positive) lui permettant de devenir un lymphocyte B immature. Tous les lymphocytes B immatures qui aboutissent à un réarrangement non fonctionnel ou à un BCR auto-immun seront éliminés par apoptose (sélection négative), après éventuellement une « ré édition » de leur chaîne légère (Receptor editing). Plus de 85 % des cellules B immatures nouvellement formées meurent dans la moelle osseuse probablement en lien avec une autoimmunité, les 10 à 15% des lymphocytes B qui

survivent chaque jour assurant la tolérance B centrale (Melchers, 2015; Nemazee and Bürki, 1989). Les LB immatures séjournent dans la MO 1 à 3 jours et vont finalement passer dans le sang pour migrer et compléter leur maturation dans la rate (*figure 1*).

1.1.2. Phase Ag dépendante : Activation et maturation des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires

Les lymphocytes B immatures qui émigrent de la MO ont une durée de vie courte et vont poursuivre leur développement la plupart du temps dans la rate en passant par des stades « transitionnels » de type 1 (T1 B cells) puis de type 2 (T2 B cells) notamment en présence d'une cytokine, BAFF (B cell Activating Factor belong to TNF Family). Ces cellules de transition à durée de vie courte vont finalement exprimer des taux importants d'IgD membranaire, en plus de l'IgM et de même spécificité antigénique, et deviennent des lymphocytes B matures à plus longue durée de vie. La plupart des cellules B matures vont acquérir la capacité de circuler et de coloniser des zones B (follicules lymphoïdes) de la rate et d'autres centres lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphoïdes, ces cellules sont appelées LB matures folliculaires (FOB). Ces FOB sont les LB responsables de la réponse adaptative humorale. Les autres vont migrer dans la zone marginale de la rate, à la jonction entre la pulpe blanche et la pulpe rouge, et y résideront sous l'appellation de cellules B de la zone marginale (MZB) (*figure 1*). Les MZB assurent une première surveillance humorale entre l'immunité innée et adaptative, car capables de répondre rapidement à des Ag circulants et d'induire la différenciation vers des plasmocytes à courte durée de vie, qui produiront des quantités importantes d'IgM (Wang et al., 2020).

Les LB matures naïfs vont rencontrer l'Ag dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, tissu lymphoïde associé aux muqueuses) et plus particulièrement dans la zone T extra-folliculaire où sont présentes de nombreuses cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules folliculaires dendritiques (FDC) et les macrophages. Dans cette zone les LB activés vont recevoir dans la plupart des cas d'Ag (Ag thymo-dépendants) des signaux de co-stimulation (cytokines ex : IL-4, récepteurs membranaires ex : CD40L) produits par des lymphocytes T auxiliaires folliculaires (T_{FH}), nécessaires à leur survie et à la poursuite de leur maturation. Ainsi, suite à cette activation par l'Ag dans un contexte T dépendant, les LB activés migrent dans le centre de la zone B des organes (follicule primaire) et commencent à proliférer activement (*figure 1*). Ils déterminent alors la formation d'une structure appelée centre germinatif (GC) au sein du follicule qui s'est développé en follicule secondaire, suite à

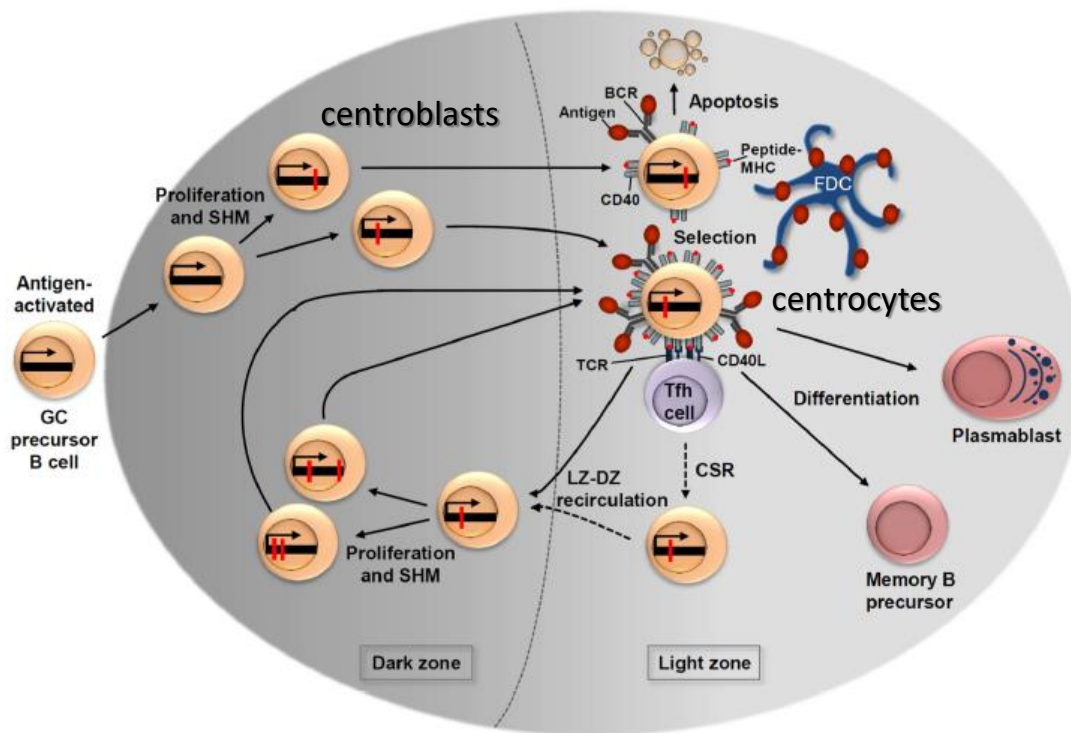


Figure 2 : Formation des centres germinatifs (GC) et principe de sélection des cellules B. Les cellules B activées par l'antigène vont proliférer de manière active dans les follicules lymphoïdes déterminant la formation du centre germinatif (GC). Dans la zone sombre, les cellules B proliférantes ou centroblastes vont alors subir le processus d'hypermutation somatique (SHM), qui introduit de façon aléatoire des mutations ponctuelles au niveau de la région variable des immunoglobulines de leur BCR. Puis les centroblastes vont migrer vers la zone claire du GC où ils deviendront des centrocytes qui expriment désormais un BCR dont l'affinité pour l'Ag a été modifiée. Cette affinité est alors testée lors d'un processus de sélection impliquant la présentation d'Ag par des cellules dendritiques folliculaires (FDC) en présence de lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh). Les centrocytes sélectionnés survivront et vont à leur tour subir une modification au niveau de leur Ig, appelée commutation de classe (CSR, Class Switch Recombination). Ils se différencient finalement en cellules B mémoires et en plasmablastes, précurseurs des plasmocytes terminaux (D'après (De Silva and Klein., 2015).

ces proliférations intenses. Deux zones sont alors visibles dans les GC, la zone sombre (DZ, dark zone) et la zone claire (LZ, light zone) (**figure 2**). Le GC s'agrandit avec la progression de la réponse immunitaire et finira par disparaître lors de la disparition de l'Ag ; les GC sont présents pendant 3 à 4 semaines après l'exposition initiale à l'Ag (Basso and Dalla-Favera, 2015; De Silva and Klein, 2015).

Les lymphocytes B activés sont d'abord retrouvés dans la zone sombre où ils continuent de proliférer devenant des centroblastes. A ce stade, ils vont terminer leur maturation en subissant des modifications de la région variable des gènes d'Ig appelés hypermutations somatiques (SHM, Somatic HyperMutation) afin d'augmenter l'affinité de leur récepteur à l'Ag. On parle de « maturation d'affinité ». Ces mutations au hasard sur les domaines variables des chaînes lourdes et légères des Igs sont réalisées dans un contexte T-dépendant par une enzyme nommée AID (Activation-induced cytidine deaminase) exprimée uniquement par les centroblastes (Muramatsu et al., 2000, 1999). L'hypermutation somatique crée des coupures simples brins de l'ADN et fait intervenir soit le système de réparation de l'ADN par excision de base (UNG, Uracil-DNA-glycosylase) soit la voie de réparation des mésappariements (MSH2/6) combinée à une ADN polymérase. En plus de l'importance du gène *PAX5* pour la formation et la survie des LB, l'initiation de la formation des GC (formation de la DZ) est orchestrée par un pic transitoire d'expression de NF- κ B, IRF4 (Interferon-regulatory factor 4) et MYC suivie de leur inhibition. En particulier, l'expression de *MYC* est directement inhibée par celle de *BCL6* qui est un régulateur clef du développement des cellules B dans la DZ du CG (Ye et al., 1997) (**figure 3**). En effet, la protéine BCL6 est un répresseur transcriptionnel qui, au stade centroblaste, réprime les gènes impliqués dans régulation négative du cycle cellulaire, inhibe les gènes impliqués dans l'activation de la cellule B (CD69, STAT1, CD80), inhibe la réponse au stress génotoxique (p53, ATR), et inhibe la différenciation en plasmocyte (en réprimant *PRDM1/Blimp-1*) et en cellule B mémoire (Klein and Dalla-Favera, 2008). Il favorise ainsi la prolifération des cellules B en leur permettant aussi de supporter les cassures de l'ADN et les mutations.

Après ces remaniements de la région variable des Igs, les centroblastes expriment une nouvelle Ig et deviennent des centrocytes qui migrent dans la zone claire des GC (**figure 2**). Ils vont être testés sur l'affinité de leur nouveau BCR à se lier à l'Ag, et subiront soit une sélection négative (apoptose) en cas d'échec ou d'auto-immunité, soit une sélection positive si le processus de maturation d'affinité a été réussi. Ce tri des centrocytes est effectué par les cellules

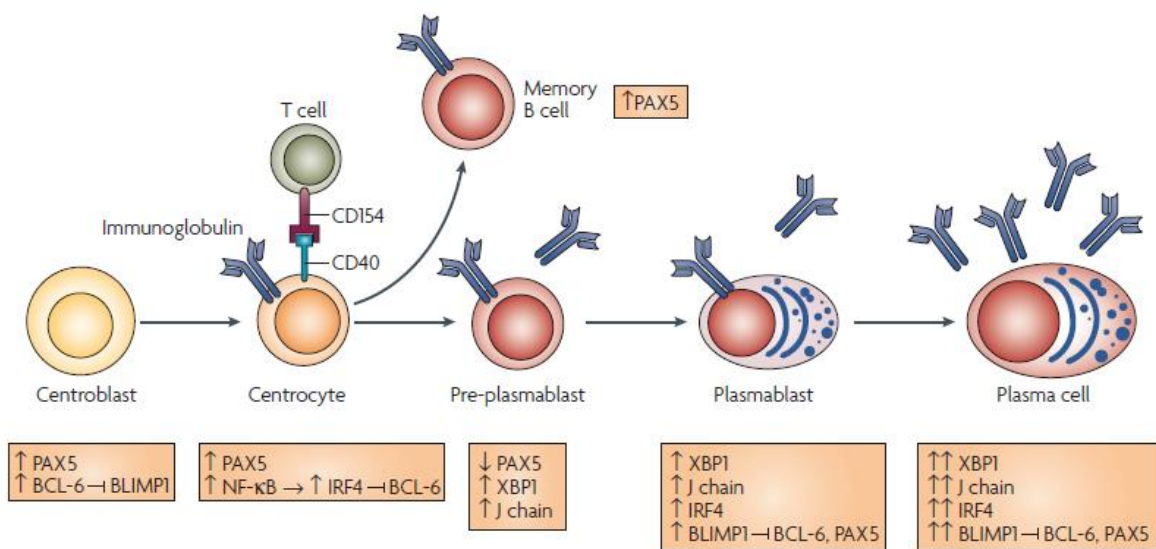


Figure 3: Programme transcriptionnel du développement des lymphocytes B dans le centre germinatif. La régulation d'expression de certains facteurs de transcription permet aux lymphocytes B (LB) activés qui migrent dans les centres germinatifs (GC) de subir plusieurs étapes de maturation dans la zone sombre (stade centroblaste) puis dans la zone claire (stade centrocyte). Puis les LB vont finir leur maturation soit en réalisant leur différenciation plasmocytaire (stade pré-plasmablaste, plasmablaste puis plasmocyte) soit en se différenciant en cellules B mémoires, et quitter le GC pour passer dans la circulation (Klein and Dalla-Favera., 2008).

folliculaires dendritiques qui exposent pendant plusieurs mois l'antigène sous forme de complexe immuns aux centrocytes. En plus de la forte stimulation de leur BCR si l'affinité a été très augmentée conduisant à l'expression notamment d'acteurs de survie (comme BCL-XL), les centrocytes reçoivent également des signaux de stimulation par les LT_{FH} (CD40L, ICOS, IL-21) se trouvant dans cette zone. L'ensemble de ces signaux vont permettre à la cellule B de survivre et terminer sa maturation (Gatto and Brink, 2010; Stebegg et al., 2018). Les centrocytes vont à leur tour subir une modification au niveau de leur Ig, appelée commutation de classe (CSR, Class Switch Recombination). Ce processus de recombinaison somatique irréversible va changer l'isotype et remplacer la production d'IgM initiale par celle d'IgG, IgA ou IgE. Cette modification, qui ne change pas la région variable de l'Ig qui restera donc de même spécificité antigénique, va conférer de nouvelles fonctions aux Ac produits. Ce processus est régulé notamment par des cytokines produites par les cellules T_{FH} (IL4, IFN γ , TGF β , IL21) et l'expression par ces cellules de signaux de co-stimulations (CD40L, BAFF). La CSR, comme l'SHM, entraîne des cassures de l'ADN et met en jeu l'AID, l'UNG et une autre enzyme, l'endonucléase apurinique/apyrimidique 1 (APE1), et des mécanismes de réparation des coupures double brins (Basso and Dalla-Favera, 2015; De Silva and Klein, 2015).

Les centrocytes ayant subi la commutation de classe avec succès vont pouvoir poursuivre leur maturation et éventuellement leur différenciation en plasmocyte (**figures 2 et 3**). Les signalisations induites notamment par le BCR, CD40, BAFFR activent des voies de survie comme NF- κ B, PI3K and MEK, ce qui détermine la ré expression de IRF4 qui va se lier au promoteur de *BCL6* et inhiber son expression. La baisse de BCL6 libère la répression exercée sur un autre régulateur majeur de la différenciation plasmocytaire, *BLIMP1* (B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1) (Klein and Dalla-Favera, 2008). BLIMP1 est un répresseur transcriptionnel qui désactive les gènes requis pour la prolifération des cellules B, la commutation de classe et la maturation d'affinité. De plus, l'activation transcriptionnelle de *XBPI* est nécessaire pour la synthèse des anticorps par les cellules en voie de différenciation plasmocytaire (**figure 3**) (Klein et al., 2006). Les centrocytes ont la possibilité de retourner dans la zone sombre afin d'y subir un nouveau cycle de prolifération et d'SHM suivie d'une nouvelle sélection (**figure 2**). Les autres terminent directement leur différenciation soit sous forme de plasmocytes en passant par un stade de « pré-plasmablaste » puis de plasmablastes, soit sous forme de cellules B mémoires capables d'initier une réponse immunitaire rapide lors d'une deuxième rencontre avec l'Ag (Gatto and Brink, 2010; Shaffer et al., 2002). La signalisation prolongée via CD40 est nécessaire à la transformation du centrocyte en cellule B mémoire à

longue durée de vie, et celle de PAX5 maintient l'identité des cellules B dans le pool des cellules B mémoires (**figure 3**). Les LB mémoires et les plasmocytes sécréteurs d'Ac de haute affinité pour l'Ag, quittent finalement les GC et passent dans la circulation pour réaliser leur rôle notamment dans les tissus lymphoïdes périphériques (Calame et al., 2003; Klein et al., 2003; Klein and Dalla-Favera, 2008; Pasqualucci and Dalla-Favera, 2015).

1.2 Remaniements génétiques, développement B et lymphomes

L'apparition d'un lymphome B peut survenir à différentes étapes du développement de la cellule B et la plupart dérivent de la transformation maligne d'une cellule B qui réalise ou a réalisé sa maturation dans un GC. Ainsi la classification des lymphomes B est basée sur le stade de maturation de la cellule normale d'origine, comme le montre la **figure 4**. Nous avons vu précédemment que le développement des cellules B impliquait plusieurs modifications génétiques, or ces modifications peuvent être source d'anomalies génétiques conduisant à l'apparition d'un lymphome. En effet, l'intervention de l'AID générant des cassures de l'ADN expose le génome des cellules B à un risque oncogénique constant, car les processus de réparation des dommages à l'ADN sont inhibés notamment par *BCL6*.

Les modifications transformantes peuvent être dues comme dans la plupart des cancers à des altérations génétiques incluant des amplifications, délétions, mutations associées à des pertes ou gains de fonction des gènes concernés. De plus dans le cas des lymphomes B, en lien avec les mécanismes de recombinaisons V(D)J, d'SHM et de CSR, on observe d'autres altérations comme les translocations chromosomiques et des processus d'SHM aberrantes ou ASHM (Aberrant Somatic HyperMutation). En effet, l'enzyme AID peut également muter des gènes qui ne codent pas pour les Ig, comme par exemple les gènes codant pour *BCL6*, *Pax5*, *c-Myc*, *Fas* et *Pim-1* (Pasqualucci et al., 1998). Ces mutations aberrantes sont fréquemment retrouvées dans les Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B (DLBCL) qui a été notre modèle de lymphome B dans ce travail de thèse, et qui fera l'objet d'un paragraphe dédié plus détaillé (Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018).

Concernant les translocations, elles impliquent fréquemment une recombinaison entre un locus d'Ig et celui d'un oncogène et on retrouve 3 catégories (**figure 4**) : (i) les translocations se produisant très tôt dans le développement B, et dérivant d'anomalies lors du processus de recombinaisons V(D)J. Ainsi la t(14 ;18), impliquant le locus *IGH* et *BCL2* conduisant à une

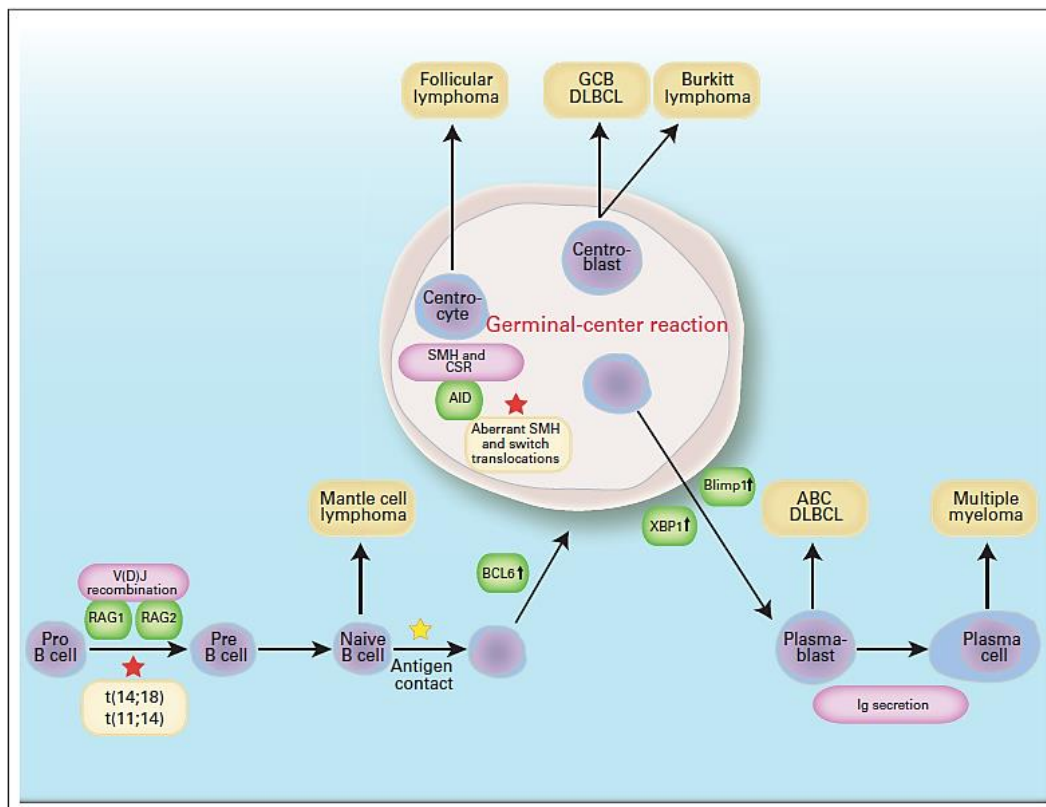


Figure 4 : Apparition des divers types lymphomes à différents stades de la maturation des lymphocytes B. Les translocations chromosomiques t(14 ;18) et t(11 ;14) représentent les premières étapes critiques et très précoces de la lymphomagenèse pour différents sous-types de lymphomes (y compris les lymphomes du manteau). Après contact avec l'antigène, les cellules B stimulées migrent dans le ganglion lymphatique et forment le centre germinatif (GC) après une régulation positive de BCL6. Dans le GC, se produisent l'hypermutation somatique (SHM) et la commutation de classe des Igs (CSR) qui sont des événements déterminants pour la maturation B mais à hauts risques pour le développement d'un lymphome (Lymphome folliculaire, sous-type GCB des DLBCL, Lymphome de Burkitt). Les cellules B vont terminer leur différenciation en plasmocytes grâce à des régulateurs clés pour la différenciation plasmocytaire, XBP1 et BLIMP-1. Cette phase terminale peut aussi aboutir à des événements transformants (sous-type ABC des DLBCL, Myélome multiple) (Nogai et al., 2011).

sur expression de la protéine anti-apoptotique BCL2, confère un avantage de survie aux cellules B, comme dans le lymphome folliculaire et dans une fraction de lymphomes DLBCL. De la même façon, la t(11;14) est détectée dans les lymphomes du manteau et juxtapose le gène *CCND1* au locus *IgH*, conduisant à la surexpression de la cycline D1 (Nogai et al., 2011) (ii) des translocations dues à des erreurs de l'AID dans la CSR, caractérisées par des points de cassures dans les régions switch des *IgH* impliquant par exemple *C-MYC* [t(8;14)] conduisant à une hyper expression de l'oncoprotéine c-myc, comme dans le lymphome de Burkitt sporadique (iii) des translocations suite à des points de cassures générées lors du mécanisme AID dépendant d'SHM, comme celle impliquant le locus *IGH* et *C-MYC* dans les lymphomes de Burkitt endémiques.

Enfin, il est possible que d'autres gènes soient touchés en dehors de ceux des *Ig*. Ainsi, des translocations ciblent *BCL6*, comme dans le cas des DLBCL, associées à une surexpression de *BCL6* ayant pour conséquence le maintien anormal du programme de prolifération, et de tolérance aux dommages à l'ADN des centroblastes (Basso and Dalla-Favera, 2015).

D'autres évènements géniques peuvent aussi être impliqués dans la lymphomagénèse comme par exemple des mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs comme *TP53* ou le gène codant $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, des amplifications génomiques (*REL*) ou encore l'implication de virus comme notamment le virus d'Epstein-Barr (EBV, membre de la famille des herpes virus). Ce virus est retrouvé dans la majorité des lymphomes de Burkitt endémiques, les lymphomes post-transplantations, les lymphomes associés au SIDA et dans des lymphomes diffus des séreuses ainsi que dans 40% des cas de maladies de Hodgkin classiques (Küppers et al., 2005).

Finalement, l'expression des gènes peut également être contrôlée par des modifications de la chromatine comme par exemple la méthylation ou l'acétylation des histones qui modulent l'accessibilité de facteurs de transcription ou l'activité transcriptionnelle de gènes proches. Cette dernière décennie, de nombreuses études ont révélé l'importance des mutations d'enzymes impliquées dans les modifications de la chromatine et par conséquent d'altérations épigénétiques dans la pathogénicité de certains lymphomes B. Ainsi, des mutations avec perte de fonction ou fonction altérée d'histone acétyltransférase (HAT) ou la surexpression de gènes codant des histone désacétylases (HDAC) sont retrouvées dans beaucoup de lymphomes B non-hodkiniens (B-NHL) (DLBCL, lymphomes folliculaires) en association avec une baisse de l'accessibilité de l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle. De plus, des modifications épigénétiques liées à de profonds changements du statut de méthylation des histones sont

fréquemment retrouvées dans les B-NHL, en lien avec des mutations au niveau des gènes codant des histones méthyltransférases (HMT). Ces mutations ont été associées à un état répresseur de la chromatine et au caractère agressif des lymphomes (DLBCL, lymphomes folliculaires) (Ribeiro et al., 2019; Shaknovich and Melnick, 2011; Velichutina et al., 2010).

Ces exemples montrent qu'il existe un très grand nombre d'altérations et de lésions génétiques qui vont se traduire par autant de mécanismes oncogéniques expliquant la très grande diversité des lymphomes B. Ainsi, malgré l'existence d'éléments communs, chaque lymphome B est caractérisé par des altérations génétiques spécifiques qui sont souvent des déterminants majeurs de leur phénotype et de leur plus ou moins grande agressivité.

Dans la partie suivante nous allons nous intéresser de manière plus spécifique au lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) qui a fait l'objet de notre étude au cours de cette thèse.

II. Le lymphome diffus à grandes cellules B

2.1 Présentation générale

Les lymphomes B, comme nous venons de l'évoquer, sont des pathologies qui résultent de proliférations malignes clonales de cellules B à différents stades de leur développement. D'un point de vue clinique, ces pathologies s'expriment par le développement de tumeurs au sein la plupart du temps du tissu lymphoïde, et notamment dans les ganglions lymphatiques. On distingue des formes indolentes (à évolution lente) et des formes agressives (d'évolution rapide). Le lymphome a été décrit pour la première fois par Thomas Hodgkin en 1832 ce qui donna le nom de maladie de Hodgkin, puis lymphome de Hodgkin. Puis, l'identification de la cellule de Reed-Sternberg à l'origine du lymphome de Hodgkin, comme une entité cellulaire à part des autres types de lymphome des cellules B, a conduit à les différencier sous le nom de lymphomes B non Hodgkinien (B-NHL).

Parmi les B-LNH, le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) est la forme la plus fréquente et une des plus agressives des lymphomes de l'adulte avec 30 à 40% des nouveaux cas de B-NHL chaque année. En France, en 2018, les DLBCL se situaient au 2^e rang des hémopathies malignes avec 5071 nouveaux cas sur les 45 000 cas d'hémopathies malignes, qui à elles seules représentent 12% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers. La fréquence et l'agressivité de ce lymphome augmente avec l'âge. Si les jeunes adultes et plus rarement les enfants peuvent être atteints par cette maladie, l'âge moyen des patients au moment du

diagnostic se situe entre 60 et 70 ans et les hommes semblent être un peu plus touchés que les femmes (Campo et al., 2011; Martelli et al., 2013). En France, l'âge moyen au diagnostic est de 70 ans. Le taux d'incidence standardisé en 2018 est de 4.7 cas chez les hommes et 3.2 cas chez les femmes pour 100 000 personnes/an, avec un sexe ratio H/F de 1.5. Ce taux évolue fortement en fonction de l'âge, notamment chez les hommes, avec 3,5/100 000-année à 40 ans contre 41,2 chez des hommes de 80 ans¹.

Le DLBCL peut être détecté sur la biopsie ganglionnaire d'une personne n'ayant pas d'antécédent de lymphome, on parle dans ce cas de DLBCL *de novo*, ou survenir au cours de l'évolution d'un autre lymphome et dans ce cas on parle de DLBCL secondaire (Martelli et al., 2013).

2.2 Origine et classification des DLBCL

Le lymphome diffus à grandes cellules B se définit comme son nom l'indique par une prolifération de grandes cellules lymphoïdes néoplasiques de la lignée B qui s'organisent de façon diffuse, effaçant partiellement ou totalement l'architecture ganglionnaire ou extra-ganglionnaire normale. La taille de leur noyau est supérieure à celui d'un macrophage ou plus de deux fois celui d'un lymphocyte normal (Li et al., 2018).

Sur le plan clinique, c'est en 1993² que l'Index Pronostique International (IPI) a été développé pour répartir les patients en différents sous-groupes de risque. C'est l'un des scores pronostiques cliniques les plus puissants et il répertorie les patients en quatre groupes à risque : faible (score de 0 ou 1), faible-intermédiaire (score 2), intermédiaire élevé (score 3) et risque élevé (score de 4 à 5) avec une survie globale (OS) à 3 ans de 91, 81, 65 et 59% respectivement (Liu and Barta, 2019). Ces différents groupes sont basés sur cinq critères : l'âge (seuil >60 ans), le stade clinique selon la classification d'Ann Arbor, l'étude de la performance (Performance Status, PS), le nombre de sites extra-ganglionnaires et le taux de LDH circulant (lactate déshydrogénase) (Li et al., 2018; Liu and Barta, 2019).

Sur le plan **phénotypique**, les cellules de DLBCL expriment des marqueurs classiques des lymphocytes B comme le CD19, le CD20, le CD22, le CD79a mais aussi le CD10 (30 à 60%), BCL-6 (B cell lymphoma 6 protein) (60 à 90%) et MUM1 (Multiple Myeloma 1, 35 à 65%).

¹ Defossez G et al., Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Synthèse. Saint-Maurice : Santé publique France, 2019. 20p.

² The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993; 329:987-994.

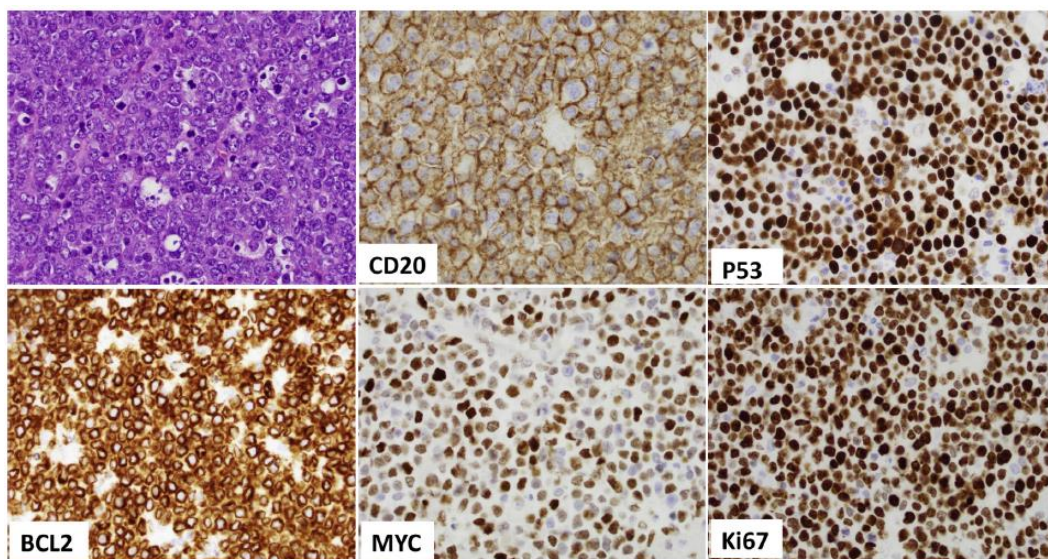


Figure 5: *Evaluation immunophénotypique pour établir le diagnostic de DLBCL. Réalisation de marquages par immunohistochimie montrant que les cellules de DLBCL expriment le CD20, P53, BCL2 et MYC. En haut à gauche, coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. L'hématoxyline colore les noyaux en bleu/violet, en se fixant sur les acides nucléiques. L'éosine colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires en rose/rouge. Le marquage nucléaire du Ki-67 démontre une importante prolifération cellulaire (Li et al., 2018).*

Cependant, elles peuvent aussi perdre l'expression d'un ou de plusieurs d'entre eux. Elles expriment également des facteurs de transcription de cellules B tels que PAX5, BOB.1 et OCT2 (Brudno et al., 2016; Korkolopoulou et al., 2016). De plus, ces cellules expriment dans la plupart des cas (50 à 75%) une immunoglobuline de surface, le plus souvent des IgM suivies des IgG et IgA (Harris et al., 1994; Loddenkemper et al., 2004). L'index de prolifération par le marquage du Ki-67 est souvent très fort et peut atteindre plus de 90% de cellules Ki-67 positives dans certains cas. Comme nous le verrons ensuite, il est fréquent de trouver en plus une forte expression, selon les sous-types de DLBCL, d'oncoprotéines comme BCL2 et/ou c-MYC dont la co-expression bien que rare, avec (Triple hit) ou pas (Double hit) celle de BCL6 est associée à un très mauvais pronostic des patients (*figure 5*) (Li et al., 2018). Cette analyse phénotypique, en plus d'être déterminante dans l'appui du diagnostic, joue également un rôle important dans la détection de potentielles cibles pour les thérapies. Par exemple, comme nous y reviendrons par la suite, l'expression du CD20 sur les cellules est une indication de l'utilisation du rituximab (anti-CD20) en plus de la chimiothérapie.

Les DLBCL constituent en réalité un groupe très hétérogène d'entités sur le plan biologique, morphologique et clinique. Dans les années 90, comme les réponses thérapeutiques étaient différentes entre les patients, cela a conduit à des recherches intensives pour caractériser sur le plan biologique et pronostique les différents sous types. Les approches génomiques (GEP, Genomic Expression Profil) menées et publiées notamment en 2000 par le groupe de Louis M. Staudt aux USA, ont permis d'établir pour la première fois une classification selon la cellule d'origine (COO, Cell Of Origin). Cette étude a été réalisée à partir de biopsies tumorales de 42 patients traités avec une chimiothérapie à base d'antracyclines, et a permis d'établir 3 groupes distincts avec des profils (signatures) génomiques et des pronostics différents :

- Le sous-type GCB (Germinal-Center B cell like)
- Le sous-type ABC (Activated B Cell like)
- un sous-type inclassable dans aucun des 2 précédents (10-15% des patients)

Les sous-groupes GCB et ABC diffèrent par leurs altérations chromosomiques, l'activation de voies de signalisations et leurs résultats cliniques que nous détaillerons par la suite. De façon générale, le sous-type GCB présente une signature transcriptionnelle comparable à celle des lymphocytes B des centres germinatifs avec l'expression de CD10 et du répresseur transcriptionnel BCL6, ainsi que des gènes d'Ig fortement mutés révélant un processus d'SHM en cours. Le sous-type ABC exprime une signature transcriptionnelle comparable à celle des lymphocytes B activés via leur BCR (signalisation notamment NF- κ B, BCL2), et la régulation

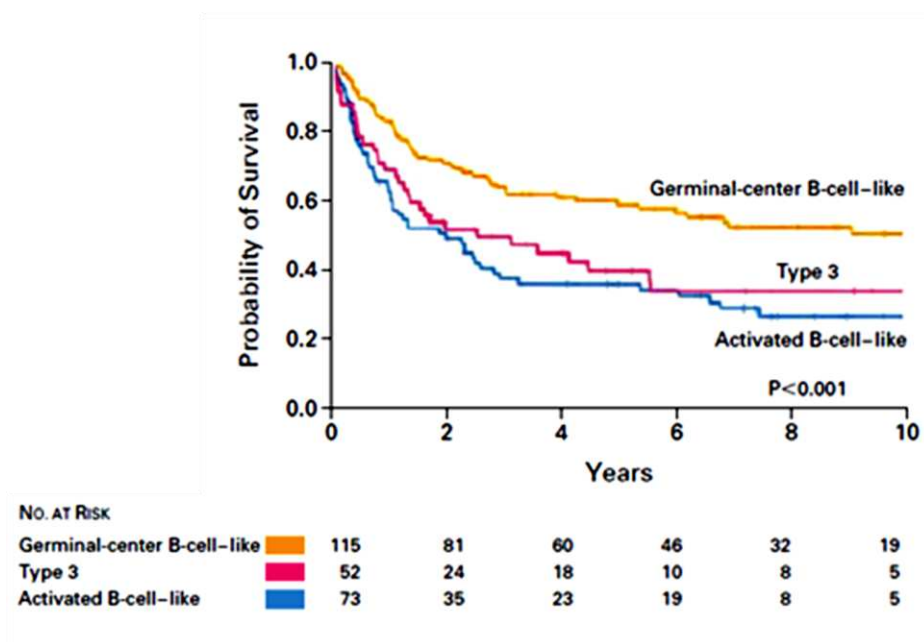


Figure 6 : Courbes de survie en fonction du groupe moléculaire de lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL). Les patients atteints d'un DLBCL de type GCB ont une survie globale plus élevée que ceux atteints d'un type ABC ou de type 3 (Rosenwald et al., 2002).

positive de gènes impliqués dans la différenciation plasmocytaire (MUM1/IRF4). Cependant, ces cellules vont être bloquées à un stade plasmoblastique et ne termineront pas leur maturation en plasmocytes. Alizadeh et collaborateurs ont également montré que les patients avec un sous-type GCB traités par thérapie CHOP (Cyclophosphamide, hydroxychlorure de doxorubicine, Oncovin, Prednisone) avaient une meilleure survie (60% à 5 ans) que ceux atteints du sous-type ABC (35% à 5 ans) (Alizadeh et al., 2000). Par la suite, les résultats de cette étude ont été confirmés sur un plus grand nombre de patients (Rosenwald et al., 2002) (**figure 6**). Finalement, l'ajout du rituximab (anti-CD20) à la chimiothérapie CHOP (R-CHOP), bien qu'ayant permis d'augmenter la survie des patients du type ABC, n'a pas changé son plus mauvais pronostic par rapport au type GCB (Lenz et al., 2008; Lenz and Staudt, 2010).

D'autres études utilisant des micropuces à ADN ont été initiées dans les années 2000 permettant d'identifier de nouvelles signatures génomiques liées à la biologie des DLBCL avec parfois des valeurs pronostiques comme le microenvironnement tumoral (signature stromale 1 inflammatoire de meilleur pronostic que la signature stromale 2 avec des marqueurs d'angiogénèse) ou la signalisation du BCR, ou encore la réponse inflammatoire de l'hôte. *Ces signatures moléculaires sont retrouvées au sein des 2 groupes GCB et ABC qui ont constitué finalement la base de classification dans notre travail de thèse* (Beham-Schmid, 2017; Lenz et al., 2008; Monti et al., 2005; Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018).

La classification mondiale des lymphomes de la WHO (World Health Organization) a reconnu en 2008 l'importance de la prise en compte des sous-types selon la COO ; cette classification a été revue en 2016 (Swerdlow et al., 2016) et elle inclue officiellement la distinction entre les sous-types GCB et ABC-DLBCL dans le diagnostic des patients. De plus, elle apporte l'existence de nouveaux sous-types très agressifs sur lesquels nous reviendrons plus tard.

Cliniquement la plupart des patients présentent une masse tumorale à croissance rapide au sein d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques ou au sein de sites anatomiques extra-ganglionnaires. En effet, environ 40 % des patients présentent une maladie extra-ganglionnaire. Beaucoup d'organes ou tissus peuvent être le site primaire du développement d'un DLBCL, mais les sites les plus fréquents sont le tractus gastro-intestinal, les amygdales, la peau, le cerveau, le médiastin, les testicules, les glandes salivaires, la thyroïde et le tissu osseux (Beham-Schmid, 2017). La révision en 2016 de la WHO a identifié plusieurs entités distinctes présentant des caractéristiques uniques sur le plan clinique et pathologiques, parmi lesquelles : les DLBCL

Tableau 1 : Liste des Lymphomes à grandes cellules B et autres lymphomes B agressifs dans la classification révisée par l'OMS en 2016 (Chen et al, 2018).

DLBCL, NOS

- Morphological variants
 - Centroblastic
 - Immunoblastic
 - Anaplastic
 - Other rare morphological variants
- Specific immunophenotype
 - Double-expresser DLBCL, NOS
 - CD30-positive DLBCL, NOS
 - CD5-positive DLBCL, NOS
 - Cyclin D1-positive DLBCL, NOS
- Molecular subtypes
 - Germinal centre B-cell (GCB) subtype
 - Activated B-cell (ABC) subtype
 - Unclassified by gene expression profiling
- Primary DLBCL of the CNS
- Primary cutaneous DLBCL, leg type
- Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma (PMBL)
- Primary effusion lymphoma (PEL)
- Intravascular large B-cell lymphoma
- T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma (THRLBCL)
- Plasmablastic lymphoma (PBL)
- EBV-positive DLBCL, NOS
- HHV8-positive DLBCL, NOS**
- DLBCL associated with chronic inflammation
- Lymphomatoid granulomatosis
- ALK-positive large B-cell lymphoma
- Large B-cell lymphoma with *IRF4* rearrangement
- Burkitt lymphoma
- Burkitt-like lymphoma with 11q aberration**
- HGBL with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangement (i.e., double-hit or triple-hit lymphoma)
- HGBL, NOS
- B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and CHL

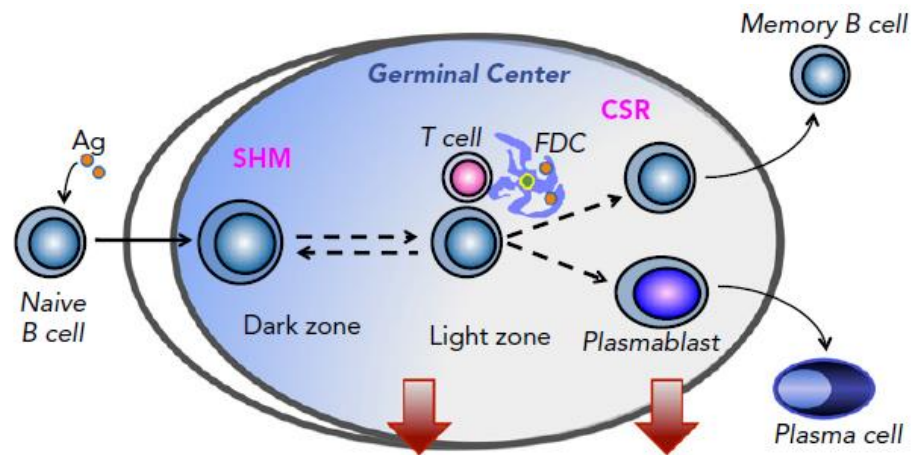
*, provisional entity. ALK, anaplastic lymphoma kinase; CHL, classical Hodgkin lymphoma; CNS, central nervous system; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; EBV, Epstein-Barr virus; HGBL, High-grade B-cell lymphoma; HHV8, human herpesvirus 8; NOS, not otherwise specified.

primitifs du système nerveux central (CNS), les DLBCL cutanés primitifs de type jambe (Primary cutaneous DLBCL, leg-type), les DLBCL primitifs médiastinaux (thymus, PMBL), les Lymphomes à grandes cellules B riches en cellules T / histiocytes (THRLBCL) ou les DLBCL associés au virus d'Epstein-Barr (EBV DLBCL). Il existe aussi des formes inclassables présentant des formes intermédiaires entre les DLBCL et les autres B-NHL ou plus spécifiquement avec les lymphomes de Burkitt, posant de gros problèmes de diagnostic et de prise en charge thérapeutique. Cependant toutes ces entités sont des formes rares et la grande majorité des DLBCL ne sont pas homogènes et sont classées actuellement dans un groupe dit NOS (Not Otherwise Specified) (Beham-Schmid, 2017; Swerdlow et al., 2016) (*voir tableau 1*). C'est dans le sous-type NOS que l'on retrouve les 2 sous-groupes moléculaires basés sur la cellule d'origine et les études transcriptomiques, GCB versus ABC. C'est aussi ce groupe de DLBCL qui a fait l'objet de notre thèse de doctorat. Nous étudierons plus spécifiquement ces 2 entités dans le paragraphe suivant.

2.3 DLBCL NOS : lésions génétiques et profils d'expression moléculaire des GCB versus ABC

Comme nous l'avons vu précédemment, Alizadeh et collaborateurs ont été parmi les premiers à utiliser les méthodes d'expression génique (GEP) et ont mis à jour l'existence de 3 sous-types, le sous-type GCB (40-50%), le sous-type ABC (50-60%) et un 3^e petit groupe inclassable (10-15%) sur lequel nous reviendrons à la fin de ce paragraphe. Les patients GCB traités par la thérapie standard (R-CHOP) présentent toujours actuellement une meilleure survie à 5 ans (de l'ordre de 70-80 %) que ceux touchés par le sous-type ABC plus agressif (40-50%) (Lenz and Staudt, 2010; Liu and Barta, 2019; Scott et al., 2015). Cette classification GCB versus ABC reste la plus largement utilisée dans le monde et la mieux connue.

Outre leur différence sur la base de la cellule d'origine, plusieurs milliers de gènes différencient ces deux types qui sont aussi associés à des altérations génétiques distinctes, à l'activation spécifique de certaines voies de signalisation moléculaires et à des réponses thérapeutiques différentes reflétant des mécanismes oncogéniques différents. Beaucoup d'études concernent encore la recherche de nouveaux biomarqueurs et l'identification des différents programmes oncogéniques des DLBCL ; en effet, les enjeux thérapeutiques restent forts, suite notamment à la forte mortalité des patients malgré l'immunothérapie (anti-CD20 et plus récemment check-points immunitaires) et aux patients qui échappent ou résistent à ces traitements. Ainsi, ces dernières années l'apport des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) centrées sur l'exome des DLBCL ont confirmé la grande complexité de ces lymphomes par



| GCB- and ABC-DLBCL | | | GCB-DLBCL | | | ABC-DLBCL | | |
|--------------------------------------|------------------|----|-------------------------------------|-------------|------|-------------------------------------|-------------|----|
| | | % | | | % | | | % |
| ■ | BCL6 Tx | 35 | ■ | BCL2 Tx/M | 34 | ■ | TNFAIP3 M/D | 30 |
| ■ | MLL2/MLL3 M | 35 | ■ | GNA13 M | 21 | ■ | MYD88 M | 30 |
| ■ | CREBBP/EP300 M/D | 30 | ■ | EZH2 M | 22 | ■ | CDKN2A/B D | 50 |
| ■ | B2M/CD58 M/D | 25 | ■ | TNFRSF14 | 20 | ■ | BCL2 Amp | 30 |
| ■ | TP53 M | 20 | ■ | BCL6 BSE1 M | 15 | ■ | PRDM1 M/D | 25 |
| ■ | MEF2B M | 15 | ■ | MYC Tx | 10 | ■ | CD79A/B M | 20 |
| ■ | FOXO1 M | 8 | ■ | PTEN D | 6-11 | ■ | CARD11 M | 9 |

| | | | | |
|--|---|--|--|--|
| ■ epigenetic modification | ■ proliferation | ■ BCL6 deregulation | ■ NF-κB/BCR signaling | ■ cell cycle |
| ■ immune escape | ■ apoptosis | ■ terminal differentiation | ■ DNA damage response | ■ other |

Figure 7 : Origine cellulaire et lésions génétiques associées aux différents sous-types de DLBCL. Les altérations génétiques les plus courantes partagées et spécifiques aux 2 principaux sous-types de DLBCL sont présentées, avec des codes de couleur indiquant la voie biologique impliquée. De plus, les diminutions d'activité sont en bleu, et les augmentations en rouge (Pasqualucci et Dalla-Favera., 2018).

rapport aux autres cancers hématologiques. En moyenne, chaque biopsie de DLBCL présente 70 altérations affectant les régions codantes avec une grande variabilité interindividuelle et une fraction importante de gènes mutés dans moins de 10% des patients (Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018). Parmi ces gènes mutés, une analyse récente réalisée sur environ 1000 exomes de DLBCL a identifié environ 150 gènes significatifs pour les DLBCL de par leur récurrence notamment ; la fonction d'oncogène a été confirmée pour certains de ces gènes sur des lignées cellulaires de DLBCL suite à leur inactivation par la technique CRISPR/Cas9 (Reddy et al., 2017). Même si cela ne représente qu'un nombre sous-estimé des mutations récurrentes des DLBCL qui touchent aussi des régions non codantes du génome, ces nouvelles technologies ouvrent de nouveaux champs d'études prospectives pour déterminer la signification théranostique et pronostique de la majorité des variants identifiés.

Comme nous l'avons évoqué, 2 processus nécessaires à l'exécution de la réponse humorale B sont déterminants, car risqués, dans l'oncogenèse des cellules B : l'SHM et la CSR. Ces modifications génétiques physiologiques se réalisant dans les GC sont source de translocations chromosomiques et de mutations somatiques aberrantes (ASHM) qui altèrent la structure et/ou la fonction d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs, ainsi que d'autres molécules pathogéniques (Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018). La démonstration de ce déterminisme a été apportée par les expériences de délétion du gène *AID* nécessaire aux 2 processus, dans des modèles de lymphome murins, qui était associée à l'inhibition des réarrangements *MYC-IGH* et empêchait le développement de DLBCL (Pasqualucci et al., 2008; Ramiro et al., 2004).

Si les sous types GCB et ABC présentent des altérations géniques spécifiques, ils partagent aussi un certain nombre de lésions génétiques que nous allons aborder en premier (*figure 7*).

2.3.1 Les altérations génétiques communes aux GCB et ABC

En 2013, Zhang et collaborateurs ont mis en évidence la présence de 322 gènes mutés de manière récurrente dans les deux types de DLBCL (ABC et GCB). Cette étude a été menée sur 73 patients et sur 21 lignées cellulaires. Ces mutations somatiques communes concernent des gènes déjà connus ou nouveaux, mais aussi des voies de signalisation des DLBCL (Zhang et al., 2013).

Altérations des gènes impliqués dans la modification des histones :

Un certain nombre de mutations récurrentes affectent des gènes codant pour des modifications des histones et donc de la chromatine, dont des méthyltransférases, acétyltransférases ou pour

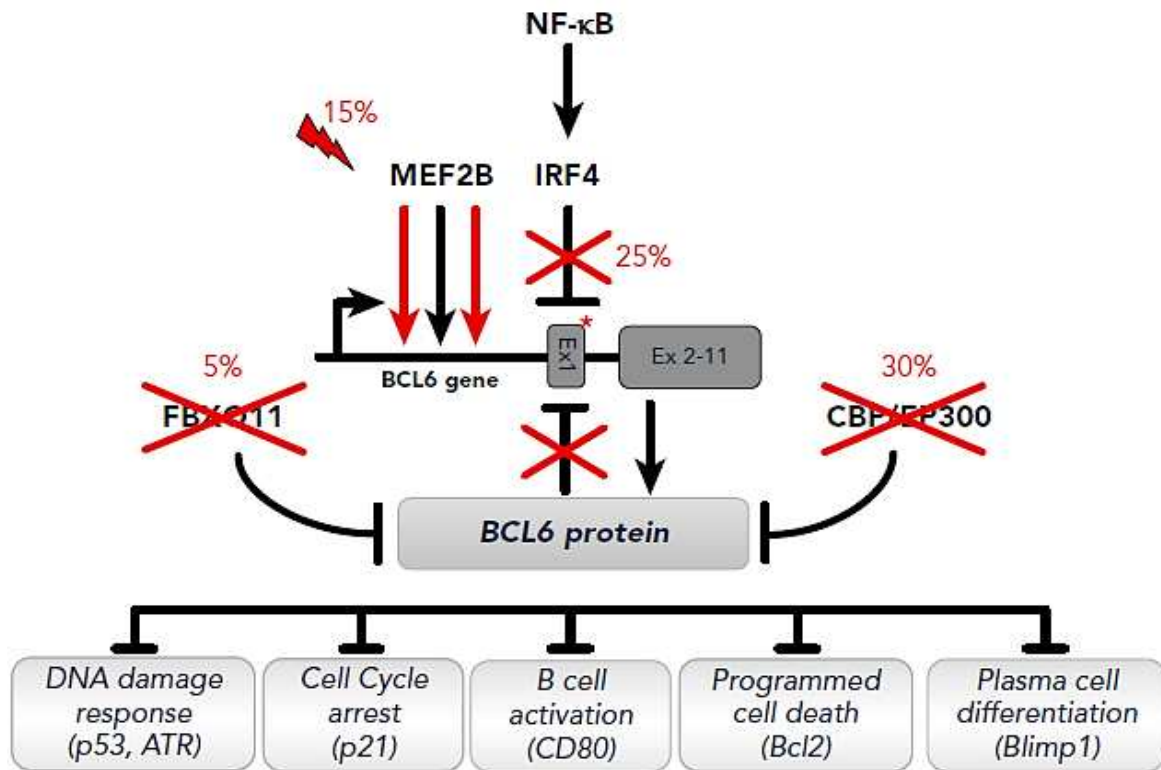


Figure 8 : Dérégulation des fonctions de BCL6 dans les DLBCL. Altérations génétiques récurrentes (en %) dérégulant soit directement ou indirectement la fonction de BCL6 dans DLBCL. Les croix illustrent des altérations génétiques de perte de fonction, et le symbole éclair illustre un gain de fonction. L'astérisque représente des mutations ponctuelles dans les séquences de régulation de BCL6, bloquant la liaison du facteur de transcription IRF4, ou de la protéine BCL6 elle-même, pour réguler négativement la transcription BCL6. Les différentes cibles biologiques modulées par BCL6 dans le centre germinatif (GC), et perturbées à la suite de ces lésions sont indiqués en bas (Pasqualucci et Dalla-Favera., 2018).

les histones elles-mêmes. Ces découvertes ont mis en évidence l'importance des régulations épigénétiques dans la lymphomagenèse.

Il s'agit notamment de mutations inactivatrices du gène *KMT2D/C* (ou *MLL2/3*) codant une histone méthyltransférase (30% des DLBCL), des gènes *CREBBP* (25%) /*EP300* (5%) codant pour des acétyltransférases (**figure 7**). Les mécanismes précis par lesquels ces mutations contribuent à la lymphomagenèse des DLBCL ne sont pas tous identifiés, mais dans le cas de celles inactivant *CREBBP/EP300*, cela favoriserait la fonction oncogénique de *BCL6* (**figure 8**), tout en inactivant celle du suppresseur tumoral p53. De plus, l'inactivation de ces méthyltransférases inhibe aussi leur rôle dans la présentation antigénique, ce qui contribuerait à l'échappement tumoral vis-à-vis de la réponse immunitaire de l'hôte (Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018).

Altérations de l'activité de BCL6

Comme on l'a décrit précédemment, *BCL6* est un répresseur transcriptionnel essentiel au développement des GC et au processus de maturation des lymphocytes (Ye et al., 1997). En condition physiologique, *BCL6* permet la prolifération cellulaire, inhibe la différenciation terminale des cellules B et les processus de réparation des dommages à l'ADN (**figure 8**). Normalement, l'ensemble de ces fonctions sont restaurées quand *BCL6* est régulé négativement dans la zone claire des GC lors de la différenciation terminale des cellules B.

Environ un tiers des DLBCL (avec un ratio de 2 :1 pour les ABC vs GCB) sont caractérisés par des translocations chromosomiques au niveau du locus 3q27 du gène *BCL6* empêchant sa baisse d'expression (**figure 7**) (Iqbal et al., 2007; Lossos, 2005; Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018). Souvent ces translocations se font avec les gènes des Ig sur les régions chromosomiques 14q32, 2p12 et 22q11 mais d'autres loci alternatifs peuvent être trouvés.

En plus d'altérations qui affectent directement le gène *BCL6*, d'autres lésions génétiques dérégulent l'expression du gène par des mécanismes indirects, comme vu précédemment pour les mutations de *CREBBP/EP300*. Environ 15% des mutations affectent et inhibent le facteur de transcription MEF2B qui est responsable notamment de la régulation positive de la transcription de *BCL6*. Finalement, dans 5% des cas de DLBCL l'expression de *BCL6* est augmentée, suite à une baisse de sa dégradation par des mutations avec baisse ou perte de fonction ou des délétions de *FBXO11*, une protéine adaptatrice impliquée dans l'ubiquitinylation et l'adressage de *BCL6* au protéasome (**figure 8**) (Duan et al., 2012; Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018; Ying et al., 2013).

Mutations de FOXO1

Ce facteur de transcription est un acteur clé de la différenciation B et son activité est régulée négativement par la voie PI3K/AKT. Plus précisément il est exprimé dans les cellules B de la zone sombre en lien avec la faible expression de PI3K, et il est nécessaire aux événements de cette zone en partie en coopération avec BCL6. Comme nous le verrons dans le chapitre sur le CD20, c'est aussi un répresseur transcriptionnel du gène *MS4A1* codant pour le CD20 (Pyrzynska et al., 2018). Des mutations de FOXO1 ont été identifiées dans 8 à 10% de tous les DLBCL (*figure 7*) et concernent un changement dans le site de phosphorylation ciblé par l'AKT, empêchant ainsi son inactivation lors de la signalisation de la voie PI3K (Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018; Trinh et al., 2013). Ces mutations de FOXO1 sont associées à un mauvais pronostic des patients et sont plus fréquemment retrouvées dans le type GCB notamment chez les patients réfractaires ou qui échappent au traitement (36% des cas) (Morin et al., 2016); c'est aussi dans les types GCB que la voie PI3K/AKT est constitutivement activée, comme nous le verrons ensuite.

Immuno-surveillance et échappement :

Enfin, un certain nombre de mutations communes à l'ensemble des DLBCL NOS concernent des gènes impliqués dans l'immuno-surveillance (*figure 7*). Une régulation négative de l'expression des molécules de classe II du CMH est retrouvée dans 40 à 50% des DLBCL et a été corrélée à un mauvais pronostic (Rimsza et al., 2004), sans doute en partie liée aux mutations de *CREBBP*. Environ 60% des DLBCL n'expriment pas des molécules de classe I du CMH, suite à des modifications génétiques ou épigénétiques. Des altérations inactivatrices du gène *CD58* sont aussi retrouvées de façon récurrente qui code pour un ligand (CD58 ou LFA3) du récepteur de costimulation CD2 exprimé sur les cellules T et les cellules NK. Ces 2 types de mutations peuvent être retrouvées sur les mêmes biopsies de patients, suggérant que ces altérations génétiques sont co-sélectionnées au cours du processus oncogénique pour favoriser l'échappement des cellules tumorales à la surveillance des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK (Challa-Malladi et al., 2011; Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018). Finalement, un faible nombre de cas (<20%) avec plus particulièrement des sous-types ABC, présentent des altérations génétiques avec gain de fonction du gène codant pour PD-L1. C'est un membre de la famille PD-L (programmed death ligands) impliqué dans un des « check-points » immunitaires en se liant au récepteur PD1 notamment des lymphocytes T, ce qui inhibe leur

activation (Georgiou et al., 2016). Il faut noter que l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales de patients atteints de DLBCL a été associée à une survie plus courte des patients et notamment pour les cas non-GCB (Hu et al., 2017 ; Kiyasu et al., 2015). Ces découvertes, dont certaines sont récentes, semblent indiquer que la stratégie thérapeutique, actuellement en cours d'essais cliniques, utilisant des anti-PD1 ou anti-PD-L1 pourrait être profitable à ce petit groupe de patients.

Si les sous-types GCB et ABC divergent selon la cellule d'origine par des signatures transcriptomiques différentes, ils sont aussi dépendants comme nous allons le voir maintenant de voies de signalisations oncogéniques différentes (*figure 7*).

2.3.2 Sous-type GCB « Germinal center B cell like »

Les DLBCL de type GCB présentent une signature transcriptomique caractéristique des cellules B du GC avec notamment l'expression des gènes *CD10* et *BCL6* (Hans et al., 2004). De plus, la translocation t(14 ;18) impliquant le gène *BCL2* et le locus *IGH* est retrouvée fréquemment puisque dans 30 à 40% des tumeurs de ce groupe, et pas dans le groupe ABC; cette translocation permettant la surexpression de *BCL2*, régulateur anti-apoptotique, confère un avantage de survie aux cellules tumorales et a été aussi associée à un plus mauvais pronostic des patients (Barrans et al., 2003; Rosenwald et al., 2002; Visco et al., 2012). Normalement l'expression de *BCL2* est réprimée par *BCL6* dans les GC, permettant le maintien par défaut d'un programme proapoptotique nécessaire aux événements de sélection négative qui s'y déroulent. La surexpression de la protéine *BCL2* peut également être due à l'amplification du gène *BCL2* indépendamment de la translocation, retrouvée dans 10% des cas de DLBCL de type GCB mais aussi dans 34% des cas de type ABC (Gascoyne, 1997; Steinhardt and Gartenhaus, 2012). Des thérapies ciblées utilisant de petites molécules inhibitrices ciblant *BCL2* (comme le Venetoclax) ont été développées et sont en cours d'essais cliniques (Liu and Barta, 2019) (*figure 9*).

Une autre caractéristique du sous type GCB est la perte de fonction, suite à différentes altérations génétiques, de la phosphatase PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) (Pfeifer et al., 2013) (*figure 9*). Cette lipide phosphatase est un suppresseur tumoral car c'est le mécanisme majeur de régulation négative de la voie de survie PI3K/AKT/mTOR. Plusieurs altérations génétiques contribuent à la perte d'expression de PTEN comme la délétion du gène dans 10 à 15 % des cas, ou des amplifications de miR-17-92 dans environ 15% des cas connu pour réguler négativement *PTEN* (Nogai et al., 2011; Xiao et al., 2008). L'activation de la voie de

signalisation PI3K/AKT/MTOR est importante pour la croissance et le métabolisme cellulaire. La perte d'expression de PTEN donne ainsi une explication sur l'activation constitutive de cette voie.

Le proto-oncogène *MYC* (ou *c-myc*) code pour le facteur de transcription MYC (ou c-Myc) impliqué dans de nombreux programmes biologiques comme la prolifération et la croissance cellulaire, le métabolisme énergétique, la différenciation, ou l'apoptose (Conacci-Sorrell et al., 2014). En condition normale, dans la plupart des cellules B des GC, l'expression de MYC est inhibée par BCL6 ; dans les DLBCL, la protéine MYC est constitutivement exprimée dans 10 à 15 % des DLBCL de type GCB (**figure 9**) suite le plus souvent à des translocations chromosomiques l'associant au locus IgH ou IgL. Comme pour BCL2, la présence de translocations impliquant *MYC* a été associée à un plus mauvais pronostic dans les DLBCL (Barrans et al., 2010).

Dans 5 à 10% des DLBCL, des translocations de *MYC* et *BCL2* coexistent ou plus rarement de *MYC* et *BCL6*. Des cas rares de patients existent aussi présentant des translocations de *MYC*, *BCL2* et *BCL6*. Ces lymphomes dits respectivement « double-hit » ou « triple-hit » ont beaucoup retenu l'attention des chercheurs ces dernières années, compte tenu de leur forte agressivité sans alternative thérapeutique, marquée par un très mauvais pronostic des patients (Aukema et al., 2014; Johnson et al., 2012; Li et al., 2013). Paradoxalement, ces tumeurs sont très majoritairement classées dans le sous-type GCB, même si la mise à jour de la WHO classification des lymphomes en 2016, les reconnaît comme une nouvelle catégorie appelée « lymphomes à cellules B de haut grade » (HGBL). Cependant, la rareté de ces formes empêche pour l'instant une caractérisation génétique complète de ces lymphomes (**voir tableau 1**). Il faut préciser que les protéines MYC et BCL2 peuvent être retrouvées co-exprimées dans les DLBCL indépendamment d'altérations chromosomiques *MYC/BCL2*, définissant les « lymphomes à double expression » (double-expressor DLBCL- DE-DLBCL) (Karube and Campo., 2015). Ces lymphomes sont plus fréquents que les DHL, car ils représentent 25 à 35 % des cas de DLBCL. Ils sont plus agressifs que les autres DLBCL NOS et représentent 50% des patients réfractaires au traitement R-CHOP ou en rechute (Xia and Zhang, 2020). Contrairement aux DHL, les DEL sont plus souvent retrouvés dans le sous-type ABC (33–46% ABC vs. 17% GCB) ce qui pourrait en partie rendre compte du plus mauvais pronostic de ce sous-type de DLBCL (Hu et al., 2013; Li et al., 2018). Dans ce contexte, la révision de 2016 de la classification mondiale des lymphomes propose que la double expression de MYC et BCL2

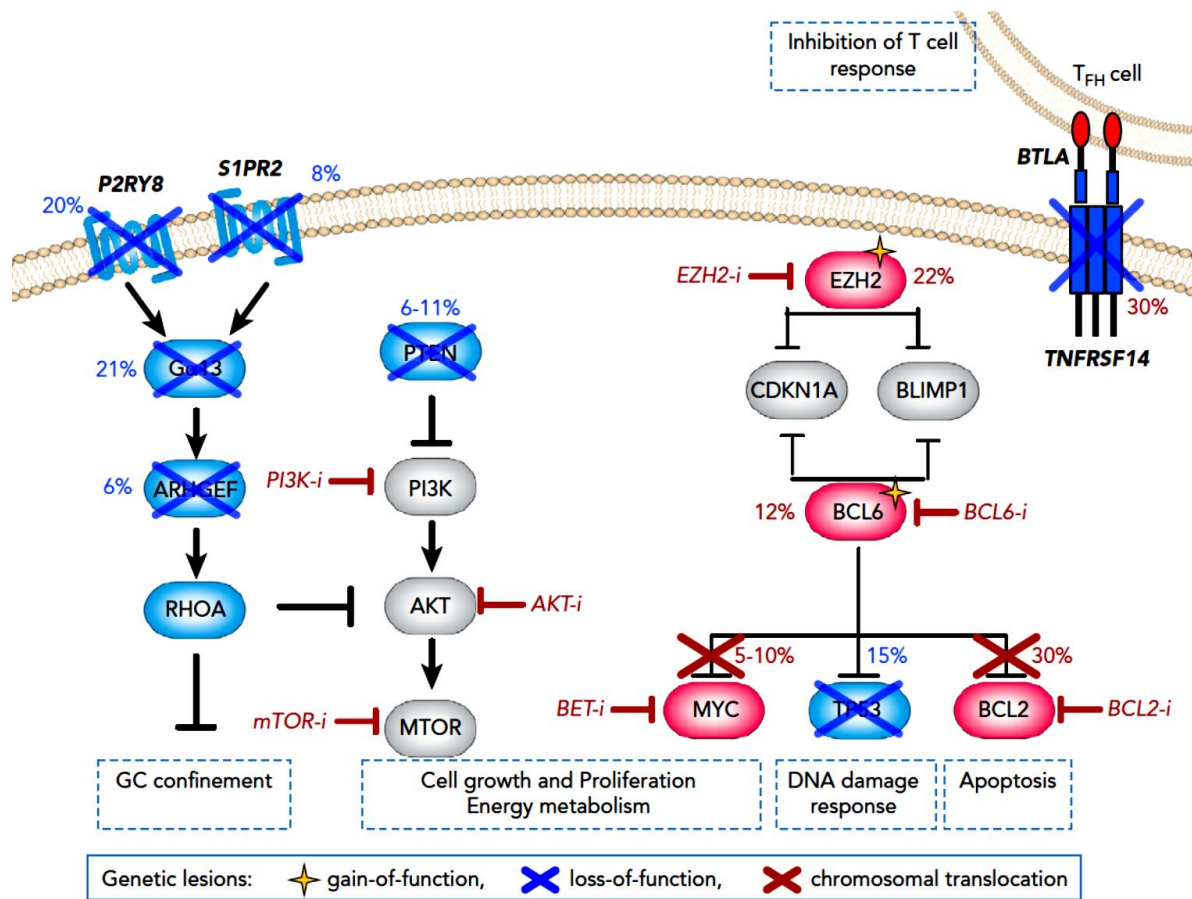


Figure 9: Altérations génétiques et conséquences sur les voies de signalisation cellulaires dans le sous-type GCB. Les lésions génétiques associées préférentiellement au sous-type GCB comprennent des translocations chromosomiques de *BCL2* (30% des cas) et/ou *MYC* (10% des cas), qui conduisent à leur surexpression, leur permettant de contourner la répression transcriptionnelle médiée par *BCL6* ; des mutations du récepteur *TNFRSF14*, conduisant à une inhibition de la réponse des lymphocytes T ; des mutations de *EZH2* (~20% des cas) qui induisent l'inhibition de la transcription de gènes antiprolifératifs et suppresseurs de tumeur, *CDKN1A* et *BLIMP1* ; des mutations ponctuelles dans les séquences de *BCL6* (~10% des cas). De plus, une perte d'expression de *PTEN* est observée suite notamment à des délétions génétiques (~10%), entraînant l'activation de la signalisation *PI3K/AKT/mTOR*. En rouge sont indiqués les inhibiteurs des différentes voies de signalisation, actuellement en essai clinique (Pasqualucci et Dalla-Favera., 2018).

soit considérée comme un nouvel indicateur pronostic des DLBCL NOS (Swerdlow et al., 2016).

Une autre altération génétique caractéristique du sous-type GCB concerne les mutations activatrices du gène codant l'histone méthyltransférase EZH2 retrouvés dans 20% des DLBCL de type GCB mais pas dans le sous-type ABC (Caganova et al., 2013; Morin et al., 2016) (*figures 8 et 9*). L'expression de EZH2 est importante pour les étapes liées à la formation du centre germinatif, et sa répression aux stades tardifs est nécessaire pour permettre la sortie du centre germinatif et la poursuite du processus de différenciation des cellules B activées (Heyn and Esteller, 2013). Dans les GC, EZH2 intervient comme BCL6, dans la répression transcriptionnelle de nombreux gènes, par exemple des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (*CDKN1A*) ou la différenciation terminale des LB (*IRF4*, *BLIMP1*) (Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018).

Enfin et contrairement au sous-type ABC, des mutations récurrentes inactivatrices de gènes impliqués dans les voies de signalisation responsables du confinement des lymphocytes B au sein des GC sont retrouvées dans le type GCB (environ 30% des cas) (*figure 9*). Il s'agit notamment des gènes *P2RY8* et *GNAI4* codant respectivement pour un récepteur membranaire et la protéine G qu'il active ($G\alpha_{13}$) déterminant l'activation de la voie RHOA (ras homolog gene family, member A) membre de la famille des Rho GTPase (Muppidi et al., 2014). Cette voie conduit notamment à la migration cellulaire et à la régulation négative de la voie PI3K/AKT. L'inactivation de cette voie suite à des mutations explique dans ces lymphomes, comme l'ont montré les modèles de délétions des gènes chez la souris, la désorganisation de l'architecture des GC et la dissémination des cellules tumorales à partir du sang circulant (Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018).

Enfin concernant les interactions cellulaires, il faut citer le gène *TNFRSF14* qui code pour un membre de la super-famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) retrouvé sur les lymphocytes T et B et qui peut présenter une dualité fonctionnelle. La protéine TNFRSF14 peut se fixer sur BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator) exprimé en particulier par les LT_{HF} présents dans les GC. La liaison TNFRSF14/BTLA fait partie des « check-point » immunitaires car BTLA fonctionne comme un récepteur inhibiteur de l'activation des LT. Des délétions et des mutations de *TNFRSF14* concernant le domaine extra-cellulaire du récepteur sont trouvées de façon récurrente dans les DLBCL, et de façon quasi-exclusive dans les GCB (30% des cas).

La conséquence fonctionnelle de ces modifications génétiques sur l'expression de la protéine n'est pas connue actuellement dans les DLBCL (Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018).

2.3.3 Sous-type ABC « Activated B Cell »

Les cellules B tumorales de type ABC possèdent une signature génomique comparable aux cellules B à un stade plasmablastique ; elles expriment donc des gènes fréquemment exprimés par les plasmocytes matures comme MUM1 et le facteur de transcription XBP1 qui régule la sécrétion des Ig. Cependant, les DLBCL de type ABC ont aussi fréquemment des inactivations du gène *PRDM1* qui code pour BLIMP1 nécessaire à la différenciation en plasmocyte (**figure 3**) ; ces observations laissent penser que l'inhibition de la différenciation au stade terminale du GC pourrait être un mécanisme de la pathogénèse de ces DLBCL (Mandelbaum et al., 2010; Pasqualucci et al., 2006; Tam et al., 2006). La perte de fonction de BLIMP1 est aussi liée dans ces DLBCL ABC à d'autres mécanismes génétiques ou épigénétiques, comme l'activation constitutive de BCL6 que nous avons décrite dans les mécanismes communs aux 2 types (**figure 8**). Ces lymphomes présentent de fortes quantités d'AID et les gènes de leur IgH sont fortement mutés. Contrairement au type GCB, la plupart des lymphomes de types ABC ne réalisent pas la commutation isotypique et ces cellules expriment l'IgM à leur surface (Lenz and Staudt, 2010).

La signature moléculaire des DLBCL de type ABC (**figure 7**) est définie par des altérations de gènes codant pour des molécules effectrices et/ou adaptatrices de la signalisation du BCR et des récepteurs Toll-like (TLR, Toll-like receptor). Bien que tous ces récepteurs aient des signalisations variées, toutes les anomalies identifiées convergent sur l'activation constitutive de la voie NF- κ B (Davis et al., 2001). Ce facteur de transcription conduit à la survie cellulaire, la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. Ainsi, cette activation constitutive va avoir des répercussions sur toutes les cibles de NF- κ B, avec notamment la surexpression de BCL2, ce qui explique que les DLBCL de type ABC possèdent une forte expression de BCL2 contribuant au mauvais pronostic associé à ce sous-type (Lenz et al., 2008; Viatour et al., 2003). L'inhibition de cette voie est mortelle pour les lignées cellulaires de DLBCL de type ABC contrairement aux lignées GCB, ce qui a démontré clairement « l'addiction » des cellules tumorales de type ABC pour la voie NF- κ B (Lam et al., 2005). Un certain nombre d'autres altérations génétiques sont fréquemment retrouvées dans le sous-type ABC, comme des amplifications du locus de *BCL2* (environ 30% des cas), la délétion homozygote des

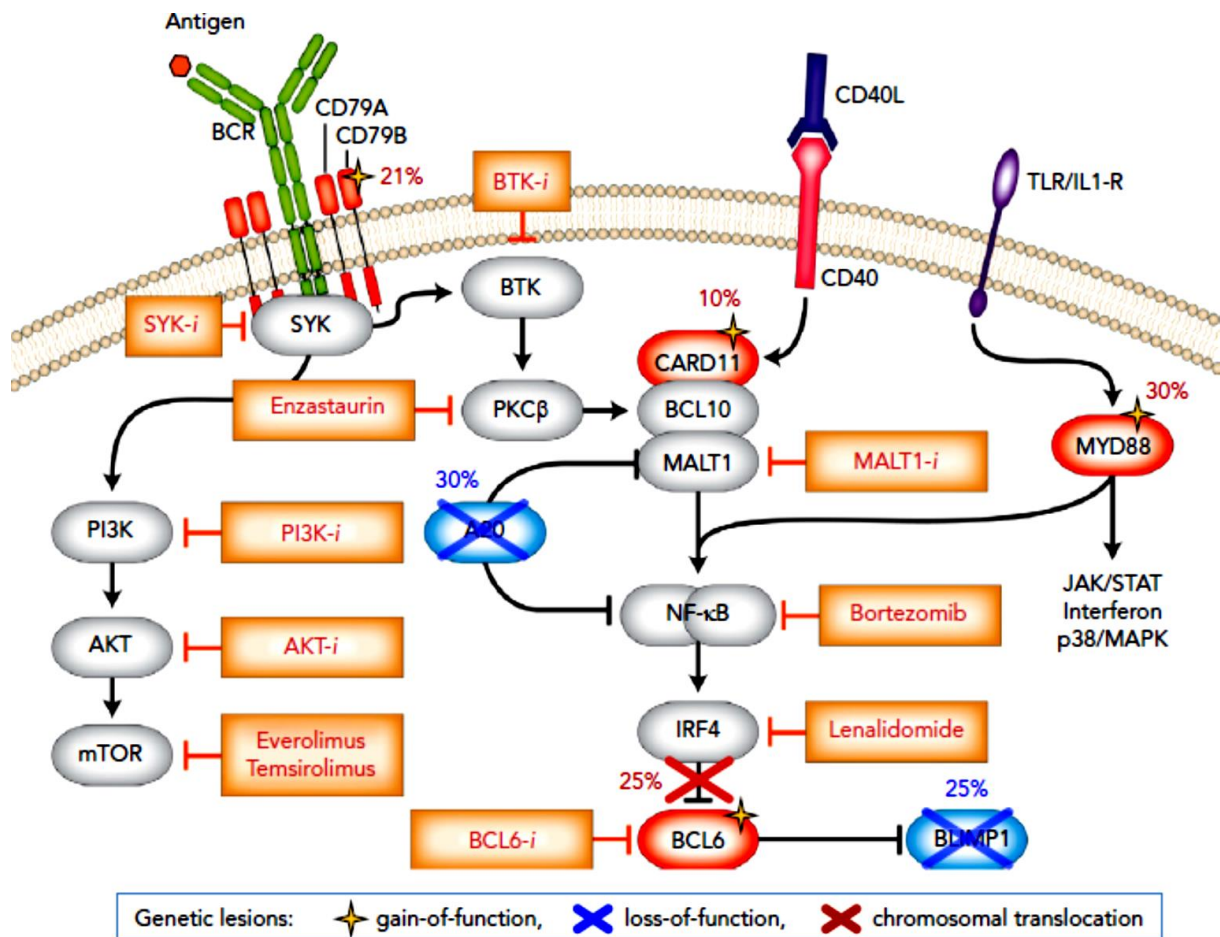


Figure 10 : Alérations génétiques et conséquences sur les voies de signalisation cellulaire dans le sous-type ABC. Le sous-type ABC est marqué par de nombreuses altérations génétiques qui maintiennent une activité constitutive de NF-κB en aval du BCR et des TLR bloquant la différenciation terminale des cellules B. Les gènes directement ciblés par ces altérations sont représentés en bleu (inactivation) et en rouge (expression/activité dérégulée). Les inhibiteurs de la voie de transduction du BCR, suite à la liaison à l'Ag, dont certains ont des effets prometteurs dans les premiers essais cliniques, sont représentés en orange (Pasqualucci et Dalla-Favera., 2018).

suppresseurs tumoraux *CDKN2A/B* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*) (dans environ 50% des cas) impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S, et des gains ou amplifications géniques en 19q au niveau du locus *SPIB* (*Spi-B Transcription Factor*) qui code pour un oncogène que s'est avéré essentiel au sous type ABC (Lenz et al., 2008). La perte de *CDKN2A* et *CDKN2B* bloque l'action des agents chimiothérapeutiques, ce qui pourrait contribuer aussi au mauvais pronostic de ce sous-type (Lenz et al., 2008; Testoni et al., 2015).

Concernant les altérations menant à l'activation constitutive de la voie NF- κ B, c'est grâce à la technique d'ARN interférence (shRNA) que les différents mécanismes responsables de cette activation ont été identifiés dans les DLBCL (Ngo et al., 2006; Nogai et al., 2011).

Une partie de ces altérations fait suite à des mutations dans la signalisation du BCR :

Dans les DLBCL de type ABC la signalisation du BCR (ou « signalosome ») est activée de façon chronique suite notamment à des mutations affectant des régulateurs associés aux événements membranaires. Ainsi, dans 21% des cas, on trouve des mutations « gain de fonction » au niveau du gène codant la sous-unité CD79B (plus rarement CD79A) de l'hétérodimère encore appelé $Ig\alpha/Ig\beta$ (Davis et al., 2010). Cet hétérodimère est associé au BCR et porte la fonction de transduction du signal du BCR, qui lui n'a qu'une fonction de reconnaissance du ligand. Dans environ 10% des cas, on détecte des mutations activatrices de *CARD11* qui code pour un complexe du « signalosome » du BCR appelé CBM formé par l'association de *CARD11*, *BCL10*, *MALT1* et *TRAF6*. Ce complexe doit être complet pour transmettre le signal en aval (Fontán and Melnick, 2013; Krappmann, 2012) (*figure 10*).

La dépendance des cellules de type ABC vis-à-vis de la signalisation du BCR a été confirmée aussi par des études cliniques plus récentes chez des patients traités avec un inhibiteur (Ibrutinib) de la tyrosine kinase BTK (Bruton's Tyrosine Kinase) qui relie le BCR à la voie NF- κ B (Wilson et al., 2015). Il est à noter que le « signalosome » du BCR induit l'activation, en plus de la voie canonique de NF- κ B, d'autres voies et facteurs de transcription comme PI3K, MAPK/ERK, et NF-AT qui participent à la transformation maligne des cellules B dans ces lymphomes ABC. Des inhibiteurs de chacun des acteurs importants ont été développés, et certains ont donné des effets prometteurs dans des essais cliniques (*figure 10*) (Liu and Barta, 2019; Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018).

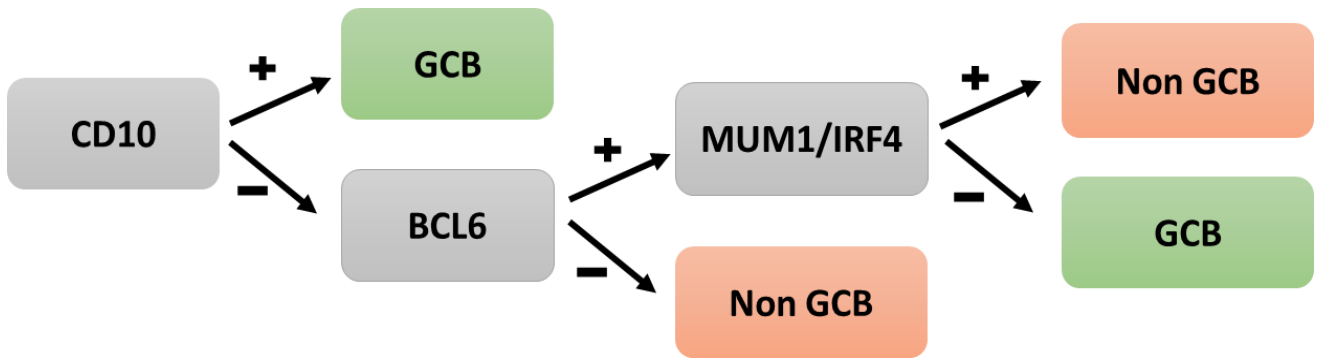


Figure 11 : Algorithme de Hans permettant de classier les DLBCL selon les sous-types GCB et non GCB. Cet algorithme utilise 3 marqueurs : CD10, BCL6 et MUM1/IRF4. Schéma adapté de (Hans et al., 2004).

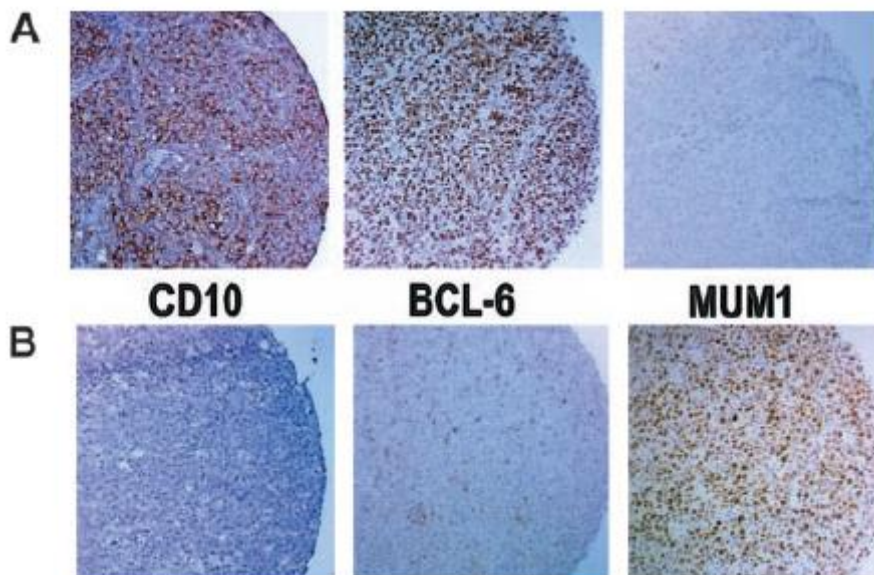


Figure 12 : Marquage immunohistochimique de coupes de tissus de DLBCL. A : Tumeur GCB : positive pour CD10 et BCL6 et négative pour MUM1. B : Tumeur non GCB : négative pour CD10, positive pour MUM1 et légèrement positive pour BCL6 (Hans et al., 2004).

Enfin, d'autres mécanismes peuvent contribuer à l'activation constitutive de la voie NF- κ B comme (figure 10) :

- les mutations de *MYD88* retrouvées dans environ 30% des DLBCL ABC qui code pour la protéine adaptatrice MYD88 impliquée dans la signalisation des récepteurs aux interleukines (avec notamment la voie JAK/STAT) et des TLR (notamment le TLR9), qui convergent aussi sur la voie NF- κ B (Kraan et al., 2013; Ngo et al., 2011).
- les mutations inactivatrices ou délétions de *TNFAIP3* qui code pour un régulateur enzymatique négatif de NF- κ B appelé A20, observées dans 30% des DLBCL de type ABC (Compagno et al., 2009).

Toutes ces données montrent la très grande hétérogénéité génétique des différents types de DLBCL et mettent en évidence la nécessité d'élaborer des traitements plus spécifiques et personnalisés à chaque patient.

De plus, les choix thérapeutiques sont déterminés par l'identification préalable des différents sous-types ; or, le coût lié aux techniques de biologie moléculaire et la nécessité d'avoir des biopsies souvent fraîches congelées pour l'identification des signatures génomiques, a mené à développer dans un premier temps d'autres techniques pour établir des profils protéiques représentant au mieux les données des GEP.

2.3.4 Profils histologiques

L'immunohistochimie (IHC) réalisée à partir de biopsies tissulaires incluses en paraffine est la technique que l'on retrouve le plus souvent pour établir des profils protéiques avec des concordances parfois incomplètes avec les GEP (environ 15% de cas non identifiés) et des problèmes de variabilité entre les laboratoires. Ces techniques ont fait suite au développement d'algorithmes afin de différencier les lymphomes de type GCB des autres dits non-GCB (où l'on retrouve en majorité les types ABC). Un des premiers qui a été publié et qui reste encore couramment utilisé en clinique est l'algorithme de Hans qui utilise trois marqueurs : CD10, BCL6 et MUM1/IRF4 (Hans et al., 2004). Les tumeurs GCB sont classés CD10⁺ ou CD10⁻/BCL6⁺/MUM1/IRF4⁻ et les non-GCB sont classés CD10⁻/MUM1/IRF4⁺/BCL6⁺ ou BCL6⁻ (figures 11 et 12).

Deux autres algorithmes ont permis d'améliorer le système de Hans, notamment celui de Choi basé sur 5 marqueurs immunohistochimiques (GCET1, CD10, BCL6, MUM1/IRF4 et FOXP1) consistant à 93% avec les résultats des GEP (Choi et al., 2009). La WHO ne spécifie

The Molecular Diagnosis of Diffuse Large B Cell Lymphoma v.2.0

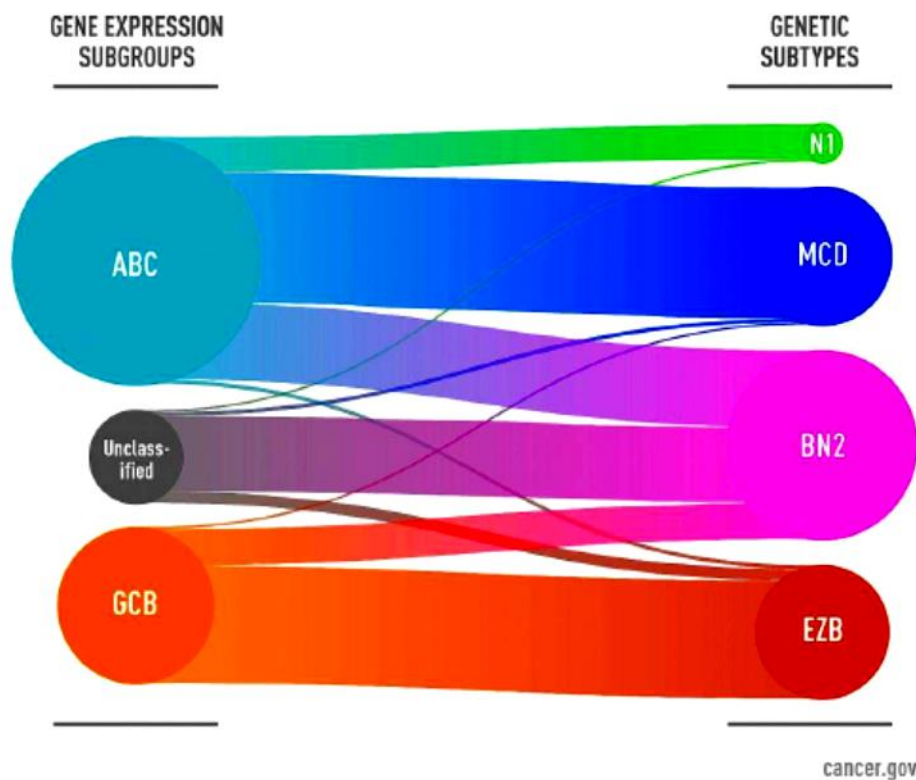


Figure 13 : Les différents sous-groupes génétiques de DLBCL. Identification de 4 sous-types différents de DLBCL sur le plan phénotypique, génétique et clinique qui se recoupent en partie avec les 3 sous-types moléculaires décrits jusqu'à alors. Le groupe MCD basé sur la présence de la mutation $MYD88^{L265P}$ et de mutations de $CD79B$. Le groupe BN2 basé sur les translocations impliquant $BCL6$ et les mutations activatrices de $NOTCH2$. Le groupe N1 basé sur les mutations activatrices de $NOTCH1$. Le groupe EZB basé sur les mutations de $EZN2$ et les translocations impliquant $BCL2$ (d'après le site du NIH et Schmitz et al., 2018).

pas quelle méthode utiliser. Plus récemment des techniques basées sur l'extraction d'ARNm à partir de tissus fixés au formol et inclus en paraffine ont prouvé leur efficacité ; elles reposent sur la technologie digitale « Nanostring » avec 20 gènes caractéristiques des sous-types de DLBCL, et pourraient représenter une nouvelle option réaliste dans les prochaines années pour déterminer plus précisément les sous-types de DLBCL (Scott et al., 2015, 2014).

2.3.5 Révision de la classification : découverte de nouveaux sous-groupes

Comme on l'a vu la classification des DLBCL selon des études d'expression génomique (GEP) laissait un 3^e groupe à côté des GCB et ABC non classables. Le groupe de Louis Michael Staudt a très récemment utilisé une plateforme génétique issue du séquençage de l'exome et du transcriptome des DLBCL, l'analyse par micro-array du nombre de copies d'ADN et le re-séquençage ciblé de 372 gènes identifiés pour des altérations récurrentes (Schmitz et al., 2018). Cette approche a été utilisée à partir de 574 biopsies fraîchement congelées faites en très grande majorité (96,5%) avant tout traitement, et prélevées sur des patients dont 51,4 % étaient de type ABC, 28,6% GCB et 20% non classables. Ainsi, ils ont enrichi leur cohorte pour ces derniers patients volontairement (11,3 % normalement de cas inclassables dans une cohorte randomisée), (Scott et al., 2015) car les caractéristiques de ces patients ne sont pas connues actuellement. Ils ont alors identifié 4 sous-types différents sur le plan phénotypique, génétique et clinique (réponse à l'immunochimiothérapie type R-CHO) : un premier groupe appelé MCD basé sur la présence de la mutation MYD88^{L265P} et de mutations de *CD79B*, un 2^e groupe nommé BN2 basé sur les translocations impliquant *BCL6* et les mutations activatrices de *NOTCH2*, un 3^e groupe appelé N1 basé sur les mutations activatrices de *NOTCH1* et un 4^e groupe EZB basé sur les mutations de *EZN2* et les translocations impliquant *BCL2* (**figure 13**). Les récepteurs NOTCH sont des récepteurs impliqués dans les interactions cellulaires des cellules B avec les cellules stromales des follicules lymphoïdes ; les conséquences fonctionnelles des mutations récemment décrites de ces récepteurs ne sont pas encore connues dans le cas des DLBCL (Arruga et al., 2018).

Les patients des sous-types BN2 et EZB ont une meilleure survie que les patients des groupes MCD et N1. De façon intéressante et cohérente avec les données sur la survie, les groupes MCD et N1 sont très majoritairement rattachés au sous-type ABC et le groupe EZB au sous-type GCB. Finalement on trouve dans le groupe BN2 des patients du sous-type ABC comme GCB

ou des patients dont le lymphome n'était pas caractérisé avant (inclassables) (*figure 13*). Cette nouvelle classification permet, de plus, de comprendre les cas de patients par exemple classés dans le sous-type le plus agressif ABC qui cependant présentaient une bonne réponse aux traitements (supérieure aux patients GCB), car caractérisés maintenant par une « bonne génétique » type BN2. Cette étude est déterminante car elle ouvre la possibilité de réaliser des études cliniques plus précises et d'adapter davantage les traitements vers des protocoles plus personnalisés.

2.4 Les traitements des DLBCL, et place de l'immunothérapie anti-CD20

Nous avons vu que les patients atteints de DLBCL présentent diverses caractéristiques cliniques, un pronostic mais aussi une réponse au traitement qui peut être variable. C'est un lymphome très agressif qui, sans traitement, limite la survie des patients à quelques mois voire quelques semaines. Cette grande hétérogénéité complique les approches thérapeutiques et explique les difficultés encore actuelles à traiter et sauver l'ensemble des patients par un même traitement.

C'est dans les années 70, que les premiers succès de thérapies sur des stades avancés de DLBCL ont été rapportés, reposant sur l'association de plusieurs drogues comme le cyclophosphamide, l'hydroxydoxorubicine, l'oncovine et la prednisone connue sous le sigle CHOP. Seulement, la chimiothérapie qui nécessite plusieurs cures est limitée par une toxicité non spécifique aux tissus tumoraux, mais également par le développement d'une résistance aux molécules thérapeutiques. Plusieurs protocoles et régimes de polychimiothérapie ont été mis au point et utilisés dans le monde, ainsi que la radiothérapie et la greffe de cellules souches autologues (Fisher et al., 1993; Milpied et al., 2004; Pfreundschuh et al., 2004). Mais les patients traités par chimiothérapie et radiothérapie développent des tumeurs secondaires due à la baisse de l'immunosurveillance induite par les agents thérapeutiques. De plus, les fortes doses nécessaires à l'efficacité des protocoles de chimiothérapies ne pouvaient être proposées qu'au sujets les plus jeunes (<60 ans), laissant les sujets âgés sans alternative thérapeutique. Cependant, les résultats à long terme étaient décevants avec un taux de survie d'environ 36% et ces traitements se sont vite avérés insuffisants en terme de survie (Fisher et al., 2004). Ainsi, il était devenu nécessaire de développer des thérapies plus ciblées, ouvrant la voie à l'immunothérapie.

Depuis que les anticorps monoclonaux (mAbs) ont été développés, leur utilisation pour la thérapie anticancéreuse a été largement explorée. La plupart des lymphomes constituent un cadre favorable pour l'utilisation d'un traitement par immunothérapie de par leur accessibilité par le sang. De plus, la présence d'Ag CD (cluster of differentiation) à la surface des cellules B en font des cibles idéales pour ce type de traitement. D'ailleurs, la première utilisation réussie des mAbs (anti-CD20) pour le traitement du cancer a été démontrée dans le lymphome et les mAbs sont maintenant utilisés chez beaucoup de patients atteints de lymphome non hodgkinien (Chinn et al., 2003; Polito et al., 2014).

Les anticorps monoclonaux dirigés contre le CD20, récepteur spécifique des lymphocytes B, ont donc été développés comme immunothérapie. Le premier anti-CD20 à être autorisé par la FDA (Food and Drug Administration) a été le rituximab en 1998 pour le traitement des lymphomes folliculaires, puis son utilisation a été élargie aux DLBCL et aux autres lymphomes B non hodgkiniens (Flowers et al., 2010). C'est Bertrand Coiffier et son groupe GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte) en France qui a démontré pour la première fois le bénéfice important de l'introduction du rituximab (MabThera®) dans le traitement CHOP, en terme de taux de rémission et de survie des patients (Coiffier et al., 2002). Cette étude a été suivie pendant 7 ans et les résultats ont montré que la survie globale était toujours hautement significative pour les patients traités avec le R-CHOP (OS 53% versus 36% ; $p = 0,0004$) (Coiffier, 2007; Feugier et al., 2005). Finalement ces résultats importants, car très supérieurs sur le « bras » R-CHOP de l'étude par rapport au CHOP seul, ont été confirmés après 10 ans (Coiffier et al., 2010) y compris au niveau européen comme en Allemagne, ou aux états Unis notamment³. Cette première étude clinique de l'équipe de Bertrand Coiffier a fondamentalement bouleversé la prise en charge des patients et a permis, en plus de sauver la vie de beaucoup de personnes dans le monde, de redonner un nouveau souffle à la recherche de nouvelles thérapies ciblées pour ce cancer.

Comme nous l'avons déjà évoqué, d'autres alternatives thérapeutiques ciblées ont été développées ces dernières années, comme des inhibiteurs de kinases, du protéasome, de BCL2, d'autres cibles de l'immunothérapie, et plus récemment les « CAR-T cells ». Cependant, le traitement R-CHOP reste la thérapie standard de ces lymphomes. Elle permet de guérir environ 50 à 70% des malades atteints de DLBC (Coiffier and Sarkozy, 2016; Li et al., 2018).

³ Lymphomes B diffus à grandes cellules : traitements de première ligne. K. Bouabdallah, N. Milpied- Correspondances en Onco-hématologie - Vol. III - n° 2 - avril-mai-juin 2008.

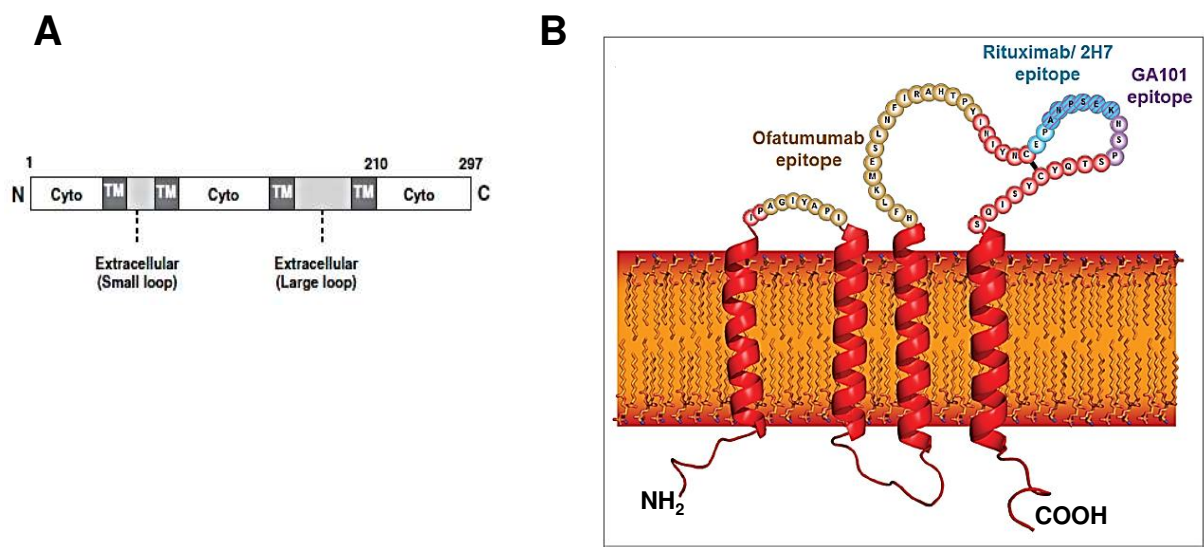


Figure 14 : Structure de la protéine CD20 et des sites de liaisons de 3 anti-CD20 utilisés dans l'immunothérapie des patients atteints de DLBCL. (A) Le gène MS4A1 code pour la protéine CD20 (forme principale de 297 acides aminés) possédant 4 domaines transmembranaires (TM), 3 domaines cytoplasmiques (Cyto) et 2 domaines extracellulaires (petite et grande boucles). Des formes plus courtes existent correspondant à des variants d'épissage (Tomita, 2016). (B) Le rituximab reconnaît un épitope présent sur la grande boucle extracellulaire. Le GA101 reconnaît une partie commune de l'épitope du rituximab. L'ofatumumab reconnaît la structure 3D d'une partie de la grande boucle mais aussi de la petite boucle extracellulaire (d'après Klein et al., 2013).

2.4.1 Du gène *MS4A1* à la protéine CD20

Le CD20 ou MS4A1 (Membrane Spanning 4-domains A) a été décrit pour la première fois comme un marqueur des lymphocytes B en 1980 (Stashenko et al., 1980). Il est exprimé à la surface des lymphocytes pré-B, des lymphocytes matures et B mémoires. En revanche, il n'est pas retrouvé au niveau des cellules souches hématopoïétiques, des cellules pro-B, ni des plasmocytes (Tedder and Engel, 1994). Par conséquent, c'était un bon candidat pour l'immunothérapie, n'affectant pas la survie des précurseurs B pouvant régénérer les LB après traitement, ni des plasmocytes permettant à l'organisme de maintenir un taux d'immunoglobulines stables protectrices vis-à-vis de certaines infections.

Le gène *MS4A1* codant pour la protéine CD20 est localisé sur le chromosome 11q12, et comporte 8 exons. Ce gène appartient à la famille MS4A (Membrane Spanning A4) dont les membres codent pour des protéines de surface formant des complexes oligomériques impliqués dans la transduction de signaux (Ishibashi et al., 2001). Plusieurs sites d'initiation de la transcription ont été identifiés, et la région codante du gène est située entre l'exon 3 et l'exon 8. De plus, des sites d'épissage alternatif ont été trouvés aboutissant à la formation de 3 ARNm codant tous pour la même protéine, car ces sites sont tous au niveau de l'exon 1 (Tedder et al., 1989).

Le CD20 est une phosphoprotéine membranaire non glycosylée de 297 acides aminés comportant 4 domaines transmembranaires, 2 domaines extracellulaires (grande et petite boucle) et 3 domaines cytoplasmiques comportant les séquences amino- et carboxy-terminales (**figure 14A**) (Tomita, 2016). La grande boucle, constituée de 43 acides aminés et située entre le 3^{ème} et 4^{ème} segment transmembranaire, contient les épitopes reconnus par la plupart des anti-CD20, notamment au niveau de l'alanine 170 et de la proline 172 (Nabhan and Kay, 2011; Teeling et al., 2006). Des études cristallographiques ont aussi montré la présence d'un pont disulfure situé entre les résidus cystéine 167 et 183 (Du et al., 2007; Ernst et al., 2005). Ce pont disulfure, en plus d'être important pour le maintien de la structure extracellulaire du CD20, joue un rôle très important dans la fixation du rituximab (Ernst et al., 2005). Concernant la petite boucle, située entre le 1^{er} et le 2^{ème} segment transmembranaire, certaines séquences peptidiques seraient reconnues par quelques anticorps anti-CD20, comme l'ofatumumab (**figure 14B**). Les extrémités intracellulaires sont riches en résidus thréonine et sérine contenus dans des sites consensus de phosphorylation. Ainsi, suite à différents statuts de phosphorylation, la protéine CD20 peut être trouvée sous 3 formes : une forme prédominante de 33 kDa et deux autres formes de 35 et 37 kDa (Bubien et al., 1993). Cet état de phosphorylation différentielle serait

régulé lors de l'activation via le BCR des lymphocytes B et lors de la fixation des anti-CD20 (Bubien et al., 1993; Tedder and Schlossman, 1988).

Le CD20 peut être présent sous forme d'homodimères et sans doute plus souvent sous forme d'homotétramères à la surface des lymphocytes B, formant des complexes protéiques avec d'autres protéines contribuant à la transduction du signal (Polyak et al., 2008). De plus, il a été montré par microscopie électronique et confocale que le CD20 était constitutivement associé aux radeaux lipidiques et à des microvillies de la membrane plasmique (Li et al., 2004) ; il est aussi associé aux molécules du CMH, CD40 et surtout au BCR, molécules elles-mêmes en lien avec les radeaux lipidiques (Léveillé et al., 1999; Petrie and Deans, 2002; Walshe et al., 2008).

La fonction physiologique du CD20 reste encore partiellement comprise de nos jours, bien qu'un consensus s'accorde à lui attribuer un rôle de canal calcique et d'amplification du signal calcique généré notamment suite à l'activation du BCR (Cragg et al., 2005; Janas et al., 2005; Klein et al., 2013; Li et al., 2003; Polyak et al., 2008). Ce rôle dans le flux calcique a été démontré *in vivo* chez des souris déficientes en CD20 (Uchida et al., 2004) et dans des modèles cellulaires d'expression ectopique du CD20 (Bubien et al., 1993). De plus, après stimulation des cellules B via leur BCR, des études ont montré que le CD20 était relocalisé avec le BCR dans les radeaux lipidiques (rafts) de la membrane plasmique (Bubien et al., 1993; Petrie and Deans, 2002). Il s'en suit son homo-oligomérisation en canaux calciques de types SOCC (store-operated calcium channel) déterminant un afflux calcique dans la cellule (Li et al., 2003). A ce jour, aucun ligand spécifique du CD20 n'a pu être identifié, aussi sa stimulation est toujours obtenue artificiellement par des anticorps capables de se fixer au niveau de son domaine extracellulaire.

2.4.2 Mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression cellulaire du CD20

Le taux d'expression membranaire du CD20 dépend de 3 mécanismes principaux : sa synthèse (régulation génétique et épigénétique), son trafic intracellulaire (endocytose notamment) et sa dégradation (via le protéasome) (Tomita, 2016).

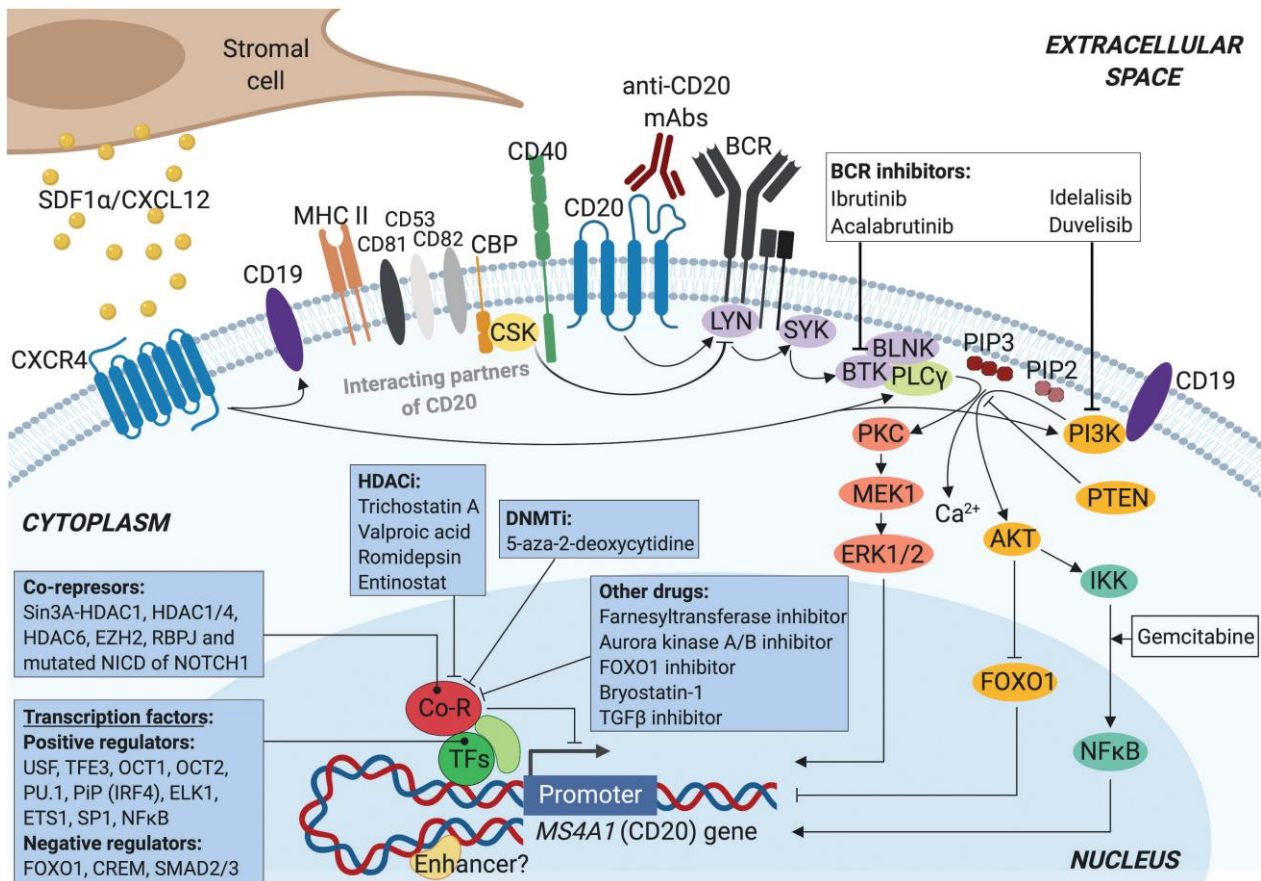


Figure 15 : Vue schématique des partenaires interagissant avec le CD20 sur la membrane cellulaire et des différents mécanismes de régulation du gène MS4A1 dans les cellules B malignes. La signalisation du BCR et ses partenaires membranaires (CD20, CD40, CD19) conduit à l'activation ou l'inhibition (FOXO1) transcriptionnelle du gène MS4A1 codant le CD20. De façon générale, la transcription de MS4A1 est régulée par des facteurs de transcription (TFs) à activité positive ou négative, et fait intervenir des co-répresseurs (Co-R) pouvant être inhibés par des inhibiteurs d'histone désacétylases (HDACi), des inhibiteurs d'ADN méthyltransférases (DNMTi) ou d'autres drogues (Pavlasova and Mraz.,2020).

2.4.2.1 Régulation de la synthèse du CD20

La transcription du gène *MS4A1* est complexe et partiellement connue ; plusieurs facteurs de transcription ont cependant été caractérisés tels que le complexe PU.1/PiP (IRF4) (Himmelmann et al., 1997), Oct2 (Thévenin et al., 1993), SP1 (Shimizu et al., 2010) CHD4 (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4) et MBD2 (Methyl-CpG Binding Domain Protein 2) (Pavlasova and Mraz, 2020; Słabicki et al., 2016).

Au niveau transcriptionnel, des travaux ont mis en évidence le rôle de certaines signalisations cellulaires qui convergent notamment sur ces activateurs transcriptionnels (*figure 15*). En effet, un certain nombre d'inhibiteurs de kinases impliquées dans la signalisation du BCR (PI3K-i, AKT-i, BTK-i, Src-i...) ont été développés et ont permis de bloquer la prolifération et d'induire l'apoptose des cellules tumorales de LNH et de leucémie (CLL, Chronic Lymphocytic Leukemia) (Li, 2005; Winiarska et al., 2014). Ils sont apparus alors comme de bons candidats potentiels pour les thérapies ciblées des DLBCL. Cependant, ces travaux ont mis à jour que les effets anti-tumoraux de ces inhibiteurs pharmacologiques s'accompagnaient d'une augmentation de la résistance des cellules B tumorales à l'immunothérapie. En effet, plusieurs inhibiteurs pharmacologiques ciblant des acteurs de la signalisation du BCR comme les kinases SYK (Spleen Tyrosine Kinase), BTK ou PI3K régulent négativement l'expression du CD20 dans les cellules B tumorales, déterminant une baisse de l'activité cytotoxique des anti-CD20 (Bojarczuk et al., 2014; Kohrt et al., 2014). De même, les inhibiteurs des Src kinases (comme LYN) induisent une forte diminution de l'expression du gène *MS4A1* dans les cultures de cellules B primaires de plusieurs LNH. La baisse de l'expression de *MS4A1* et de la protéine à la surface des cellules tumorales nécessitait la présence du promoteur de *MS4A1*, et était associée à une augmentation forte de la résistance des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* aux effets cytotoxiques des anti-CD20. Cet effet négatif des inhibiteurs des Src kinases sur l'expression du CD20 était réversible, et les niveaux de CD20 pouvaient être restaurés par la stimulation de la voie AKT, suggérant que cette voie était déterminante dans la modulation des taux membranaires du CD20. Finalement, des études plus récentes ont montré que la voie AKT inhibait par phosphorylation FOXO1, facteur de transcription répresseur de la transcription de *MS4A1* (Pyrzynska et al., 2018), comme on l'a évoqué à propos des mutations récurrentes des DLBCL. L'effet répresseur de FOXO1, actif sous forme non phosphorylée, serait lié au recrutement de différents complexes, comme le complexe Sin3A/HDAC1, permettant ainsi la désacétylation des histones, notamment H3, inhibant alors la transcription du gène *MS4A1* (Tomita, 2016). En conséquence, en même temps que de révéler des mécanismes nouveaux de

la régulation de l'expression du CD20, ces études ont mis l'accent sur le risque important d'effets antagonistes lors de la combinaison de ces inhibiteurs pharmacologiques aux anti-CD20, limitant aussi leur utilisation clinique.

Un autre répresseur de *MS4A1*, CREM (cAMP Responsive Element Modulator) a été identifié suite aux travaux menés par Slabicki et coll. en 2016. Ils ont élaboré une librairie génomique de shRNA qu'ils ont transfectés par lentivirus à une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt choisie pour ses taux d'expression moyenne de CD20, la lignée Raji. Ils ont ensuite confirmé le rôle répresseur de CREM sur des lignées dépourvues de CREM où ils ont pu corrélérer l'augmentation d'expression du CD20 avec une meilleure efficacité *in vitro* de la cytotoxicité du rituximab dépendante du complément (CDC). Ces résultats suggèrent que l'interférence avec CREM mais aussi avec d'autres répresseurs du gène *MS4A1* dans le lymphome peut modifier le niveau d'expression du CD20 et améliorer l'efficacité de l'immunothérapie par les anti-CD20. Les travaux de Slabicki et coll. en 2016 ont également permis d'identifier 2 nouveaux activateurs transcriptionnels, CHD4 et MBD2 ; or ce sont des membres du complexe Nucleosome Remodeling Deacetylase (NuRD) qui contrôle l'accessibilité de l'ADN pour activer ou réprimer la transcription des gènes (Zhang et al., 1999). Ces études ont naturellement orienté les recherches sur les régulations épigénétiques.

Concernant les régulations épigénétiques, des travaux antérieurs avaient déjà montré qu'il n'y avait pas beaucoup d'ilots CpG dans la région en amont du promoteur de *MS4A1*. Pourtant, on observe dans des lignées cellulaires traitées avec des inhibiteurs d'ADN méthyltransférases (DNMT inhibitors) comme la 5-Azacitidine, une augmentation des transcrits de *MS4A1* et une augmentation modérée de la protéine CD20 (Hiraga et al., 2009; Rahmé et al., 2013; Sugimoto et al., 2009). En conséquence, il a été conclu que ces agents pharmacologiques exerçaient leurs effets sans engager la déméthylation de l'ADN. Plus tard, des travaux ont montré qu'il s'agissait d'effets indirects (Tomita, 2016) (*figure 15*).

De plus, il a été observé que le complexe co-répresseur Sin3A-HDAC1 était recruté sur le promoteur de *MS4A1* dans des lignées cellulaires B CD20 négatives. Ce complexe se dissocie du promoteur notamment suite à un traitement avec de la trichostatine A (TSA), un inhibiteur non spécifique d'histones désacétylases (HDACi), résultant en une augmentation de l'acétylation des histones et une partielle restauration de l'expression du CD20 (Sugimoto et al., 2009). D'autres études ont montré l'intérêt de l'utilisation *in vitro* et *in vivo* des HDACi comme la TSA (Tomita et al., 2007), l'acide valproïque (Shimizu et al., 2010) ou la romidepsine

(Damm et al., 2015) et spécifiques de HDAC6 avec la rubacine et le ricolinostate (Bobrowicz et al., 2017) ainsi que la chidamide qui cible les HDAC 1,2 et 3 (Guan et al., 2020). En effet, les HDACi, en induisant une hyperacétylation des histones activatrice de la transcription, restaurent l'expression de l'ARNm et de la protéine du CD20 y compris chez les patients traités au rituximab (Damm et al., 2015; Shimizu et al., 2010). Cet effet est lié notamment au recrutement de facteurs de transcription comme SP1, mais varie dans ses mécanismes en fonction des lignées cellulaires (Tomita, 2016) (*figure 15*).

Il est important de noter que tout traitement ou cytokine modulant les voies de signalisations et régulateurs décrits précédemment vont pouvoir affecter aussi l'expression du CD20. C'est le cas notamment des anticorps thérapeutiques anti-CD20, comme le rituximab, dont nous reparlerons dans le paragraphe sur les mécanismes cytotoxiques des anti-CD20.

D'autres facteurs peuvent réguler les niveaux d'expression du CD20 comme des mutations somatiques, et des ARNs non codants (Słabicki et al., 2016). Concernant les DLBCL les mutations du CD20 sont rares et ne seraient pas impliquées dans un échappement aux anti-CD20 (Johnson et al., 2009b; Tomita, 2016).

2.4.2.2 Autres mécanismes impliqués dans la régulation du taux de CD20 cellulaire et membranaire

Parmi les autres évènements cellulaires pouvant moduler l'expression du CD20 des cellules B se pose la question de son trafic et notamment de son internalisation (endocytose) de la membrane au cytoplasme, menant jusqu'à sa dégradation ou son recyclage. Si les mécanismes régulant la synthèse du CD20 sont mieux compris, peu de données concernent ceux qui régulent son trafic et sa densité à la surface des cellules B. La compréhension de ces processus présente donc un enjeu majeur clinique pour cibler et augmenter davantage l'efficacité des anti-CD20. En effet, comme nous allons le voir prochainement, la diminution du CD20 chez les patients traités au R-CHOP est un des mécanismes principaux des résistances thérapeutiques.

Au niveau post-transcriptionnel, l'augmentation de la phosphorylation du CD20 et de sa mobilité de la membrane vers l'espace intracellulaire, avaient été observées dans une étude déjà ancienne, suite à un traitement avec le PMA (phorbol myristate acétate) activateur des protéines kinases PKCs (Tedder and Schlossman, 1988; Valentine et al., 1989). Le CD20 des cellules B

normales proliférantes ou malignes est fortement phosphorylé contrairement au CD20 des cellules non proliférantes, et la liaison par des anti-CD20 augmente cette phosphorylation. Le lien entre phosphorylation du CD20 et la prolifération des cellules a été ensuite confirmé (Tedder and Schlossman, 1988; Valentine et al., 1989).

Concernant sa dégradation, en condition normale, le CD20 est ubiquitinylé, ce qui adresse cette molécule au système UPS (ubiquitin-proteasome system) pour sa dégradation. De plus, le rituximab induit une augmentation de l'ubiquitylation du CD20 membranaire, pouvant être à l'origine de la perte du CD20, comme nous le verrons dans le paragraphe sur les résistances aux anti-CD20. Ainsi il a été proposé que les inhibiteurs du protéasome, en déterminant une augmentation du CD20 membranaire, pourraient sensibiliser les cellules aux rituximab. Cependant et de façon inattendue, les études ont montré que lors de l'exposition des cellules B avec un inhibiteur du protéasome (borzétomib), aucune augmentation du CD20 membranaire était observée. Un effet même opposé pouvait être obtenu avec une baisse donc de l'expression membranaire du CD20. Les recherches ont permis de montrer qu'en inhibant la dégradation via le protéasome, on favorisait en compensation un 2^e mécanisme de dégradation du CD20 via le système de dégradation protéique lysosome/autophagosome amenant ainsi à une augmentation de la dégradation du CD20 (Bil et al., 2010). Ainsi ces travaux ont permis de mettre à jour l'existence de 2 systèmes de dégradation du CD20, l'un dépendant du système UPS et l'autre des lysosomes/autophagosomes (Winiarska et al., 2010).

Ces processus sont régulés positivement notamment lors de la liaison par les anti-CD20, déterminant des résistances thérapeutiques au traitement R-CHOP que nous décrirons plus en détail par la suite.

2.4.3 Les mécanismes de la déplétion des cellules B par les anti- CD20

Depuis son approbation en 1997 par la Food and Drug Administration des Etats-Unis, puis par l'Agence française du médicament en 1998, le rituximab administré par voie intraveineuse a permis d'augmenter considérablement l'efficacité des traitements des tumeurs malignes des lymphocytes B. Il est devenu un élément standard des soins pour le lymphome folliculaire, la leucémie lymphoïde chronique, le lymphome du manteau et le lymphome diffus à grandes cellules B. Il figure également sur la liste modèle de l'OMS des médicaments essentiels depuis 2015.

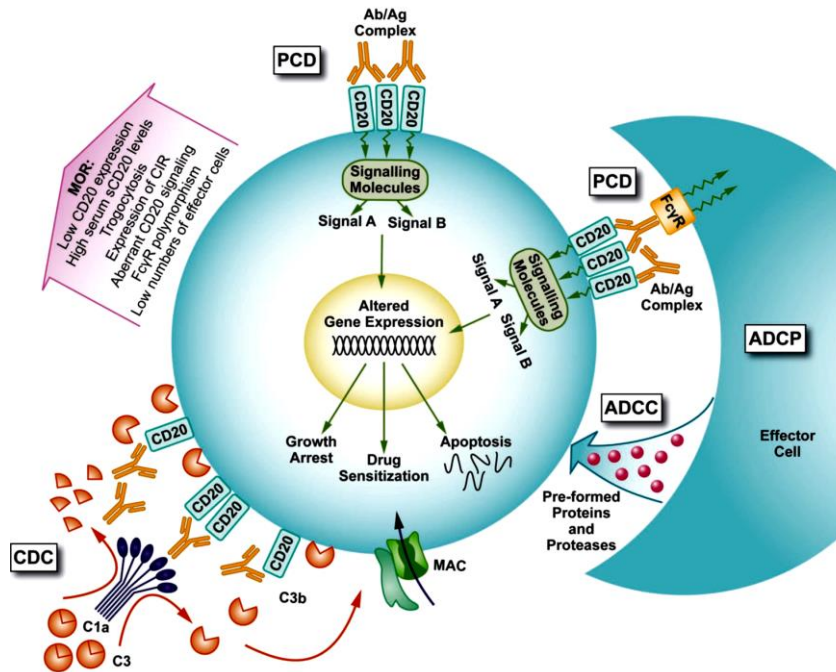
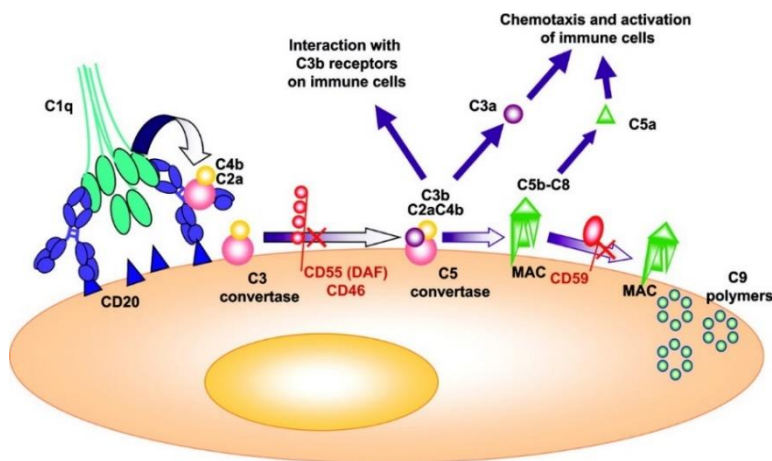
A**B**

Figure 16 : (A) Les différents mécanismes d'action des anti-CD20. Suite à leur fixation sur le CD20, les anti-CD20, comme le rituximab, peuvent induire la mort des cellules B par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes : la cytotoxicité induite par le complément (CDC), la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) et la mort directe en engageant la voie intrinsèque de la mort cellulaire programmée (PCD), ce qui sensibilise les cellules à la cytotoxicité des drogues de la chimiothérapie. MOR : mécanismes de résistance ; CIR : récepteurs inhibiteurs du complément (Oflazoglu and Audoly, 2010). (B) CDC : Activation de la voie classique du complément. La fixation du facteur C1q aux portions Fc d'IgG ou d'IgM déclenche une cascade protéolytique, entraînant la génération de grandes quantités de C3b. Les molécules C3b agissent comme des opsonines mais se lient également à la convertase C3 pour former la C5 convertase conduisant à la génération du complexe d'attaque membranaire (MAC), qui tue la cible. Plusieurs systèmes de contrôle existent comme les protéines anti-complémentaires CD55 (DAF) et CD46 interférant avec l'activation de la C3 convertase, et le CD59 empêchant la formation du MAC (Cartron et al., 2004).

Le rituximab (MabThera® Roche –Europe ou Rituxan® Genentech/Biogen IDEC -US) est un anticorps monoclonal chimérique humain-souris possédant les régions variables des chaînes légères (VL) et lourdes (VH) d'immunoglobuline de souris et les domaines constants H et L d'une immunoglobuline humaine IgG1. Cette construction permet d'obtenir un anticorps dont la partie constante n'est pas immunogène chez l'homme (de StGroth and Scheidegger, 1980). Nous verrons également que la partie constante de cet anticorps est responsable des fonctions « cytotoxiques » en recrutant divers effecteurs du système immunitaire (Cartron et al., 2004). Du fait de ses caractéristiques de fixation sur le CD20 et des mécanismes principaux de lyse des cellules B, le rituximab fait partie des anti-CD20 « de type I », se distinguant des anti-CD20 « de type II » comme l'obinutuzumab, mais je reviendrais sur cet aspect un peu plus loin dans ce manuscrit.

En se fixant sur le CD20, le rituximab est responsable de la mise à mort des cellules normales mais aussi cancéreuses. Quatre mécanismes, dont 3 recrutant des effecteurs du système immunitaire, sont classiquement décrits pour expliquer les effets cytotoxiques des anti-CD20 : la lyse cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC, Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity), la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'activation du système du complément (CDC, Complement-Dependent Cytotoxicity), la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP, Antibody Dependent Cell Phagocytosis) et l'activation de la voie intrinsèque de la mort cellulaire programmée (PCD, Programmed Cell Death ou apoptose). Le ou les mécanismes mis en jeu réellement *in vivo* et la part des uns par rapport aux autres restent à préciser encore de nos jours (**figure 16A**) (Maloney et al., 2002; Weiner, 2010). Comme nous le verrons ensuite, à chaque processus a été associée une possibilité de mécanisme de résistance.

2.4.3.1 La cytotoxicité cellulaire dépendante du complément (CDC)

Cette cytotoxicité implique l'activation classique du système du complément. La fixation des anti-CD20 sur le CD20 entraîne la redistribution du CD20 au sein des radeaux lipidiques de la membrane plasmique favorisant la fixation du facteur C1q du complément à la partie Fc du rituximab (Reff et al., 1994). Cela déclenche toute la cascade d'activation et de protéolyse de ce système de protéases, avec notamment la libération importante du facteur du complément C3b qui va notamment permettre la formation et l'activation de la C5 convertase (**figure 16B**). Finalement ce système détermine la formation d'un complexe d'attaque membranaire (MAC) suite à la polymérisation et l'insertion membranaire sous forme d'un pore

lytique des facteurs C5b à C9, provoquant ainsi la lyse de la cellule cible. La fixation du facteur C3b sur la cellule (opsonisation) peut aussi recruter des cellules effectrices cytotoxiques ou phagocytaires (granulocytes, macrophages, NK) exprimant le récepteur au facteur C3b (Cartron et al., 2004).

L'activation du système du complément génère cependant des quantités importantes de certains facteurs responsables d'effets secondaires observés *in vivo* chez les patients. Il s'agit notamment de la libération d'anaphylatoxines telles que C3a, C4a et C5a provoquant des processus inflammatoires (**figure 16B**). Cette observation a confirmé l'activation du complément chez les patients après traitement au rituximab (van der Kolk et al., 2001). Si l'activation du complément a été démontrée comme une condition prérequis à l'action du rituximab dans un modèle syngénique de lymphomes chez des souris déficientes en C1q (Di Gaetano et al., 2003), les données cliniques dans les lymphomes non hodgkiniens semblent indiquer que ce mécanisme pourrait ne pas être essentiel pour l'efficacité du rituximab. Cependant, la contribution de la CDC pourrait varier en fonction des anti-CD20 (Rezvani and Maloney, 2011). *Dans le cadre de notre thèse, nous avons choisi ce mécanisme de cytotoxicité (CDC), car très en lien avec le taux de CD20 membranaire, pour analyser le rôle des exosomes produits par les cellules de DLBCL.*

2.4.3.2 La cytotoxicité et phagocytose cellulaire dépendantes d'anticorps (ADCC et ADCP)

L'ADCC est suggérée comme étant le principal mécanisme d'action *in vivo* du rituximab. La liaison des anti-CD20 au CD20 des cellules B facilite la liaison de leur fragment Fc aux récepteurs FcγR (FcγRIIIa ou CD16) exprimés à la surface des cellules immunitaires cytotoxiques telles que les cellules NK, déclenchant la formation d'une synapse immunitaire entre ces 2 cellules. Cette zone de contact induit l'activation de la cytotoxicité des cellules NK, libérant des granules contenant notamment des perforines qui déterminent la formation d'un pore perméabilisant la membrane de la cellule B. Les NK libèrent aussi des granzymes B dans l'espace de la synapse, qui s'introduisent dans la cellule B suite à sa perméabilisation. Une fois rentrées dans la cellule, les granzymes B déterminent l'apoptose par différentes voies caspases dépendantes (Oflazoglu and Audoly, 2010; Pierpont et al., 2018) (**figure 16A**).

D'autres cellules de l'immunité innée présentent à leur surface les récepteurs FcγR, il s'agit de cellules phagocytaires telles que les monocytes/macrophages et des granulocytes. Ainsi, la

liaison des anti-CD20 au CD20, en exposant leur fragment Fc, peut recruter des phagocytes et déclencher la phagocytose des cellules B. Ce processus met en jeu divers types de récepteurs Fc γ R de plus ou moins grande affinité en fonction des cellules qui les expriment. Ce mécanisme effecteur de la cytotoxicité du rituximab est celui qui a été décrit le plus récemment à partir d'expériences *in vitro* et impliquerait essentiellement les macrophages ; cependant il n'existe pas de certitude que ce mécanisme existe *in vivo* chez les patients (Golay et Inrona, 2012; Pierpont et al, 2018).

L'importance de l'ADCC dans la réponse clinique au traitement par le rituximab a été démontrée notamment chez les patients atteints de NHL présentant des polymorphismes du CD16 (Fc γ RIIIa) (Seyfizadeh et al., 2016). Les patients avec des variants de haute affinité du récepteur Fc γ RIIIa présentaient une meilleure réponse au rituximab. A l'inverse, les patients possédant des récepteurs Fc γ R hétérozygotes pour certains acides aminés semblaient avoir une réponse clinique au rituximab moins importante par rapport aux patients homozygotes. Ces données ont mis en évidence l'importance de l'interaction Fc-Fc γ R dans les effets anti-tumoraux du rituximab, et suggèrent que l'ADCC est un mécanisme d'action majeur dans les lymphomes non hodgkiniens (Weiner, 2010).

2.4.3.3 L'apoptose dans les effets des anti-CD20

A ce jour aucun ligand physiologique du CD20 n'est connu et la plupart des connaissances sur les signaux intracellulaires déclenchés par le CD20 résultent de la fixation des anticorps monoclonaux. C'est ainsi aussi que l'on a mis en évidence la capacité du CD20 à induire un programme de mort cellulaire (*figure 16A*).

Bien que ces effets contribuent sans doute de façon limitée aux mécanismes anti-tumoraux du rituximab *in vivo*, sa liaison au CD20 peut déclencher une « mort directe » sans mettre en jeu des effecteurs du système immunitaire. Cette apoptose, décrite surtout à partir de lignées de cellules tumorales dont les lignées DLBCL, implique des voies caspases dépendantes comme caspases indépendantes. De plus, ces effets varient considérablement entre les lignées cellulaires (Bonavida, 2007; Shan et al., 2000). Bien que peu de choses soient connues sur le mécanisme de cette mort cellulaire *in vivo*, les expériences *in vitro* ont permis d'identifier la régulation de certaines voies cellulaires (Seyfizadeh et al., 2016; Unruh et al., 2005). Notamment, la redistribution dans les rafts du CD20 s'accompagne d'une réduction de l'activité

de kinases de la famille Src connues pour être associées à ces radeaux lipidiques comme Lyn, ce qui détermine l'inhibition de voies de survie en aval (Hofmeister et al., 2000; Zhou et al., 2008). La liaison du rituximab au CD20 déclenche l'inhibition des voies p38MAPK, NF- κ B, ERK1/2 et AKT, toutes impliquées dans l'expression de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques comme BCL-2, BCL-xL, XIAP et MCL-1. En conséquence, cela détermine une forte sensibilisation des cellules B à l'apoptose (Zhou et al., 2008).

Ces effets du rituximab ont été finalement impliqués dans la sensibilisation des cellules tumorales aux médicaments cytotoxiques dans plusieurs lymphomes B. En effet, la plupart des agents chimiothérapeutiques utilisés dans les traitements des cancers induisent l'apoptose des cellules via des voies dépendantes des caspases ; la modulation de ces voies est également en lien avec la majorité des résistances thérapeutiques. En inhibant les régulateurs anti-apoptotiques comme BCL-2, dont on a vu précédemment qu'il était fréquemment surexprimé dans les lymphomes B –NHL, le rituximab peut s'opposer et lever cette résistance liée à une plus grande survie (Rezvani and Maloney, 2011; Shan et al., 2000). Cette capacité sensibilisatrice du rituximab a été démontrée notamment *in vitro* (Bonavida, 2007; Weiner, 2010). Néanmoins des lignées résistantes au rituximab le sont également à la chimiothérapie suggérant des mécanismes communs entre les deux traitements (Jazirehi et al., 2007).

L'association du rituximab à la chimiothérapie CHOP a permis d'améliorer la réponse au traitement et de permettre une rémission à long terme pour 50 à 70% des patients, il est donc devenu le traitement standard des patients atteints de DLBCL (Coiffier et al., 2010). Cependant, le traitement R-CHOP n'est pas adapté ni efficace pour 30 à 40% des patients (Coiffier, 2007; Sehn, 2012). Les raisons de ces échecs sont multiples : si la mort suite aux toxicités (environ 5%) peut s'observer notamment chez des patients âgés, la plupart des échecs sont dus soit à un état primaire réfractaire (15 à 25% des patients en échec thérapeutique), soit à une rechute après une réponse initiale (pour 20 à 30% des cas). Finalement environ 5% des patients n'arrivent jamais en rémission totale mais restent en réponse partielle. La plupart des patients réfractaires au R-CHOP se retrouvent parmi les formes très agressives dont on a parlé précédemment, les DLBCL « double-hit » (réarrangements *MYC/BCL2*) et les DLBL « double expression » (DE, avec sur expression de cMYC et BCL2). Les patients qui présentent une rechute ont souvent des tumeurs caractérisées par des perturbations épigénétiques, ou des altérations de gènes comme *TP53*, *FOXO1*, *MLL3*, *CCND3*, *NFKBIZ* et *STAT6* (Coiffier and Sarkozy, 2016; Morin et al., 2016).

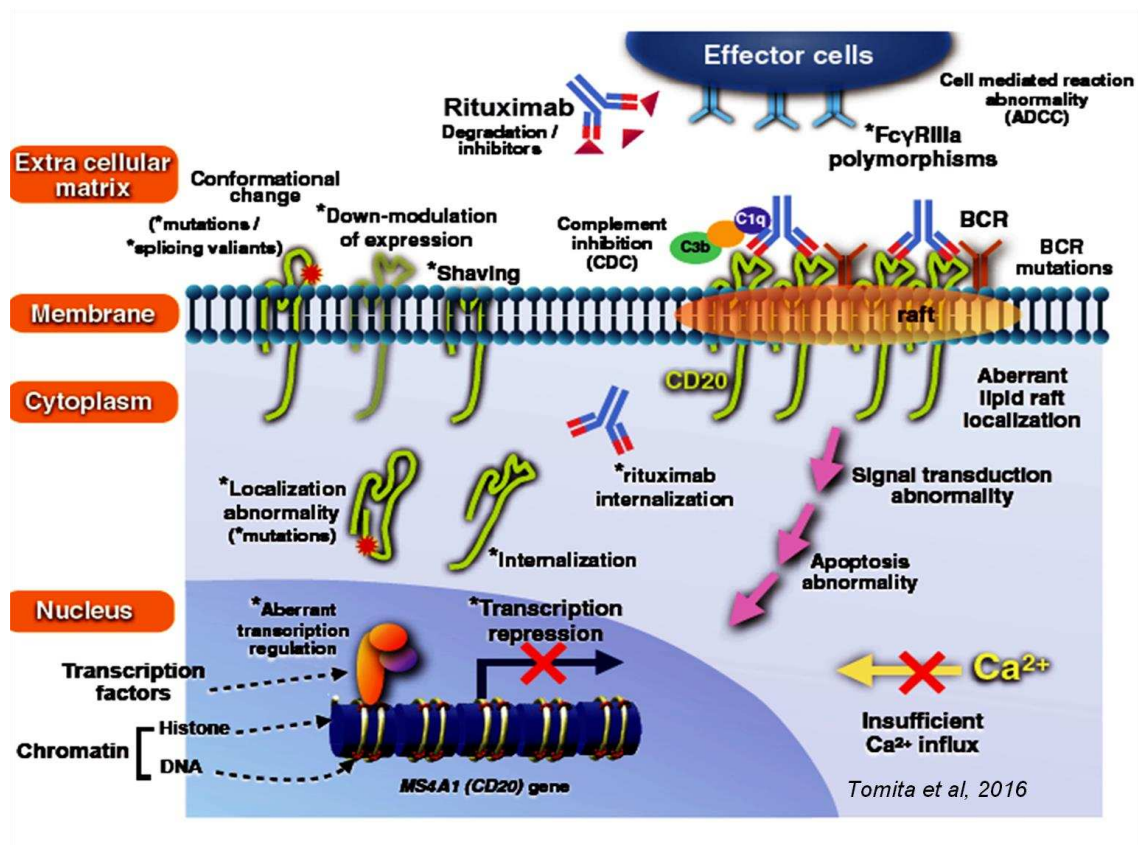


Figure 17 : Mécanismes de la modification de l'expression du CD20 et des résistances au rituximab. L'expression, la structure et la localisation du CD20 peuvent être modifiées (i) génétiquement et épigénétiquement comme par l'apparition de mutations, la présence d'une isoforme tronquée, la diminution de l'expression de la protéine et des ARNm du CD20, (ii) la digestion (Shaving) par des phagocytes, l'internalisation du CD20 dans le cytoplasme. Les résistances au rituximab peuvent également être dues notamment à un défaut de l'ADCC suite à un polymorphisme du récepteur FcγRIIIa des effecteurs cellulaires recrutés, ou à une inhibition de la CDC suite à l'expression par les cellules tumorales B de protéines anti-complémentaires (Tomita., 2016).

De plus, **des mécanismes de résistances au rituximab** ont été identifiés et comme ce sont ces résistances qui ont fait l'intérêt de notre travail de thèse, nous allons nous y arrêter plus spécifiquement dans le prochain paragraphe. Nous verrons un peu plus loin que des stratégies thérapeutiques et des anti-CD20 de 2^{ième} et 3^{ième} génération ont été aussi développés pour obtenir de meilleures réponses des patients, et tenter de diminuer les échappements et rechutes.

2.4.4 Les résistances au rituximab

Plusieurs mécanismes à l'origine des résistances thérapeutiques au R-CHOP ont été décrits pour chacun des effets anti-tumoraux du rituximab, à savoir des résistances au niveau de la CDC, de l'ADCC, de l'apoptose directe, mais également au niveau de la modification de l'expression membranaire du CD20. On peut rassembler ces mécanismes en 2 groupes : 1) les anomalies de la liaison du rituximab au CD20 et 2) les défaillances dans les mécanismes après la liaison du rituximab au CD20 (*figure 17*).

2.4.4.1 Résistances liées à des anomalies de la liaison du rituximab

Plusieurs évènements peuvent se produire chez les patients et interférer avec la liaison du rituximab au CD20 (Tomita, 2016) comme (*figure 17*) :

- des mutations/délétions de *MS4A1*,
- l'expression anormale de variants d'épissage des ARNm codant le CD20 : pour exemple, une forme tronquée a été décrite par Henri et collaborateurs (2010) qui a perdu la partie codée par les exons 3 à 7, résultant en une forme intracytoplasmique du CD20.
- une diminution de la densité du CD20 à la surface des cellules : il s'agit ici de la cause principale des résistances au rituximab et plus généralement aux anti-CD20 (Oflazoglu and Audoly, 2010; Tomita, 2016). Cette diminution de l'expression membranaire du CD20 est multifactorielle. *Notre thématique de thèse a portée spécifiquement sur ces modifications d'expression membranaire en lien direct avec la sensibilité des cellules B tumorales aux effets cytotoxiques des anti-CD20.* Nous les détaillerons donc dans un paragraphe spécifique.

2.4.4.2 Résistances liées à des anomalies des mécanismes effecteurs du rituximab après sa liaison au CD20

On peut attribuer ces résistances à un certain nombre d'anomalies (Tomita, 2016), comme (*figure 17*) :

- un défaut de localisation du CD20 dans les rafts, et par conséquence de sa signalisation.
- une insuffisance de la CDC par l'augmentation de l'expression de protéines anti-complémentaires ou CRP (Complement Regulatory Proteins) comme CD46, CD55 et CD59 interférant avec l'activation de la cascade du complément et/ou de la formation du complexe d'attaque membranaire (Hu et al., 2011; Takei et al., 2006). Cette expression confère aux cellules B tumorales une protection contre la lyse du complément.
- une ADCC moins efficace notamment due aux polymorphismes du Fc γ R et notamment le polymorphisme du Fc γ RIIIa (CD16) décrit en 1997 (Koene et al., 1997), avec la substitution d'une phénylalanine (F) en une valine (V) en position 158. Les patient hétérozygotes (VF) ont un récepteur de moins bonne affinité et présentent une réponse à l'ADCC moins efficace que les patients homozygotes (FF) (Cartron et al., 2002).

La reconnaissance de la portion Fc de l'anticorps par les cellules effectrices peut dépendre aussi de changements de la conformation des complexes CD20/rituximab dans la membrane cellulaire. En effet, le cholestérol semble jouer un rôle important dans l'effet du rituximab. Une étude a montré qu'en présence de statines qui inhibent la synthèse de cholestérol, l'ADCC médiée par le rituximab est altérée *in vitro*, suggérant que des modifications des radeaux lipidiques pourraient conduire à une résistance à l'ADCC (Rezvani and Maloney, 2011).

- Finalement, en dehors des cas de DH DLBCL ou de DE DLBCL, qui présentent une surexpression d'oncogènes avec des propriétés anti-apoptotiques, un défaut de l'apoptose peut aussi être responsable de résistances au rituximab. La fixation du rituximab sur le CD20 peut induire directement, comme nous l'avons évoquée, l'apoptose de la cellule en modifiant des voies de signalisation de survie. De façon inattendue, l'expression prolongée des cellules B tumorales au rituximab transforme les cellules en cellules résistantes au rituximab. Cette résistance n'était pas due à une régulation de l'expression du CD20 mais à la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 notamment en lien avec la surexpression de la voie NF- κ B et à une régulation négative des protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bak (Jazirehi et al., 2007). Ainsi, une balance s'établit dans les cellules tumorales entre les régulateurs pro et anti-apoptotiques à l'origine de la sensibilisation à l'apoptose. L'utilisation d'inhibiteurs de ces voies de signalisations de survie permet, en dérégulant cette balance du

côté des facteurs pro-apoptotiques, de re-sensibiliser les cellules au rituximab (Jazirehi et al., 2007). De même, certaines résistances à l'apoptose induite par le rituximab pourraient impliquer des boucles de régulation autocrines/paracrines réalisées par des cytokines anti-apoptotiques, comme l'IL10, capables d'augmenter l'expression de BCL2 et donc de contrarier les effets du rituximab. Ainsi, dans les DLBCL des sous-types GCB et ABC, une très forte expression des gènes associés à la signalisation de l'IL10 a été retrouvée suggérant l'importance de cette signalisation dans la survie de ces cellules tumorales (Béguelin et al., 2015).

2.4.4.3 Les mécanismes impliqués dans la perte du CD20 membranaire

Le mécanisme le plus important de résistance au rituximab est sans doute la perte de l'expression du CD20 à la membrane des cellules. En effet, la réponse au traitement peut être influencée par le taux de CD20 qui est différent entre chaque patient, et les DLBCL se situent parmi les B-NHL exprimant le plus fortement le CD20 (Prevodnik et al., 2011).

Des études cliniques ont très tôt décrit la modification du phénotype des cellules tumorales B des patients de DLBCL suite au traitement par le rituximab, avec une diminution et même la perte du CD20 membranaire corrélée à une survie inférieure des patients (Alvaro-Naranjo et al., 2003; Hiraga et al., 2009; Johnson et al., 2009a; Miyoshi et al., 2012). La perte du CD20 suite au traitement par le rituximab ne s'expliquait pas par des mutations du gène *MS4AI*, et était retrouvée avec une plus forte incidence chez des patients résistants après un premier traitement comme chez des patients réfractaires (Miyoshi et al., 2012). Ces observations ont été confirmées sur des lignées humaines de DLBCL traitées au rituximab, allant jusqu'à l'obtention d'un phénotype CD20 négatif des cellules. Notamment, des lignées cellulaires issues de patients DLBCL devenus négatifs en CD20, ont été établies et les mécanismes moléculaires liés à ce nouveau phénotype analysés. Il a été observé que les lignées CD20 négatives bien que n'exprimant plus le CD20 membranaire, gardaient un niveau d'expression des ARNm du CD20, bien que plus faible par rapport aux lignées CD20 positives. La CDC du rituximab était dépendante du niveau d'expression du CD20 et les lignées au phénotype nul étaient, comme attendu, complètement résistantes. Ces résultats ont conforté l'hypothèse du rôle déterminant de cette perte d'expression du CD20 dans les résistances au rituximab (Sonoki et al., 2009; Tomita, 2016; Tomita et al., 2007).

Comme nous l'avons déjà indiqué, la liaison du CD20 par les anti-CD20 induit une rapide redistribution du CD20 dans les rafts. Cette relocalisation a été décrite comme nécessaire à son activité de canal calcique, cependant elle n'entraînerait pas l'internalisation du CD20 (Janas et al., 2005). Plusieurs autres mécanismes ont alors été évoqués et confirmés de façon indépendante soit chez les patients, soit à partir de lignées cellulaires de DLBCL (**figure 17**) ; il s'agit notamment de la régulation négative de l'expression de *MS4A1* et de la digestion (shaving) de la partie extracellulaire du CD20, par des monocytes.

Concernant la régulation négative de l'expression de *MS4A1* : Plusieurs études ont montré que les modifications d'expression du CD20 après un traitement par le rituximab seraient dues, au moins partiellement, à des mécanismes épigénétiques induits par le rituximab (Czuczman et al., 2008; Hiraga et al., 2009; Miyoshi et al., 2012). En effet, dans l'étude de Hiraga et collaborateurs en 2009, la quantification par RT-PCR des ARNm du CD20 des patients a révélé que ces taux étaient diminués dans les cellules ayant perdu le CD20, comparativement aux cellules du même patient CD20 positives ; de plus, lorsqu'ils traitent *in vitro* les cellules CD20 négatives des patients avec un inhibiteur des ADN méthyltransférases (5-aza-2'-deoxycytidine), l'expression des ARNm du CD20 réaugmente après 3 jours, restaurant l'expression de la protéine et la sensibilité au rituximab. Cependant, comme nous l'avons évoqué, il s'agit sans doute de mécanismes indirects ne mettant pas en jeu directement la déméthylation de *MS4A1* mais résultant plutôt de l'inhibition de complexes répresseurs (**figure 15**). De la même façon, après avoir montré *in vitro* l'augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine CD20 dans des lignées cellulaires traitées avec des inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi) (trichostatine A, acide valproïque) (Tomita et al., 2007), la place des HDACi a été évoquée dans des approches thérapeutiques. Cependant peu d'études cliniques ont évalué l'efficacité des drogues « épigénétiques » sur l'expression du CD20 des patients ; dans le cas des DLBCL une étude, faite sur 3 patients, indique une augmentation de l'expression du CD20 chez les patients prétraités avec l'acide valproïque 48h avant le R-CHOP (Damm et al., 2015). De façon générale, l'augmentation de l'expression du CD20 reste modérée et l'efficacité de ces traitements varie d'un patient à l'autre (Tomita, 2016).

En conclusion, la stimulation de l'expression du CD20 par des drogues à visée épigénétique devrait permettre de contrer les effets « pro-tumoraux » du rituximab car permettant l'échappement des cellules tumorales, et d'augmenter la CDC et l'ADCC ; cependant, leur impact sur la survie des patients reste à prouver.

Concernant la perte d'expression du CD20 membranaire il faut aussi rappeler qu'une isoforme tronquée du CD20, issue d'un épissage alternatif, a été mise en évidence dans des cellules B de

patients atteints notamment de DLBCL. Cette isoforme est intracellulaire et serait impliquée dans la réduction d'expression de la forme sauvage. Sa présence serait également corrélée avec la résistance des patients au rituximab (Henry et al., 2010).

Enfin, un mécanisme très particulier a été décrit, appelé « shaving » ou « rasage », pour expliquer la disparition du CD20 et certaines résistances au rituximab (Beum et al., 2006). Dans ce contexte, les complexes CD20/rituximab sont retirés de la surface des cellules B non par endocytose mais par les monocytes reconnaissant l'anticorps par leur récepteurs Fc (Beum et al., 2006). Il s'agit d'un mécanisme de trogocytose où un fragment membranaire est transféré d'une cellule donneuse (ici la cellule tumorale B) à une cellule receveuse (ici les monocytes). Ce processus a été décrit *in vitro* et *in vivo* pour plusieurs anti-CD20 dont le rituximab (Taylor and Lindorfer, 2015). Une étude réalisée à partir de cellules B humaines périphériques prélevées chez des individus sains, mises en présence d'anti-CD20 et de cellules phagocytaires, montre que l'internalisation (endocytose) des complexes CD20/anti-CD20 a bien lieu ; cependant, le « shaving » est observé très rapidement et beaucoup plus tôt que l'endocytose. Ainsi, ce processus de « shaving » est probablement le mécanisme primaire déterminant la baisse rapide et importante du CD20 chez les patients suite à la perfusion par le rituximab (Beum et al., 2011). Les monocytes semblent être responsables de ce mécanisme, alors que les cellules NK, qui elles aussi reconnaissent la partie Fc de l'anticorps grâce à leurs FcγR, induisent plutôt l'ADCC. L'efficacité du rituximab pourrait donc théoriquement être améliorée en augmentant la fonction des cellules NK et en inhibant celle des monocytes favorisant l'ADCC par rapport au mécanisme de « shaving » (Beum et al., 2008). Enfin, à tous ces mécanismes, pourrait s'ajouter la sélection suite à l'exposition du rituximab de clones de cellules B tumorales présentant une faible expression du CD20, ce qui pourrait expliquer aussi des rechutes (Tomita, 2016).

2.4.5 Evolution de l'immunothérapie anti-CD20 et nouvelles cibles

Bien que notre travail de thèse ait essentiellement porté sur le rituximab, nous présentons ici de façon sommaire l'évolution des anti-CD20 ainsi que les autres approches de l'immunothérapie.

2.4.5.1 Autres anti-CD20

La compréhension des mécanismes de résistances a permis l'exploration d'un certain nombre d'approches pour améliorer l'efficacité de l'immunothérapie ; de nouveaux anti-CD20 ont été développés avec 2 objectifs : améliorer la tolérance et l'efficacité clinique.

Pour augmenter la tolérance, il a fallu baisser l'immunogénicité : cela correspond au développement d'anti-CD20 humanisés tels que l'obinutuzumab (ou GA101, approuvé par la FDA en 2013) et humains comme l'ofatumumab (approuvé par la FDA en 2009), beaucoup moins immunogènes que les premiers anti-CD20 chimériques comme le rituximab.

Pour augmenter l'efficacité clinique, plusieurs leviers ont été utilisés comme :

- le changement de la région complémentaire (CDR, complementary-determining region) à l'épitope reconnu par l'anti-CD20 car la conformation de l'épitope influe sur la liaison avec l'anti-CD20 : avec des variants du rituximab dans lesquels des points de mutations ont été introduits dans la région de liaison avec le CD20 (Li et al., 2009) ou l'exemple de l'ofatumumab qui cible un épitope à cheval entre la petite et la grande boucle extracellulaires du CD20 (**Figure 14**) (Klein et al., 2013; Pérez-Callejo et al., 2015).

- la modification de la composition biochimique de l'anti-CD20 permettant aussi d'influer sur sa liaison à sa cible, comme les modifications de la glycosylation (glycoengineering) de la partie Fc de l'anticorps. C'est le cas de l'obinutuzumab qui présente une région Fc non fucosylée permettant une meilleure liaison au récepteur FcγRIIIa des cellules effectrices. C'est aussi le cas de l'ublituximab (EMAB-6) qui contient peu de fucose dans la région Fc

Les anticorps anti-CD20 ont été alors classés en deux sous-type : Type I et Type II en fonction de l'épitope reconnu et de leur effet après liaison au CD20. Les anticorps de Type I déterminent, après liaison, la translocation et la stabilisation du CD20 dans les radeaux lipidiques ce qui augmenterait le recrutement et l'activation du complément. Ainsi les anti-CD20 de type I induisent fortement la CDC mais plus faiblement l'apoptose directe *in vitro* (Barth et al., 2012; Du et al., 2009). Les anticorps de Type II ne stabilisent pas le CD20 dans les radeaux lipidiques et induisent plus faiblement la CDC, en revanche ils semblent être plus efficace dans l'induction de l'ADCC. De plus ce sont de forts inducteurs de la mort cellulaire. L'explication biologique de cette différence entre le type I et le type II serait liée à une stœchiométrie de liaison basée sur le ratio 2:1 pour les anti-CD20 de type I. Un anticorps de type I est lié à 2 tétramères de CD20 (inter-tétramères), ce qui permettrait l'accumulation des CD20 dans les rafts ; alors que chaque anticorps de type II relie 2 CD20 d'un même tétramère

Tableau 2 : Les différents anti-CD20 : Mécanismes cytotoxiques et aspects cliniques (Polito et al., 2014)

| | Cytotoxic Mechanisms Compared To RTX | Clinical Trials | FDA Approval |
|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|----------------|
| First Generation | | | |
| RTX | CDC, ADCC, apoptosis | I, I/II, II, III, IV | Yes |
| Second Generation | | | |
| Ofatumumab | ↑CDC | I/II, II, and III | In development |
| Veltuzumab | ↑CDC | I/II | In development |
| Ocrelizumab | ↑ADCC, ↓CDC | I/II | In development |
| Third Generation | | | |
| RhumAb v114 | ↑affinity to FcγRIIIa (↑ADCC) | I | Terminated |
| Ocaratuzumab | ↑affinity to FcγRIIIa (↑ADCC), ↑CDC | I | In development |
| Obinutuzumab | ↑affinity to FcγRIIIa (↑ADCC) | I, I/II, II, III, and IV | Yes |
| TRU-015 | Apoptosis | I/II | Terminated |
| EMAB-6 | ↑affinity to FcγRIIIa (↑ADCC) | I and I/II | In development |

(intra-tétramère) (Klein et al., 2013). La plupart des anti-CD20 existants, y compris le rituximab, se retrouvent dans le type I. Ces anticorps de Type I et de Type II intègrent des anticorps de 1^{ière}, 2^{ième} ou 3^{ième} génération. Le rituximab est un anticorps de la première génération, les anticorps anti-CD20 de 2^{ième} génération incluent les anticorps humanisés, l'ocrelizumab et le veltuzumab, et l'ofatumumab entièrement humain ; ceux de 3^{ième} génération incluent le RhumAb v114, l'ocaratumumab (AME-133v), l'obinutuzumab (Gazyva), le TRU-015 (anti-CD20 simple chaîne) et l'ublituximab (EMAB-6). L'objectif principal de ces nouveaux anticorps de 3^{ième} génération est d'augmenter l'efficacité thérapeutique chez tous les patients, et notamment chez ceux qui présentent des variants de faible affinité des récepteurs FcR sur les cellules effectrices immunitaires responsables de l'ADCC (Singh et al., 2015) (*tableau 2*).

Tous ces anti-CD20 ont montré la plupart du temps *in vitro* une plus forte efficacité par rapport au rituximab mais les essais cliniques, encore en cours pour certains, n'ont pas permis pour l'instant de prouver leur meilleure efficacité sur la survie des patients comparativement au traitement R-CHOP.

2.4.5.2 Autres cibles de l'immunothérapies

La grande diversité des mécanismes moléculaires impliqués dans ces pathologies et la stabilisation des taux de survie après traitement R-CHOP à des taux d'environ 60% à 5 ans a incité des recherches pour trouver d'autres cibles thérapeutiques et le développement de nouveaux traitements (Wang et al., 2020).

Dans le cas des DLBCL, plusieurs cibles moléculaires ont été identifiées en lien avec l'activation des cellules B et des cellules T. D'autres anticorps monoclonaux ciblant des marqueurs des cellules B parmi lesquels CD19 et CD22 ont été développés ou des régulateurs membranaires de la signalisation du BCR comme le CD79B ou le CD40. Ces approches en monothérapie n'ont pas donné de résultats bénéfiques pour les patients, mais peuvent s'avérer parfois intéressantes associées au traitement R-CHOP. Ainsi, dans une étude clinique de phase II, l'association de l'épratuzumab, anticorps humanisé anti-CD22, au R-CHOP a permis d'augmenter la survie sans progression (PFS) et la survie globale des patients atteints de DLBCL comparativement au R-CHOP seul (Micallef et al., 2011). De même, après une étude en phase II prometteuse, une étude de phase III est en cours utilisant un anti-CD79B (Polatuzumab vedotin) en association au R-CHOP dans les DLBCL (Wang et al., 2020).

Plus récemment ont été développés des anticorps bi-spécifiques comme les anti-CD19/anti-CD3 qui permettent d'engager le CD19, et donc les cellules B tumorales, en même temps que le CD3 et donc les effecteurs T cytotoxiques ; ces anticorps font partie des BiTEs (Bispecific T cell Engagers) et favorisent la formation d'une synapse T/B et la lyse des cellules B par les LTc. Des études cliniques de phase II ont été initiées dans les DLBCL ou sont en cours, cependant les premiers résultats montrent des toxicités neurologiques de grade 3 (Viardot et al., 2016).

Les progrès thérapeutiques semblent cependant pouvoir venir quand même de l'immunothérapie ciblant le microenvironnement immunitaire des tumeurs et notamment en lien avec les « check-points immunitaires » ; c'est le cas de l'axe PD-1/PDL-1 ou CTLA4/CD80/86 exprimés sur les LT activés (PD-1, CTLA4) et sur les cellules B tumorales (PDL-1 et CD80/86) dont les DLBCL (Kiyasu et al., 2015). Ces expressions correspondent à une stratégie de défense des cellules tumorales qui inhibent par cette expression la réponse cytotoxique des LTc activés. Différents anticorps ciblant PD-1 et PD-L1 ou CTLA4 ont été développés ces dernières années et sont pour la plupart en cours d'évaluation souvent en association avec le rituximab, dans le traitement des DLBCL réfractaires ou en rechute (Wang et al., 2020).

Finalement l'immunothérapie qui semble émerger avec des résultats déjà très prometteurs est celle associée à la thérapie cellulaire, et plus précisément la technologie des « CAR-T cells » (Chimeric Antigen Receptor T cells). Brièvement, il s'agit de cellules T modifiées génétiquement *in vitro* des patients pour leur permettre d'exprimer un récepteur chimérique ou CAR, spécifique d'une cible moléculaire (dans notre cas un marqueur des cellules B tumorales). L'avantage de ces LT autologues modifiés est que, contrairement au TCR qui nécessite une reconnaissance restreinte aux molécules du soi du CMH, leur CAR peut engager directement l'Ag, et sans nécessiter de molécules de co-stimulation ; en effet, des domaines d'activation et de co-activation ont été introduits dans la partie intracellulaire du CAR. Ces cellules T sont réinjectées au patient par voie intraveineuse après une phase de conditionnement chimiothérapeutique, et elles vont alors circuler jusqu'à reconnaître leur cible et détruire les cellules tumorales. La FDA a autorisé la mise sur le marché de 2 CAR-T, anti-CD19 des cellules B, en 2017 (axicabtagene ciloleucel) puis 2018 (tisagenlecleucel) et leur utilisation clinique pour les lymphomes agressifs dont les DLBCL. Les premiers résultats ont révélé des taux de réponses et des taux de rémission remarquables allant respectivement jusqu'à 80% et 58% en fonction des lymphomes, et ces nouvelles thérapies ont été proposées comme les nouveaux

traitements standards des DLBCL pour des patients réfractaires ou en rechute (Chavez et al., 2019; Locke et al., 2019). Cependant, malgré ces avancées thérapeutiques, il reste encore des patients qui ne répondent pas aux traitements et aussi des patients qui présentent des toxicités sévères secondaires. Il s'agit notamment du syndrome de libération cytokinique (CRS) ou « orage cytokinique », inhérent à la technologie des « CAR-T cells ».

2.5 Place des exosomes dans les DLBCL et les résistances thérapeutiques

Les exosomes sont des petites vésicules extracellulaires (small EVs) de taille nanométrique (50 à 150 nm de diamètre) libérées dans le milieu extracellulaire par divers types cellulaires, notamment du système immunitaire comme les lymphocytes B et l'ensemble des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Leur sécrétion, que nous étudierons en détails dans le prochain chapitre est réalisée à partir de la fusion d'endosomes multi-vésiculaires (ou corps multi vésiculaires, MBV) avec la membrane plasmique (Johnstone, 2005; Kharaziha et al., 2012). Les exosomes ont été détectés dans des fluides biologiques tels que le sang (Caby et al., 2005), la salive (Ogawa et al., 2011), ou le liquide céphalo-rachidien (Street et al., 2012). La plupart des études, réalisées notamment au début de leur découverte et même après, présentent des données sur des préparations d'exosomes dont il n'est pas toujours prouvé qu'elles soient pures et sans parfois l'identification de marqueurs protéiques de leur origine endosomale. Cependant, dans la majorité de ces études, les protocoles utilisés pour la préparation des exosomes sont basés sur des centrifugations différentielles, filtration avec des filtres de 0,22 μm et ultracentrifugation, ce qui indique une présence majoritaire de « small EVs » (moins de 150 nm). En effet, ces petites vésicules, dont les exosomes font partie, se retrouvent majoritairement concentrées dans les culots obtenus à 100 000g. Ainsi, il est probable que ces préparations soient un mélange de petites EVs dont l'origine subcellulaire reste hétérogène. Aussi, nous utiliserons pour la suite de ce paragraphe et pour le chapitre sur les exosomes, la nomenclature conseillée par les sociétés française, européenne et internationale des scientifiques travaillant sur les exosomes (EV-TRACK Consortium et al., 2017 ; Mateescu et al., 2017 ; Tkach et al., 2017 ; Théry et al., 2018). Nous parlerons donc, de façon générale et dans la plupart des cas des « small EVs », plutôt que des exosomes.

Ces microvésicules transportent de nombreuses molécules comme des protéines, des lipides et des informations génétiques (ARN) capables, une fois transférées à d'autres cellules, de

moduler leur fonction. Ainsi, comme nous le verrons aussi plus loin, les exosomes sont des acteurs importants du processus de communication intercellulaire. Les exosomes contiennent ou expriment des protéines structurales et communes à tous les exosomes, mais présentent aussi à leur surface notamment des protéines spécifiques, signature de leur cellule d'origine. Ainsi, les « small EVs » sécrétées par les cellules B normales ou malignes expriment, le marqueur CD20, cible aussi de l'immunothérapie (Clayton et al., 2001; Oksvold et al., 2014).

La découverte que la plupart des cellules cancéreuses étaient capables de sécréter des exosomes appelés TEX (Tumor-derived exosomes), en quantité plus importante que les cellules normales a suscité un intérêt scientifique important pour comprendre leur fonction physiopathologique (Record et al., 2014). Les données expérimentales montrent globalement que ces « small EVs » peuvent avoir plusieurs rôles dans le processus tumoral, sur lesquels nous reviendrons (Kahlert and Kalluri, 2013; Yu et al., 2015). Notamment, en exprimant des marqueurs de surface de la cellule d'origine, ils peuvent interférer avec l'action des anticorps de l'immunothérapie en modulant leur liaison aux cellules tumorales. C'est aussi le cas pour les cellules de lymphomes B qui sécrètent des « small EVs » exprimant le CD20, cible des anticorps thérapeutiques, ce qui déterminerait des « récepteurs leurres » pour les anti-CD20 thérapeutiques. Au moment du démarrage de notre thèse quelques études commençaient à être publiées sur le rôle « small EVs » dans le développement et la progression des cancers mais aussi dans les résistances thérapeutiques des DLBCL. Plus particulièrement, les travaux pionniers de Aung et collaborateurs ont permis de démontrer la fixation des anti-CD20 aux CD20 des « small EVs », conférant une protection des cellules tumorales vis-à-vis des effets cytotoxiques induits par les anti-CD20. Cette étude, certes réalisée seulement *in vitro*, suggérait que ces petites vésicules participaient par ce processus aux mécanismes d'échappement thérapeutique dans les lymphomes B agressifs (Aung et al., 2011).

Ainsi peu de données concernaient la fonction potentiellement déterminante de la sécrétion de ces petites vésicules parmi lesquelles les exosomes dans les lymphomes agressifs comme les DLBCL, et notamment les sous-types GCB versus ABC. Or, la modulation de l'expression du CD20 comme d'autres régulateurs membranaires (ex : PD-L1) au niveau cellulaire comme exosomal représente un élément central des futures stratégies thérapeutiques de ces cancers. De plus, les exosomes dérivant des cellules tumorales et circulants dans le sang apparaissent désormais comme une possibilité d'obtenir des informations de façon non-invasive sur les tumeurs des patients (contrairement aux biopsies tissulaires) et font partie à ce titre des biopsies

dites « liquides ». Ils pourraient devenir de nouveaux biomarqueurs des cancers à valeur diagnostique et/ou pronostique. *C'est pourquoi nous avons décidé de nous intéresser à l'étude des « small EVs » et si possible des exosomes au cours de notre thèse et à leur éventuel rôle dans les résistances au rituximab, ainsi qu'à l'impact de différents traitements sur leur sécrétion ; dans ce contexte, nous nous sommes concentrés plus particulièrement sur la stimulation de la voie de survie impliquant l'axe TrkB/BDNF préalablement décrite dans les DLBCL avant mon arrivée dans le laboratoire (Dubanet et al., 2015).*

III. Petites vésicules extracellulaires, exosomes et cancers, cas des DLBCL

3.1 Généralités sur les vésicules extracellulaires

Chez les organismes multicellulaires, les cellules ont la capacité de communiquer entre elles et avec leur microenvironnement, ce qui assure la coordination des fonctions des différents types cellulaires et l'homéostasie tissulaire. Pendant longtemps, on a imaginé qu'il n'existait que 3 moyens pour échanger des informations entre les cellules : par contact direct cellule à cellule (ex : synapse neurale ou synapse immunitaire), par le biais des jonctions de type « gap », ou par la sécrétion de facteurs solubles dans le milieu extracellulaire. Puis à partir des années 70, des équipes ont découvert une autre alternative de communication intercellulaire : la libération de vésicules extracellulaires (EVs), c'est-à-dire des vésicules contenant du cytosol issu de la cellule sécrétrice et délimitées par une bicouche lipidique (Abels and Breakefield, 2016; Crawford, 1971; Raposo and Stoorvogel, 2013). Initialement on pensait que c'était une façon pour les cellules de se débarrasser de matériels devenus inutiles/toxiques, ou des débris cellulaires suite à la mort des cellules. Puis, on s'est aperçu qu'il s'agissait d'un processus largement conservé dans l'échelle animale qui permet le transfert à partir d'une cellule « donneuse » de molécules biologiquement actives localement ou à distance, et qui vont finalement réguler l'expression génique et/ou la fonction cellulaire de cellules « réceptrices » (Abels and Breakefield, 2016; Campanella et al., 2019; Raposo and Stoorvogel, 2013). Les EVs sont très hétérogènes sur le plan de leur origine, taille, composition et propriétés fonctionnelles ; leur composition dépend de la cellule d'origine et du microenvironnement, y compris des conditions de culture *in vitro*. Leur contenu ou cargaison (« cargo ») consiste en des lipides, acides nucléiques et protéines, notamment des protéines associées à la membrane plasmique, le cytosol et le métabolisme lipidique. La classification de ces vésicules repose sur leurs propriétés morphologiques (taille, densité), leurs mécanismes de biogenèse, leur composition

Tableau 3 : Principales caractéristiques de toutes les vésicules extracellulaires et des différentes sous-classes (d'après Mallia et al., 2020).

| | | Sous-classes d'EV | | |
|------------------|--|---|---|---|
| | EVs | Exosomes | Microvésicules | Corps Apoptotiques |
| Diamètre | Small EVs : <100 ou < 200 nm | 50-150 nm | 50-1000 nm | 500-4000 nm |
| Densité | Faible densité Densité moyenne Forte densité | Entre 1,08-1,19g/ml | | 1,16-1,28g/ml |
| Biogénèse | Sécrétées naturellement par les cellules. L'affectation de l'EV à une voie de biogénèse particulière est parfois difficile à moins d'utiliser des techniques d'imagerie en direct | Endosome multivésiculaire | Bourgeonnement de la membrane plasmique | Vésicules se détachants de la cellule apoptotique |
| Marqueurs | Protéines transmembranaires, tissus non spécifiques (tétraspanines, CMHI, intégrines, LAMP1/2, héparanes sulfates etc...) Protéines cytosoliques, lipides ou protéines membranaires (ESCRT, ALIX, flotillines 1 et 2, cavéolines, annexines, HSP, synténine) et HSP70, actine tubuline, GAPDH | Complexe ESCRT (ALIX, TSG101), tétraspanines (CD63, CD9, CD81 et CD82), Flotillines, protéines HSP (HSC70, HSP60, HSP70, HSPA5, CCT2 et HSP90), Sélectines, intégrines, annexines (A1 et V) | | Phosphatidylsérines, histones, annexine V, TSP et C3b |
| | | ALIX ? | | |

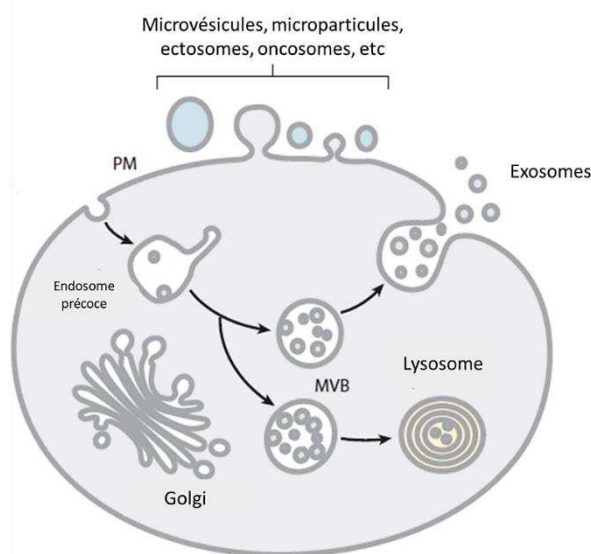


Figure 18 : Représentation schématique des différents types de vésicules secrétées à partir du bourgeonnement de la membrane plasmique, ou d'origine intracellulaire issues de la fusion de compartiments endosomiques multivésiculaires (MVB) avec la membrane plasmique (Colombo et al., 2014).

biochimique, notamment protéique, et celle de leur cargaison, et leur voie de libération (*figure 18*).

En effet, les EVs peuvent être classées en trois catégories principales: exosomes, microvésicules (MV) et corps apoptotiques que l'on peut regrouper en 2 catégories en fonction de leur biogénèse (*tableau 3*) (Mallia et al.,2020) :

- Les microvésicules (50 à 1000 nm et plus) et les corps apoptotiques (500 à 4000 nm) correspondent aux vésicules membranaires directement formées à partir de la membrane plasmique ; leur libération est réalisée par bourgeonnement vers l'extérieur de la membrane plasmique médiée par le remodelage du cytosquelette et les réarrangements des phospholipides.
- les exosomes (parmi les plus petites, 50-150 nm) d'origine endosomale, sont produits sous forme de vésicules intraluminales (ILV) dans des corps multivésiculaires (MVB) et sont libérés dans l'environnement extracellulaire par fusion avec la membrane plasmique.

Ainsi, si on différencie les EVs par leur taille, on aura le groupe des petites vésicules extracellulaires ou « small EVs » (< à 200 nm) et le groupe des moyennes et grandes EVs (>200 nm).

Les exosomes font donc partie des « small EVs » issues de la voie endosomale, et leur densité est comprise entre 1,08 et 1,19 g/ml (Mallia et al.,2020). Ils ont été découverts plus tardivement dans le milieu des années 80 par les groupes de P. Stahl et R. Johnstone (Harding et al., 1983; Johnstone et al., 1987; Pan and Johnstone, 1983) en étudiant la maturation des globules rouges. En raison de leur origine endosomale, les exosomes contiennent des protéines issues du processus d'endocytose et de la formation d'endosomes multivésiculaires ou corps multivésiculaires (MVB) (comme les protéines de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) et leurs partenaires avec par exemple ALIX et TSG101), de la membrane plasmique (comme des tétraspanines ou les protéines du CMH, complexe majeur d'histocompatibilité) ou du cytosol, mais pas de protéines nucléaires, mitochondriales, du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi (Théry et al., 2018).

Les exosomes sont sécrétés en condition normale comme pathologique, notamment lors d'une infection ou d'un processus tumoral, par quasiment tous les types cellulaires (Kharaziha et al., 2012; Wubbolts et al., 2003). Cependant, comme nous l'avons évoqué précédemment, la plupart des études notamment conduites à la fin des années 80 et début 2000 parlaient

d'exosomes sans systématiquement donner la preuve de l'origine endosomale de leurs EVs. En effet, à cette époque, les marqueurs exosomaux n'étaient pas tous validés de façon collective par la communauté scientifique internationale, ni les méthodologies permettant cette purification. Aussi, nous parlerons le plus souvent de « small EVs » plutôt que d'exosomes. Les études *in vitro* ont permis l'identification de leur sécrétion notamment : par les cellules d'origine hématopoïétique (lymphocytes T et B, cellules dendritiques, mastocytes, réticulocytes, plaquettes) (Pan et al., 1985; Peters et al., 1989; Raposo et al., 1997; Rialland et al., 2006; Wubbolts et al., 2003) les cellules épithéliales (van Niel et al., 2001), les neurones (Fauré et al., 2006) ou les adipocytes (Lazar et al., 2016). Leur sécrétion peut-être : (i) induite comme par exemple pour les lymphocytes T et B lors de l'activation par l'Ag (Peters et al., 1989; Rialland et al., 2006), ou (ii) constitutive comme cela a été démontré pour les lymphocytes B infectés et transformés par l'EBV (Epstein-Barr Virus) (Raposo et al., 1996), les cellules dendritiques (Zitvogel et al., 1998), les macrophages (Bhatnagar et al., 2007) tout comme aussi la majorité des lignées cellulaires tumorales (Wolfers et al., 2001). De part leur taille, les exosomes peuvent facilement circuler et diffuser dans les tissus et organes. La réalité physiologique de la sécrétion des EVs, dont les exosomes, *in vivo* a été démontrée par leur mise en évidence dans la majorité des fluides biologiques (sang, urine, lait, salive, liquide amniotique, liquide cébrospinal...) (Admyre et al., 2007; Asea et al., 2008; Caby et al., 2005; Colombo et al., 2014; Ogawa et al., 2011; Pisitkun et al., 2004). Une fois sécrétées, ces petites vésicules circulent et peuvent contacter des cellules de leur environnement pour leur transférer leur « cargaison », allant jusqu'à modifier la fonction et/ou le comportement de ces cellules. Ainsi, ces petites vésicules ont un rôle majeur dans les processus de communication intercellulaire.

Ainsi, ces différentes découvertes ont accentué l'intérêt des scientifiques pour les exosomes, et même si les microvésicules et d'autres vésicules membranaires avaient été étudiées pour leurs fonctions de communication pendant plusieurs décennies, le terme « exosomes » a commencé à être de plus en plus employé aux dépens de celui des « microvésicules » dans la littérature scientifique à partir des années 2000. Cela a donc donné l'impression que les exosomes étaient plus intéressants à étudier et avaient plus de potentiel biomédical que les autres vésicules extracellulaires (Tkach et al., 2017). Or, les connaissances actuelles sur les fonctions respectives des exosomes et des autres vésicules ne sont pas assez pointues pour certifier cette hypothèse. De plus, aucun marqueur ni méthodes de purification, sur lesquelles je reviendrai à la fin de ce manuscrit, ne permettent aujourd'hui d'affirmer que l'on a des préparations pures d'exosomes.

C'est pourquoi, comme nous l'avons déjà dit, nous emploierons régulièrement au cours de ce manuscrit le terme de petites vésicules extracellulaires (« small EVs »).

3.2 La Biogenèse des exosomes

Les exosomes étant d'origine endosomale, leur biogénèse démarre à partir de la formation de vésicules intraluminales (ILV) dans les corps multivésiculaires (MVB), pour finalement se terminer par la fusion de ces MVB avec la membrane plasmique et donc leur libération dans l'espace extracellulaire. Comme nous allons le voir aussi, la composition des exosomes est étroitement liée à la machinerie permettant la formation de ces ILVs.

3.2.1 Aspects morphologiques et dynamiques : de la maturation d'endosomes précoces à la formation de MVB et la libération des exosomes

L'endocytose permet à la cellule de dégrader, recycler ou libérer (exocytose) des protéines, lipides ou acides nucléiques. Les particules (y compris cellules notamment en apoptose) entrent dans la cellule par « phagocytose » réalisée par des cellules spécialisées appelées « phagocytes » (ex : macrophages) ; cependant tous les types cellulaires peuvent aussi internaliser des molécules solubles, il s'agit alors de pinocytose. Ce processus conduit à la formation d'endosomes, par invagination de la membrane plasmique selon plusieurs modalités notamment dépendantes ou pas de clathrine ou de cavéoline, en fonction du « cargo » transporté et de la machinerie protéique de transport utilisée (Abels and Breakefield, 2016). Toutes ces vésicules endocytiques fusionnent finalement en un compartiment intracellulaire appelé « endosome précoce ».

A l'intérieur du système endosomal, les endosomes sont répartis en différents compartiments : endosomes précoces (EE, Early Endosomes), endosomes tardifs (LE, Late Endosomes) et endosomes de recyclage selon que la destinée de leur contenu est la dégradation, le recyclage ou la sécrétion (Grant and Donaldson, 2009). Ainsi, le contenu à recycler des vésicules endocytiques se fera dans les EE, puis les molécules à recycler seront adressées aux endosomes de recyclage (cas notamment du recyclage de certains récepteurs membranaires), les autres endosomes matureront en LE (*figure 19*).

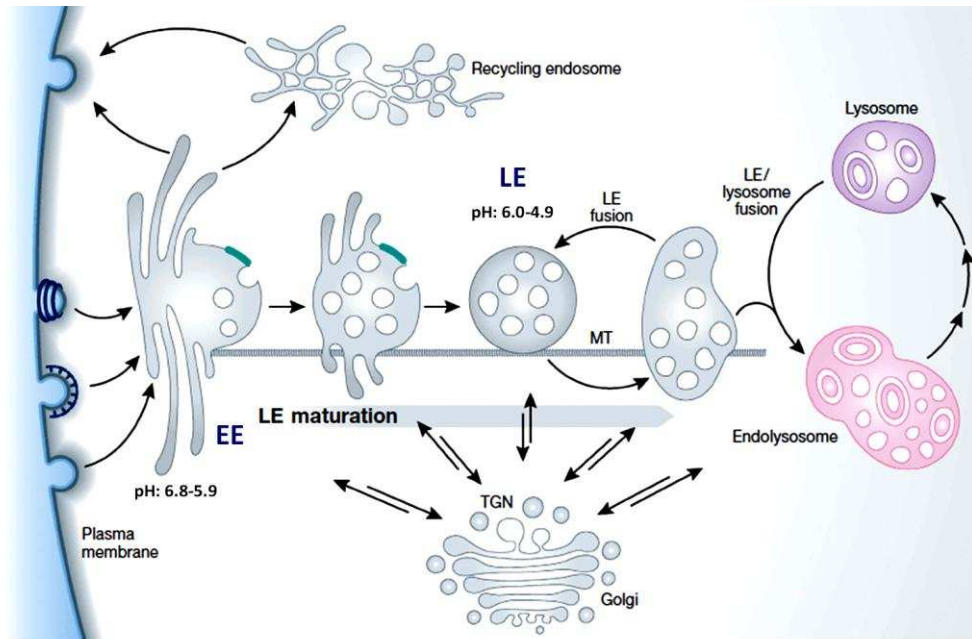


Figure 19 : Maturation des compartiments endosomaux suite au processus d'endocytose cellulaire. Les vésicules endocytaires primaires délivrent leur contenu et leur membrane aux endosomes précoces (EE) dans le cytoplasme périphérique. Les EE vont maturer en endosomes tardifs (LE) en se déplaçant vers l'espace périnucléaire le long des microtubules (MT). Les LE se forment en héritant des domaines vacuolaires du réseau EE qu'ils combinent en route avec des hydrolases lysosomales nouvellement synthétisées et des composants membranaires de la voie de sécrétion. Ils subissent des réactions de fusion, grossissent et acquièrent plus de vésicules intraluminales (ILV). Ils continuent de subir un processus de maturation qui les prépare à la fusion avec les lysosomes, générant un endolysosome, dans lequel une dégradation active a lieu. L'endolysosome est converti en un lysosome dense, qui constitue un organe de stockage pour les hydrolases lysosomales et les composants membranaires (Huotora and Helenius., 2011).

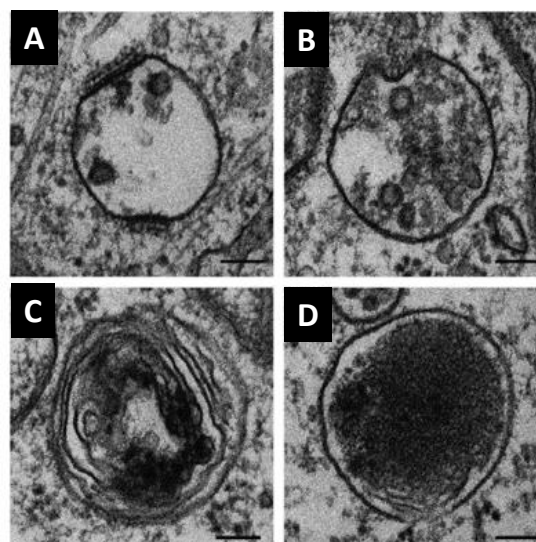


Figure 20 : Morphologie des endosomes et des lysosomes au sein de cellules HeLa observée en microscopie électronique. A : Endosome précoce avec des réseaux de clathrine et quelques ILVs, B : Endosome tardif contenant beaucoup d'ILVs, C : endolysosome, D : lysosome avec un lumen dense aux électrons. Echelle : 100nm (Huotari and Helenius., 2011).

Les EE ont été définis pour la première fois dans les années 80 comme le compartiment qui reçoit les cargaisons et les fluides entrants (Helenius et al., 1983). Ce sont des structures complexes avec des domaines tubulaires et des domaines vacuolaires localisées à la périphérie des cellules où se fait un tri des molécules internalisées. La biogénèse de ce compartiment n'est pas totalement bien définie mais l'étude de sa composition membranaire et de son contenu laissent penser qu'il est formé à partir de vésicules d'endocytose qui fusionneraient entre elles ; il a été établi que les EE acceptent l'entrée de vésicules pendant 10 minutes, temps pendant lequel elles recyclent les membranes et fluides, et retiennent certains éléments des « cargos » pour les acheminer vers les LE (Huotari and Helenius, 2011). Ainsi, les EE sont caractérisés par la présence de récepteurs membranaires et certains marqueurs comme l'EEA1, (Early Endosome Antigen 1) et la petite GTPase Rab5 impliqués dans la fusion entre les vésicules endocytiques et les EE. En effet, Rab5 et son effecteur VPS34, une PI3K de classe III (Phosphatidylinositol 3-kinase), vont permettre la phosphorylation du phosphatidylinositol en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) permettant de réguler les modifications structurales de la membrane des endosomes précoces (Wandinger-Ness and Zerial, 2014). Le PI3P est enrichi dans les membranes des endosomes précoces, des corps multivésiculaires et des vésicules impliquées dans la voie endosomale, qu'on ne retrouve pas dans les endosomes tardifs (Gillooly et al., 2000; Gruenberg, 2003). L'acidité du pH (6,8 à 5,9) de leur contenu permet la dissociation des complexes ligands/récepteurs, facilitant l'adressage des ligands vers des voies de dégradation et le recyclage des récepteurs vers les endosomes de recyclage (Maxfield and Yamashiro, 1987). A ce stade, la voie par défaut qui est utilisée est la voie du recyclage vers la membrane plasmique. Les molécules destinées à être recyclées vont s'accumuler dans les parties tubulaires de l'endosome précoce qui se détachent pour donner les endosomes de recyclage dont les marqueurs sont Rab4 et Rab11. Les molécules destinées à être dégradées, comme par exemple les récepteurs membranaires ubiquitinylés, vont quant à elle s'accumuler dans la partie vacuolaire de l'EE. Elles sont regroupées dans des zones de membrane qui vont bourgeonner donnant des vésicules intraluminales (ILVs, Intraluminal Vesicles) qui vont se détacher dans le lumen de l'endosome (*figure 19 et 20*). En effet, la face cytosolique de la membrane des EE contient des domaines riches en clathrine et composants du complexe endosomal de tri et transport (ESCRT, Endosomal Sorting Complex Required for Transport) sur lequel nous allons revenir plus en détail ensuite. Ces domaines particuliers vont permettre la formation de ILVs en petit nombre dès le stade des EE (Huotari and Helenius, 2011). Huit à 15 minutes après le processus d'endocytose, les EE se transforment en LE (*figure 19*) à partir de leur région centrale vacuolaire. Cette maturation s'accompagne de leur déplacement

le long du réseau de microtubules, grâce à des moteurs moléculaires associés aux microtubules que sont la dynéine et la kinésine, vers l'espace périnucléaire (Pfeffer, 1999). Le pH reste acide (6,0 à 4,9) (Maxfield and Yamashiro, 1987). Les LE qui se forment héritent donc des domaines vacuolaires des EE mais le contenu de leur « cargo » s'enrichit tout au long du processus par des hydrolases lysosomiales et des protéines membranaires lysosomiales (comme LAMP1, lysosome associated membrane protein 1) nouvellement synthétisées à partir du réseau trans-golgien. En effet, les LE servent aussi de support « nourricier » pour les lysosomes et permettent de renouveler en permanence les composants des lysosomes qui dépendent de cet apport pour assurer leurs fonctions de dégradation. A l'inverse, certains composants des EE sont éliminés lors du processus de maturation des EE (Huotari and Helenius, 2011). Les LE matures sont ronds ou ovales de diamètre entre 250-1000nm. On trouve dans leur lumière de nombreuses vésicules intraluminales (souvent >30) de diamètre compris entre 50-100nm, qui s'y accumulent (*figure 20*). Ces ILVs se forment par invagination de la membrane endosomale ; au cours de ce processus, s'opère un tri et adressage dans ces ILVs de protéines cytosoliques, acides nucléiques et certains lipides. Les ILVs sont riches en récepteurs membranaires de la cellule d'origine et concentrent aussi d'autres molécules destinées à être dégradées. En terme de marqueurs, il faut noter le « switch » des protéines Rab5 et Rab7 ; en effet la formation d'un nouveau LE est précédée par l'apparition de domaines contenant Rab7 au dépens de Rab5 ; la protéine Rab7 est un marqueur spécifique des endosomes tardifs (Huotari and Helenius, 2011; Platta and Stenmark, 2011). Ce switch permet de reprogrammer des associations avec de nouveaux effecteurs cytosoliques et redonne de nouvelles propriétés à l'endosome ; d'autres Rab sont perdues comme Rab4, Rab11 et Rab22, et d'autres sont ajoutées comme Rab9. On trouve aussi comme autre marqueurs la protéine LAMP-1 et des tétraspanines (protéines à 4 domaines transmembranaires) comme CD63 (également appelée Lamp3). D'autres modifications se produisent au cours de la maturation des LE et notamment au niveau de la composition lipidique des membranes, avec la phosphorylation des PI3P donnant les phosphatidylinositol-3,5-biphosphates (PI(3,5)P2). Cette modification permettra la fusion de l'endosome aux lysosomes et elle est également nécessaire à la formation des ILV à partir de la membrane de l'endosome, via les protéines du complexe ESCRT. La membrane des LE est aussi constituée de cholestérol, de radeaux lipidiques riches en sphingolipides (Huotari and Helenius, 2011; Mukherjee and Maxfield, 2004).

L'accumulation des ILV en grand nombre dans les LE détermine la formation des endosomes multivésiculaires ou corps multivésiculaire (MVB) (*figure 21*). Ce sont des organelles

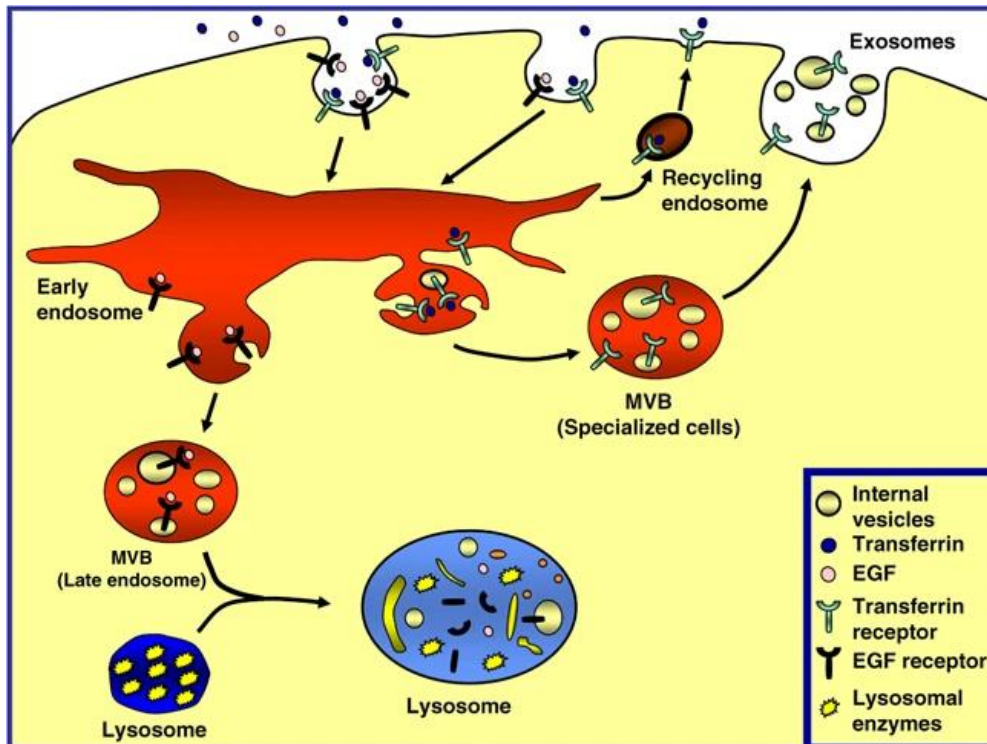


Figure 21 : Formation et devenir des corps multivésiculaires (MVB). Les protéines et ligands de surface endocytés sont délivrés dans le système endosomal. Plusieurs récepteurs, tels que le récepteur à la transferrine (TfR), sont recyclés vers la membrane plasmique en recyclant les endosomes. Certaines protéines de cargaison destinées à la dégradation dans le lysosome, telles que l'EGFR, sont triées dans les vésicules luminales internes des MVB. Les MVB matures peuvent fusionner avec le lysosome où les vésicules et la cargaison sont dégradées par les enzymes lysosomales. Dans des types de cellules spécialisées, tels que les précurseurs érythroïdes, certaines protéines membranaires telles que le TfR sont internalisées par endocytose et triées sélectivement dans un MVB. Ce MVB va fusionner avec la membrane plasmique, libérant les vésicules internes (exosomes) et leur cargaison dans le milieu extracellulaire (Fader et al., 2009).

sphériques, à pH acide (6,0), homogènes en taille (environ 500nm), et caractérisés en microscopie électronique par une simple membrane extérieure entourant un nombre variable (en moyenne 24) de ILV de diamètre compris entre 50 et 100nm (Klumperman and Raposo, 2014). Les premières observations en microscopie électronique d'endosomes multivésiculés datent des années 50 (Palade, 1955), mais ce n'est que bien plus tard qu'ils ont été associés à la voie endocytaire (Gruenberg et al., 1989). La destinée principale des MVB est de fusionner avec les lysosomes, conduisant à la formation d'un endolysosome où survient la dégradation de leur contenu par les enzymes lysosomales et les hydrolases acides (*figure 19 et 21*). Les lysosomes sont des vésicules dont le pH est maintenu entre 3,5 et 5 par la présence au niveau de leur membrane de pompes à protons et de canaux ioniques. Ce pH très acide est indispensable au fonctionnement des hydrolases acides qu'ils contiennent. Les lysosomes possèdent des marqueurs comme les protéines LAMP-1 et LAMP-2, CD63 et Rab9. Plus tard on a démontré que les MVB vont également pouvoir fusionner avec la membrane plasmique et libérer les IVLs dans le milieu extracellulaire. Ces vésicules libérées correspondent aux exosomes dont le diamètre est équivalent à celui des IVL dont ils sont issus (Abels and Breakefield, 2016; Fader et al., 2009; Huotari and Helenius, 2011) (*figure 21*).

Ce devenir différent des MVB pourrait s'expliquer par l'existence de différents MVB. En effet, l'étude des lipides des MVB semble suggérer plusieurs sous-populations de MVB. La majorité des MVB seraient riches en cholestérol dans lesquels ce lipide s'accumule au sein des ILV ; les travaux de Möbius et collaborateurs ont montré que le destin de certains MVB dépendait de leur niveau en cholestérol. Ainsi, une vésicule riche en cholestérol était sécrétée, alors qu'une vésicule morphologiquement identique qui était dépourvue de cholestérol était adressée au lysosome pour sa dégradation (Möbius et al., 2003, 2002). Certains MVB seraient plutôt enrichis en LBPA (Lyso Bis Phosphatidic-Acid) et d'autres non. Une étude sur la stimulation de l'EGFR par son ligand a permis d'avancer cette hypothèse (White et al., 2006). En effet, ce récepteur serait envoyé dans la voie de dégradation au sein d'endosomes multivésiculaires qui ne contiennent pas de LBPA. De plus, la stimulation à l'EGF augmenterait à la fois la formation de ces nouveaux MVB et le bourgeonnement d'ILV contenant l'EGFR. Cette étude suggère que la présence de LBPA dans les MVB les destinerait à la dégradation plutôt que la fusion à la membrane plasmique. C'est cohérent avec le fait que les exosomes ne contiennent pas de LBPA comme cela a été montré aussi dans les études réalisées à partir de lymphocytes B (Wubbolts et al., 2003). L'existence de MVB différents a été aussi démontrée à propos de

l'adressage des molécules du CMH II dans les futurs exosomes des cellules dendritiques (Buschow et al., 2009).

Nous allons décrire maintenant les principaux mécanismes responsables de la formation des exosomes qui démarre donc à partir de la formation des IVLs à l'intérieur des MVB.

3.2.2 Mécanismes de la biogenèse des exosomes

3.2.2.1 Mécanisme ESCRT dépendant

Le processus qui gouverne la formation des ILV à l'intérieur des MVB, et ensuite leur fusion avec la membrane plasmique pour libérer des exosomes dans l'espace extracellulaire n'est que partiellement compris. Un des mécanismes moléculaires proposé est assuré par la machinerie de transport endosomal ESCRT (Colombo et al., 2013).

Cette machinerie est composée d'une vingtaine de protéines Vps (vacuolar protein sorting) qui s'assemblent en 4 complexes multiprotéiques nommés dans l'ordre de leur recrutement à la face cytosolique de la membrane endosomale : ESCRT-0, -I, -II, -III. A ces 3 complexes il faut ajouter le complexe AAA ATPase Vps4 qui est impliqué dans le désassemblage des complexes ESCRT (Hessvik and Llorente, 2018; Raiborg and Stenmark, 2009). Les protéines Vps ont été découvertes pour la première fois chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et identifiées comme ayant un rôle dans l'internalisation des protéines marquées par un signal « ubiquitine » (Raiborg and Stenmark, 2009). C'est un système très conservé depuis la levure jusque chez les mammifères, où ces protéines ont été caractérisées dans les années 2000 comme étant des acteurs clés de la formation des MVB (Babst et al., 2002; Henne et al., 2011; Katzmann et al., 2001). *Dans la nomenclature et dans le texte nous utiliserons les noms des protéines chez les mammifères, le nom des protéines chez la levure sera indiqué entre parenthèse (voir **tableau, annexe 1**). Les travaux ont permis de démontrer que la machinerie ESCRT était majoritairement impliquée dans la liaison, le tri, et le regroupement de protéines et récepteurs ubiquitylés.*

Le processus de la formation des ILVs commence quand la membrane endosomale est réorganisée en microdomaines enrichis en tétraspanines (TEMs, Tetraspanins-enriched microdomains) comprenant en particulier les tétraspanines CD9 et CD63, ce qui va permettre l'assemblage de la machinerie. Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires avec 4 domaines transmembranaires, 2 extrémités C et N terminales cytoplasmiques, et 2 domaines

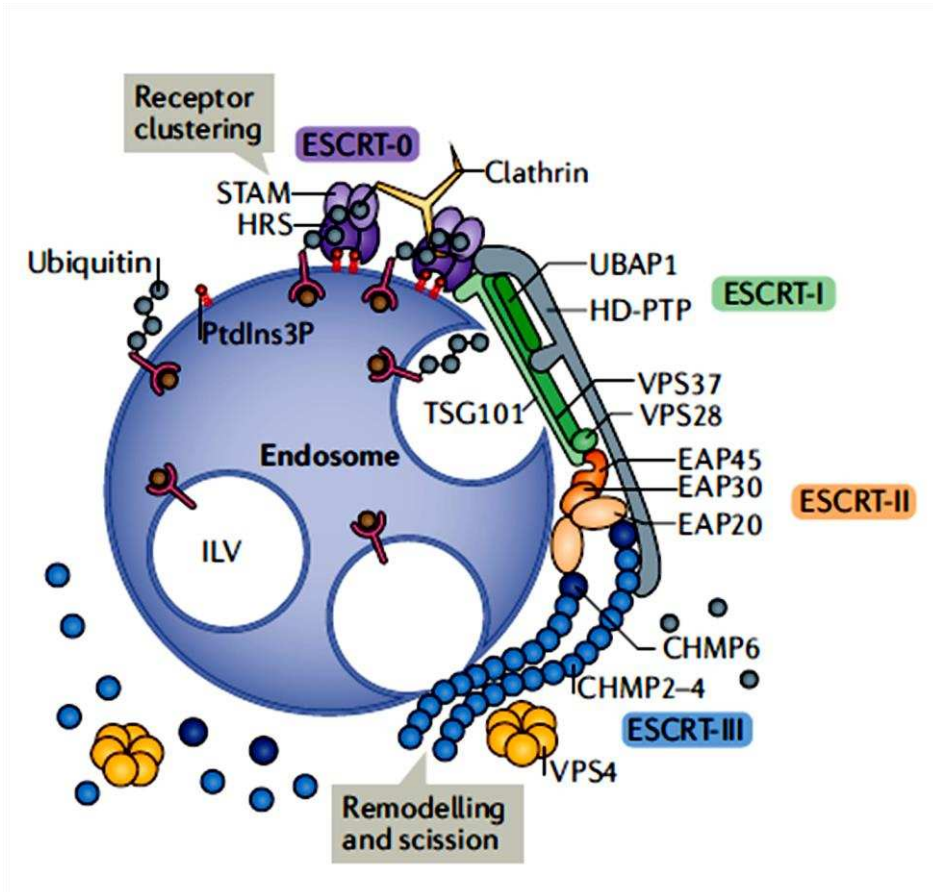


Figure 22 : Assemblage schématique et interactions moléculaires de la machinerie ESCRT. Un récepteur polyubiquitinylé de la membrane endosomale est reconnu par l'ESCRT-0 (comprenant HRS et STAM), qui est recruté dans la membrane endosomale par les PtdIns3P et se regroupe en microdomaines via la liaison de la clathrine. ESCRT-0 recrute ESCRT-I. ESCRT-I recrute ESCRT-II et, ensemble, ce complexe forme une invagination de la membrane endosomale dans laquelle le récepteur ubiquitinylé est trié. Les deux sous-unités EAP20 de ESCRT-II recrutent CHMP6 de ESCRT-III, qui crée la nucléation de filaments constitués de CHMP4, CHMP2 et CHMP3. Les filaments sont remodelés par VPS4 pour obtenir une scission de l'ILV. Le recrutement et la nucléation de ESCRT-III s'accompagnent d'une déubiquitinylation des récepteurs. HD-PTP s'associe à l'ESCRT-0 pour coordonner le recrutement de l'ESCRT-I et de l'ESCRT-III, en contournant le besoin d'ESCRT-II. Le désassemblage de l'ESCRT-III après la scission de l'ILV est médié par VPS4. ALIX, qui peut reconnaître les cargaisons non ubiquitinylés et qui peut contourner le besoin d'ESCRT-II, n'est pas inclus dans la figure (Vietri et al., 2020).

extracellulaires l'un court et l'autre long (Pols and Klumperman, 2009). De façon générale, le complexe ESCRT-0 reconnaît les protéines transmembranaires ubiquitinylées et les recrute à la membrane endosomale, tandis que les complexes ESCRT-I et -II sont recrutés à la face cytosolique et semblent être responsables de la déformation de la membrane en bourgeons avec la cargaison séquestrée ; enfin, les composants ESCRT-III entraînent par la suite la scission des vésicules (Colombo et al., 2013; Hurley and Hanson, 2010; Wollert et al., 2009) (*figure 22*).

✚ **ESCRT-0** est le premier complexe à être recruté au niveau des radeaux lipidiques de la membrane de l'endosome tardif ; il est constitué de deux sous-unités : HRS (Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate ou Vps27) et STAM 1/2 (Signal transducing Adaptor Molecule 1/2 ou Hse1). Ces deux sous-unités vont interagir sous forme d'un hétérotétramère apportant 10 sites de liaison pour des ubiquitines (3 pour chaque HRS et 2 pour chaque sous-unité STAM), ce qui va permettre la capture de « cargos » polyubiquitinylés. La molécule d'ubiquitine reconnaît le motif UBD (Ubiquitin-Binding Domain) des sous-unités du complexe ESCRT-0 (Piper and Lehner, 2011; Raiborg and Stenmark, 2009). Ce complexe est recruté par la sous-unité HRS qui se lie au PI3P de la membrane endosomale, stabilisant l'amarrage des complexes ESCRT. HRS va interagir aussi avec la clathrine au niveau de son extrémité C-terminale (Raiborg et al., 2001) ce qui va permettre le recrutement de la clathrine au niveau des endosomes précoces, et également la séquestration de HRS et son cargo au niveau membranaire. Ces différentes interactions permettent d'initier la première étape de la formation des MVB. ESCRT-0 va ensuite pouvoir recruter le reste de la machinerie ESCRT à ses domaines, et notamment ESCRT-I (Vietri et al., 2020).

✚ **ESCRT-I** a été le premier complexe à avoir été identifié chez la levure puis ensuite chez les mammifères. Ce complexe est composé de 4 sous-unités : TSG101 (tumor susceptibility gene 101) (Vps23), VPS28 (Vps28), VPS37A-D (Vps37), MVB12 (multivesicular body 12, mbv12) ou UBAP1, ces 2 dernières sous-unités étant mutuellement exclusives. Ce complexe va interagir avec ESCRT-0 et avec les protéines ubiquitylées grâce à la sous-unité TSG101 qui comportent des domaines d'interaction avec l'ubiquitine. Cette sous-unité est une protéine essentielle dans la formation des ILV ; en son absence la formation des vésicules est altérée et les MVB observés possèdent peu d'ILV (Falguières et al., 2008; Piper and Lehner, 2011; Raiborg and Stenmark, 2009).

- ✚ **ESCRT-II** est ensuite recruté par ESCRT-I à la membrane des MVB, ce complexe est un hétérotétramère composé de trois 3 protéines à domaine WH (winged-helix) : EAP30 (Vps22), EAP45 (Vps36) et EAP20 (Vps25) en 2 exemplaires. Ce complexe possède aussi des domaines d'interaction avec l'ubiquitine, mais l'interaction avec les protéines ubiquitinyllées est principalement régie par ESCRT-0 car c'est celui qui possède le plus de domaines de liaison aux ubiquitines. Le recrutement d'ESCRT-II est une pré-étape pour l'assemblage et la fonction d'ESCRT-III.
- ✚ **ESCRT-III** est biochimiquement moins bien défini que les 2 autres complexes précédents. C'est un oligomère ou polymère de 4 petites protéines de la famille CHMP (Charged Multivesicular Body Protein) : CHMP6 (Vps20), CHMP4,B (Vps32), CHMP3 (Vps24) et CHMP2A,B (Vps2). Ces quatre monomères doivent d'abord s'associer pour former la protéine ESCRT-III fonctionnelle (Henne et al., 2011; Raiborg and Stenmark, 2009). Dans un premier temps la protéine CHMP6 (Vps20) va interagir avec EAP20 (Vps25) de ESCRT-II et l'assemblage total de ESCRT-II va être réalisé. En effet, pour polymériser, le principal acteur de l'élongation protéique, CHMP4, doit être activé par des facteurs de nucléation comme CHMP6 qui vont déterminer la formation de structures multimériques. Une fois activée CHMP4 détermine la formation de filaments en activant d'autres molécules CHMP4 ; un autre facteur de nucléation et d'activation de CHMP4 est aussi impliqué, il s'agit de la protéine ALIX (Alg-2 Interacting protein X) ou AIP1 (Apoptosis Interacting Protein 1) (chez la levure Bro1, BCK-1 like resistance to osmotic shock protein-1) (Lata et al., 2009). ALIX est une protéine cytoplasmique adaptatrice présentant un domaine Bro1 en position N-terminale qui lui permet de se lier aux protéines CHMP4 du complexe ESCRT-III. Finalement la polymérisation des CHMP2-4 va entraîner la déformation de la membrane puis la fission de la vésicule (ILV) nouvellement formée. Un homologue d'ALIX est aussi présent dans les cellules de mammifères, HD-PTP (His Domain PhosphoTyrosine Phosphate) qui pourrait avoir un rôle plus important qu'ALIX dans le tri des récepteurs membranaires. En effet, contrairement à la déplétion d'Alix, celle de HD-PTP inhibe de façon importante la dégradation de l'EGFR et la formation des IVLs (Doyotte et al., 2008; Schmidt et al., 2004). Les protéines à domaines Bro1 comme Alix chez les mammifères et HD-PTP sont aussi impliquées dans la stabilisation et le recrutement du complexe ESCRT-III, et notamment la liaison entre ESCRT-0/I et ESCRT-III, sans passer par l'ESCRT-II (*figure 22*) (Vietri et al., 2020).

Le processus se termine par le recrutement d'une déubiquitinase qui enlève « l'étiquette ubiquitine » des protéines avant leur tri dans les IVLs. Ce processus de déubiquitinylation est une étape importante afin de préserver les protéines internalisées de la dégradation par les lysosomes (Babst, 2011; Piper and Lehner, 2011). Enfin, la formation des ILV va faire intervenir l'AAA-ATPase VPS4 (Vps4) qui va dissocier les membres du complexe ESCRT-III et aboutir à la libération de la vésicule (ILV) dans la lumière de l'endosome (Abels and Breakefield, 2016; Vietri et al., 2020).

Ainsi, le système ESCRT contrôle à la fois le tri des protéines membranaires ubiquitinylées et la biogenèse des ILV qui vont transporter ces protéines au sein des MVB.

Cependant, toutes les protéines endocytées, dont l'adressage aux ILV mettent en jeu la machinerie ESCRT, ne sont pas ubiquitinylées (Shields and Piper, 2011). Ainsi, une étude réalisée chez la levure sur le devenir de protéines de fusion se liant aux endosomes et interagissant avec le système ESCRT, a permis de montrer que l'ubiquitine n'était pas l'unique signal de tri pour entrer dans les ILV. Certaines protéines peuvent directement interagir avec les complexes ESCRT-III ou avec des protéines associées à l'ESCRT-III, et se retrouvent finalement dans la lumière des ILV ; de plus, certaines protéines solubles sont délivrées dans les ILV, alors que toutes les autres protéines cytoplasmiques en sont exclues. Dans ce cas aussi, l'interaction avec la membrane endosomale et le système ESCRT seraient impliqués (Mageswaran et al., 2014). D'autres études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de tri des protéines retrouvées finalement dans les exosomes.

Cependant, contrairement à la levure, l'absence fonctionnelle des protéines ESCRT dans les cellules de mammifères n'empêche pas la formation des MVB, mais altère la morphologie des compartiments endocytiques et l'internalisation des protéines (Stuffers et al., 2009). Ces résultats montrent l'implication d'un mécanisme ESCRT indépendant dans la formation des MVB.

3.2.2.2 Mécanismes ESCRT indépendants

Il existe donc une alternative à la formation des MVB indépendamment de la machinerie ESCRT, qui pourrait coopérer en parallèle du premier qui reste le principal mécanisme.

En effet, comme on l'a évoqué à la fin du paragraphe précédent, l'inactivation simultanée de quatre composants de la machinerie ESCRT a été réalisée en 2009 par siRNA dans des cellules HeLa exprimant le CMH-II. Il s'agissait de HRS (ESCRT-0), TSG101 (ESCRT-I), EAP30 (Vps22 ; ESCRT-II) et CHMP3 (Vps24 ; ESCRT-III) (Stuffers et al., 2009). Les résultats ont

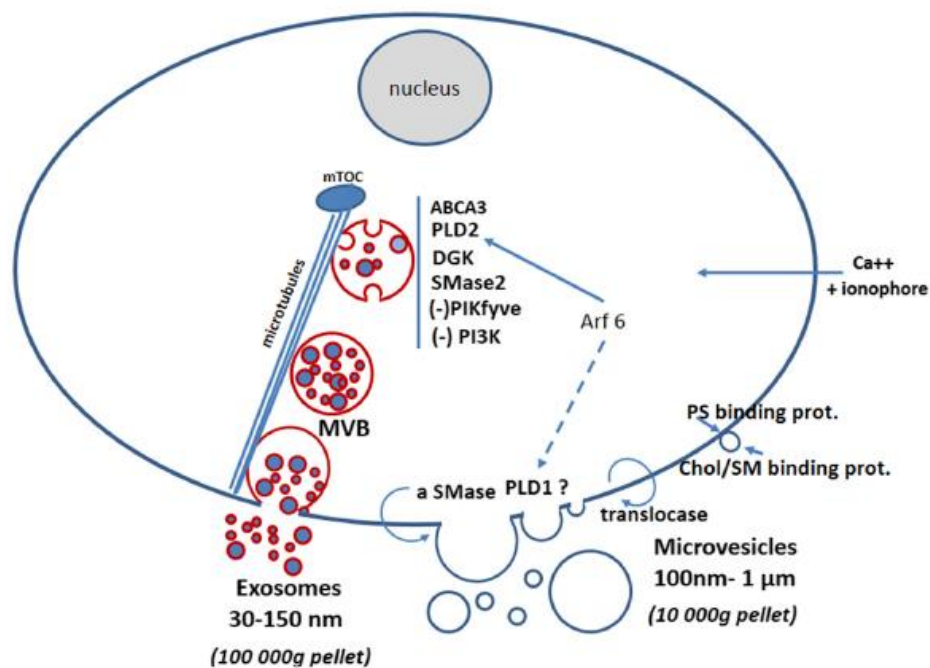


Figure 23 : Partenaires lipidiques dans la biogenèse des exosomes et microvésicules. La production d'exosomes nécessite l'implication du transporteur des lipides ABCA3, elle requiert l'activité de la PLD2, de la diglycéride kinase (DGK), de la sphingomyélinase SMase2 et l'inhibition des phosphoinositides kinases telles que PI3K et PIKfyve. La translocation sur le feuillet externe de la membrane plasmique de la sphingomyélinase acide (aSMase) favorise le bourgeonnement des microvésicules. Ce processus de bourgeonnement implique également les petites protéines G, telles que Arf6 et RhoA, qui activent PLD2 (Record et al., 2018).

montré que les cellules présentaient une altération importante de leurs compartiments endocytaires mais qu'ils étaient bien distincts les uns des autres grâce à des marquages spécifiques (EEA1, CD63, LBPA, LAMP2). Il a également été montré que l'absence de HRS, STAM1 et TSG101 correspondant au complexe ESCRT-0-I diminue la production d'exosomes portant CD63, CD81 et CMH-II. L'absence de CMP30 (Vps4B ; ESCRT-III) ou ALIX provoque simplement des ILV de plus petites tailles et en moins grand nombre.

Plusieurs mécanismes, qui varient en fonction du type cellulaire et du contenu des vésicules, ont été évoqués et impliquent certains lipides (notamment des sphingolipides comme les céramides) des tétraspanines et des protéines de choc thermique (Stuffers et al., 2009). Parmi eux, les lipides semblent occuper une place plus importante. Il faut préciser d'abord que, contrairement au tri des protéines, la machinerie ESCRT n'est pas impliquée dans l'incorporation et le tri des lipides dans les ILVs. Les mécanismes mis en jeu impliquent: des sphingomyélinases comme la nSMase (neutral sphingo-myelinase), la phospholipase D2 (PLD2), mais aussi des transporteurs de lipides comme la protéine ABCA3 (ATP-Binding Cassette, subfamily A, member 3) plutôt connue pour être associée aux compartiments lysosomiaux, et impliquée dans la production du surfactant (Yamano et al., 2001) (**Figure 23**). Comme pour le système ESCRT, des mécanismes impliqués dans l'apport et l'enrichissement en lipides des ILV sont aussi recrutés dans certaines étapes de la biogenèse de ces vésicules et donc des exosomes.

Parmi les principales découvertes sur le rôle des lipides :

- ✚ En 2003, il a été mis en évidence la présence de microdomaines lipidiques (les radeaux lipidiques ou rafts) dans les membranes exosomales suggérant leur participation dans la formation des vésicules (de Gassart et al., 2003).
- ✚ Une voie impliquant des céramides et la sphingomyélinase 2 a également été caractérisée notamment dans le tri de la protéine protéolipide, la PLP (Trajkovic et al., 2008). Le céramide possède une structure conique comme le LBPA qui permettrait de déformer la membrane pour la formation des ILV. De plus, l'inhibition de la sphingomyélinase (Smase), qui clive la sphingomyéline en phosphatidylcholine et céramide, diminue la sécrétion de la PLP dans les exosomes sécrétés par des oligodendrocytes. A noter, la PLP comme la sphingomyéline, est associée aux radeaux lipidiques et l'inhibition de certains composants de la machinerie ESCRT notamment TSG101, VPS4 ou ALIX n'affecte pas la sortie de la PLP dans les exosomes suggérant qu'elle est dépendante des céramides et non des ESCRT.

✚ Plus récemment, une autre voie de biogenèse des exosomes impliquant le complexe syndécane/synténine-ALIX a été identifiée nécessitant l'activation notamment de la PLD2. En effet, son inactivation empêche la formation d'ILV à l'intérieur des MVB (Ghossoub et al., 2014). PLD2 est activée par une petite protéine G, ARF6, qui est également impliquée dans la formation de microvésicules à partir de l'excrétion de la membrane plasmique (Tricarico et al., 2017) (*Figure 23*).

La synthénine se lie à l'extrémité cytoplasmique des syndécane, qui sont internalisés dans les endosomes de tri avec leurs chaînes d'héparane sulfates intactes. L'héparanase des endosomes induit la formation de « clusters » de syndécane en hydrolysant les chaînes d'héparane sulfates, favorisant le recrutement de la synthénine et d'ALIX. Puis avec l'aide de ARF6 et de la PLD2, ce complexe détermine la formation de ILV et donc de MVB. Il est important de préciser que le recrutement d'ALIX par le système syndécane/synténine permet de relier ce système à la machinerie classique ESCRT de formation des exosomes (Fares et al., 2017). Finalement l'héparanase a été trouvée dans les exosomes de patients atteints de cancers, ce qui suggère que sa distribution via les exosomes à des cellules « receveuses » pourrait augmenter le processus de libération d'exosomes par le système syndécane-synténine-ALIX (Fares et al., 2017; Thompson et al., 2013).

✚ Enfin concernant les cancers hématologiques (leucémie aigüe myéloïde et notre modèle biologique, les DLBCL), il faut citer la découverte par le groupe de Gerald G Wulf du rôle du transporteur lipidique ABCA3 dans l'assemblage et la libération des exosomes produits par les cellules tumorales. De plus ils ont montré, comme on le reverra ensuite dans la partie « exosomes et DLBCL », un lien avec la résistance thérapeutique (Aung et al., 2011; Chapuy et al., 2008; Koch et al., 2016.).

En dehors de l'implication de certains lipides dans ces mécanismes ESCRT indépendants, il faut indiquer le rôle sans doute important de certaines tétraspanines comme CD63. Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires associées à d'autres partenaires protéiques constituant de grands complexes multimoléculaires appelés TEM (tetraspanin-enriched microdomain). Leur rôle est apparu évident parce qu'elles sont retrouvées très enrichies dans les IVL, même en l'absence d'un système ESCRT fonctionnel (Buschow et al., 2009; Stuffers et al., 2009). Ainsi, en 2011 il a été démontré dans des cellules humaines de mélanome, que la tétraspanine CD63 participait au tri d'un pigment amyloïdogénique, la PMEL (Pigment cell-specific type I integral membrane protein) de manière ESCRT-indépendante (van Niel et al.,

2011). En plus de leur rôle dans le tri de certaines protéines du « cargo », le réseau de tétraspanines semble être impliqué dans la déformation de la membrane des MVB conduisant à leur bourgeonnement, et ainsi à la formation des ILV (Andreu and Yáñez-Mó, 2014; Verweij et al., 2012).

En conclusion, si le système ESCRT reste le principal moteur de la formation des exosomes, d'autres voies alternatives sont sans doute utilisées, y compris en parallèle, et pourraient expliquer le caractère constitutif des productions de certains types cellulaires ou cellules tumorales. Les mécanismes impliqués sont certainement dépendants du « cargo » qui est à trier et du type cellulaire ainsi que son statut d'activation, suggérant que les exosomes diffèrent au sein d'une même production cellulaire et entre des types cellulaires différents.

3.3 Processus de libération des exosomes

Les ILV formées peuvent être soit dirigées vers le lysosome pour la dégradation de leur cargaison, soit libérées dans le milieu extracellulaire après fusion du MVB avec la membrane plasmique, sous forme d'exosomes. Les mécanismes moléculaires et les conditions cellulaires qui régulent cette balance « dégradation/sécrétion » restent encore peu connus (Hessvik and Llorente, 2018; Vietri et al., 2020).

Concernant la sécrétion des exosomes, et comme pour les mécanismes de leur biogenèse, plusieurs mécanismes ont été proposés, parmi lesquels, les GTPases (Guanosyl triphosphatases) de la famille RAB (Ras-related in brain) ont une place importante (Abels and Breakefield, 2016; Kalra et al., 2016). Ainsi, la fusion du MVB avec la membrane plasmique nécessite dans un premier temps un rapprochement des membranes. Les protéines régulatrices du cytosquelette (actine, tubuline) et les moteurs moléculaires (kinésines, myosine) jouent un rôle important dans la migration des MVB vers la membrane plasmique, alors que d'autres familles de protéines comme les membres de la famille des GTPases RAB et les protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptors) sont nécessaires aux phases finales de la fusion (Kowal et al., 2014).

- ✚ Les petites protéines G de la famille des RAB GTPases contrôlent différentes étapes du trafic des vésicules intracellulaires, de la formation des vésicules endocytiques à leur fusion à la membrane plasmique ou leur transport vers les lysosomes (Wandinger-Ness and Zerial, 2014). Plusieurs protéines RAB ont été impliquées, suite à l'utilisation de modèles cellulaires exprimant des mutants dominant négatifs ou après inhibition de leur synthèse par siRNA ou shRNA ; elles diffèrent souvent en fonction des lignées

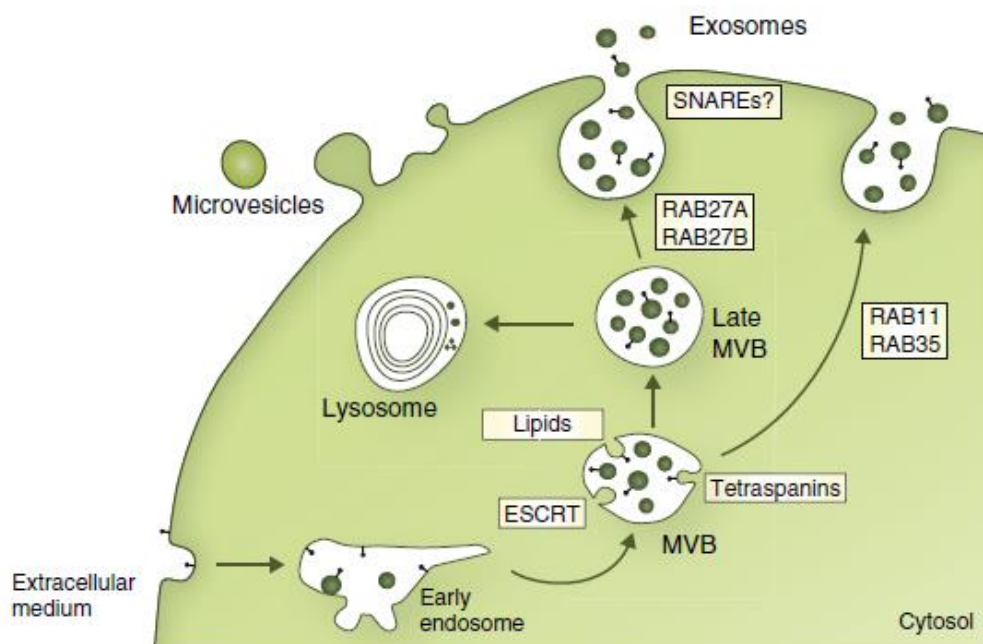


Figure 24 : Mécanismes intracellulaires de biogenèse et de sécrétion des exosomes. Représentation schématique de l'origine et de la libération d'exosomes par les cellules eucaryotes. Plusieurs molécules sont impliquées dans la biogenèse des ILV, comme la machinerie ESCRT, les lipides (ex : le céramide) et les tétraspanines. Plusieurs protéines RAB (RAB11, RAB27 et RAB35) sont impliquées dans le transport des MVB vers la membrane plasmique et dans la sécrétion des exosomes. Le modèle propose que différentes protéines RAB pourraient agir sur différents MVB. De plus, des protéines SNAREs sont probablement impliquées dans la fusion de ces MVBs avec la membrane plasmique. D'autres types de vésicules peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement de la membrane plasmique, et sont appelés microvésicules (Kowal et al., 2014).

cellulaires humaines utilisées dans ces études avec, par exemple : RAB11 dans les cellules de la lignée érythroleucémique K562 (Savina et al., 2005) ou dans la lignée de cellule épithéliale rétinienne RPE1 (Abrami et al., 2013); RAB35 dans une lignée d'oligodendrocytes et la lignée RPE1 (Abrami et al., 2013).

Une étude réalisée par le groupe de Clotilde Théry, à partir de la lignée humaine HeLa (issue d'un cancer du col de l'utérus) surexprimant les molécules de classe II du CMH (HeLa-CIITA), a permis de mettre en évidence le rôle de 5 protéines RAB dans ce processus. En effet, ils ont utilisé une « librairie » de shRNA lentiviraux ciblant 59 membres de cette famille, et le knock-down de RAB5A, RAB9A, RAB2B, et de façon plus importante encore pour RAB27A et RAB27B diminuait de façon significative la sécrétion des exosomes (Ostrowski et al., 2010). Cependant ils n'observaient pas de diminution suite à la déplétion de RAB11A ou RAB7. Ce dernier était par contre nécessaire à la libération d'exosomes contenant de la synténine et ALIX par les cellules MCF-7 issues d'un adénocarcinome de la glande mammaire (Baietti et al., 2012) (*figure 24*).

Le rôle de RAB27 a été confirmé ensuite dans des lignées tumorales murines comme humaines (Bobrie et al., 2011; Kowal et al., 2014). Des études en microscopie électronique et en microscopie à fluorescence ont permis de préciser les rôles de RAB27A et RAB27B dans la libération des exosomes. Ainsi, une absence de RAB27A conduit à une augmentation de la taille des MVB, due à une accumulation des ILVs non libérées ; alors que l'absence de RAB27B entraîne une diminution au contraire de la taille des MVB associée à leur relocalisation périnucléaire empêchant leur fusion à la membrane plasmique (Ostrowski et al., 2010). Il a été proposé que RAB27A favoriserait l'accrochage et la fusion des MVB à la membrane plasmique, alors que RAB27B jouerait un rôle dans le transfert des vésicules du Golgi vers les MVB, et dans la mobilisation des MVB vers le réseau d'actine situé sous la membrane plasmique. De même, l'ensemble des données suggère la coexistence au sein d'une même cellule de différents MVB dont la machinerie d'accrochage et de fusion serait aussi différente. Ainsi, les protéines RAB11 et RAB 35 seraient impliquées dans l'arrimage des MVB et la fusion à la membrane plasmique à un stade plus précoce que pour les protéines RAB27 (Théry et al., 2009) (*figure 24*). L'absence de ces deux protéines entraîne une accumulation des ILVs dans les MVB due à l'absence de la fusion des MVB à la membrane plasmique (Hsu et al., 2010; Hu et al., 2012; Kowal et al., 2014).

✚ Après l'accrochage de 2 compartiments intracellulaires, la fusion des bicouches lipidiques nécessite l'intervention d'un système de protéines, les protéines SNARE (SNAP (soluble NSF attachment protein) Receptors). Ce sont des protéines présentes au niveau des membranes cellulaires qui sont des acteurs majeurs de l'exocytose (Kowal et al., 2014). Il existe deux catégories de SNARE : les SNAREs vésiculaires (v-SNAREs ou vesicular associated membrane proteins, VAMPs), localisées à la membrane des vésicules et les SNAREs cible (t-SNAREs), associées à la membrane cible. L'association des v-SNARE avec les t-SNARE permet l'accrochage et la fusion des vésicules à la membrane plasmique. Deux v-SNARE ont été identifiées comme nécessaires dans la sécrétion des exosomes, en inhibant ou surexprimant ces protéines dans des modèles cellulaires différents, selon un mécanisme Ca^{2+} dépendant (Fader et al., 2009; Hessvik and Llorente, 2018). Il s'agit d'une part de la synaptobrevine YKT6 dans les cellules embryonnaires humaines rénales HEK293 (Gross et al., 2012) et la lignée humaine de carcinome pulmonaire A549 (Ruiz-Martinez et al., 2016); d'autre part, il s'agit de VAMP7 (vesicle associated membrane protein 7) identifiée pour son rôle dans la libération d'exosomes contenant de l'acétylcholinestérase dans la lignée K562 (Fader et al., 2009; Hessvik and Llorente, 2018).

Finalement, la sécrétion des exosomes dépend aussi des conditions d'activation et de culture des cellules. En effet, si certaines cellules comme des cellules tumorales sécrètent de façon constitutive des exosomes, beaucoup d'autres types cellulaires ont une sécrétion induite (Colombo et al., 2014; Kharaziha et al., 2012; Théry et al., 2009). C'est notamment le cas pour beaucoup de leucocytes où l'activation s'accompagne d'une augmentation de la production d'exosomes comme : lors de la dégranulation des mastocytes induites par les IgE (Raposo et al., 1997), l'activation des cellules dendritiques par des peptides tumoraux (Zitvogel et al., 1998), la stimulation des lymphocytes T par leur TCR (Blanchard et al., 2002) ou des lymphocytes B par l'IL4 ou leur BCR (Saunderson et al., 2008).

Comme on vient de le notifier à propos des v-SNARE, la fusion des MVB avec la membrane plasmique est dépendante du calcium intracellulaire. Il est en général impliqué dans tous les mécanismes de fusion membranaire au cours de la voie endosomale et notamment dans la sécrétion des exosomes. Il a été montré dans différents types cellulaires que les stimuli conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium (par exemple des ionophores calciques ou lors de l'activation des immunorécepteurs TCR/BCR) entraînent une augmentation de la libération des exosomes (Bobrie et al., 2011; Kharaziha et al., 2012).

Le pH joue également un rôle important dans la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire. Un environnement acide, comme par exemple au niveau des masses tumorales, favoriserait la sécrétion d'exosomes mais également la capture de ces exosomes par les cellules (Kharaziha et al., 2012; Parolini et al., 2009).

De façon générale la sécrétion des exosomes dépend de l'état de la cellule, comme on a pu le constater dans les cultures cellulaires où il faut souvent plusieurs jours de culture pour enrichir les préparations en exosomes, ou lors de situations de stress, comme la privation sérique qui affectent qualitativement et quantitativement la production d'exosomes. Ainsi l'homéostasie cellulaire influence la production d'exosomes ; les situations de stress augmentent souvent la production d'exosomes comme par exemple l'irradiation, le traitement des cellules au cisplatine ou leur maintien en conditions hypoxiques. Les explications ne sont pas sûres mais passeraient soit par la nécessité pour les cellules de se débarrasser de déchets suite aux stress, ce qui suggère un rôle protecteur aux exosomes, soit cela permettrait aux cellules d'informer les cellules voisines de leur situation de danger (Desdín-Micó and Mittelbrunn, 2017; Hessvik and Llorente, 2018).

3.4 Composition biochimique des exosomes

Le contenu des exosomes ne reflète pas seulement la composition de la cellule d'origine mais traduit aussi la régulation d'un mécanisme de tri comme on l'a vu précédemment. La composition biologique et l'hétérogénéité des exosomes dépendent de la cellule d'origine et de l'état du tissu ou de la cellule au moment de la génération des exosomes. De plus, des différences peuvent apparaître en fonction de la méthode utilisée pour leur purification ; la plupart des données biochimiques obtenues ont été extraites d'études analysant les EVs par ultracentrifugation différentielle. Or cette méthode peut aboutir à un mélange de populations d'EV différentes (Colombo et al., 2014). Il existe trois bases de données dans lesquelles ont été regroupés les résultats des études sur la composition en protéines, en lipides et en acides nucléiques des vésicules extracellulaires, ainsi que les méthodes de purification utilisées pour générer ces données : Exocarta (<http://exocarta.org>) (Mathivanan et al., 2012; Mathivanan and Simpson, 2009) Vesiclepedia : (<http://microvesicles.org>) (Kalra et al., 2012) et EVpedia (<http://evpedia.info>) (Kim et al., 2013).

Comme on va le voir dans ce paragraphe à plusieurs occasions, il est encore difficile d'avoir une représentation fidèle de la composition d'un exosome et le groupe de Clotilde Théry a proposé en 2014 un schéma qui est plutôt une représentation globale des EVs, mais qui reste une base de référence pour aborder la spécificité des exosomes, et que nous avons choisi pour

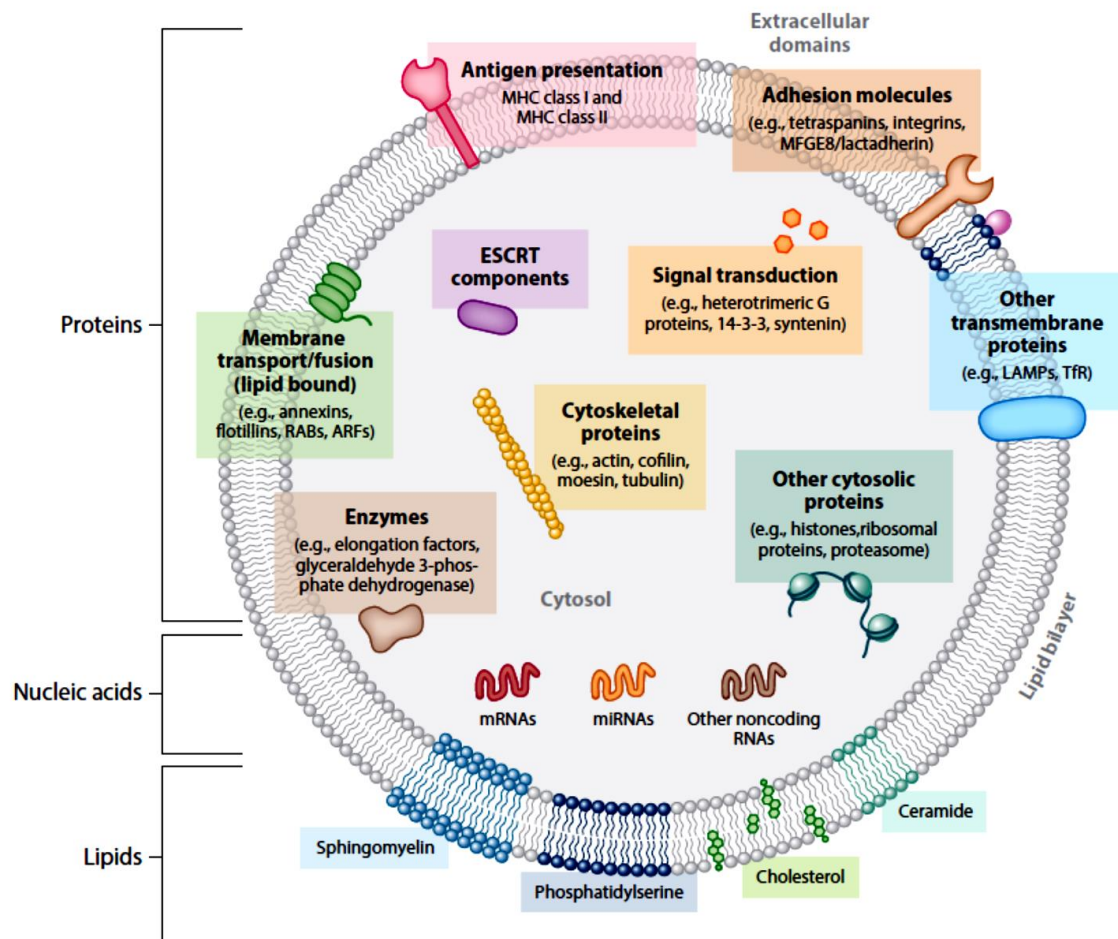


Figure 25 : Composition globale des vésicules extracellulaires (EVs). Représentation schématique de la composition en protéines, lipides, acides nucléiques et de l'orientation membranaire des EVs. Certains composants regroupés dans les différentes catégories peuvent être présents dans certains types d'EVs et pas dans d'autres. Exemples de tétraspanines couramment trouvées dans les EVs : CD63, CD81 et CD9 (Colombo et al., 2014).

illustrer notre propos (*figure 25*). Nous allons donc décrire ici les caractéristiques biochimiques reconnues actuellement en privilégiant les marqueurs moléculaires les plus spécifiques des exosomes.

3.4.1 Composition protéique

La composition protéique des exosomes a été étudiée de manière approfondie depuis leur découverte. Les premières techniques utilisées étaient basées sur la détection de protéines spécifiques à l'aide d'anticorps (comme le western blot) mais dans les années 90 les techniques d'analyses protéomiques ont permis d'identifier de nouvelles protéines dans les préparations de vésicules extracellulaires. Les premières études protéomiques ont montré que les exosomes contiennent un ensemble de protéines cellulaires spécifiques, dont certaines dépendent du type cellulaire qui les sécrète, tandis que d'autres se trouvent dans la plupart des exosomes, quelque soit le type cellulaire. Ces dernières comprennent des protéines des endosomes, de la membrane plasmique et du cytosol. En revanche, les protéines du noyau, des mitochondries, du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi ne doivent pas être retrouvées dans les purifications d'exosomes pour lesquelles elles sont actuellement considérées comme des contaminants des préparations (Colombo et al., 2014; Théry et al., 2018). Les protéines communes à tous les exosomes sont en réalité, pour un grand nombre, retrouvées communes à d'autres EV comme les microvésicules ; ainsi, c'est l'enrichissement fort de telle ou telle protéine qui permet d'identifier des marqueurs protéiques dans les exosomes par rapport aux autres EV, et bien sûr aussi par rapport aux lysats cellulaires de la cellule d'origine (Colombo et al., 2014; Doyle and Wang, 2019). De plus, c'est surtout l'origine endosomale des exosomes qui les différencie des autres EV par l'expression de protéines endosomales. C'est sur cette base et avec cette réserve, que l'on peut tenter de décrire la composition protéique des exosomes (Mallia et al., 2020; Tkach et al., 2018) (*figure 25 et tableau 3*).

De part leur origine endosomale, les exosomes contiennent des protéines impliquées :

- ✓ dans le trafic membranaire (RAB GTPases mais aussi les annexines)
- ✓ et dans la biogenèse des MVB (avec la clathrine, les protéines de la machinerie ESCRT comme TSG101 ou associées comme ALIX et plus récemment la synténine-1)

Le fait qu'ils soient issus de la membrane plasmique explique qu'on y trouve aussi :

- ✓ des protéines associées aux radeaux lipidiques comme les flotillines 1/2

- ✓ des molécules d'adhésion comme des intégrines ou les tétraspanines CD9, CD63, CD81, CD82, ou la lactadhérine (ou MFGE8, Milk fat globule EGF factor 8)
- ✓ des protéines de classe I du CMH

La présence simultanée des tétraspanines CD63 et CD9 ou CD81 pourrait être un marqueur spécifique des exosomes (Tkach et al, 2017). En effet, la présence d'une seule des tétraspanines n'est pas une condition suffisante pour identifier spécifiquement les exosomes ; des études protéomiques récentes ont montré que si CD63 n'est retrouvée que dans les « small EVs », CD9 et CD81 sont aussi présentes dans des « large EVs » (Kowal et al., 2016 ; Tkach et al, 2017).

Finalement, certaines protéines cytosoliques sont aussi retrouvées dans les exosomes comme des protéines de signalisation intracellulaire (sous-unités α des petites protéines G, la protéine 14-3-3), des protéines de choc thermique (Hsp70, Hsp90) ou des enzymes du métabolisme cellulaire (GAPDH) (Colombo et al., 2014; Doyle and Wang, 2019; Jeppesen et al., 2019).

A cette composition « classique » commune à tous les exosomes, viennent s'ajouter des protéines spécifiques de la cellule d'origine. Par exemple, les réticulocytes qui sont les premières cellules à avoir été analysées secrètent des exosomes riches en récepteurs à la transferrine (TfR) (Johnstone et al., 1987). Dans le système immunitaire, on peut citer les molécules du CMH-II, l'ICAM-1 ou le CD86 que l'on retrouve dans les exosomes produits par les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques et les lymphocytes B (Clayton et al., 2001; Raposo et al., 1996; Zitvogel et al., 1998). **Plus en lien avec notre problématique, comme on l'a déjà indiqué, il faut noter l'expression du CD20 en plus du BCR à la surface des « small EVs » libérées par les lymphocytes B normaux ou tumoraux (Aung et al., 2011; McLellan, 2009; Oksvold et al., 2014; Saunderson et al., 2008).**

3.4.2 Composition lipidique

Les lipides représentent la population de molécules la plus enrichie dans une membrane cellulaire. Plus précisément, la couche externe de la bicouche lipidique de la membrane plasmique est enrichie en phosphatidylcholine (PC) et en sphingomyéline, tandis que la couche interne est composée d'aminophospholipides, de phosphatidylsérine (PS) et de phosphatidyléthanolamine (PE). Les autres lipides composant la membrane sont le cholestérol, le phosphatidylinositol (PI), l'acide phosphatidique, les glycosphingolipides et le phosphatidylglycérol (Vance, 2015).

La composition lipidique des exosomes a fait l'objet de beaucoup moins d'études que l'analyse protéomique. La cellule contient des milliers d'espèces moléculaires lipidiques différentes réparties dans plusieurs classes et sous classes, et la plupart des études ont quantifié les classes de lipides retrouvées dans les exosomes, et peu les espèces moléculaires. De la même façon que le contenu protéique, l'analyse du contenu lipidique peut être influencée fortement par la méthode choisie pour isoler les exosomes, mais aussi pour l'analyse de ces molécules (Spectrométrie de masse, chromatographie sur couche mince ou en phase gazeuse), ce qui aboutit parfois à des résultats controversés. Ainsi, après ultracentrifugation différentielle, méthode la plus classique utilisée pour isoler les exosomes, les préparations peuvent être contaminées par des gouttelettes lipidiques, des lipoprotéines et autres lipoparticules qui peuvent interférer avec les analyses lipidomiques (Skotland et al., 2017). Comme pour les protéines, le contenu lipidique est le reflet de celui notamment de la membrane plasmique de la cellule d'origine, et par conséquent peut subir des variations d'un type cellulaire à l'autre. Enfin, comme pour le profil protéique des exosomes, certains lipides des exosomes participent aussi à leur biogenèse comme on l'a déjà décrit précédemment (Record et al., 2018).

Au cours du processus de biogenèse des exosomes, deux invaginations membranaires ont lieu. La première invagination s'effectue au niveau de la membrane plasmique lors de l'endocytose et la seconde survient au niveau de la membrane des MVB formant les ILV (Pant et al., 2012). Ces deux processus conduisent à la même orientation des protéines transmembranaires présentes à la membrane des exosomes que celles retrouvées au niveau de la membrane cellulaire (Février and Raposo, 2004). Il est souvent suggéré que l'asymétrie lipidique de la membrane plasmique n'est pas retrouvée dans la membrane des exosomes ; cette hypothèse a été proposée suite à la description par un certain nombre d'études de l'exposition des PS à la surface des exosomes, contrairement aux membranes plasmiques où les PS sont au niveau du feuillet interne. Ces résultats sont liés à la possibilité de détecter les exosomes avec de l'annexine-V, connue pour se lier aux PS. De même la PE, contrairement à la membrane plasmique, a été retrouvée répartie de façon homogène entre les 2 feuillets de la membrane des exosomes (Laulagnier et al., 2004; Record et al., 2018). L'explication pourrait être liée à l'absence des flippases, responsables de cette distribution asymétrique des phospholipides dans la membrane plasmique, dans les exosomes sécrétés (Hugel et al., 2005). Cependant, les PS seraient présents dans la membrane des exosomes à des taux plus faibles que les microvésicules formées à partir de la membrane plasmique (Heijnen et al., 1999). Récemment, suite à une méta-analyse d'études lipidomiques à partir d'exosomes de types cellulaires différents, un autre

modèle a été proposé où les PS seraient majoritairement retrouvés dans le feuillet interne de la membrane exosomale comme dans la membrane plasmique ; certains exosomes pourraient cependant exposer des PS, notamment suite à des conditions de prélèvements, stockage ou de culture, comme par exemple l'hypoxie (Skotland et al., 2017).

Concernant les caractéristiques de la composition lipidique de la membrane des exosomes, la grande majorité des études s'accordent sur son homologie avec les radeaux lipidiques (rafts), avec un enrichissement, par rapport à la membrane de la cellule d'origine, en sphingomyéline, en cholestérol et en phospholipides insaturés (PS, PC et PE) (*figure 25*). De plus leur contenu est enrichi en ganglioside (GM3) et céramide ou ses dérivés, mais pas en acide lysobisphosphatique (LBPA, ou BMP pour bismonoacyl glycerophosphate) un lipide présent comme on l'a vu cependant dans les ILV (Llorente et al., 2013; Trajkovic et al., 2008).

En cohérence avec leur composition proche des rafts, la présence de protéines associées aux rafts (protéines à ancre Glycosylphosphatidylinositol (GPI) et flotillines) a été décrite dans les exosomes (Colombo et al., 2014).

En conclusion, le contenu lipidique de la membrane des exosomes diffère de celui de la membrane plasmique de la cellule d'origine, certains lipides étant enrichis de façon spécifique ce qui suggère un processus de tri au cours de leur biogenèse qui reste à préciser. Des particularités ont été décrites aussi pour certains types cellulaires, comme la présence de différents effecteurs enzymatiques et/ou protéines associés aux rafts dans les exosomes de cellule différente (ex : Src-kinases dans des lignées lymphoblastoïdes B, des protéines à ancre GPI comme l'acétylcholinestérase dans les cellules K562) (de Gassart et al., 2003).

De façon générale, la composition lipidique et le haut ratio protéines/lipides apportent une rigidité plus importante à la membrane exosomale par rapport à celle de la membrane plasmique, ce qui confère aux exosomes une stabilité dans le milieu extracellulaire et la capacité de transporter du matériel entre les cellules (Laulagnier et al., 2004). De façon intéressante, des études montrent que les exosomes qui sont transférés à des cellules « receveuses » cibles ont la capacité de changer la composition lipidique de ces cellules, notamment en cholestérol et sphingomyéline, ce qui influence leur homéostasie cellulaire (Mashouri et al., 2019).

3.4.3 Composition en acides nucléiques

La découverte de la présence d'acides nucléiques, et plus précisément d'ARN, a été faite en 2007 à partir des exosomes produits par des mastocytes murins et humains (Valadi et al., 2007). De plus, ces études ont permis de démontrer leur fonctionnalité (synthèse protéique) et

la capacité des exosomes par ces ARN à contrôler à distance l'expression génique d'autres cellules. En effet, ils ont mis en évidence la présence de protéines murines dans des cellules humaines qui avaient été incubées avec des exosomes murins.

La plupart des études réalisées depuis ont confirmé la présence de petits ARN y compris des ARN messagers (ARNm ou mRNA) et des microARN (miRNA) mais pas d'ADN. L'absence d'ARN ribosomique 18S et 28S dans les préparations d'exosomes est considéré comme un bon indicateur de qualité de leur purification. Pour éviter les contaminations d'ARN notamment issu de cellules apoptotiques en culture, un traitement à la RNase est préconisé, car il n'agit pas sur les ARN présents à l'intérieur des exosomes (Valadi et al., 2007). Par la suite, les techniques de séquençage NGS (Next-generation sequencing) ont permis d'identifier, en plus des ARNm et miRN, des petits ARN non codants qui sont aussi enrichis dans les exosomes en comparaison avec la cellule d'origine (Colombo et al., 2014) (*figure 25*).

La découverte de la présence des miRNA a ouvert la voie à un nouveau champ de recherches sur le rôle des exosomes dans le contrôle à distance de leur microenvironnement cellulaire dans un contexte physiopathologique, et notamment dans le cas des cancers. Ainsi un nombre important de publications sont parues ces 10 dernières années ; elles ont permis de démontrer *in vitro* ce transfert fonctionnel de différents miRNA par l'inhibition de l'expression des gènes cibles de ces miRNA dans différentes cellules immunitaires exposées aux exosomes « cargos » (Record et al., 2011; Robbins and Morelli, 2014; Wang and Lotze, 2014). Des approches *in vivo* ont aussi été envisagées avec, notamment, l'étude publiée en 2011 dans Nature Biotechnology ; les auteurs ont obtenu des résultats très prometteurs chez la souris en utilisant des exosomes chargés avec des siRNA dirigés contre la protéase BACE1 impliquée dans la formation du peptide β -amyloïde dans la maladie d'Alzheimer (Alvarez-Erviti et al., 2011). Nous reviendrons sur cet aspect dans les fonctions physiologiques des exosomes et leurs applications dans le domaine de la santé.

Les miRNA ne se retrouvent pas dans les exosomes par hasard et la composition en miRNA des exosomes n'est pas le reflet de la composition de la cellule. Plusieurs mécanismes seraient impliqués dans la sélection des miRNA exportés dans les exosomes dont les céramides (Kosaka et al., 2010; Zhang et al., 2015). Parmi les autres mécanismes, on peut citer l'interaction du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) avec la machinerie ESCRT (Siomi and Siomi, 2009), la sumoylation de la protéine hnRNPA2B1 (heterogenous nuclear ribonucleoproteins A2B1) dans les lymphocytes T (Villarroya-Beltri et al., 2013), et le rôle de la protéine ALIX dans le cas des exosomes d'hépatocytes (Iavello et al., 2016). Cependant il

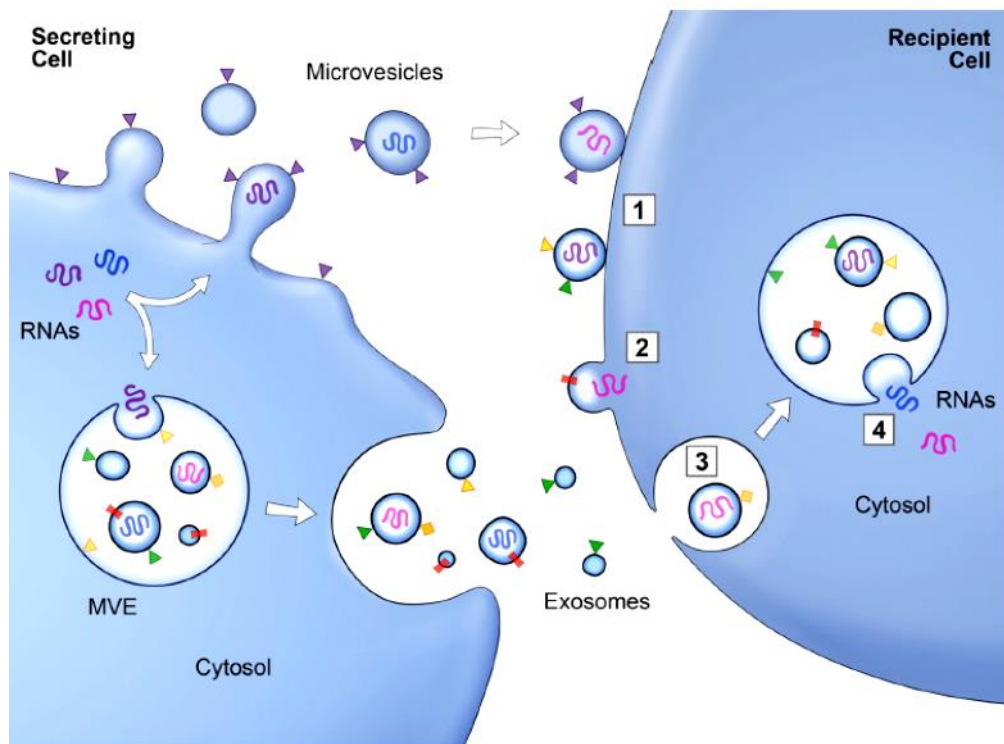



Figure 26 : Mécanismes d'interaction des exosomes avec la cellule cible. Les exosomes pourraient soit (1) se lier à un constituant de la membrane plasmique (ex : récepteur membranaire) de la cellule réceptrice et induire une réponse cellulaire soit (2) fusionner avec la membrane de la cellule réceptrice, soit (3) être endocyté ou phagocyté. (4) Une fois fusionnés ou internalisés, la cargaison des exosomes en protéines et acides nucléiques est délivrée à la membrane ou au cytosol de la cellule cible (Raposo and Stoorvogel., 2013).

reste beaucoup à apprendre et là encore la qualité des préparations en lien avec la méthodologie choisie pour isoler les exosomes, et la présence d'autres EVs peuvent largement influencer les résultats. De plus, aucun argument n'est avancé pour penser que ces mécanismes soient universels, il est en fait probable qu'il existe plusieurs mécanismes en fonction des ARN sélectionnés pour le transport (Colombo et al., 2014).

Finalement, la communauté scientifique et médicale s'intéresse aussi à l'utilisation en clinique de ces ARN présents dans les exosomes ; notamment, beaucoup d'études permettent déjà d'envisager déjà de les utiliser en tant que biomarqueurs de pathologies ou en tant qu'outils de diagnostic ou de suivi des patients notamment atteints de cancers (Mashouri et al., 2019), comme on le verra dans le cas notamment des DLBCL (Rutherford et al., 2018).

3.5 Mécanismes du transfert d'informations par les exosomes

De par leur petite taille, les exosomes sont difficiles à analyser en microscopie optique ou à fluorescence. En revanche l'utilisation de colorants lipophiles fluorescents, comme le PKH26 ou 67 ou la Rhodamine B Octadécyle (R18) (marqueurs des membranes) par exemple, ont permis de les suivre et de visualiser leur mode d'interaction avec la cellule réceptrice. Les différentes études ont permis de démontrer que les exosomes ont 3 moyens pour transmettre un message aux cellules de leur environnement (Raposo and Stoorvogel, 2013 ; Abels and Breakefield, 2016) : (1) par contact cellulaire en créant une signalisation de type ligand/récepteur (Muller et al., 2017) (2) par fusion avec la membrane plasmique (Parolini et al., 2009) et (3) par endocytose (Franzen et al., 2014; Sagar et al., 2016) (*figure 26*).

 **Communication entre les exosomes et les cellules par une interaction de type ligand-récepteur** : Ce mode de transmission d'informations a beaucoup été décrit pour les exosomes interagissant avec des cellules d'origine hématopoïétique. A la membrane des exosomes sécrétés la présence de molécules d'adhésion cellulaire comme les intégrines, ou certains récepteurs membranaires peuvent activer une signalisation au niveau de la cellule cible sans forcément être internalisé. C'est le cas des exosomes de lymphocytes B qui portent des intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ impliquées dans l'adhésion Ca^{2+} dépendante des fibroblastes activés par le $\text{TNF-}\alpha$ (Clayton et al., 2004). De la même façon, les exosomes produits par les cellules dendritiques (DC) sont capables d'activer *in vitro* et *in vivo* les lymphocytes T en se fixant à d'autres DC sans nécessiter leur internalisation. L'activation des LT implique ensuite, comme on l'a évoqué précédemment, la présence de complexes CMH-Ag à la surface des exosomes. La fixation des exosomes sur les cellules dendritiques résulte de l'interaction entre ICAM-1

présent sur les exosomes et son récepteur LFA-1 présent à la surface des cellules dendritiques. Cette étude a permis de démontrer le transfert et la capture d'exosomes entre DC, ce qui détermine potentiellement une augmentation de l'efficacité de la réponse immune (Segura et al., 2007).

✚ Cependant, le transfert de protéines cytosoliques et d'ARN nécessite la fusion et/ou l'entrée des exosomes dans la cellule « réceptrice ».

Les exosomes sont également capables de fusionner avec la membrane plasmique des cellules. Cependant, cette modalité serait mineure par rapport à l'endocytose qui semble être la forme la plus commune pour l'entrée des exosomes (Abels and Breakefield, 2016) (*figure 26*). Les tétraspanines CD9 et CD81 semblent être impliquées dans ce processus observé dans des cellules cancéreuses de mélanome (Montecalvo et al., 2012). Une fois fusionnés, les exosomes peuvent déverser leur contenu directement dans le cytosol de la cellule réceptrice. Enfin, les exosomes peuvent également être internalisés par endocytose ou phagocytose par les cellules phagocytaires (monocytes et macrophages). Plusieurs mécanismes ont été évoqués qui pourraient varier en fonction de la cellule « réceptrice » (Abels and Breakefield, 2016; Colombo et al., 2014b). L'endocytose peut-être, comme pour la biogenèse des exosomes : dépendante (cas de neurones) ou indépendante de la clathrine (certaines cellules tumorales), dépendante de la cavéoline (ex : cellules épithéliales), dépendante de la dynamine 2, du réseau d'actine et de la PI3K dans le cas de la phagocytose par des macrophages ou des DC (Feng et al., 2010; Montecalvo et al., 2012). Des travaux ont montré après endocytose d'exosomes marqués au PKH67 ou avec du R18 dans des types cellulaires variés, que les exosomes intègrent le système endosomal de la cellule. En effet, ils ont été localisés dans un premier temps au niveau des compartiments endosomaux précoces puis tardifs par la suite (Morelli et al., 2004; Tian et al., 2013). Cependant, une fois endocytés la cargaison de ces exosomes doit ressortir pour être déversée dans le cytosol de la cellule réceptrice, et donc échapper à la poursuite de la voie endosomale qui mène normalement à la dégradation via les lysosomes. Ce processus d'échappement à la voie endosomale existe puisque que le transfert d'acides nucléiques a été décrit à la fois *in vitro* et *in vivo* (Abels and Breakefield, 2016). De plus, il a été observé à l'aide de sondes fluorescentes lipophiles dans des cellules tumorales et des DC (Montecalvo et al., 2012; Parolini et al., 2009). Le mécanisme n'est pas complètement élucidé, mais il suggère une étape de fusion qui pourrait se faire : soit avec la membrane des MVB (back-fusion) (Abrami et al., 2013) soit ou celle de l'endosome (Joshi et al., 2020).

3.6 Signification biologique des EVs : aspect physiologique et physiopathologique

Initialement envisagés lors de leur découverte comme un moyen pour les cellules de se débarrasser de leurs déchets (Johnstone, 2006), les exosomes sont devenus ces 10 dernières années le sujet fascinant d'un vaste champ de recherches. Ces nombreux travaux, menés au niveau français et international, ont permis d'identifier un nouveau moyen de communication intercellulaire qui est très conservé depuis les cellules d'invertébrés à celles des mammifères, mais aussi des pathogènes comme les virus et certaines plantes (Jimenez-Jimenez et al., 2019; Kumar et al., 2020; Nagarajah, 2016). Les processus dans lesquels ils interviendraient sont très vastes allant du comportement animal (Corrigan et al., 2014) à l'infection virale (Izquierdo-Useros et al., 2010).

Leur rôle principal est de réaliser le transfert d'informations entre les cellules des organismes et ils participent plus globalement à l'homéostasie cellulaire et tissulaire en modifiant la viabilité, le statut et la fonction des cellules qu'ils contactent et en intervenant dans la réparation tissulaire (Borges et al., 2013). En France, deux publications du groupe de Graça Raposo à la fin des années 90 ont été importantes dans la révélation du rôle des exosomes en tant que médiateurs de la communication intercellulaire. Ces travaux portaient sur les interactions entre des cellules du système immunitaire. La première publication analysait les vésicules produites par des lymphocytes B notamment transformés par l'EBV, démontrant qu'ils exprimaient à leur surface des molécules de classe II du CMH et avaient la capacité de présenter des Ag à des lignées de lymphocytes T, déterminant leur activation spécifique (Raposo et al., 1996). Ces résultats *in vitro* ont été poursuivis par des essais *in vivo* dans la seconde publication démontrant, pour la première fois, la capacité vaccinale et anti-tumorale des EVs produites par des cellules dendritiques murines vis-à-vis du développement de tumeurs syngéniques dans des modèles murins (Zitvogel et al., 1998). Ces découvertes, et les applications fondamentales en immunothérapie qui semblaient possibles, ont alors conduit à une myriade d'articles puis de revues traitant du rôle des exosomes *in vitro* et *in vivo* dans le domaine de l'immunorégulation et des cancers (Mashouri et al., 2019; Théry et al., 2009; Tkach and Théry, 2016). En effet, très vite aussi, on a découvert que les cellules tumorales sécrétaient des EVs (Wolfers et al., 2001) qu'on retrouvait en périphérie chez les patients (Taylor and Gercel-Taylor, 2008). Depuis, on sait que le champ d'action physiologique des EVs dépasse le système immunitaire ou plus généralement hématologique, car leur libération a été démontrée par les neurones, les cellules microgliales, ou le tissu adipeux par exemple (Nagarajah, 2016). Bien que les modèles

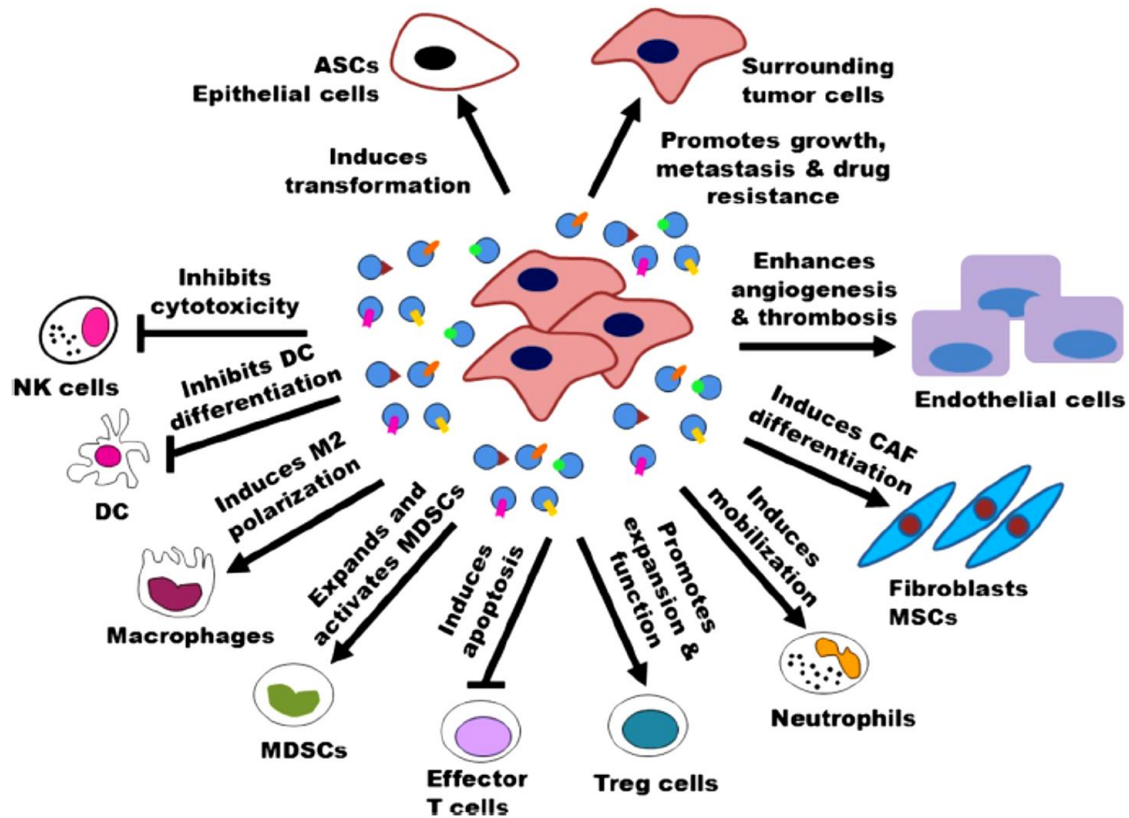


Figure 27 : Rôle des exosomes dans les cancers. Les exosomes d'origine tumorale peuvent activer les cellules endothéliales pour favoriser l'angiogenèse et les thromboses. Ils peuvent différencier les fibroblastes et les cellules souches mésenchymateuses (MSC) en myofibroblastes pour faciliter l'angiogenèse et les métastases tumorales. Ils contribuent à créer un microenvironnement immunosuppresseur en induisant l'apoptose et en altérant la fonction des lymphocytes T et des cellules NK, en inhibant la différenciation des cellules dendritiques (DC), en activant les cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Ils peuvent mobiliser les neutrophiles et favoriser la polarisation M2 des macrophages, facilitant la progression tumorale. De plus, ils peuvent aider les cellules tumorales à développer une résistance aux médicaments en transférant des protéines et des miARN multirésistants, en exportant des médicaments antitumoraux et en neutralisant des médicaments à base d'anticorps (Zhang et al., 2015).

expérimentaux *in vivo* manquent parfois, ou la certitude que les données *in vitro* soient le reflet des concentrations physiologiques des EVs, de plus en plus d'études suggèrent leur rôle émergent dans le traitement ou le diagnostic d'autres pathologies comme les pathologies neurodégénératives (Li et al., 2020), le diabète (Lazar et al., 2018; Noren Hooten and Evans, 2020) ou les maladies inflammatoires chroniques (Larabi et al., 2020).

Notre problématique de thèse a concerné le rôle des « small EVs » dont les exosomes dans l'échappement des cellules B tumorales de DLBCL vis à vis de l'immunothérapie anti-CD20. Aussi, nous avons choisi de ne décrire que le rôle des EVs dans les cancers ; puis nous finirons par les données connues au moment du démarrage de ma thèse dans les DLBCL.

3.7 Vésicules extracellulaires, exosomes et cancers

La découverte à partir des années 2000 de la production par les cellules tumorales de grandes quantités d'exosomes, appelés TEX pour « Tumor-derived exosomes » a initié de nombreuses études visant à déterminer leur rôle dans le processus tumoral. Leur présence a été effectivement retrouvée dans le microenvironnement tumoral (TME) mais aussi dans les fluides biologiques des patients atteints de cancers. La proportion de ces TEX est majoritaire parmi les vésicules plasmatiques notamment chez les patients présentant des stades avancés de leurs maladies. De plus, il a été décrit que l'environnement acide au sein d'une masse tumorale favoriserait la sécrétion des EVs à des taux supérieurs comparés aux cellules saines (Kharaziha et al., 2012; van Dommelen et al., 2012) et que ce pH favoriserait la fusion de ces vésicules issues de cellules tumorales à la membrane plasmique des cellules saines (Marleau et al., 2012; Parolini et al., 2009). Dans ce TME, les TEX vont être les acteurs déterminants de la communication intercellulaire avec d'autres cellules tumorales, mais aussi des cellules normales notamment des cellules immunitaires ou endothéliales et des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) recrutées au niveau de la tumeur. Ils vont ainsi par des activités paracrines contrôler et détourner les fonctions des cellules du TME au bénéfice de la tumeur, mais aussi en circulant dans le sang périphérique se disséminer à distance et transmettre leur cargaison vers d'autres organes ou sites anatomiques (Whiteside, 2018) (*figure 27*).

Un grand nombre d'études indiquent maintenant que les EVs jouent un rôle important dans plusieurs étapes du processus de la tumorigenèse, comme : la croissance, la progression, l'angiogenèse, la dissémination sous forme de métastases et les résistances thérapeutiques (*figure 27*). Si la majorité de ces études ont permis de mettre à jour le rôle pro-tumoral des TEX, d'autres ont mis en perspectives leur dualité fonctionnelle notamment par leur effet

immunogénique ou leur capacité à véhiculer des « cargaisons » anti-tumorales, ouvrant la voie à des stratégies thérapeutiques, comme la vaccination ou le ciblage tumoral. Enfin un grand nombre d'études récentes y compris dans le domaine des lymphomes, mettent en avant leur capacité à représenter de nouvelles « biopsies liquides » qui pourrait être déterminante dans le diagnostic et/ou le suivi des malades (Navarro-Tableros et al., 2018; Whiteside, 2018; Zhang et al., 2015). Dans les paragraphes suivants, nous allons préciser les cibles cellulaires impliquées dans la diversité (pro et anti-tumorale) des effets des exosomes et les principales applications de ces nanovésicules en oncologie. **De plus, bien que les EVs peuvent aussi être libérées par des cellules non tumorales (cellules immunitaires, MSCs...) nous ne traiterons que des vésicules produites par les cellules tumorales.**

3.7.1 Régulation par les TEX du système immunitaire

Les « exosomes » ont été initialement décrits comme des « antigènes associés aux tumeurs » et des agents immunostimulateurs (Zitvogel et al., 1998). Par la suite, les travaux sur les EVs produites par les cellules tumorales (TEX) ont montré qu'ils réalisaient plutôt des fonctions immunosuppressives notamment sur les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral (TME), en transportant notamment des molécules immunosuppressives ou pro-apoptotiques telles que le TRAIL (TNF (tumor necrosis factor) related apoptosis-inducing ligand), Fas-ligand, PD-L1 (programmed death-ligand 1), et l'interleukine-10 (IL-10) (Kunigelis and Graner, 2015; Muller et al., 2017). Ils réalisent un rôle pro-tumoral en contrôlant et bloquant l'activité de différentes cellules immunitaires de l'immunité innée (cellules dendritiques ou DCs, macrophages et cellules NK) et adaptative (lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et LT cytotoxiques CD8⁺ notamment), spécialisées dans la lutte anti-tumorale. Ainsi, les TEX diminuent *in vitro* la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 (Andreola et al., 2002; Huber et al., 2005), et inhibent l'effet cytotoxique des cellules NK (Liu et al., 2006). Les TEX peuvent aussi induire la différenciation de cellules souches myéloïdes recrutées sur le site tumoral en cellules myéloïdes suppressivesc (MDSCs, Myeloid-derived suppressor cells), responsables de l'inhibition des lymphocytes T, facilitant par exemple des métastases pulmonaires (Zhang et al., 2015). Concernant les macrophages, plusieurs études ont montré que les TEX stimulent l'infiltration des macrophages sur le site de la tumeur et leur polarisation en macrophages de type M2 anti-inflammatoires, ou TAMs (tumor-associated macrophages), favorisant la progression tumorale (Navarro-Tableros et al., 2018; Shinohara et al., 2017; Zhang et al., 2015).

Les mécanismes responsables de ces immunomodulations sont très variés et beaucoup sont liés à des ligands de récepteurs ou molécules signalisatrices à la surface des « small EVs ». En particulier, ces vésicules expriment à leur membrane le TGFβ1, immunosuppresseur des lymphocytes T CD8⁺ (Clayton et al., 2007). De même, ils expriment des ligands des récepteurs de mort comme Fas-L déterminant l'apoptose des LT CD8⁺ ; ces mêmes EVs peuvent aussi induire la prolifération et l'activation de cellules T régulatrices (Treg, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) qui, par leur activité immunosuppressive des LT cytotoxiques notamment, favorisent l'échappement de la tumeur vis-à-vis de la réponse immunitaire (Whiteside, 2018; Wieckowski et al., 2009). Ces expressions et celles d'autres ligands de surface sont retrouvées *in vivo* ; par exemple, les « small EVs » circulants de patients présentant un cancer de la prostate expriment des ligands du récepteur cytotoxique NKG2D des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺. L'expression de ces ligands conduit à la régulation négative de l'expression du NKG2D déterminant une inhibition de l'activité de ces cellules cytotoxiques (Lundholm et al., 2014). Les effets pro-tumoraux des EVs, décrits pour beaucoup sur des modèles cellulaires tumoraux *in vitro*, ont également été démontrés dans des modèles *in vivo* ; ainsi l'injection d'exosomes issus de cellules tumorales à des souris atteintes de carcinome mammaire et de mélanome favorise la croissance tumorale et les métastases en augmentant la différenciation des cellules myéloïdes inhibitrices et en diminuant l'activité des cellules NK (Liu et al., 2006). Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, les exosomes seraient capables d'inhiber la différenciation des monocytes en macrophages et de précurseurs myéloïdes en cellules dendritiques, permettant aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire (Bobrie and Théry, 2013; Yu et al., 2007).

Parmi les autres mécanismes, il faut rappeler la capacité pour les exosomes d'être capturés (internalisés) par des cellules cibles, permettant de fait la vidange de leur « cargaison ». Ainsi, le transfert de certains ARNm et de microARN a été impliqué notamment dans la polarisation des macrophages en type 2 (Fabbri et al., 2012; Zhang et al., 2015).

En conclusion, l'ensemble de ces données suggèrent que les TEX interfèrent à plusieurs niveaux de la réponse immune anti-tumorale facilitant l'échappement de la tumeur. Cependant, la fonction anti-tumorale de ces EVs, bien que sans doute insuffisante, est aussi révélée par l'identification de molécules immunostimulatrices comme CD80 ou CD70, de même que la présence des molécules du CMH et d'antigènes (Ag) associés aux tumeurs (TAAs) (Whiteside, 2018). De plus, les TEX sont capables de transférer des Ag tumoraux à des DCs via l'expression des molécules de classe I du CMH et d'induire une immunité anti-tumorale CD8⁺ dépendante (Wolfers et al., 2001).

3.7.2 Rôle des TEX dans la progression tumorale

Les TEX ne jouent pas seulement un rôle dans la régulation des cellules immunitaires présentes ou recrutées sur le site de la tumeur. Ils peuvent transférer des signaux de survie à d'autres cellules tumorales, mais aussi moduler le fonctionnement d'autres cellules du TEM impliquées dans la formation de niches tumorales primaires et/ou pré-métastatiques. Il s'agit principalement des cellules stromales avec notamment les fibroblastes et les MSCs qui vont contribuer à la formation d'un environnement pro-tumoral, et des cellules endothéliales pour induire un programme pro-angiogénique (Lobb et al., 2017; Whiteside, 2018; Zhang et al., 2015) (*figure 27*).

En effet, un certain nombre de travaux ont permis de mettre en évidence l'implication des exosomes dans la progression tumorale et dans la formation de métastases. L'équipe de Clothilde Théry a utilisé des cellules tumorales dont l'expression de Rab27a avait été inhibée, puis a regardé la capacité des exosomes à développer des tumeurs *in vivo* et à interagir avec le système immunitaire. Ils ont observé que les tumeurs contrôles se développaient progressivement et formaient des métastases. En revanche, les tumeurs qui présentaient une diminution de sécrétion d'exosomes, suite à l'inhibition de Rab27a, ne se développaient presque pas (Bobrie and Théry, 2013). De même, les exosomes issus de sérum de patientes atteintes de cancer du sein induisent la formation de tumeurs chez des souris injectées avec des cellules épithéliales saines (Melo et al., 2014). Ces résultats montrent que les exosomes peuvent participer au développement de la tumeur, mais également à la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses (Zhang et al., 2015).

Les mécanismes impliquent en majorité le transfert à des cellules cibles du TEM de la cargaison des exosomes et plus particulièrement des ARNm et microARN, comme ce sera le cas aussi dans les lymphomes que nous traiterons à part. Ainsi, pour exemple, les microvésicules périphériques de patients atteints de glioblastomes contiennent des ARNm du variant III du récepteur à l'EGFR (EGFRvIII) qui stimulent la prolifération des cellules de gliomes (Al-Nedawi et al., 2008). Les exosomes produits par des lignées cellulaires de cancer de la prostate contiennent des protéines oncogéniques (comme de la famille des Ras GTPases) ou des ARNm (ex : KRAS) et des microARN (miR-125b, miR-130b ou miR-155) responsables de la transformation maligne de cellules souches adipeuses des patients (Abd Elmageed et al., 2014). D'autres travaux ont révélé l'importance des microARN dans la progression et le suivi du mélanome ; ainsi la présence de miR-9 dans les exosomes, produits par des cellules de mélanome et internalisés par les cellules endothéliales, favorise l'angiogenèse et le processus

métastatique via l'activation de la voie JAK-STAT (Gajos-Michniewicz et al., 2014). Le rôle des TEX dans la formation de niches pré-métastatiques pulmonaires peut aussi être réalisé via le transfert et la régulation positive du facteur angiogénique VEGF et d'une enzyme responsable du remodelage de la matrice extra-cellulaire, la MMP2 (matrix metalloproteinase-2) par les cellules endothéliales pulmonaires (Lobb et al., 2017). De façon plus générale, les TEX peuvent, en fonction des types de cancers, transporter et transférer des protéines comme le TGF β , la cavéoline-1, l'HIF- α et la β -caténine impliquées dans le caractère invasif des cellules tumorales et dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire (ECM) vers la formation de niches (Dai et al., 2020).

3.7.3 Exosomes et résistances thérapeutiques

Etant donné le rôle important des exosomes dans la survie, la prolifération et la progression des cellules tumorales, il est apparu rapidement évident qu'ils pouvaient contribuer également à la résistance aux traitements. Le mécanisme intuitif impliquant les exosomes serait l'internalisation des molécules médicaments cytotoxiques dans les vésicules intracellulaires, et leur expulsion dans le milieu extracellulaire afin de protéger les cellules des traitements. En effet, ces observations ont été faites sur des microvésicules issues de cellules tumorales de mélanome et du cancer de l'ovaire où les exosomes sécrétés expulsaient les molécules médicaments cytotoxiques, permettant aux cellules de se protéger de leurs effets nocifs (Chen et al., 2006; Safaei et al., 2005). Les cellules tumorales résistantes peuvent également transmettre aux cellules sensibles, via leurs exosomes, des protéines associées au processus de la résistance multi-drogues (MDR, multi-drug resistance) (Corcoran et al., 2012). Ce mécanisme de résistance peut également impliquer le transfert de microARN. Une étude a montré que les miR, tels que miR-30a, miR-222 ou miR-100-5p, transportés dans les exosomes issus de cellules de cancer du sein résistantes aux traitements (adriamycine et docétaxel) induisaient la résistance des cellules sensibles. Une fois transférés, ces microARN modifient la progression du cycle cellulaire et affectent les voies de signalisation de l'apoptose, notamment les voies MAPK ou mTOR pour diminuer la sensibilité aux médicaments (Chen et al., 2014). Ainsi, dans certains cas comme les carcinomes hépatocellulaires (HCC) ou les cancers du colon, le transfert de microARN par les exosomes détermine un phénotype MDR via l'inhibition de PTEN et l'activation consécutive de l'AKT (Mashouri et al., 2019).

Finally, as we will see in the case of B lymphomas (Aung et al., 2011), the « small EVs » by expressing targeted Ags by immunotherapy can behave like « decoy receptors » vis-à-vis therapeutic antibodies, interfering consequently with the efficacy of these treatments. This is the case, for example, of exosomes produced by cancer cell lines or isolated from patient serum. They express the HER2 receptor determining a decrease in the efficacy of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) induced by therapeutic antibodies targeting this receptor on tumor cells (trastuzumab) (Battke et al., 2011).

3.7.4 Utilisation des exosomes comme biomarqueurs et outils de diagnostic dans les cancers ?

In general, and despite certain therapeutic advances, patients for whom clinicians and pathologists judge a poor prognosis arrive often at an advanced stage of the disease. In fact, we still lack specific biomarkers allowing for early detection of tumors. This is why, more and more studies are dedicated to the identification of potential biomarkers with diagnostic but also prognostic value, that is to say specific molecular signatures for cancer detection and early patient care.

The analysis of the content of exosomes secreted by tumor cells has allowed to show the abundance of information carried or expressed by them in the form of proteins, lipids, nucleic acids and characteristic metabolites of the disease, reflecting the phenotype and the content of the parent tumor cell (Boukouris and Mathivanan, 2015). In addition, exosomes are transported in biological fluids (blood, serum, plasma, urine) and their lipid composition protects their cargo from degradation. This presence, especially in blood, allows for their easy isolation from patients, without the need for invasive procedures, comparing them to « liquid biopsies ». Thus, since the early 2000s and following the publication of methodological articles validating purification protocols for circulating extracellular vesicles (Muller et al., 2014; Théry et al., 2006), a certain number of articles have demonstrated the value of « biomarkers » of TEX in certain cancers. This is notably the case in lung, breast and colon cancers where certain microRNAs have been proposed as diagnostic, prognostic and even predictive biomarkers of therapeutic response (Dai et al., 2020). For example, recently the

présence des microARN miR-451a, miR-21 et miR-4257, dans des petites vésicules périphériques de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules, a été fortement associée à la progression tumorale, les rechutes et un mauvais diagnostic (Kanaoka et al., 2018). Ces découvertes concernent aussi les cancers hématologiques, avec pour exemple, la valeur pronostique/prédictive du miR155 exosomal pour certaines hémopathies malignes notamment les leucémies (CLL, Chronic lymphocytic leukemia ; CML, Chronic myelocytic leukemia ; AML, Acute myeloid leukemia) mais aussi les DLBCL (Xia et al., 2018).

En plus du contenu en ARN, certaines protéines exosomales pourraient constituer des biomarqueurs potentiels dans les cancers. Comme on l'a évoqué précédemment, les microvésicules isolées du sérum de patients atteints de glioblastome présentent des niveaux accrus de l'EGFRvIII spécifique du glioblastome, suggérant qu'ils pourraient être utilisés comme marqueur diagnostic du cancer (Skog et al., 2008). Plus récemment, une étude a montré que l'identification de la protéine pro-angiogénique Del-1 (Developmental endothelial locus-1 protein), sur des EVs obtenues à partir du plasma de patientes atteintes de cancers du sein, était un nouveau biomarqueur pour la détection de la maladie à un stade précoce (Moon et al., 2016). En conclusion, il est de plus en plus évident que les EVs dont les exosomes périphériques des patients représentent de nouveaux biomarqueurs des cancers. Si beaucoup de publications ont concerné les tumeurs solides, les cancers hématologiques ont fait l'objet d'une attention particulière ces dernières années, y compris les DLBCL comme nous allons le détailler ensuite. De façon intéressante, le nombre d'EVs plasmatiques a été retrouvé augmenté chez les patients pour beaucoup d'hémopathies malignes (leucémies, myélome multiple, lymphome de Hodgkin) par rapport aux sujets sains ; il est suggéré que la concentration de ces EVs pourrait même être un indicateur de la « charge tumorale » à valeur pronostique notamment en réponse aux traitements (Longjohn et al., 2020).

Le champ des applications cliniques potentielles va du diagnostic et suivi des cancers à l'utilisation des « small EVs » dont les exosomes en tant que vecteurs de vaccinations ou de navettes à médicaments. Leur valorisation et leur transfert en clinique seront sans doute favorisés par la simplification, qui commence à se réaliser, des protocoles de purification et d'analyse à partir des liquides biologiques.

3.8 Exosomes et DLBCL

Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur les résistances thérapeutiques des DLBCL, le maintien de l'expression du CD20 à la surface des cellules B tumorales reste un enjeu clinique important. La découverte de la libération de « small EVs » par les cellules B normales et

tumorales et de la présence du CD20 notamment à leur surface (Clayton et al., 2001; Oksvold et al., 2014) a évoqué naturellement leur rôle dans l'échappement des cellules vis-à-vis des anti-CD20 thérapeutiques.

Au moment où j'ai débuté ma thèse, il y avait peu de travaux sur ces vésicules et les exosomes dans les DLBCL et ils concernaient surtout leur rôle dans les résistances thérapeutiques. Les études pionnières publiées par l'équipe de Gerald G. Wulf en Allemagne ont posé les bases de ma thèse, démontrant sur des modèles *in vitro* l'échappement des cellules de lignées de type GCB de DLBCL, ou de cellules périphériques de patients, vis-à-vis de la CDC induite par le rituximab.

Dans ces cellules, le processus de production des « small EVs » est dépendant du transporteur lipidique ABCA3, impliqué comme on l'a évoqué dans la biogenèse des exosomes, confirmant aussi la présence des exosomes dans leur préparation ; ces données ont été obtenues après inhibition de l'expression de l'ABCA3 la fois par shRNA et par inhibition pharmacologique (indométhacine) (Aung et al., 2011). Puis, cette même équipe a mis en évidence leur capacité signalisatrice via le transport de la protéine Wnt3a, qui joue un rôle dans l'équilibre de la population cellulaire constituant la tumeur, en modulant les états de clonogénicité des cellules (Koch et al., 2014). Comme pour les autres TEX, les exosomes libérés par les cellules de DLBCL peuvent capturer et retenir des drogues de la chimiothérapie. Cette capture a été associée à une baisse de la sensibilité des cellules B tumorales aux molécules thérapeutiques (doxorubicine et pixantrone). De plus, la sensibilité des cellules aux drogues est restaurée et augmentée lors du blocage du processus de sécrétion des exosomes, suite à l'inhibition de l'expression du transporteur ABCA3 (Koch et al., 2016).

Par la suite, le rôle des exosomes produits par les cellules B tumorales de DLBCL a été précisé notamment pour leur implication dans la progression tumorale, y compris via leur capacités immunomodulatrices, et en tant que biomarqueurs. En effet, les TEX libérés par des lignées cellulaires de DLBCL ont la capacité d'être capturés par des cellules dendritiques (DCs) humaines et par des cellules d'autres lymphomes B, et exercent sur ces cellules des effets immunosuppresseurs. En particulier, ils déterminent, comme on l'a vu pour les propriétés immunomodulatrices des autres exosomes, l'apoptose de cellules T humaines en régulant positivement l'expression de PD-1 dans ces cellules (Chen et al., 2018). Les « small EVs » périphériques de patients DLBCL, en rechute ou réfractaires aux traitements, induisent une diminution de la prolifération et de la cytotoxicité des cellules NK de patients ou de sujets sains contrôles, ce qui va déterminer un échappement à une partie de la défense de l'hôte (Zare et al., 2020). De même, ces exosomes modifient le microenvironnement tumoral, en favorisant la

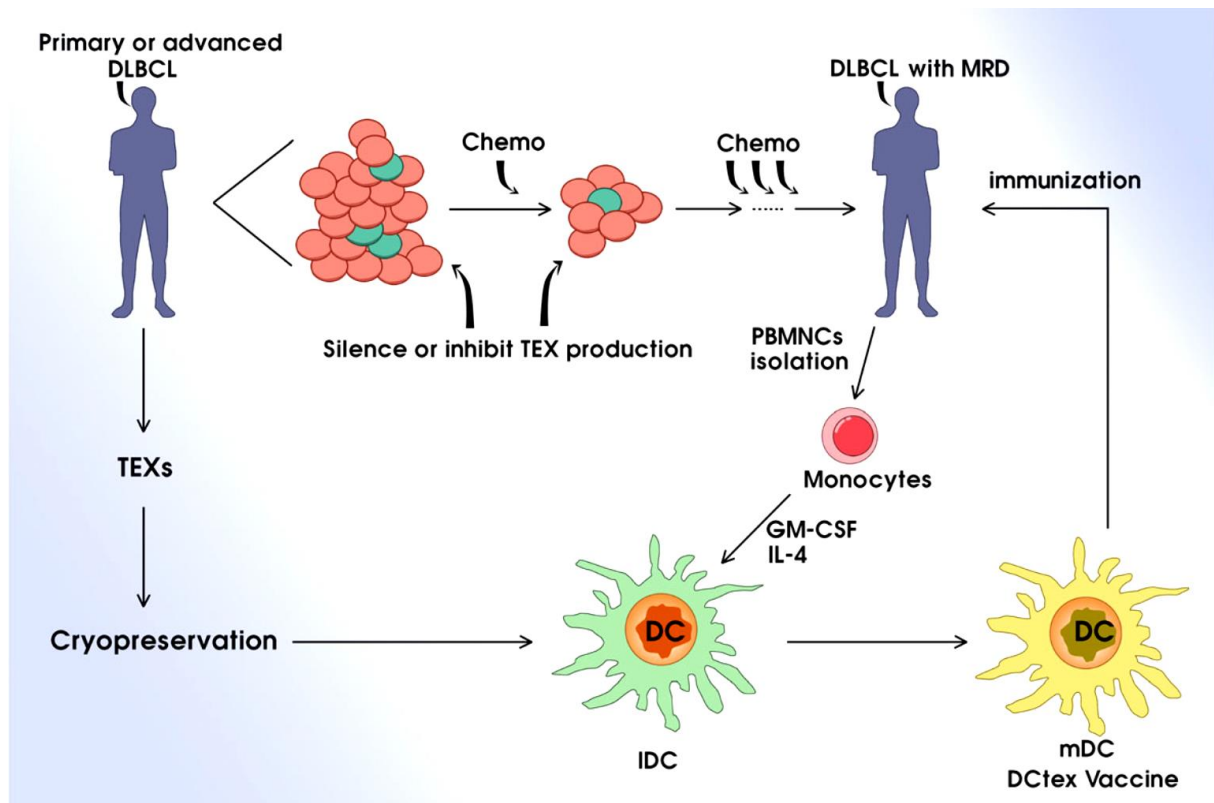


Figure 28 : Représentation schématique de la thérapie ciblant les exosomes dérivés de DLBCL. La dualité fonctionnelle des TEX est illustrée par la nécessité de pouvoir inhiber leur production avant les traitements tout en proposant de les utiliser pour favoriser la présentation d'Ag tumoraux par les cellules dendritiques. Dans ce dernier cas les exosomes de DLBCL seraient utilisés comme « vaccins » pour augmenter la défense immunitaire spécifique anti-tumorale des patients. TEXs, exosomes dérivés de cellules tumorales; Chemo, chimiothérapie; MRD, maladie résiduelle minimale; PBMCN, cellules mononucléées du sang périphérique humain; DC, cellule dendritique; IDC, cellule dendritique immature; mDC, cellule dendritique mature (Chen et al., 2018).

prolifération et la migration de cellules stromales (fibroblastes humains normaux) mais aussi l'angiogenèse (cellules HUVEC). Comme pour les autres types de TEX, une dualité dans les applications cliniques a été aussi mise en évidence pour ceux libérés par les cellules B de DLBCL. Ainsi, en parallèle des effets protumoraux, leur capacité immunostimulatrice vis-à-vis des cellules présentatrices d'Ag, comme les DCs, a été démontrée. La pré-incubation des DCs avec ces exosomes stimule l'expansion clonale des cellules T lors de leur coculture, et augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL6, TNF α) tout en diminuant celle de cytokines immunosuppressives (IL4, IL10). *In vivo*, les LT prélevés de souris immunodéficientes porteuses de xenogreffes tumorales de DLBCL (lignée OCI-LY3), et immunisées avec des exosomes de même origine (autologues), présentent une activité anti-tumorale supérieure par rapport aux cellules T des souris non immunisées (Chen et al., 2018). Ces résultats suggèrent d'une part l'intérêt à bloquer le processus de sécrétion des exosomes dans les DLBCL, tout en laissant la possibilité d'autre part de les utiliser dans un protocole de vaccination, notamment pour traiter des patients ayant une maladie résiduelle après les traitements conventionnels (*figure 28*).

Ces dernières années un certain nombre de travaux ont été réalisés sur le contenu en ARN des EVs de DLBCL (Navarro-Tableros et al., 2018). Certaines études ont validé la pertinence de ce choix, comme celle de Rutherford et collaborateurs, qui montre que le profil mutationnel des ARN des exosomes produits par des lignées cellulaires de DLBCL reflète parfaitement celui des cellules tumorales d'origine (Rutherford et al., 2018); ils suggèrent finalement à la fin de leur étude que, par l'accès à ces informations génomiques, les exosomes périphériques des patients pourraient servir de biomarqueurs dans le suivi des patients atteints de ce lymphome. D'autres travaux ont permis d'identifier certains ARN présents dans les EVs circulants des patients comme des marqueurs de pronostic, comme l'ARNm de C-MYC qui est associé à un mauvais pronostic (Provencio et al., 2017). Plus récemment, une étude espagnole a analysé les profils des microARN dans les exosomes issus de lignées cellulaires de DLBCL chimiorésistantes au R-CHOP comparativement aux exosomes produits par les cellules parentales, ainsi qu'à partir du sérum de patients. 37 miARN régulés à la hausse ont été identifiés, dont le miR-99a-5p et le miR-125b-5p qui ont été de plus retrouvés à des taux élevés dans les exosomes sériques des patients. Finalement, la présence de ces taux élevés des 2 microARN exosomaux a été corrélée avec une diminution de la survie sans progression des patients, suggérant qu'ils pouvaient être utilisés pour prédire l'efficacité du traitement par chimiothérapie (Feng et al., 2019).

En conclusion, les données obtenues ces 10 dernières années ont apporté des arguments expérimentaux attestant que les « small EVs » des patients atteints de DLBCL, ou les exosomes quand leur caractérisation était complète, peuvent servir de biomarqueurs de la progression de la maladie, mais aussi prédictifs de la survie et/ou de la réponse thérapeutique. Cependant, l'origine cellulaire et par conséquent tumorale de ces EVs périphériques reste à prouver, sachant que d'autres cellules non tumorales doivent y contribuer (cellules B normales, cellules dendritiques, cellules stromales...). Les TEX produits par les cellules B de DLBCL pourraient cependant être produits en grande quantité, si on regarde les données obtenues sur d'autres hémopathies malignes. De plus, aucune étude comparative n'avait été réalisée sur la production des « small EVs » et leur niveaux d'expression du CD20 en fonction du sous-type de DLBCL. Finalement, la confirmation de leur implication clinique dans des modèles *in vivo*, en lien avec l'échappement aux anti-CD20, nécessitait des études supplémentaires.

C'est pourquoi nous avons décidé d'approfondir au cours de cette thèse l'étude de la production des « small EVs » et si possible des exosomes par des lignées cellulaires GCB et ABC de DLBCL. De plus, leur capacité à interférer avec l'action des anticorps de l'immunothérapie a été étudiée notamment in vivo sur un modèle murin de xénogreffe de DLBCL. Finalement, nous avons analysé l'effet de la signalisation du récepteur TrkB sur ce processus. En parallèle, suite au démarrage d'un contrat de recherche en septembre 2018 avec l'Institut Roche, j'ai pu réaliser un travail sur des « small EVs » isolées du plasma de patients atteints de DLBCL, comparativement à des sujets sains volontaires. Cette partie de ma thèse a été réalisée grâce à la collaboration avec le service d'Hématologie Clinique (Pr Arnaud Jaccard et Dr Julie Abraham), le laboratoire d'Hématologie (Pr Jean Feuillard) et le Centre de Recherche clinique et d'Innovation du CHU de Limoges. Les premiers résultats, qui font l'objet d'une clause de confidentialité, seront présentés dans un chapitre à part, car non encore publiables, dans ce mémoire.

Résultats – Article 1

CD20 expression, TrkB activation and functional activity of Diffuse Large B Cell Lymphoma-derived small extracellular vesicles.

Marine Aitamer, Hussein Akil, Chantal Vignoles, Maud Branchaud, Julie Abraham, Nathalie Gachard, Jean Feuillard, Marie-Odile Jauberteau, Hamasseh Shirvani, Danielle Troutaud* and Hafidha Bentayeb* .

Les neurotrophines

Les neurotrophines (NTs) constituent une famille de facteurs de croissance structurellement liés essentiels pour la survie, la différenciation et la prolifération des cellules nerveuses. La première neurotrophine découverte dans les années 50 par Levi-Montalcini (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951) est le NGF (Nerve Growth Factor) (Levi-Montalcini, 1964). C'est seulement dans les années 80 puis 90 que les autres membres de la famille des neurotrophines ont été caractérisés chez les mammifères avec : le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Barde et al., 1982; Leibrock et al., 1989), la neurotrophine 3, NT-3 (Hohn et al., 1990; Jones and Reichardt, 1990; Maisonpierre et al., 1990) et les neurotrophines 4/5, NT-4/5 (Hallböök et al., 1991). Bien qu'initialement décrites pour leur rôle dans le développement et le fonctionnement des neurones, leur rôle a été montré depuis dans de nombreux autres systèmes physiologiques, y compris le système immunitaire (Vega et al., 2003). De plus, elles exercent également des effets dans le contrôle de la prolifération et de la migration cellulaires de cellules non neuronales dans des conditions physiopathologiques comme les cancers (Skaper, 2018).

Des gènes aux protéines

Chez l'homme, les gènes codants pour les neurotrophines NGF, BDNF, NT-3 et NT-4/5 sont respectivement localisés sur les chromosomes 1, 11, 12 et 19 (Francke et al., 1983; Ozçelik et al., 1991). Ils possèdent des exons non codants qui subissent des épissages alternatifs donnant naissance à des régions 5'UTR de l'ARNm non traduites et présentent plusieurs promoteurs en amont de ces exons non codants (Metsis, 2001). La traduction des ARNm des neurotrophines aboutit à des précurseurs protéiques appelés pré-pro-neurotrophines d'environ 250 acides aminés qui sont amenés via leur peptide signal au sein du réticulum endoplasmique (RE). (**figure 29**). Puis, le peptide signal est clivé donnant naissance aux pro-neurotrophines (pro-NTs, de 30-35 kDa). Ces formes immatures peuvent s'associer directement en homodimères reliés par des liaisons non covalentes dans le RE et sont transportées vers l'appareil de Golgi où elles s'accumulent (Lessmann et al., 2003). Des protéases intracellulaires telles que la furine ou des proconvertases sont ensuite responsables du clivage de ces pro-NTs, libérant la forme

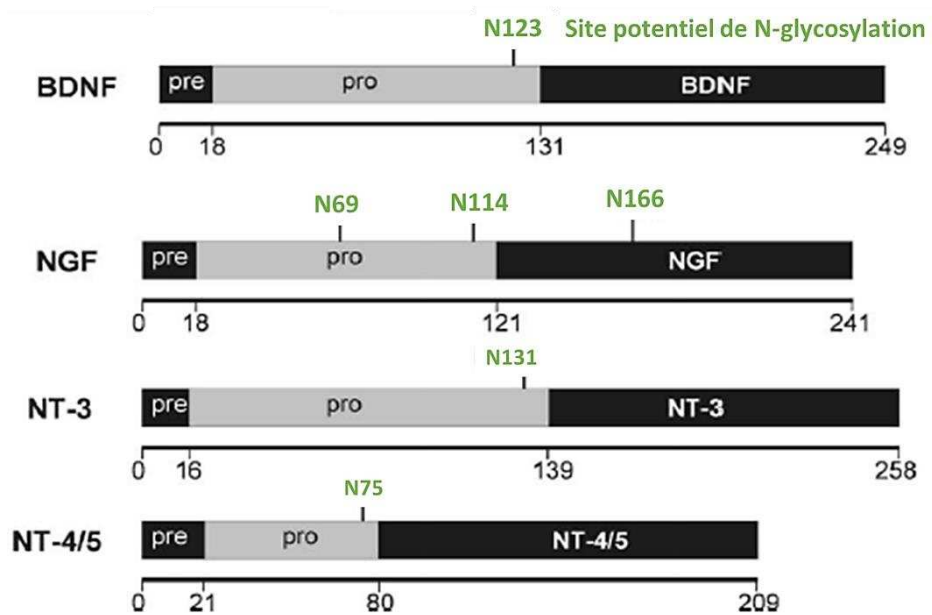


Figure 29 : Schéma des différents domaines constituant les neurotrophines. Le peptide signal correspond au domaine « pré » de 18 à 21 acides aminés, les sites potentiels de N-glycosylation sont représentés en verts (Lessmann et al., 2003).

active de 12 à 14 kDa qui sera sécrétée par la cellule (Bresnahan et al., 1990; Seidah et al., 1996). Les pro-NTs peuvent également être libérées dans le milieu extracellulaire et clivées par des protéases extracellulaires telles que la plasmine et des métalloprotéases (MMP-3, MMP-7 ou MMP-9) (Pang et al., 2004). Des sites de *N*-glycosylation ont été identifiés notamment au niveau des pro-domaines des NT (**figure 29**) et interviennent dans la maturation et la sécrétion des pro-NT, comme c'est le cas pour le pro-BDNF (Benicky et al., 2019). Les NTs matures vont former des homodimères, par liaison non covalente, d'environ 28 kDa, constituant la forme active des NTs, expliquant la présence dans les échantillons biologiques de nombreuses isoformes avec des masses moléculaires allant de 12 à 35 kDa (Lee et al., 2001). Les pro-NTs sont aussi biologiquement actives sous forme d'homodimères et se fixent sur les mêmes récepteurs membranaires que les formes matures.

Les récepteurs Trk et cas de TrkB

Les activités biologiques des NTs sont réalisées principalement par la signalisation de 2 types de récepteurs membranaires spécifiques : la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase Trk (ou NTRKs, neurotrophic tyrosine kinase receptors) essentiellement impliqués dans des signalisations de survie et prolifération cellulaires, et le récepteur p75^{NTR} retrouvé plus fréquemment associé à des signalisations de mort cellulaire. Les récepteurs Trk comprennent TrkA, TrkB et TrkC chacun d'eux étant plus ou moins spécifique d'une neurotrophine. Ainsi, NGF se lie préférentiellement à TrkA, BDNF et NT4/5 à TrkB et NT3 se lie surtout à TrkC, mais aussi à un degré moindre à TrkA et TrkB. Par contre, les pro-NTs se lient avec la même affinité que les NTs matures au récepteur p75^{NTR} (Hempstead, 2014). Un troisième type de récepteur appelé la sortiline (ou NTSR3, neurotensin receptor-3), fixe également les pro-NTs et joue le rôle de co-récepteur en association notamment avec le récepteur p75^{NTR} (Nykjaer et al., 2004). *Dans notre travail de thèse nous avons utilisé un agoniste du récepteur TrkB ou son ligand physiologique le BDNF ; aussi, nous allons uniquement détailler la structure et la signalisation de TrkB.*

Le récepteur TrkB est codé par un gène unique, *NTRK2*, comportant 24 exons et localisé chez l'homme sur le chromosome 9 (9q22) (Middlemas et al., 1991; Nakagawara et al., 1995; Stoilov et al., 2002). Les 5 premiers exons contiennent des sites d'initiation de la transcription et de recrutement de facteurs de transcription ; le codon d'initiation de la traduction protéique de la forme complète de TrkB se situe dans l'exon 5. Les exons 5 à 14 codent pour la partie

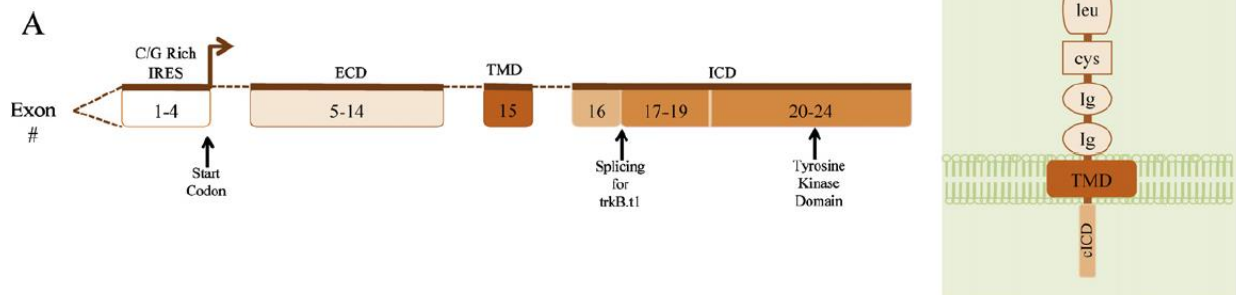


Figure 30 : Structure du récepteur TrkB. (A) Le gène de TrkB code pour au moins 36 variants dus à de l'épissage alternatif de ses 24 exons. Les exons 1 à 4 contiennent des sites d'entrée interne aux ribosomes (IRES) riches en C/G. Le codon de départ pour les deux isoformes les plus abondantes, TrkB.T1 et TrkB.TK+ est situé sur l'exon 5. Les transcrits TrkB.T1 et TrkB.TK+ partagent les exons 5–16. Les exons 5 à 14 codent pour le domaine extracellulaire (ECD), l'exon 15 code pour le domaine transmembranaire (TMD) et les exons 16 à 24 pour le domaine intracellulaire (ICD) où les exons 20–24 codent pour le domaine tyrosine kinase. (B) L'ECD contient 5 domaines, dont 2 régions riches en cystéine (Cys), une région riche en leucine (Leu) et 2 domaines de type IgG. Les domaines représentés sont homologues à 100% entre TrkB.T1 et TrkB.TK+ (Lessmann et al., 2003).

extracellulaire de TrkB, l'exon 15 pour la partie transmembranaire, et le domaine tyrosine kinase intracellulaire est codé par les exons 20 à 24 (*figure 30A*).

Comme les autres Trk, le récepteur TrkB est constitué de trois domaines distincts (*figure 30A et B*): un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité kinasique. La forme active du pro-BDNF et du BDNF mature étant un homodimère, il va se produire une oligodimérisation du récepteur TrkB, qui sera responsable de la signalisation en aval.

Le domaine extracellulaire possède une région riche en résidus leucine entourée par deux régions riches en résidus cystéines, suivies de deux domaines de type immunoglobuline C2 (« Ig-like C2») où s'effectue l'interaction spécifique avec son ligand, BDNF (Patapoutian and Reichardt, 2001). Ces domaines empêcheraient également l'activation des récepteurs Trk en l'absence de ligand (Benito-Gutiérrez et al., 2006). Enfin, la partie extracellulaire du récepteur inclue plusieurs sites de *N*-glycosylation qui seraient essentiels à la localisation transmembranaire des récepteurs Trk et à leur signalisation (Chao and Hempstead, 1995). En effet les formes non glycosylées, majoritairement cytoplasmiques ne peuvent pas induire l'activation des principales voies de signalisation intracellulaire comme Ras/Raf/MEK et ERK. Des études récentes montrent que les *N*-glycosylations sont impliquées dans le recrutement rapide de TrkB et sa translocation du RE à la surface cellulaire (Andreska et al., 2020).

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

Le domaine intracytoplasmique contient un large domaine à activité tyrosine kinase dont la séquence présente plus de 75% d'homologie avec celle des autres récepteurs Trk. Cette région comprend donc le site de liaison à l'ATP ; de plus, elle inclue plusieurs sites d'autophosphorylation (Tyr516/702/706/707/817) dont certaines permettront le recrutement de protéines adaptatrices ou effectrices des signalisations en aval (Reichardt, 2006).

En plus de la forme complète du récepteur TrkB, TrkB full-length (TrkB-FL) qui comprend 838 AA, quatre isoformes majeures de TrkB ont été caractérisées chez l'homme dérivant de sites d'initiation de la traduction présents dans l'exon 5 (Fenner, 2012; Luberg et al., 2010). Deux isoformes avec leur domaine kinasique intact ou fonctionnel : l'isoforme longue de TrkB (gp145, ~145 kDa) (ID : Q16620-1) comprenant 822 AA, ayant perdu les 16 AA en dessous du domaine transmembranaire, et une isoforme appelée TrkB-(T)-TK (ou gp95, 95 kDa) (ID : Q16620-6) qui a perdu les domaines codés par les exons 23 et 24, suite à un épissage alternatif au niveau de l'exon 24, mais qui garde une activité kinasique. A cela s'ajoute, 2 isoformes

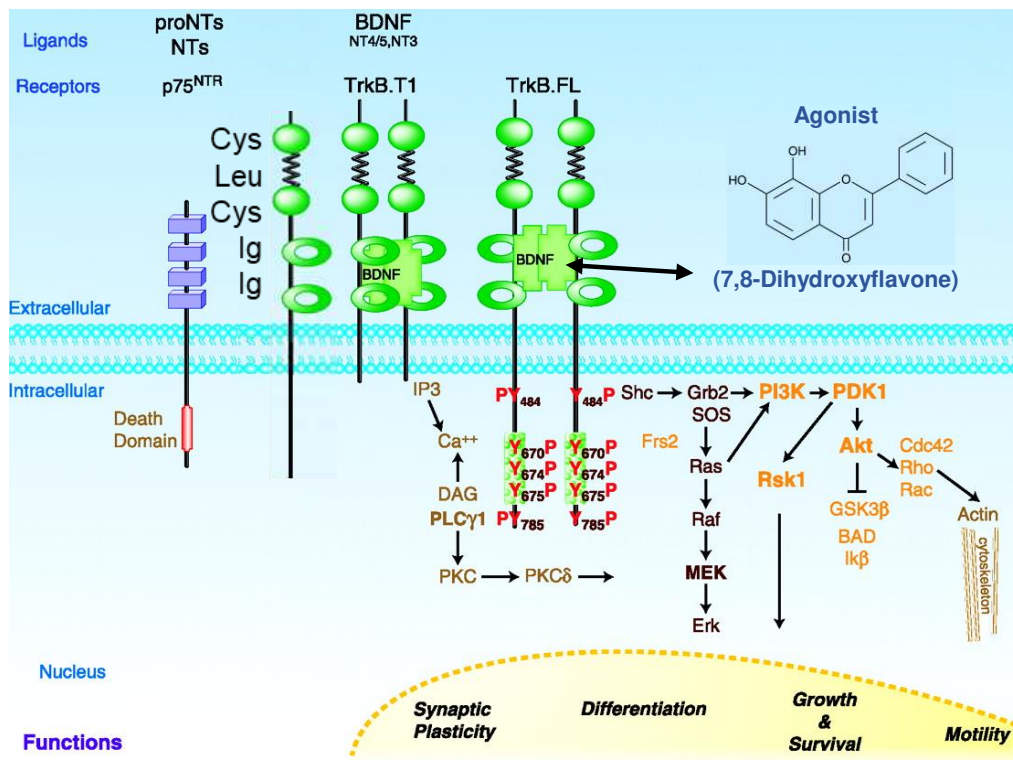


Figure 31 : Représentation schématique des principales voies de signalisation du récepteur TrkB. La fixation de la neurotrophine BDNF ou de l'agoniste 7,8 dihydroxyflavone (7,8 DHF) au niveau des domaines « Ig-like » du récepteur de haute affinité TrkB induit sa dimérisation et conduit à la phosphorylation de nombreuses tyrosines dans le domaine TK et juxtamembranaire. Ces tyrosines phosphorylées recrutent les protéines cytoplasmiques telles que Shc, PLC γ conduisant à l'activation des voies de signalisation des MAPK, PI3K et PKC. L'activation de ces voies de signalisation régulent certaines fonctions cellulaires telles que la plasticité synaptique, la différenciation, la croissance et la survie cellulaire. D'autres récepteurs ou partenaires sont représentés comme la forme tronquée de TrkB (TrkB-T1) dépourvue du domaine TK, ainsi que le récepteur de mort p75^{NTR} liant toutes les neurotrophines (NTs) et les pro-neurotrophines (pro-NTs). Les numéros des tyrosines de la partie intracellulaire correspondent à la numérotation de référence de TrkA. D'après (Thiele et al., 2009).

tronquées de leur domaine C-terminal intracellulaire, donc dépourvues d'activité tyrosine kinase : TrkB-T1 (477 AA, ID : Q16620-2) générée suite à un épissage alternatif au niveau de l'exon 16 et TrkB-Shc (537 AA, ID : Q16620-3), uniquement identifiée dans le cerveau, et générée par l'épissage alternatif à partir de l'exon 19 lui permettant de conserver un domaine de liaison aux protéines Shc. Ces isoformes dépourvues d'activité kinasique jouent notamment le rôle de « récepteurs dominants négatifs », inhibant la signalisation du récepteur complet. Cependant, des études montrent que TrkB-T1 aurait gardé une activité signalisatrice propre, même en l'absence du domaine tyrosine kinase. Ainsi, un signal calcique dépendant de la formation d'IP3 a été décrit suite à la fixation de BDNF sur des cellules gliales exprimant cette isoforme (Rose et al., 2003) (**figure 31**). D'autres isoformes tronquées en N-terminal ont aussi été décrites dont la fonction reste à préciser (Fenner, 2012; Gupta et al., 2013).

La fixation de BDNF à TrkB induit sa dimérisation, activant ainsi le domaine kinasique suite à son autophosphorylation au niveau de 3 tyrosines, Y702/706/707 présentes dans ce domaine (homologues de celles de référence Y670/674/675 de TrkA) (**figure 31**). Cette auto-activation détermine la phosphorylation de 2 autres résidus tyrosine, Y817 (homologue de Y785 de TrkA) et Y516 (cf Y490 de TrkA) déterminant le recrutement respectivement de la protéine phospholipase C- γ (PLC- γ) et de la protéine adaptatrice Shc.

La protéine Shc permet le recrutement et activation de la voie des **Ras/MAP kinases** et de la **PI3K/AKT** ; l'activation de la petite protéine G Ras nécessite d'abord le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2 (Rozakis-Adcock et al., 1992) qui interagit avec la protéine SOS (Son Of Sevenless, facteur activateur de la petite protéine G Ras) via ses domaines SH3. Une fois activée, Ras détermine l'activation en cascade de la voie c-Raf-MEK1/2-ERK1/2 (Moodie et al., 1993) responsable de l'activation notamment de Rsk (Ribosomal protein S6 kinase) et MSK1 (Mitogen and Stress-activated protein kinase 1) qui vont à leur tour phosphoryler et activer des facteurs de transcription comme CREB (cAMP Response element Binding) ou ELK-1 (membre de la famille ETS). Ces facteurs de transcription activent la transcription de gènes ayant un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Janknecht et al., 1993; Reichardt, 2006; Riccio et al., 1999).

Concernant l'activation **de la voie PI3K**, elle peut être dépendante ou non de la protéine Ras. L'activation Ras-indépendante met en jeu des protéines adaptatrices, comme le complexe Shc-Grb2 lié au Trk, qui va fournir des sites de fixation pour la protéine Gab1 qui une fois phosphorylée se lie aux domaines SH2 de la PI3K et permet son activation (Holgado-Madruga

et al., 1997; Vaillant et al., 1999). La PI3K induit la formation de phosphatidyl inositol 3,4-biphosphate et active en collaboration avec la PDK (phosphoinositide-dependent kinase), la protéine AKT. La serine/thréonine kinase AKT contrôle par phosphorylation l'activité de nombreuses protéines impliquées, comme décrit dans les DLBCL, dans la survie cellulaire ; ce rôle est exercé soit en régulant la transcription de gènes, soit via un effet direct sur des protéines impliquées dans l'apoptose cellulaire telle que la protéine pro-apoptotique Bad. En effet, lorsque Bad est phosphorylée en particulier par l'AKT, elle est séquestrée par les protéines 14-3-3 l'empêchant d'interagir avec Bcl-XL pour induire l'apoptose. AKT module également la fonction de facteurs de transcription tels que Forkhead et NF- κ B. Lorsque Forkhead est phosphorylé, il va être séquestré dans le cytoplasme ce qui l'empêche d'activer des gènes apoptotiques. AKT va également phosphoryler I κ B, ce qui induit sa dégradation et la libération du facteur de transcription NF- κ B impliqué, comme on l'a vu aussi dans les DLBCL, dans la survie et la prolifération cellulaire.

La voie de la PLC- γ conduit à la libération de Ca²⁺ et à l'activation de la PKC δ (Arévalo and Wu, 2006; Reichardt, 2006). En effet, une fois activée, la PLC- γ hydrolyse les phosphatidylinositol 4,5-biphosphates en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG), à l'origine respectivement de l'augmentation du calcium intracellulaire et de l'activation notamment des PKC. La voie de la PKC rejoint celle des MAPK, comme ERK1/2, ce qui va activer, comme vu précédemment, le facteur de transcription CREB.

TrkB et Cancers

Les voies de signalisation de TrkB ont été décrites activées initialement dans les neurones suite à la fixation de BDNF où elles déterminent la survie, la croissance cellulaire et la différenciation des neurones. Mais la présence et la signalisation de TrkB ont aussi été retrouvées dans des cellules non neuronales, comme des cellules du système immunitaire notamment par l'équipe où j'ai réalisé ma thèse (Fauchais et al., 2008; Vega et al., 2003). De plus, la surexpression ou une signalisation aberrante de TrkB/BDNF ont été décrites dans les cellules tumorales de cancers du tractus gastro-intestinal, du gliome, cancer de la vessie ou du sein associées à une surexpression de BDNF (Griffin et al., 2018). En lien avec notre problématique de thèse, en plus de leur activité dans les cellules B normales, les NTs et plus particulièrement BDNF et son récepteur TrkB, contribuent à la pathogénicité de cancers des cellules B (Hillis et al., 2016) ; en particulier dans les leucémies aiguës lymphoblastiques, le lymphome de Burkitt, et le

myélome multiple ou, comme démontré par les travaux de l'équipe, les DLBCL (Bellanger et al., 2011; Dubanet et al., 2015). Ainsi, la signalisation de l'axe BDNF/TrkB joue un rôle dans la survie des lignées cellulaires de lymphomes de Burkitt et l'inhibition du BDNF par shRNA induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de ces lignées. De plus, l'inhibition de la signalisation de TrkB augmente la sensibilité des cellules aux effets cytotoxiques de la chimiothérapie *in vitro* (Xia et al., 2014). Comme nous allons le décrire pour les DLBCL, ces facteurs de croissance participent par des boucles de régulation autocrine/paracrine à la survie des cellules B tumorales et potentiellement aux résistances thérapeutiques.

TrkB et Cas des DLBCL

Peu de publications évoquent le rôle de ces neuropeptides dans les DLBCL, et l'essentiel des travaux ont été réalisés, avant mon arrivée, par l'équipe dans laquelle j'ai effectué mon stage doctoral. Notamment, la production des formes matures et immatures du NGF et du BDNF ainsi que l'expression de leurs récepteurs TrkA, TrkB et p75^{NTR} ont été démontrées pour les lignées de sous-type GCB (SUDHL4 et SUDHL6) et ABC (OCI-LY3 et OCI-LY10) (Bellanger et al., 2011). Les mêmes cellules produisent les NTs et expriment leurs récepteurs, suggérant l'existence de boucles de régulation autocrines. Plus particulièrement, ces lignées de DLBCL expriment la forme complète (TrkB-FL) et tronquée (TrkBgp95) du récepteur TrkB. Ces données ont été confirmées *ex vivo* à partir de 51 biopsies tumorales de patients atteints de DLBCL de manière indépendante du sous-type GCB/non-GCB ; elles ont permis de suggérer un axe pro-survie BDNF/TrkB dans ces lymphomes. Finalement les études *in vitro* sur les lignées cellulaires de DLBCL, et *in vivo* sur un modèle murin de xénotransplante tumorale de DLBCL, ont mis en évidence l'implication des voies de signalisation des neurotrophines dans la survie et la résistance aux anti-CD20 (rituximab) des cellules tumorales de ces lymphomes B (Dubanet et al., 2015).

Plusieurs stratégies ont été proposées pour inhiber la signalisation des récepteurs Trk dans un certain nombre de cancers, en ciblant soit les NT par des anticorps « bloquants », soit leurs récepteurs par l'utilisation d'anticorps bloquants ou d'inhibiteurs pharmacologiques (Griffin et al., 2018). En effet, en plus de la surexpression des NT et des récepteurs Trk, des réarrangements génomiques aberrants ont été observés dans quelques rares cas de tumeurs solides. Ils impliquent les gènes *NTRK* et déterminent la formation de protéines de fusion oncogéniques aboutissant à un récepteur activé constitutivement ou avec une activité kinasique surexprimée

(Amatu et al., 2016). Plusieurs molécules ciblant les récepteurs aux neurotrophines ont vu le jour parmi lesquelles le **K252a** alcaloïde naturel, analogue de la staurosporine, ou son dérivé synthétique le lestauritinib (CEP-701). Le K252a agit comme un pan-inhibiteur de l'activité des kinases de par sa compétition avec la fixation de l'ATP au niveau du domaine catalytique (Morotti et al., 2002), ciblant notamment les récepteurs TrkA, TrkB, et TrkC (Tapley et al., 1992). Ces dernières années d'autres inhibiteurs ont été développés de plus en plus sélectifs des Trk comme l'entrectinib ou le larotrectinib (Roviello et al., 2020). Dans le cas des DLBCL, c'est le K252a qui avait été utilisé dans les travaux de l'équipe. Il a permis de montrer que la pan-inhibition des Trk potentialisait l'effet du rituximab sur les lignées cellulaires de DLBCL et plus particulièrement sur les lignées moins sensibles à l'anti-CD20, en induisant l'apoptose des cellules (Bellanger et al., 2011; Dubanet et al., 2015). *In vivo* (xénogreffes tumorales chez des souris immunodéficientes) l'inhibition pharmacologique des Trk par l'injection du K252a a permis de diminuer de manière significative la croissance tumorale et de potentialiser à nouveau l'effet du rituximab (Dubanet et al., 2015). De plus, la neutralisation du BDNF endogène via l'utilisation d'anticorps bloquants s'accompagnait de la diminution de la viabilité des lignées cellulaires de DLBCL. Ces résultats ont permis, avec d'autres, de mettre en évidence la fonction pro-survie de la signalisation BDNF/TrkB et son interférence avec les effets cytotoxiques des anti-CD20 dans les lignées de DLBCL.

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre sur les DLBCL, les mécanismes d'induction d'apoptose des cellules de lymphomes B exposées au rituximab sont connus ; ils impliquent une inhibition des voies de survie qui sont activées de manière constitutive, comme la voie PI3K/AKT, ERK1/2 et la voie NF- κ B conduisant également à une chimiosensibilisation. Ces voies de survie qui sont aussi connues pour réguler l'expression du CD20 cellulaire, sont également activées par la signalisation des récepteurs Trk. Ainsi, il était intéressant de poursuivre le travail sur les DLBCL en analysant notamment l'effet de la signalisation de TrkB sur l'expression cellulaire du CD20 en lien avec l'échappement aux rituximab. Le lien probable, mais non démontré, entre la variation des taux du CD20 membranaire et celle au niveau des « small EVs » dont les exosomes, nous a conduit à explorer aussi l'effet de l'activation de la voie BDNF/TrkB sur l'expression du CD20 au niveau de ces vésicules et ses conséquences in vitro et in vivo.

CD20 expression, TrkB activation and functional activity of Diffuse Large B Cell Lymphoma-derived small extracellular vesicles.

Marine Aitamer¹, Hussein Akil², Chantal Vignoles², Maud Branchaud¹, Julie Abraham^{2,3}, Nathalie Gachard^{2,4}, Jean Feuillard^{2,4}, Marie-Odile Jauberteau¹, Hamasseh Shirvani⁵, Danielle Troutaud^{1*} and Hafidha Bentayeb^{1*}.

¹EA3842 CAPTuR Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland 87025 Limoges Cedex, France. ² UMR CNRS 7276 /INSERM U1262, Facultés de Médecine, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland 87025 Limoges Cedex, France. ³Service d'Hématologie Clinique, CHU de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87000 Limoges, France. ⁴Laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87000 Limoges, France. ⁵Institut Roche, 30, cours de l'île Seguin 92650 Boulogne-Billancourt, France.

*These authors contributed equally as last authors.

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

E-mail: danielle.troutaud@unilim.fr ORCID iD : <https://orcid.org/0000-0002-2619-5059>

Supplementary information: Supplementary Fig. S1

ABSTRACT

Background: Small Extracellular Vesicles (EVs) including exosomes, carrying the CD20, could be involved in immunotherapy resistance in Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL). We have reported endogenous BDNF/TrkB survival axis in DLBCL. Here, we performed a comparative study of small EV production by GCB and ABC DLBCL cell lines, and analyzed TrkB activation on this process.

Methods: GCB (SUDHL4, SUDHL6) and ABC (OCI-LY3, OCI-LY10, U2932) cell lines were used. Small EVs were characterized using NTA technology and western blot. CD20 content was also analyzed by ELISA, and complement-dependent cytotoxicity of rituximab was investigated. 7,8-DHF was used as TrkB agonist. *In vivo* role of small EVs was evaluated in a SUDHL4 xenograft model.

Results: Small EV production varied significantly between DLBCL cells, independently of subtype. CD20 level was consistent with that of parental cells. Higher CD20 expression was found in EVs after TrkB activation, with a trend in increasing their concentration. Small EVs determined *in vitro* and *in vivo* a protection from rituximab, that was enhanced when produced by 7,8-DHF-treated cells.

Conclusions: DLBCL-derived small EVs have differential capacity to interfere with immunotherapy that could be enhanced by growth factors like neurotrophins. Evaluating EVs CD20 level could be useful for disease monitoring.

BACKGROUND

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common subtype of Non-Hodgkin lymphoma (NHL), accounting for 30% to 40% of all newly diagnosed cases worldwide. DLBCL is a highly aggressive and heterogeneous lymphoma that would imminently be fatal without treatment. Two major prognostically significant subtypes have been identified which differ from the cell origin, germinal center B-cell (GCB) and activated B-cell (ABC) type of better and worse prognostic respectively.¹⁻³ Monoclonal anti-CD20 antibody, rituximab, in combination with CHOP chemotherapy (R-CHOP immunochemotherapy) has been widely used with favorable results and is still the standard treatment for several kinds of B-NHL, included DLBCL. However, 30-40% of patients are not cured and will relapse or be refractory to R-CHOP. Thus, primary or acquired resistance to rituximab has become a considerable problem.⁴⁻⁶ Several mechanisms of resistance have been predicted but their clinical significance remains unclear. However, decreased CD20 expression has been postulated to be one of the most important etiologies contributing to rituximab resistance. Indeed, CD20 level determined by flow cytometry at onset is an independent predictor for prognosis of patients with DLBCL.⁷ Moreover, a CD20-negative phenotypic transformation was observed in patients after rituximab treatment, and in B-lymphoma cells rituximab was shown to down regulate CD20 gene (*MS4A1*) expression partially by using epigenetic mechanisms.⁸⁻¹⁰ Thus, targeting the modulation of CD20 membrane expression, which represents a key factor in determining anti-CD20 effectiveness, is still an important challenge for novel therapy in combination with immunotherapy in B-cell neoplasms.

Exosomes are small extracellular vesicles (small EVs) of endosomal origin ranging from 30-150 nm and secreted by several cell types during exocytic fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane.^{11,12} In normal condition, exosomes are released by erythroid progenitors during their maturation process, as well as by B-lymphocytes and dendritic cells. Exosomes were shown to play multiple immunomodulatory functions which leads to multiple studies and clinical trials as tumour “vaccines”. Importantly, many cancer cells have been shown to secrete exosomes in greater amounts than normal cells,^{13,14} and as exosome composition seems to be cell and tissue specific, they are highly suitable to serve as diagnostic markers. Current knowledge of tumor-derived exosomes suggests that they can also play an important role in the development and progression of cancer.¹⁵ They are able to modulate intercellular communication within the tumor microenvironment by the transfer of multiple signaling molecules like protein, lipid and RNA cargo.¹⁶⁻¹⁸ In DLBCL, increasing evidence

supports a role for EVs in progression and response or resistance to therapy. Small EVs containing CD20 were able to shield target cells from anti-CD20 antibody attack, revealing a possible role of resistance to immunotherapy in DLBCL patients.¹⁹ Similarly, DLBCL-derived exosomes attenuated chemotherapeutic efficacy by encapsulating doxorubicin and removing it from the cells.²⁰ Interestingly, recent data showed that RNA contents of peripheral EVs from DLBCL patients could enable disease monitoring through liquid biopsy²¹ and can be used as predictors of prognosis and chemotherapeutic efficacy.²² However, biological stimuli regulating quantitatively and/or qualitatively exosome secretion still remain poorly defined, notably in a comparative study on GCB and ABC subtypes and after rituximab exposure.

Neurotrophins (NTs) among with the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are structurally and functionally related growth factors that are widely expressed in a variety of tissues including the immune system.²³ Moreover, NTs and their Trk (tropomyosin-related kinase) receptors are involved by autocrine and/or paracrine signaling pathways in cancer cell growth and dissemination.²⁴ Binding of BDNF to its high-affinity receptor TrkB triggers cell survival by activating several signaling pathways (PI3K/Akt, MAPK, and PLC- γ). We have previously demonstrated that BDNF can realize autocrine / paracrine loops involved in the survival of human DLBCL cell lines. Furthermore, inhibition of Trk signaling induced cell apoptosis and potentiated the cytotoxic effect of rituximab *in vitro* and *in vivo*.^{25,26} We hypothesized that BDNF/TrkB signaling could interfere with rituximab sensitivity and thus may contribute to therapeutic resistance.

The objective of this work was to realize a comparative study of small EVs derived from GCB and ABC DLBCL cell lines, by analyzing CD20 content in relation to its ability to protect cells from rituximab-induced cytotoxicity. Furthermore, we explored the effect of 7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF), a TrkB agonist,²⁷ on small EVs secretion and CD20 expression in reference to rituximab exposure. The *in vitro* (DLBCL cell lines) and *in vivo* (GCB-DLBCL xenograft model in SCID mice) findings discussed in this study strongly argue for the role of small EVs including exosomes in the immunotherapy escape of DLBCL tumor cells. Furthermore, they may improve our understanding of the molecular events leading to the expression of CD20 at the cellular and EV levels.

MATERIAL AND METHODS

Human B cell lines and cell cultures

Two GCB-DLBCL cell lines (SUDHL4 and SUDHL6 obtained from DSMZ) and three ABC-DLBCL cell lines (OCI-LY3 and OCI-LY10, given by Pr. Feuillard, UMR CNRS 7276, Limoges University, with the kind agreement of the Louis M. Staudt, National Cancer Institute, USA and U2932 from DSMZ) were used. The cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cell lines were expanded upon receipt and low-passage vials were stored in liquid nitrogen. All experiments were realized within 8 weeks after drawing. The cell lines were routinely tested to confirm the absence of mycoplasma by the MycoAlert Kit from Lonza. For the functional analyses, cells (10⁶ /mL) were incubated with rituximab (MabThera®, stock 10 mg/mL, a generous gift from CHRU Dupuytren of Limoges, Pharmacie centrale) and 7,8-DHF (500 nM, Sigma-Aldrich, France) or exogenous BDNF (rhBDNF, 100 ng/ml, Promega) alone or in combination.

Flow cytometry analysis of surface and intracellular CD20 expression

After washing in PBS, 0.5x10⁶ DLBCL cells were used for cytometry analysis of surface CD20 expression using PE-labeled mouse anti-CD20 antibody (clone B9E9 [HRC20]; Beckman Coulter) incubated for 30 min at 4°C to detect the extracellular epitope located in the larger CD20 loop. Isotypic control was also realized (IgG2a mouse-PE, Beckman Coulter). After washing, cells were resuspended in PBS/1% formaldehyde. CD20-positive cells were analyzed with a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) acquiring 10 000 events after gating on light scatter properties (forward vs side: FSC/SSC) to eliminate debris and cellular aggregates. The mean fluorescence intensity (MFI) values were used as a semiquantitative measure of the expression of CD20.

Alternatively, when cells were exposed to treatment (i.e. rituximab or 7,8-DHF), they were fixed in PBS with 1% formaldehyde, permeabilized with ice-cold 100% methanol for 20 minutes at -20°C, washed in PBS and incubated with 3% BSA-PBS for 30 minutes at 4°C. Then, cells were incubated for 1h at 4°C with rabbit anti-CD20 (EP459Y clone, Abcam) directed against a cytoplasmic epitope within CD20 molecule or isotypic control in 1% BSA-PBS. After washes in PBS, Abs were revealed using Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (Invitrogen) for 30 min at 4°C. After washing twice in PBS, cells were suspended in PBS and analyzed by flow cytometry.

Real-time quantitative PCR analysis of MS4A1 expression

Total RNA was isolated using the QIAzol Lysis Reagent from QIAGEN, and 2 µg of total RNA was used as template for cDNA synthesis using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Experiments were performed in triplicate with TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem ThermoFisher Scientific) and *Membrane spanning 4-domains A1 (MS4A1; CD20)* specific primers and probe, or 18S TaqMan® Gene Expression Assays (Primer/Probe Set). Amplification of cDNA was measured using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Quantitation of results was determined using the delta delta CT method. *MS4A1* mRNA expression in DLBCL cells was normalized to 18S RNA levels (delta CT) and then expressed relative to culture condition control (delta delta CT). Primers used for *MS4A1*: forward primer 5'-ATGTCTTCACTGGTGGGCC-3' and reverse primer 5'-TAATCTGGACAGCCCCCAA-3' and sequence of the *MS4A1* TaqMan® probe: 5'-CACGCAAAGCTTCTTCATGAGGGAATCT-3'.

EV separation, analysis and quantification

Small EV preparation from DLBCL cell culture medium

EVs were harvested from 72h supernatants of DLBCL cell lines cultured in RPMI 1640 with 10% EV-depleted FBS by differential centrifugation and ultracentrifugation, according to standard protocols²⁸ and update of the MISEV2014 guidelines.²⁹ Briefly, supernatants were sequentially centrifuged (4°C) at 300g for 10 min, at 2000g for 10 min and at 10,000g for 30 min followed by filtration (0.22µm filter; Millipore). Then, small EVs were pelleted by ultracentrifugation at 120,000g for 70 min and washed in PBS by a repeated 120,000g centrifugation (SW28 rotor, Beckman Coulter). Supernatants were carefully removed and small EV pellets were suspended either in 50 µl of RIPA lysis buffer (when used for western blotting), or in 500 µl of PBS or ELISA sample buffer (when used for NTA analysis or CD20 ELISA respectively), or in RPMI medium for *in vitro* or *in vivo* functional experiments.

Nanoparticle Tracking Analysis

Structural and quantitative analysis of EVs secreted by DLBCL cells was performed using the NanoSight NS300 instrument (Malvern Instruments Company), following the manufacturer's protocol. Mean particule sizes, modus and concentration of EVs were determined using NTA 2.3 software in which 5 videos of 60 s were taken under controlled fluid flow with a pump speed set to 100. Plots represent the average value of the 5 recordings performed for each sample.

Electronic microscopy

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

Flow cytometry analysis of complement-dependent cell cytotoxicity (CDC)

Functional analysis of small EV binding capacity to rituximab was evaluated by the rescue of DLBCL cell lines from rituximab-mediated CDC. Non-inactivated pooled normal human serum obtained from voluntary healthy donors was used as complement source. Autologous or heterologous small EV preparations from 40×10^6 DLBCL cell supernatants were pre-incubated or not with 0.1 μg of rituximab in serum free medium at 37°C for 10 minutes. Then, freshly DLBCL cell cultures (10^6 cells/mL) were added followed by addition of human serum (20% vol/vol). After 30 minutes of incubation at 37°C , cells were washed and resuspended in 500 μl of PBS. Cell death was analyzed using propidium iodide (PI, 0.5 mg/mL) by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson)

Western blotting analysis

Cell or small EV pellets were treated with RIPA buffer (Cell Signaling Technology) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Sigma). After centrifugation at $12,000g$ for 20 minutes the supernatant was collected. 20 to 80 μg of proteins were separated by SDS-PAGE then transferred to PVDF membrane (Biorad). The primary Abs used were: mouse anti-human CD20 (Dako), antiCD81 (Santa Cruz Biotechnology), anti- β -actin (Sigma-Aldrich); rabbit anti-CD63 (Abcam), anti-flotillin 1 and anti-flotillin 2 (Cell Signaling Technology) and anti-p-TrkB (Y817) (Abcam). Horseradish peroxidase (HRP)–conjugated secondary antibodies were from DakoCytomation. Blotted proteins were detected and quantified using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) and a bioimaging system (GeneSnap; Syngene).

Alternatively, small EV preparations were first immunocaptured with magnetic Dynabeads® ProteinG (Invitrogen) conjugated with mouse IgG2a anti-human CD20 (Dako) according to the manufacturer's protocol. After overnight incubation with rotation at 4°C , bead-bound small EV complexes were washed 3 times in PBS, and finally resuspended in RIPA buffer with protease and phosphatase inhibitors for western blotting analysis.

Quantification of CD20 proteins on small EVs by ELISA

Small EV preparations from DLBCL (produced by 10×10^6 cells) were resuspended in ELISA sample buffer, and CD20 level was quantified using CD20/MS4A1 (human) ELISA kit (BioVision) according to the manufacturer's protocol. The limit of detection was 0.156 ng/ml.

***In vivo* Xenografts**

All animal studies were conducted in accordance with the guidelines established by the internal Institutional Animal Care and Use Committee (CREEAL N°2-07-2012). 4 weeks old SCID mice (CB17.SCID) were supplied by Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). To analyze the *in vivo* function of small EVs, we used a DLBCL xenograft model as previously reported.^{26,30} SCID mice were injected with 1×10^7 SUDHL4 cells subcutaneously. When tumors were established (~6 weeks after tumor cells inoculation), mice were randomly divided into different groups (6 mice per group, control, treated with rituximab, treated with autologous or heterologous small EVs from control or 7,8-DHF cell cultures, treated with both rituximab and small EVs). Rituximab (25 mg/kg) was administered i.p. twice a week, alone or in combination with purified small EVs (1.10^7 cells-derived EVs) from 72h DLBCL cell cultures (SUDHL4) exposed or not to 7,8-DHF (500 nM). For control mice, treatment with vehicle alone was used and injections were realized with the same protocol than treated mice. Animals weighted ~20g on day of treatment. All animals were ear-tagged and monitored individually throughout the experiment. Tumor volume (cm^3) was estimated every 3 days during 2 weeks by measurements of the length (L), width (W) and height (H) of the tumor using the formula: volume = L \times W \times H. Mice were sacrificed after 14 days of treatment.

Statistical methods

Statistical significance between groups in the *in vitro* and xenograft studies was determined by two-tailed Student's t-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 1

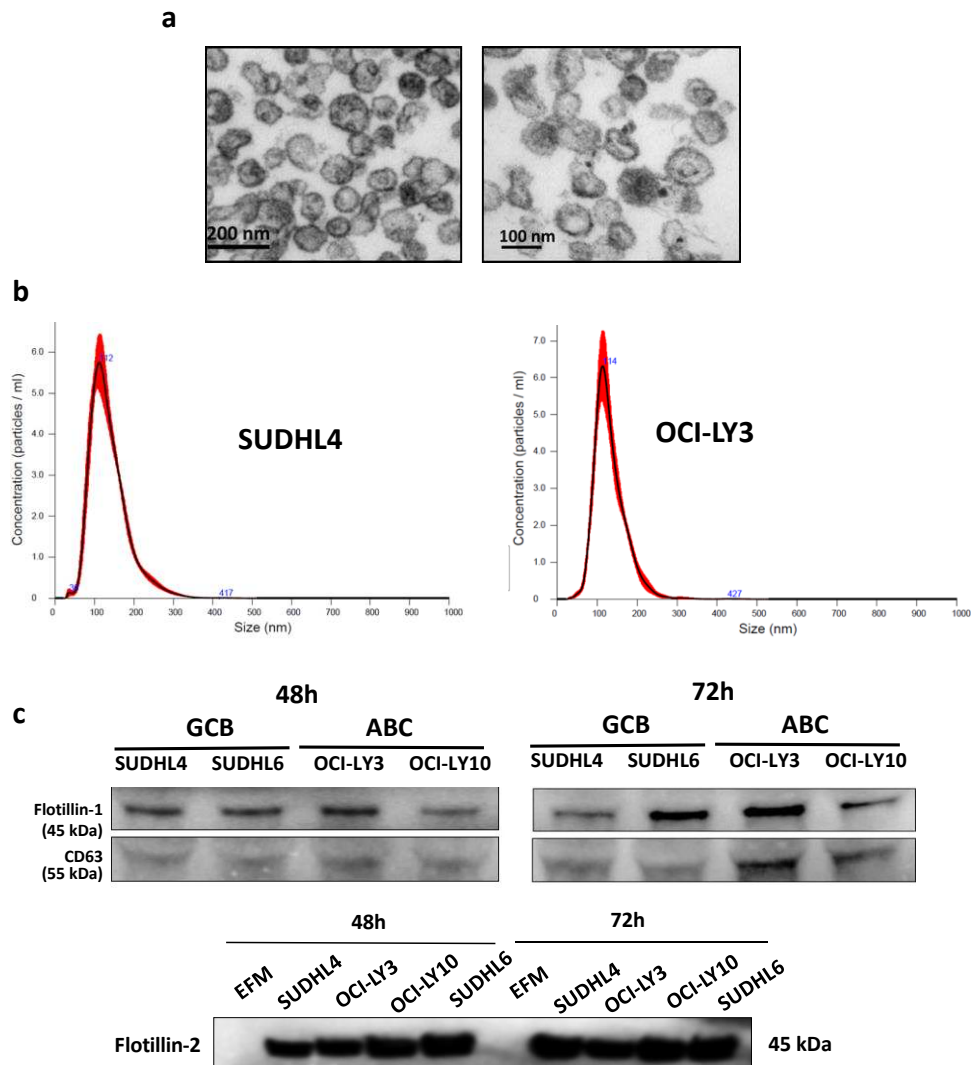


Fig.1 Characterization of small EVs produced by GCB and ABC DLBCL cell lines.

(a) Structural analysis of OCI-LY3-derived EVs: micrographs from transmission electron microscopy (TEM) of immunocaptured-EVs with anti-CD63-coupled immunobeads. (b) Nanosight Tracking Analysis (NTA) size distribution profile for representative EV preparations produced by DLBCL cell lines. Results are shown for SHDHL4 (GCB subtype) and OCI-LY3 (ABC subtype). Plots represent the mean value (black line) with standard error (red shaded area) of 5 recordings. (c) Representative western blot bands for analysis of small EV markers (i.e. flotillin-1 and 2; CD63) in total EV lysates from 48h and 72h supernatants of DLBCL cell line cultures (10×10^6 cells). EFM: EV free medium used in the cell cultures.

Results

Characterization of EV preparations from DLBCL cell cultures and analysis of CD20 expression

ABC and GCB DLBCL-derived EVs were isolated from cell culture supernatants (30×10^6 cells) by differential centrifugation. Characterization of small EVs was performed using transmission electron microscopy (TEM), and nanoparticle tracking analysis (NTA, NanoSight). The mean size of exosomes derived from the five tested DLBCL cell lines was 137 ± 6 nm with a modus mean of 111 ± 3 nm (Fig. 1a,b ; Table 1a). Moreover, western blot analysis revealed the expression of CD63, flotillin-1/2 and CD81 proteins (Fig. 1c, as also shown in Fig. 2b for CD81) commonly used as small EV markers, including exosomes. These proteins were detected in small EV samples after 48h of cell culture, and were enriched after 72h (Fig. 1c). Of note, as level of flotillin 2 was higher than flotillin 1 in our samples, we have chosen flotillin 2 for the following experiments. Even if DLBCL-derived small EVs were very homogenous in size, we observed some variations in the concentration of EVs produced by each cell line (Table 1b). Indeed, the ABC cell line OCI-LY10 was the least productive cell line with a significant lower EV concentration when compared to SUDHL4 and SUDHL6. Furthermore, SUDHL6 and OCI-LY3 are the most productive cell lines with a significant higher EV production than SUDHL4, OCI-LY10 and U2962 (only for OCI-LY3). Moreover, our data strongly suggest no difference in cell capacity to produce small EVs according to the DLBCL subtype, as highest productions were observed in GCB (i.e. SUDHL6) as well as in ABC (i.e. OCI-LY3) cell lines.

Among the DLBCL cell lines tested, CD20 membrane expression was heterogeneous and U2932 cells showed the lowest CD20 expression at the cell membrane and at the intracellular level (Fig. 2a,b). This was also confirmed by lowest CD20⁺ cell percentages (Table 2). As expected, western blot analysis showed that GCB and ABC-derived small EVs carried CD20 (Fig. 2b). As shown in Fig 2B, the levels of CD20 but also of CD81 and with a lesser extend of flotillin 2 varied between DLBCL cell lines when total protein quantification was used to normalize our EV samples. Thus, we decided for the following experiments to use the number of viable cells that produced small EVs to normalize our samples. CD20 expression of small EVs was also confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (preliminary data, Fig. 2c). Of note, EVs from the U87-MG human glioblastoma cell line were used as negative controls in order to verify the specificity of CD20 detection (Fig. 2c). We detected low levels of CD20 on EVs from U2932 cell line that we did not show by western blot analysis. Even though some high variability was found for CD20 level on OCI-LY3 small EVs, our

Figure 2

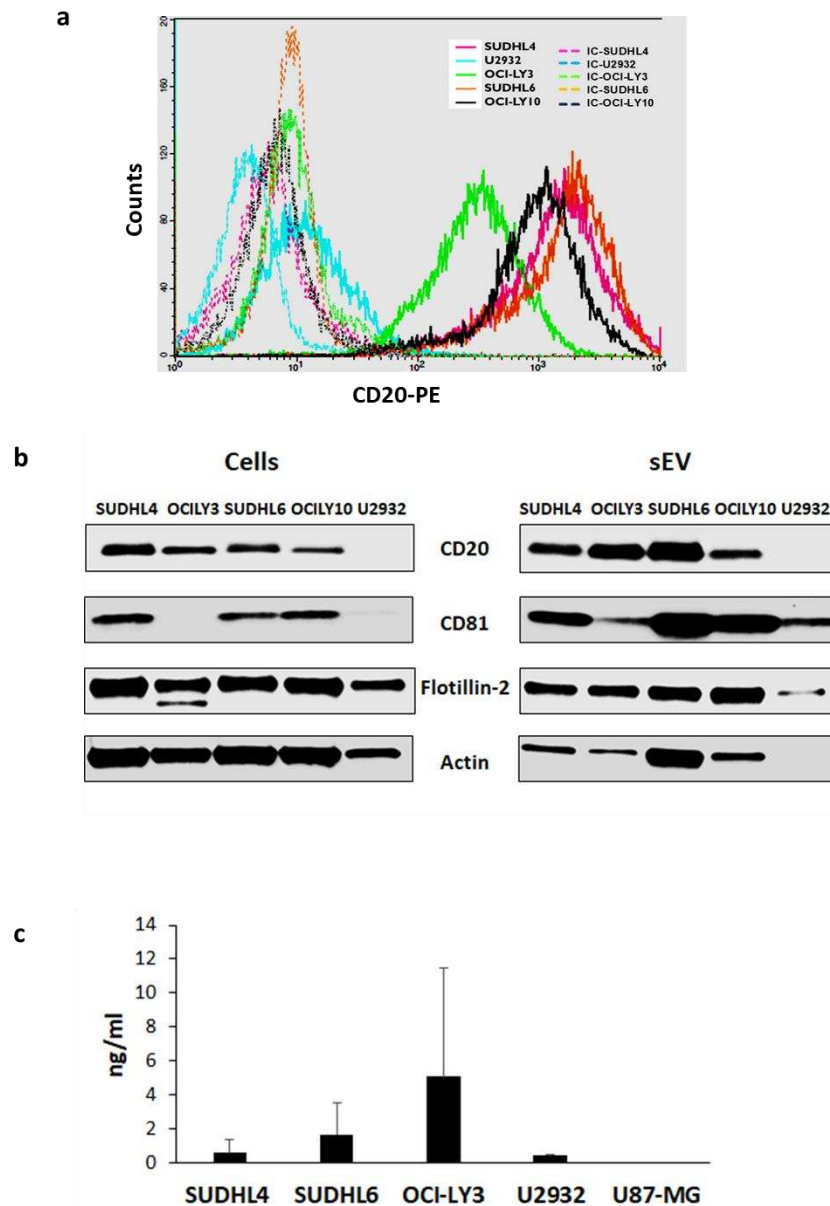


Fig. 2 CD20 expression in DLBCL cell lines and small EVs.

(a) CD20 surface expression was determined using anti-CD20-PE by flow cytometry in GCB (SUDHL4, SUDHL6) and ABC (OCI-LY3, OCI-LY10 and U2932) DLBCL cell lines. Representative histograms are shown: solid outline histograms indicate expression of CD20 in DLBCL cells; dashed lines are the fluorescence intensity of cells labeled with isotype control mAb.

(b) Western blot analysis of CD20 and small EVs-marker proteins (CD81, flotillin-2) in EV lysates as compared to cell lysates (72h- 10 μ g of protein/well). CD20 expression was not detected in U2932 cell lysates using 10 μ g of protein but was found with 20 μ g only in cells (data not shown). Actin is shown as loading control. Data are representative of at least 3 independent experiments.

(c) Levels of CD20 on small EVs produced by 10×10^6 DLBCL cells as assayed by ELISA; results (ng/ml) are expressed as mean \pm SD of 3 (SUDHL4, OCI-LY3) or 2 (SUDHL6, U2932, U87) independent experiments.

Figure 3

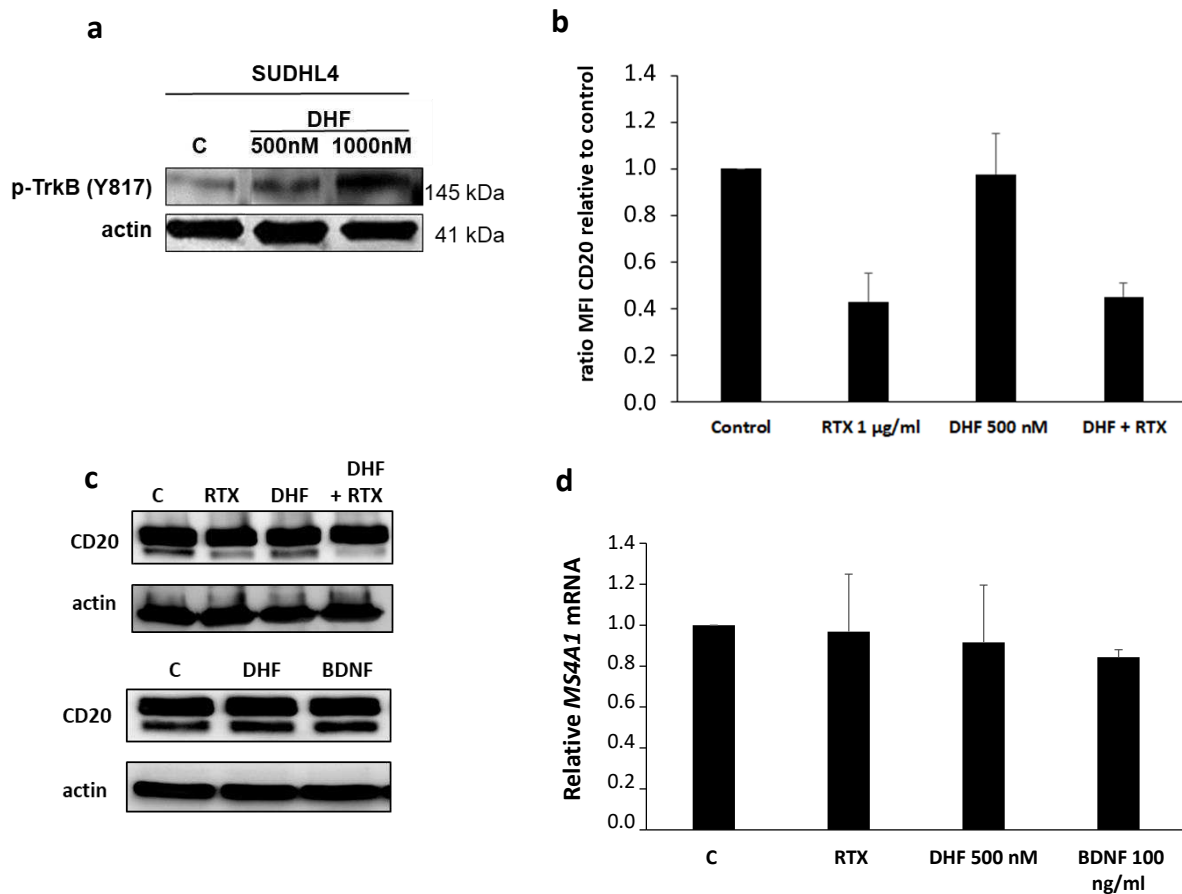


Fig. 3 Effect of TrkB activation on CD20 expression in DLBCL cells.

(a) TrkB activation by 7, 8-dihydroxyflavone (7,8-DHF, 500 and 1000 nM) was confirmed using anti-phospho-TrkB (Y817) by western blot analysis in 48h SUDHL4 cell lysates (80 µg of protein/well) as compared to control lysates (C, DMSO control). (b) Intracellular CD20 level was analyzed by flow cytometry after permeabilization of SUDHL4 cells incubated with or without rituximab (1 µg/ml) and/or 7,8-DHF (500 nM). Data from 3 independent experiments are expressed as ratio of mean fluorescence intensity of stained cells to isotype control, and relative to the culture control. (c) Representative western blot bands from at least 2 independent experiments for CD20 intracellular expression of SUDHL4 cells exposed or not (C, control) to rituximab (1 µg/ml) and/or 7,8-DHF (500 nM). Alternatively, the physiologic TrkB ligand, BDNF, was used (100 ng/ml) (20 µg of protein/well). Actin is shown as loading control (d) Relative quantification by qRT-PCR analysis of MS4A1 mRNA levels in SUDHL4 cell cultures. MS4A1 mRNA was normalized to 18S RNA levels and then expressed relative to culture condition control. Histograms represent means ± SD of 4 or 2 (for BDNF) independent experiments

preliminary data obtained by ELISA were in good agreement with those obtained by western blot analysis of EV lysates. Taken together, these data showed that CD20 expression on small EVs produced by DLBCL cells reflects those on parental cells, as expected, notably at the membrane level. Indeed, EVs from U2932 expressed the lowest CD20 level and SUDHL6 seemed to release small EVs with the higher CD20 level, as in their respective parental cells. Furthermore, these data suggest, for the first time, that CD20 level on small EVs seems not to be in relation with the DLBCL subtype and thus aggressivity.

The TrkB agonist, 7,8-DHF, enhances CD20 level in DLBCL small EVs

We have previously shown an autocrine BDNF/TrkB survival signaling axis in DLBCL.²⁶ To further explore the TrkB mechanisms involved in DLBCL cells, we used a TrkB agonist (7,8-DHF) and we focused our study on EV production and CD20 expression. DLBCL cell lines were pre-exposed or not for 24h to 7,8-DHF (500nM) and then rituximab (Rtx 1µg/ml) was added or not in EV-free complete medium for an additional 48 h. Finally, small EVs were enriched from cell supernatants and analyzed. 7,8-DHF-induced TrkB activation was confirmed, as previously reported,²⁶ by an enhanced phosphorylation (Y817) of the receptor (Fig. 3a). EVs production was analyzed by NTA in GCB and ABC DLBCL cell lines as shown for SUDHL4 and OCI-LY3 in table 3. Particule size and distribution of EVs, that confirmed to be consistently in the reported range of small EVs including exosomes, were not significantly modified by 7,8-DHF treatment; however, there was a trend towards an increase in EV concentration in SUDHL4 and OCI-LY3 cell cultures incubated with TrkB agonist as compared to culture controls (Table 3).

CD20 expression was first analyzed at the protein (72h, Fig. 3b,c) and transcriptional (*MS4A1* mRNA) (48h, Fig. 3d) levels in rituximab and or 7,8-DHF-treated SUDHL4 cells. Our data confirmed the rituximab-induced decrease of CD20 intracellular level, as shown for SUDHL4 cells in Fig. 3b by flow cytometry analysis; moreover, rituximab cell exposure seemed to affect notably the hypo-phosphorylated form of CD20 (western-blotting analysis, Fig. 3c). Of note, the decrease of CD20 protein expression was not explained by a lower *MS4A1* mRNA level (Fig. 3d). When cells were incubated with the TrkB agonist, DHF, no modification of the CD20 level was observed at the protein (Fig. 3b,c) and mRNA levels (Fig. 3d). These results were also found with the physiological ligand (i.e. recombinant human BDNF 100 ng/ml), as shown in Fig. 3c and d. These same results were also found with the ABC cell line, OCI-LY3 (data not shown).

Figure 4

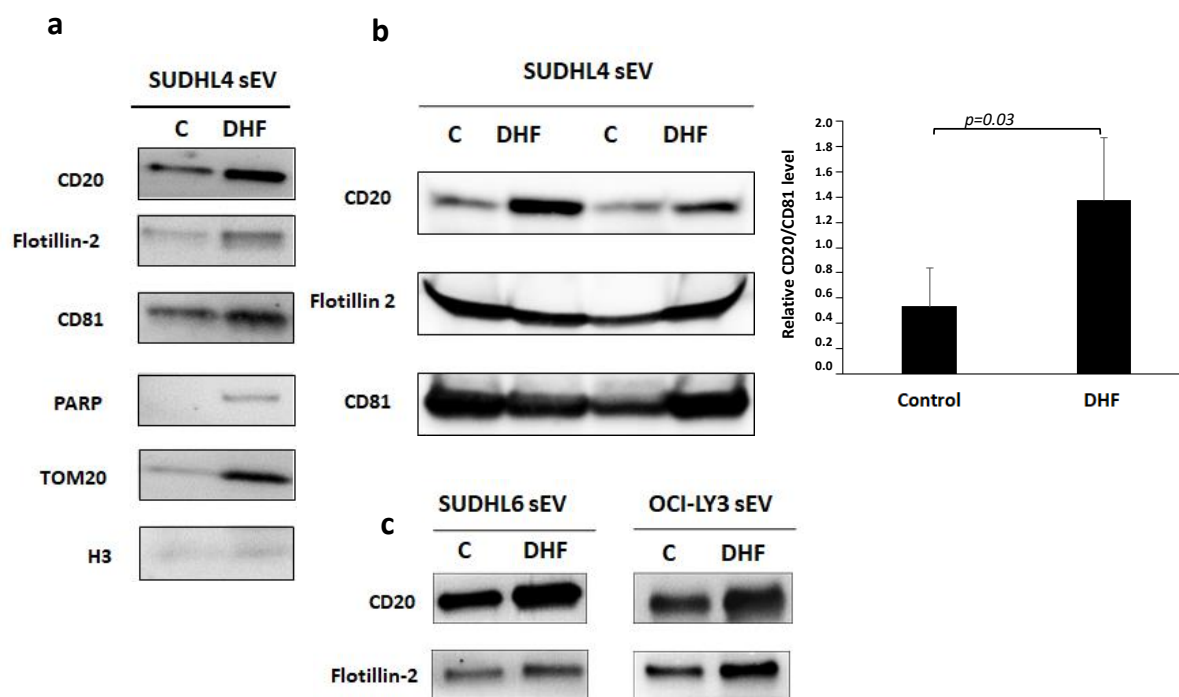


Fig. 4 TrkB activation enhanced CD20 expression on DLBCL-derived small EVs.

(a) Western blot analysis of proteins in EV lysates from 72h supernatants of SUDHL4 cell cultures in presence or not (C, control) of 7,8-DHF. Total small EV lysates produced by 40×10^6 cells were used for each culture condition. Expression of CD20, small EV markers (flotillin-2 and CD81), but also mitochondrial (TOM20) and nuclear (PARP and H3) markers were assessed in at least 2 independent experiments. (b) Alternatively, anti-CD20 immunocaptured-EVs were used before western blot analysis of total small EV lysates produced by 20×10^6 cells. Histograms show quantification by densitometry of CD20 expression normalized to CD81 level of 5 independent experiments (c) Enhanced CD20 expression was also found in total small EV lysates after TrkB activation of 40×10^6 SUDHL6 and OCI-LY3 cells. Images are representative of 3 independent experiments.

Figure 5

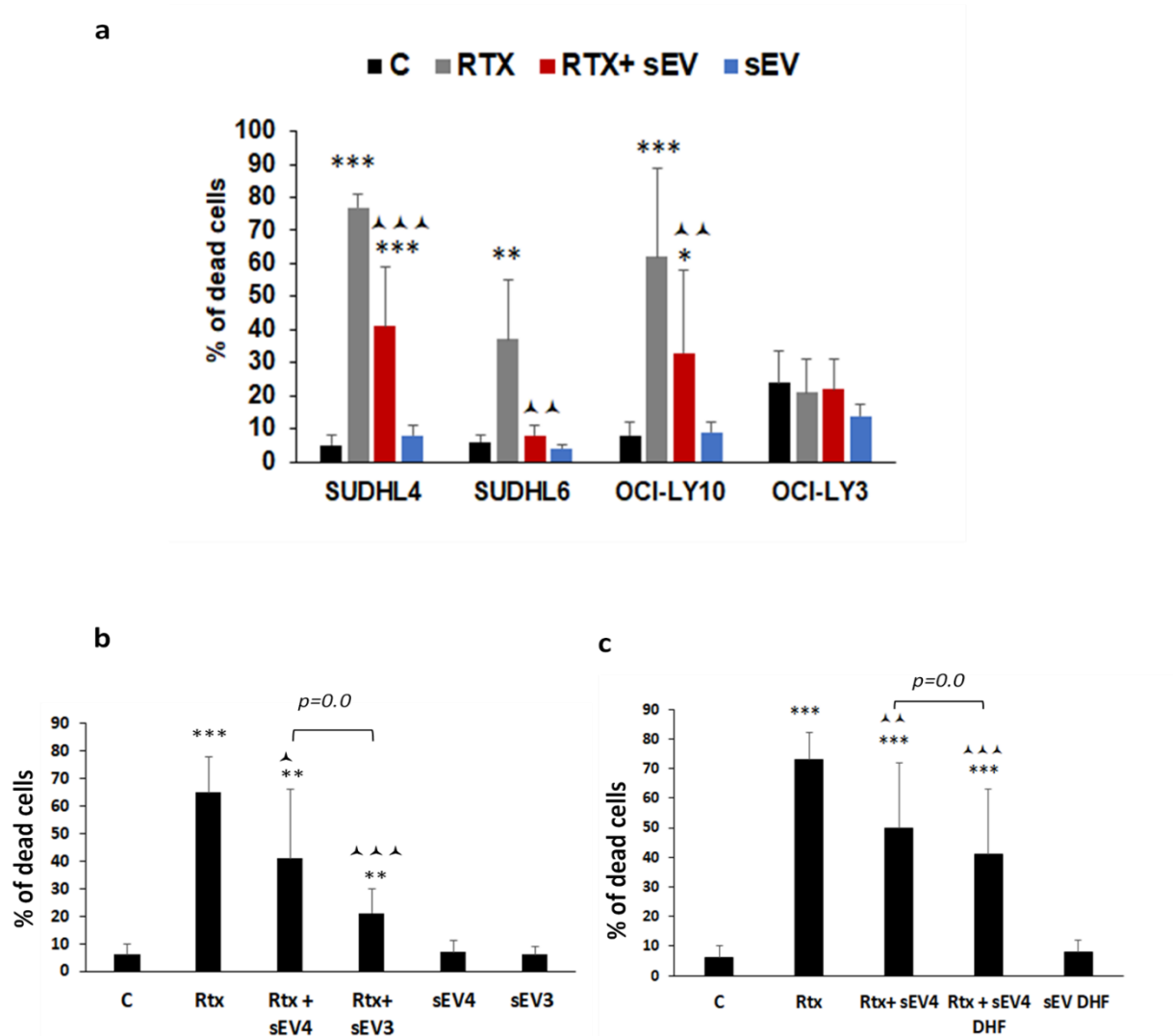


Fig. 5 *In vitro* analysis of differential capacity of small EVs in protecting DLBCL cells from rituximab cytotoxicity, and effect of TrkB stimulation.

(a) GCB (SUDHL4 and SUDHL6) and ABC (OCI-LY3 and OCI-LY10) DLBCL cell lines were cultured in presence or not (C, control) of autologous small EV samples (sEV) isolated from 40×10^6 (or from 10×10^6 for SUDHL6) cell supernatants, or/and rituximab (Rtx, $0.1 \mu\text{g/ml}$). Rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity (CDC) was analyzed by flow cytometry after 30 minutes in presence of human serum. Dead cell (propidium iodide positive cells) percentages are shown and histograms represent means \pm SD of at least 7 (SUDHL4/6, OCI-LY10) and 4 (OCI-LY3) independent experiments. *, **, ***: $p < 0.05$, 0.01 or 0.001 vs control; \blacktriangle , $\blacktriangle\blacktriangle$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$: $p < 0.01$ or 0.001 vs RTX. (b) Alternatively, heterologous small EVs (derived from OCI-LY3, sEV3) were compared to autologous (sEV4) in protecting SUDHL4 cells from rituximab CDC. Histograms represent means \pm SD of dead cell percentages from 7 independent experiments. (c) Finally, autologous small EVs derived from SUDHL4 cultured with the TrkB agonist, 7,8-DHF (Rtx + sEV4 DHF) or not (Rtx + sEV4) were also evaluated for their capacity to modify SUDHL4 CDC susceptibility. Histograms represent means \pm SD of dead cell percentages from 9 independent experiments.

CD20 expression was further analyzed by western blot on small EVs derived from supernatants of DLBCL cell cultures. Flotillin-2 and/or CD81 in EVs lysates were used as small EVs-associated proteins (Fig. 4) and as control of EV yields when total small EV lysates was loaded. Our data showed a strong increase in CD20 level in total small EV lysates from DHF treated SUDHL4 cell cultures (Fig. 4a), in contrast to the decrease observed after rituximab exposure (Supplementary Fig. S1). We confirmed this result by western blot analysis of immunocaptured-small EVs as shown in Fig. 4b, with a significant higher CD20 level in EVs released by DHF treated cells as compared to EVs of the control culture. Interestingly, enhanced CD20 level was also observed after TrkB stimulation in small EVs of other GCB (i.e. SUDHL6) and ABC (i.e. OCI-LY3, OCI-LY10) cell lines (Fig. 4c and Supplementary Fig. S1). Of note, western blot analysis of flotillin 2 and/or CD81 levels in total EV lysates suggest that part of this DHF-enhanced CD20 expression is related to an increase in the EVs number, as suggesting data from NTA analysis. Moreover, in contrast to control culture conditions (Fig. 4a), we found co-isolated contaminants of proteins localized in other compartments like nucleus (i.e. PARP and histone H3) and mitochondria (i.e. TOM20) when EVs were isolated from 7,8-DHF-treated cell supernatants. These data strongly suggest that TrkB agonist signaling determines higher CD20 in EVs and/or release of EVs that contain small EVs like exosomes but also other medium/large EVs.

DLBCL cells are differentially protected by autologous small EVs from rituximab cytotoxicity, and effect of EVs from TrkB agonist-treated cultures

Previous data showed that small EVs released from aggressive B-lymphoma cells act as decoy targets upon rituximab exposure, allowing cells to escape from humoral immunotherapy.¹⁹ With the aim to further explore this protection effect *in vivo* and also with EVs from TrkB-activated cell cultures, we first evaluated *in vitro* the capacity of our small EV preparations to influence the sensitivity of DLBCL cell to rituximab, and notably to the complement-dependent rituximab cytotoxicity (CDC). We have chosen to focus our analyses on SUDHL4 cells as we used SUDHL4 xenograft-bearing mice for the *in vivo* study.

Results showed (Fig. 5a) that when small EVs are added to cell cultures, sensitive DLBCL cells (i.e. SUDHL4, SUDHL6 and OCI-LY10) became more resistant to rituximab-mediated CDC with a strong decrease in dead cell percentages when compared to rituximab alone. Of note, cell viability was not modified by co-culture with small EVs alone for all studied cell lines. Interestingly, autologous small EVs induced total rituximab escape of SUDHL6 cells, as CDC with EVs was no longer significantly different from the CDC control (Fig. 5a). Of note, a

Figure 6

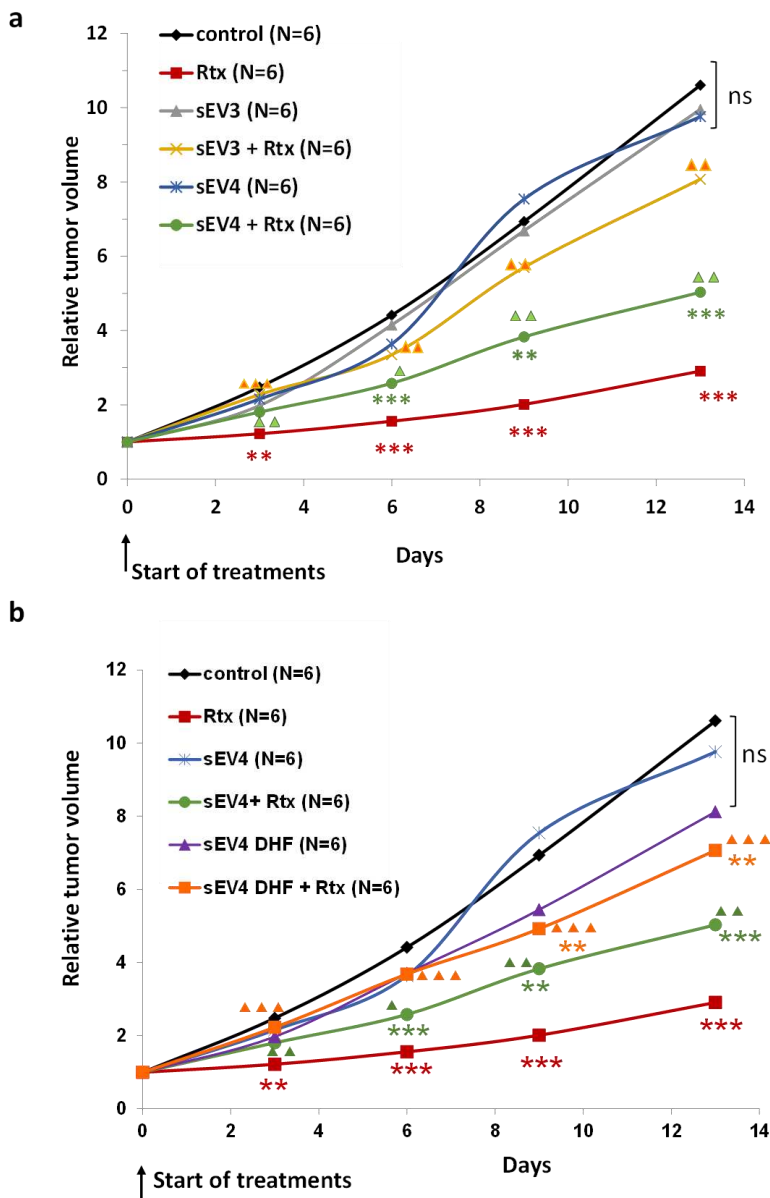


Fig. 6 Autologous and heterologous small EVs allow *in vivo* rituximab escape of tumor in a DLBCL-xenograft model that is enhanced with EVs from Trk-stimulated cells.

(a) SCID mice bearing tumors from SUDHL4 cells were injected i.p. twice a week, with or without (control) rituximab (Rtx, 25 mg/ml) alone or in combination with autologous (sEV4 + Rtx) or heterologous small EVs (sEV3 + Rtx) enriched from 72h cell cultures ($1 \cdot 10^7$ cells). Injection of only small EV samples (sEV3 and sEV4) were also realized. (b) Alternatively, mice were injected with Rtx in combination with autologous EVs derived from SUDHL4 supernatants of cultures exposed to 500 nM of 7,8-DHF (sEV4 DHF + Rtx) or not (sEV4 + Rtx), as compared to mice injected with small EVs alone (sEV4 and sEV4 DHF). Tumor volumes (cm^3) were estimated during 2 weeks. Means of tumor volumes relative to day 0 obtained for 6 mice per group are shown, and SD are not indicated for a better reading of the figure. **,***: $p < 0.01$ or 0.001 respectively vs control mice and $\blacktriangle, \blacktriangle\blacktriangle, \blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$: $p < 0.05, 0.01$ or 0.001 respectively vs Rtx treated mice.

positive correlation was observed between CD20 membrane expression (MFI) of each cell line and EV-mediated CDC protection (correlation coefficient= 0.92; $R^2=0.85$). These data show that EV-mediated escape from CDC is linked to the cell sensitivity (i.e. membrane CD20 level) to rituximab. In the ABC DLBCL subtype cell line, OCI-LY3, known to be more resistant, rituximab (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) exposure did not induce CDC, which could be explained by the lower CD20 membrane expression as compared to responsive cell lines (Table 2). Furthermore, viability was not changed when cells were exposed to small EVs alone (Fig. 5a). As OCI-LY3 cells were rituximab unresponsive, but seemed to produce small EVs with high level of CD20 compared to those released by SHDHL4 cells, we analyzed the effect of OCI-LY3-derived EVs on the CDC sensitivity of SUDHL4 cells. Our results showed that, in the presence of heterologous OCI-LY3-derived small EVs, SUDHL4 cells were more resistant to CDC when compared to autologous EVs (Fig. 5b). These data confirm the functionality of OCI-LY3 - derived small EVs, likely by exercising a decoy function against anti-CD20 antibodies. Finally, as treatment with 7,8-DHF enhanced small EV CD20 expression, we explored the *in vitro* capacity of autologous small EVs isolated from DHF-treated SUDHL4 cell cultures to enhance protection against rituximab-mediated CDC. Indeed, our results (Fig. 5c) showed that CDC escape was higher with small EV preparations from DHF-treated cell cultures (Rtx + sEV4 DHF) than that of the control culture (Rtx + sEV4). Of note, we also observed the same trend with small EVs from OCI-LY10 cell cultures on autologous cell protection from rituximab-mediated CDC (data not shown). However, no effect was observed for small EVs from DHF-treated SUDHL6 cell supernatants (data not shown). This result could be explained by the strong protection already done by SUDHL6-derived EVs from control cultures (Fig. 5a).

Small EVs allow *in vivo* tumor escape from rituximab treatment in a DLBCL xenograft mouse model

In order to confirm our data *in vivo*, we used a GCB-DLBCL xenograft murine model as previously reported,^{26,30} in which SCID mice were subcutaneously inoculated with SUDHL4 cells. After 6 weeks, tumor-bearing mice were i.p. treated with rituximab (25 mg/kg) or PBS solution (control mice), in association or not with autologous small EVs purified from 10×10^6 SUDHL4 cell cultures in presence or not with 7,8-DHF (500 nM). Moreover, the *in vivo* capacity of heterologous OCI-LY3-derived small EVs to protect SUDHL4 tumors from rituximab cytotoxicity was also evaluated.

Tumor growth in mice treated only with SUDHL4 or OCI-LY3-derived small EVs purified from control cultures (sEV4 or sEV3 respectively) was not significantly different from those of PBS-treated control mice (Fig. 6a, ns). Our data showed that, when associated to rituximab treatment, small EV preparations (sEV4 or sEV3 + Rtx) induced a significant increase of tumor growth, compared to mice injected with rituximab alone; this escape from rituximab was stronger with the heterologous OCI-LY3-derived EVs, confirming our *in vitro* findings. Indeed, tumor volumes were no longer significantly different from those of control mice (Fig. 6a). Interestingly, an enhanced protection was observed when small EVs were purified from TrkB agonist-treated cell cultures (i.e. sEV4 DHF + Rtx in Fig. 6b) and tumor growth was significantly higher ($p < 0.05$) compared to mice receiving small EVs purified from control cultures (i.e. sEV4 + Rtx). Of note, no significant effect was observed with small EVs from DHF cell cultures alone (i.e. sEV4 DHF). To the best of our knowledge, these data show, for the first time, the *in vivo* capacity of DLBCL-derived small EVs to protect tumors from rituximab treatment in a DLBCL xenograft model, that could also be enhanced using EVs produced by cells with TrkB activation.

Discussion

Increasing evidences support an important role for exosomes in hematological malignancies including DLBCL development and progression.^{31,32} However, the mechanisms of CD20 regulation at the exosomal level needed to be clarified for the different DLBCL cell subtypes. In the present study, we realized a comparative analysis of small EV production by GCB and ABC DLBCL cell lines, and evaluated their CD20 level. NTA and western blot data demonstrated small EVs in our EV preparations, which probably include exosomes. As reported for membrane CD20 level among tumor B cell lines, or in patients,^{33,34} CD20 expression of small EVs was variable, with a higher level for EVs derived from cell lines expressing high membrane CD20 levels (i.e. SUDHL6). As expected, CD20 expression was mostly undetectable in small EV lysates produced by U2932 cells that were also CD20^{low}, and CD20 was not detected at cellular (data not shown) and EV levels in a CD20 negative glioblastoma cell line. Thus, variation of CD20 level in EVs may mirror the differential CD20 membrane levels of parental cell lines. Our analysis suggests no significant difference according to the DLBCL subtype, even if we have to confirm this with additional cell lines as well as in small EV from patients. As expected, we confirmed *in vitro* the functional capacity of autologous and heterologous small EVs to protect cells from rituximab-mediated CDC.^{19,35} CDC activity of

rituximab has been shown to be dependent on CD20 expression level,³⁶ which could explain the CDC resistance of OCI-LY3 in this study. Interestingly, our data revealed a stronger protection in autologous model (i.e. SUDHL6 EVs vs SUDHL6 cells) or heterologous model (i.e. OCI-LY3 EVs vs SUDHL4 cells) with EVs that likely express higher CD20 levels and/or are highly concentrated in cell culture supernatants. Indeed, NTA data showed that small EV production varies significantly between the DLBCL cell lines, which was also suggested by western blot analysis. As for SUDHL6 cells, the higher CD20 level that we observed in small EV lysates, could also reflect higher EV concentration in comparison with other cell lines. Of note, the comparative analysis of CD20 levels in small EVs (Fig. 2) was in good agreement with EV concentrations of the cell lines obtained by NTA analysis (Table 1b). However, as EV productions by the studied DLBCL cell lines in the present work were low and probably heterogeneous, we have used the viable cell number rather than total protein quantification to normalize our EV samples for the western blot and functional analyses.

We have previously shown that autocrine BDNF/TrkB survival pathways may affect rituximab efficacy in DLBCL.²⁶ Herein, we report for the first time *in vitro* and *in vivo* evidence for a TrkB role in cell escape from rituximab treatment that could involve EV production and their CD20 expression. 7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF) is a member of the flavonoid family that has been identified as the first small-molecule compound that crosses the blood brain barrier, binds with high affinity and specificity to the BDNF receptor, TrkB, and activates its down-stream signaling cascade.²⁷ In the present work, we used 7,8-DHF to mimic BDNF effect in DLBCL cells that we proved by enhanced phosphorylation of TrkB. Erk and Akt signaling pathways, involved in TrkB signaling,³⁷ have been also described to control the up-regulated expression of CD20 on human tumor B cells.^{38,39} Thus, we evaluated the role of TrkB activation on the regulation of CD20 expression. We first analyzed CD20 membrane and intracellular levels in DLBCL cells exposed to the TrkB agonist, 7,8-DHF, associated or not to rituximab. We confirmed, in SUDHL4 cell, the previously reported down-regulation of CD20 level after rituximab exposure.^{10,34} However, we show that this effect was not associated with reduced mRNA *MS4A1* levels suggesting, as previously described, the complexity of mechanisms involved in rituximab-induced down-regulation of membrane CD20.³⁶ As concerning small EVs released by DLBCL cell lines, we observed a decrease of CD20 expression after rituximab exposure (Supplementary Fig. S1); this result, reported here for the first time to our knowledge, strongly suggests that this variation in CD20 level reflects the down-regulation of the membrane CD20 level observed in parental cells. Interestingly, we found in small EV lysates, derived from DLBCL cell cultures, an over expression of CD20 after 7,8-DHF exposure, that was not

explained by an overall increase in cellular CD20 level neither in *MS4A1* mRNA. The higher CD20 expression on EVs after TrkB activation was found in all tested DLBCL cell lines and was observed with the natural ligand of TrkB, BDNF. Of note, increased expression of CD20 in EV lysates were often associated with a slight increase in small EV marker expression (i.e. CD81 or flotillin 2), suggesting that this effect could be due, at least partly, to an increase in EV production. This hypothesis is supported by the NTA analysis of EV preparations that were purified from DLBCL cell cultures after 7,8-DHF treatment as compared to control. However, we could not find any significant differences between our groups likely due to the high variability of EV concentrations produced by each cell culture. Our previously reported data in DLBCL cell lines and biopsies samples from patients revealed the expression of full length (TrkB.FL) and truncated (TrkB.T1) forms of BDNF high affinity receptor, and p75^{NTR}, the low affinity neurotrophin receptor.²⁶ Furthermore, we showed evidence for a pro-survival role of endogenous BDNF/TrkB/p75^{NTR} axis in DLBCL cells that could be involved in aggressive phenotypes. Interestingly, in neurons BDNF/TrkB.FL/p75^{NTR} signaling was demonstrated to induce internalization and accumulation of p75^{NTR}, that had escaped the lysosomal route, in CD63-positive multivesicular bodies (MVBs) for exosome release.^{40,41} Of note, p75^{NTR} was previously found in small EVs released by DLBCL cell lines (personal data). Therefore, even if we can't exclude medium/large EVs in our preparations, we suggest that, as in neurons, BDNF/TrkB.FL/p75^{NTR} signaling in DLBCL cells may increase internalization and post-endocytic trafficking of membrane receptors as p75^{NTR} favouring MVBs specialized for exosome release.

Results from our *in vitro* studies indicated higher CD20 levels in EVs after TrkB activation, suggesting a potential effect in cell escape from rituximab-induced CDC. To assess this possibility *in vivo*, we used xenografts of SUDHL4 cells in SCID mice and evaluated the role of autologous small EVs purified from supernatants of SUDHL4 cell cultures treated or not with 500 nM of 7, 8-DHF. First we confirm *in vivo*, for the first time to our knowledge, in a DLBCL xenograft mice model, the capacity of autologous EVs to protect DLBCL tumors from rituximab cytotoxicity. Moreover, data are consistent with *in vitro* results showing a stronger protection with heterologous OCI-LY3 derived EVs, probably by exercising a higher decoy function against rituximab. Interestingly, we proved that this protection was significantly higher when small EVs were derived from SUDHL4 cells exposed to the TrkB agonist. Even though we proposed that increase in CD20 expression in EVs and/or EV release are involved in this higher cell escape, we can't exclude other EV components as complement or complement regulatory proteins (CRPs) that have been also reported in small EVs from

DLBCL.¹⁹ Moreover, *in vivo*, small EVs can influence tumor microenvironment or inhibit target cells as NK cells by carrying genetic information notably microRNAs (miRs).⁴² Indeed, further experiments are required to understand the *in vivo* mechanisms as well as TrkB-mediated regulation of CD20 levels in small EV of DLBCL.

In conclusion, present data provide comparative quantitative and qualitative (i.e. CD20 levels) informations on small EVs released by GCB and ABC DLBCL cell lines. Furthermore, they report *in vivo* (xenograft model) the capacity of autologous and heterologous EVs to protect tumors from immunotherapy, that could be influenced and enhanced by culture conditions. Notably, we showed that autocrine/paracrine survival loops realized by BDNF/TrkB axis, that we previously reported in DLBCL, also target small EV release enhancing protection to rituximab. Finally, beyond their role in exercising a decoy function against rituximab, our results suggest that peripheral small EVs from patients, by providing indirect information on the CD20 phenotype of parental cells, could serve as a “liquid biopsy” in DLBCL disease monitoring.

Table 1. Morphological characterization and quantification of EV preparations from 72h culture supernatants of GCB (SUDHL4/6) and ABC (OCI-LY3/10, U2932) DLBCL cell lines.

a

| Sub-type | DLBCL cell line | Particule size (nm) (Means \pm SE) | Modus (nm) |
|----------|-----------------|---|--------------|
| GCB | SUDHL4 | 130 \pm 10 | 106 \pm 15 |
| | SUDHL6 | 143 \pm 12 | 116 \pm 11 |
| ABC | OCI-LY3 | 141 \pm 14 | 112 \pm 7 |
| | OCI-LY10 | 141 \pm 15 | 111 \pm 6 |
| | U2936 | 132 \pm 26 | 111 \pm 18 |

b

| Concentration (x10 ⁸ particles /ml) | SUDHL4 | SUDHL6 | OCI-LY3 | OCI-LY10 | U2932 |
|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------|
| SUDHL4 | 3 \pm 1 | | | | |
| SUDHL6 | <i>p</i> = 0.04 | 6 \pm 3 | | | |
| OCI-LY3 | <i>p</i> = 0.01 | <i>p</i> = 0.07 | 16 \pm 14 | | |
| OCI-LY10 | <i>p</i> = 0.001 | <i>p</i> = 0.02 | <i>p</i> = 0.05 | 2 \pm 0.4 | |
| U2932 | <i>p</i> = 0.81 | <i>p</i> = 0.15 | <i>p</i> = 0.04 | <i>p</i> = 0.09 | 4 \pm 2 |

(a) Mean particle size, modus and (b) concentration of EVs released by 30x10⁶ cells were quantified using the NanoSight Tracking Analysis system after small EVs enrichment by ultracentrifugation as described in Materials and Methods. Results are expressed as means \pm SD of at least 5 independent experiments. The corresponding statistical comparisons of EV production between cell lines are done (*p-value*).

Table 2. Flow cytometry analysis of membrane CD20 expression on GCB (SUDHL4, SUDHL6) and ABC (OCI-LY3, OCI-LY10 and U2932) DLBCL cell lines.

| CD20 cell surface Expression | SUDHL4 | SUDHL6 | OCI-LY3 | OCI-LY10 | U2932 |
|------------------------------|---------------|---------------|-------------|---------------|------------|
| MFI | 1824 \pm 50 | 1989 \pm 18 | 389 \pm 1 | 1195 \pm 21 | 23 \pm 5 |
| Positivity (%) | 99 \pm 0 | 99 \pm 0 | 98 \pm 0 | 99 \pm 0 | 76 \pm 2 |

Membrane CD20 expression was analyzed by flow cytometry after anti-CD20-PE staining of DLBCL cells. MFI: Mean Fluorescence Intensity of CD20 staining. Data are the means of 3 experiments \pm SD.

Table 3. Effect of the TrkB agonist (7,8-DHF) on EV production by DLBCL cells

| | SUDHL4 | | OCI-LY3 | |
|---|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
| | Control | DHF (500 nM) | Control | DHF (500 nM) |
| Particle size (nm) (Means \pm SE) | 130 \pm 10 | 134 \pm 11 | 141 \pm 14 | 142 \pm 18 |
| Modus (nm) | 106 \pm 15 | 108 \pm 8 | 112 \pm 7 | 112 \pm 8 |
| Concentration (x10 ⁸ particles/ml) | 3.5 \pm 1 | 6 \pm 7 | 25 \pm 29 | 45 \pm 53 |

Mean particle size, modus and concentration of EVs were quantified using the NanoSight Tracking Analysis system after EV enrichment by ultracentrifugation as described in Materials and Methods. Results are expressed as means \pm SD of at least 8 independent experiments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: DT and DB. Acquisition, analyse and interpretation of data: MA, HB, MB, CV, DT; Drafting the article or revising it critically for important intellectual content: DT, HB and HA; Wrote the paper including design of figures: DT, MA and HB; Final approval of the version to be published: DT, MOJ, NG, JF, JA and HS.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding: This work was supported by grants from Institut Roche, Région Nouvelle Aquitaine, Ligue Contre le Cancer (87) and CORC (Comité d'Orientation Recherche Cancer en Limousin).

Competing interests: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-511 (2000).
2. Wright G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, E. H., Wiestner, A. & Staudt, L. M. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9991-9996 (2003).
3. Lenz, G. & Staudt, L.M. Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1417-1429 (2010).
4. Coiffier, B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* **26**, 3603-3613 (2007).
5. Rezvani, A. R. & Maloney, D. G. Rituximab resistance. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **24**, 203-216 (2011).
6. Li, S., Young, K. H. & Medeiros, L. J. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology* **50**, 74-87 (2018).
7. Suzuki, Y., Yoshida, T., Wang, G., Togano, T., Miyamoto, S., Miyazaki, K. et al. Association of CD20 levels with clinicopathological parameters and its prognostic significance for patients with DLBCL. *Ann. Hematol.* **91**, 997-1005 (2012).
8. Czuczman, M.S., Olejniczak, S., Gowda, A., Kotowski, A., Binder, A., Kaur, H. et al. Acquirement of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 1561–1570 (2008).
9. Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, T., Shimada, K., Ito, M., Nakamura, S. et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* **113**, 4885-4893 (2009).
10. Miyoshi, H., Arakawa, F., Sato, K., Kimura, Y., Kiyasu, J., Takeuchi, M. et al. Comparison of CD20 expression in B-cell lymphoma between newly diagnosed, untreated cases and those after rituximab treatment. *Cancer Sci* **103**, 1567-1573 (2012).

11. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289 (2014).
12. Doyle, L. M. & Wang, M. Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* **8**, 727 (2019).
13. Kharaziha, P., Ceder, S., Li, Q. & Panaretakis, T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Bio. Biophys. Acta* **1826**, 103-111 (2012).
14. Kahlert, C. & Kalluri, R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med. (Berl)* **91**, 431-437 (2013).
15. Yu, S., Cao, H., Shen, B. & Feng, J. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. *Oncotarget* **6**, 37151-37168 (2015).
16. Hannafon, B.N. & Ding, W.Q. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 14240-14269 (2013).
17. Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H. & Xu, W. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J. Hematol. Oncol.* **8**, 83 (2015).
18. Ruivo, C. F., Adem, B., Silva, M. & Melo, S. A. The Biology of Cancer Exosomes: Insights and New Perspectives. *Cancer Res.* **77**, 6480-6488 (2017).
19. Aung, T., Chapuy, B., Vogel, D., Wenzel, D., Oppermann, M., Lahmann, M. et al. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**: 15336-15341 (2011).
20. Koch, R., Aung, T., Vogel, D., Chapuy, B., Wenzel, D., Becker, S. et al. Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 395–404 (2016).
21. Rutherford, S. C., Fachel, A. A., Li, S., Sawh, S., Muley, A., Ishii, J. et al. Extracellular vesicles in DLBCL provide abundant clues to aberrant transcriptional programming and genomic alterations. *Blood* **132**, e13-e23 (2018).
22. Feng, Y., Zhong, M., Zeng, S., Wang, L., Liu, P., Xiao, X. et al. Exosome-derived miRNAs as predictive biomarkers for diffuse large B-cell lymphoma chemotherapy resistance. *Epigenomics* **11**, 35-51 (2019).
23. Vega, J. A., García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M. & Germanà, A. Neurotrophins and the immune system. *J. Anat.* **203**, 1-19 (2003).
24. Griffin, N., Faulkner, S., Jobling, P. & Hondermarck, H. Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. *Pharmacol. Res.* **135**, 12-17 (2018).
25. Bellanger, C., Dubanet, L., Lise, M. C., Fauchais, A. L., Bordessoule, D., Jauberteau, M.O. et al. Endogenous neurotrophins and Trk signalling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS One* **6**, e27213 (2011).
26. Dubanet, L., Bentayeb, H., Petit, B., Olivrie, A., Saada, S., de la Cruz-Morcillo, M.,A. et al. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br. J. Cancer* **113**, 934-944 (2015).
27. Jang, S. W., Liu, X., Yepes, M., Shepherd, K. R., Miller, G. W., Liu, Y. et al. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2687–2692 (2010).

28. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3, Unit 3.22 (2006).
29. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **7**, 1535750 (2018).
30. Bentayeb, H., Aitamer, M., Petit, B., Dubanet, L., Elderwish, S., Désaubry, L. et al. Prohibitin (PHB) expression is associated with aggressiveness in DLBCL and flavagline-mediated inhibition of cytoplasmic PHB functions induces anti-tumor effects. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 450 (2019).
31. Xia, B., Li, M., Yang, R., Wang, X., Shun, C. & Zhang, Y. The Central Roles of Exosomes in Hematological Malignancies: A New Frontier Review. *Biosc. Biotech. Res. Comm.* **11**, (2018).
32. Fernandes, M., Teixeira, A. L. & Medeiros, R. The opportunistic effect of exosomes on Non-Hodgkin Lymphoma microenvironment modulation. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **144**, 102825 (2019).
33. Olejniczak, S. H., Stewart, C. C., Donohue, K. & Czuczman, M. S. A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. *Immunol. Invest.* **35**, 93-114 (2006).
34. Johnson, N. A., Boyle, M., Bashashati, A., Leach, S., Brooks-Wilson, A., Sehn, L. H. et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood* **113**, 3773-3780 (2009).
35. Oksvold, M.P., Kullmann, A., Forfang, L., Kierulf, B., Li, M., Brech, A., et al. Expression of B-cell surface antigens in subpopulations of exosomes released from B-cell lymphoma cells. *Clin. Ther.* **36**, 847-862.e1 (2014).
36. Tomita, A. Genetic and Epigenetic Modulation of CD20 Expression in B-Cell Malignancies: Molecular Mechanisms and Significance to Rituximab Resistance. *J. Clin. Exp. Hematop.* **56**, 89-99 (2016).
37. Arévalo, J. C. & Wu, S. H. Neurotrophin Signaling: Many Exciting Surprises! *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1523-1537 (2006).
38. Wojciechowski, W., Li, H., Marshall, S., Dell'Agnola, C. & Espinoza-Delgado, I. Enhanced expression of CD20 in human tumor B cells is controlled through ERK-dependent mechanisms. *J. Immunol.* **174**, 7859-7868 (2005).
39. Winiarska, M., Bojarczuk, K., Pyrzynska, B., Bil, J., Siernicka, M., Dwojak, M. et al. Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *MAbs.* **6**, 1300-1313 (2014).
40. Escudero, C. A., Lazo, O. M., Galleguillos, C., Parraguez, J. I., Lopez-Verrilli, M. A., Cabeza, C. et al. The p75 neurotrophin receptor evades the endolysosomal route in neuronal cells, favouring multivesicular bodies specialised for exosomal release. *J. Cell Sci.* **127**, 1966-1979 (2014).
41. Ishii, T., Warabi, E. & Mann, G. E. Circadian control of BDNF-mediated Nrf2 activation in astrocytes protects dopaminergic neurons from ferroptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 169-178 (2019).

42. Zare, N., Haghjooy Javanmard, S. H., Mehrzad, V., Eskandari, N., Andalib, A. R. Effect of Plasma-Derived Exosomes of Refractory/Relapsed or Responsive Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma on Natural Killer Cells Functions. *Cell J.* **22**, 40-54 (2020).

Résultats – Article 2 *en préparation*

Evaluation of circulating small extracellular vesicles derived CD20 as a potential biomarker in patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma

Marine Aitamer*, Hafidha Bentayeb*, Hussein Akil, Chantal Vignoles, Agnès Olivrie, Julie Abraham, Nathalie Gachard, Hamasseh Shirvani, Jean Feuillard and Danielle Troutaud.

Synopsis

Le projet « ExoReBLY » (Exosomes and Resistance to immunotherapy in aggressive Non-Hodgkin B-cell Lymphomas) est un projet de recherches qui a été conçu en collaboration avec le Pr Jean Feuillard (UMR, CNRS UMR7276, INSERM U1262, Université de Limoges), et les services d'Hématologie et d'Hématologie clinique du CHU de Limoges. Il avait comme but d'aborder la signification clinique des petites vésicules extracellulaires (small EVs) circulantes dont les exosomes chez les patients atteints de DLBCL et présentait un aspect de valorisation (confidentiel) vers de nouveaux outils thérapeutiques. Il a permis l'obtention d'un co-financement avec l'Institut Roche et la région Nouvelle Aquitaine. C'est ainsi qu'au cours de ma thèse (à partir de juillet 2018) et en étroite collaboration avec Hafidha Bentayeb, post-doctorante, j'ai commencé à travailler sur ce projet prometteur. Un des objectifs était de rechercher d'éventuelles corrélations entre l'expression du CD20 sur les « small EVs » circulants (purifiés à partir du plasma) et celle retrouvée dans les biopsies tumorales, et/ou les paramètres clinico-biologiques des patients. En effet, une des questions posées dans ce projet était de savoir si cette expression du CD20 des EVs pouvait varier en fonction de l'agressivité des tumeurs chez les patients ; cette dernière question ouvre la voie sur la possibilité d'utiliser les « small EVs » comme des « biopsies liquides » pouvant être à la base d'un « test compagnon » prédictif de l'évolution de la maladie et/ou de la réponse thérapeutique.

Les résultats liés au projet, pour lequel la phase d'inclusion des patients est toujours en cours, sont soumis à une clause de confidentialité ; nous ne présentons dans le cadre de ce mémoire et sous couvert de l'Institut Roche, seulement les données concernant les aspects qualitatif et quantitatif des « small EVs » des patients en comparaison avec ceux de volontaires sains. Ces résultats ont notamment été obtenus grâce à l'acquisition par ce co-financement, du Nanosight NS300 de chez Malvern, permettant de caractériser morphologiquement et de compter les nanovésicules extracellulaires purifiées. Les données obtenues nous permettent de dire que les patients ont une quantité « small EVs » circulants significativement plus importante que les volontaires sains. De plus, nous avons commencé à analyser par deux techniques différentes (ELISA et western blot), l'expression du CD20 présent au sein de la population circulante des EVs des patients atteints de DLBCL, toujours en comparaison avec ceux des volontaires sains. Nous confirmons la forte présence de CD20 dans les « small EVs » dont les exosomes circulants des patients. En revanche, nous ne pouvons pas conclure pour l'instant sur une éventuelle différence d'expression entre les patients et les volontaires sains. D'autres approches sont en cours de réalisation afin de compléter ces données.

Titre provisoire

Evaluation of circulating small extracellular vesicles derived CD20 as a potential biomarker in patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma.

Marine Aitamer^{1*}, Hafidha Bentayeb^{1*}, Hussein Akil², Chantal Vignoles², Agnès Olivrie³, Julie Abraham^{2,3}, Nathalie Gachard^{2,4}, Hamasseh Shirvani⁵, Jean Feuillard^{2,4} and Danielle Troutaud¹.

¹EA3842 CAPTuR Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland 87025 Limoges Cedex, France. ²UMR UMR CNRS 7276 /INSERM U1262, Facultés de Médecine, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland 87025 Limoges Cedex, France. ³Service d'Hématologie Clinique, CHU de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87000 Limoges, France. ⁴Laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87000 Limoges, France. ⁵Institut Roche, 30, cours de l'île Seguin 92650 Boulogne-Billancourt, France.

*These authors contributed equally to this work

Funding: This work was supported by grants from Institut Roche, Région Nouvelle Aquitaine, and Ligue Contre le Cancer (87).

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

E-mail: danielle.troutaud@unilim.fr

Background: Small extracellular vesicles (EVs) including exosomes derived from DLBCL tumor cells, by expressing CD20, acted as decoy targets upon rituximab exposure, allowing lymphoma cells to escape from humoral immunotherapy. But, the clinical significance of this EV CD20 expression and its use as biomarker have not been investigated in patients.

Methods: Small EVs were isolated from plasma samples of DLBCL patients (n=11) and healthy donors (HV, n=15). Morphological analysis and concentration of plasma EVs were determined by NTA technology. Moreover, expression of CD20 and small EVs and exosome-marker proteins were analyzed by western blotting or ELISA (CD20). Capture of anti-CD20 by plasma small EVs from DLBCL patients compared to healthy volunteers was also evaluated by flow cytometry. Finally, analysis of potential correlations with clinico-biological features of patients was planned.

Results: Our preliminary results demonstrated small EVs enrichment that likely included exosomes in our EVs plasma samples. No variation in the morphological characteristics of EVs was observed in comparison with those of HV. Interestingly, we showed for the first time in DLBCL an increase of small EV concentration compared to HV. Even though preliminary, CD20 expression in DLBCL plasma-derived small EVs was not significantly modified when compared with HV. Inclusion of patients is still in progress, and thus correlations with the clinico-biological features of patients remain to be analyzed.

Conclusion: This study provides arguments to investigate further plasma small EVs in DLBCL as an indicator of tumor burden, and the EV CD20 as a biomarker for the disease monitoring.

Introduction

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) are highly aggressive and heterogeneous B-cell lymphoma that would imminently be fatal without treatment. Monoclonal anti-CD20 antibody, rituximab, in combination of CHOP chemotherapy (R-CHOP) is widely used with favorable results. Although more than half of patients achieve long-term remission, many are not cured with this immunotherapy. Suboptimal response and/or resistance to rituximab have remained a challenge in the therapy of DLBCL but also of all B-NHL (Bonavida, 2014; Sehn and Gascoyne, 2015). Decreased CD20 expression has been postulated to be one of the most important mechanisms contributing to rituximab resistance (Miyoshi et al, 2012). Interestingly, it has been reported that CD20 positive small EVs, released by B-NHL cells, acted as decoy targets upon rituximab exposure, allowing lymphoma cells to escape from humoral immunotherapy (Aung et al., 2011).

Exosomes are small membrane extracellular vesicles (EVs), with typically 30–150 nm in diameter, secreted by several cell types during exocytic fusion of multivesicular bodies (MVBs) with the plasma membrane (Doyle and Wang, 2019). Many cancer cells have been shown to secrete exosomes in greater amounts than normal cells (Kharaziha et al., 2012). They modulate and control cellular connections in the tumor microenvironment by transferring functional and/or oncogenic proteins, miRNAs and lipids cargos. Current knowledge of tumor derived-exosomes suggests that they play multiple roles in tumor development and therapy sensitivity included in hematological malignancies (Yu et al., 2015; Fernandez et al., 2019). Finally, as exosome composition is cell and tissue specific, they are highly suitable to serve as diagnostic markers. Indeed, identified tumor-related antigens that are also therapeutic targets for immunotherapy, such as CD19 and CD20, are expressed in small EVs of B tumoral cells included DLBCL (Aung et al., 2011; Caivano et al., 2015). Moreover, several recent studies have evaluated the prognostic and predictive values of pretreatment tumor-associated mRNA and miRNA in exosomes from non-Hodgkin B cell lymphomas (Navarro-Tableros et al., 2018; Rutherford et al., 2018). BCL-6 and C-MYC mRNA positivity in pretreatment small EV samples were predictors of worse progression-free survival (PFS) (Provencio et al., 2017). In a recent study 37 miRNA were identified overexpressed in exosomes from sera of DLBCL patients, included miR-99a-5p and miR-125b-5p. These two miRNA were associated with PFS shorter time, and they can predict chemotherapeutic efficacy (Feng et al., 2019). However, the potential biomarker capacity of exosomal CD20 has not be evaluated.

In this study, we studied quantitatively and qualitatively (i.e. CD20 level) small EVs from plasma of DLBCL patients, with the aim to realize a comparative analysis between GCB and ABC subtypes, and with healthy controls. Moreover, we planned to evaluate the potential relationship between EV CD20 level and the clinicopathological features of DLBCL patients.

Material and Methods

Patients samples

Blood samples of DLBCL patients (n = 11) treated in the hematology department of Dupuytren Hospital (Limoges, France) were taken before beginning treatment. Blood samples were also obtained from 15 healthy volunteers matched for age and sex ratio with general population of DLBCL patients. Whole blood was collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes and plasmas were obtained after two centrifugations at 2000×g for 5 minutes at room temperature, and within 2h of collection. Plasma samples were then apportioned into 1 ml aliquots and stored at –80°C at the CRBioLim of the Hematology Laboratory of Limoges'CHU until use. All samples were subjected to only one freeze/thaw cycle. Clinical and laboratory data were available at the time of diagnosis. Tumors were classified according to the World Health Organization classification (Campo et al., 2011) and assigned as germinal center B-cell (GCB) or non-GCB subtype using the Hans algorithm (Hans et al., 2004) as previously described (Dubanet et al., 2015; Bentayeb et al., 2019). The project has been approved by the scientific and methodological advice of clinical research department of Limoges' CHU. Written informed consent was obtained from all participants after an explanation of the nature of the study as approved by the ethical committee (CPP EST I Dijon; ID-RCB : 2019-A00651-56). Declaration on the “Protocol Registration and Results System” (PRS, ClinicalTrials.gov) was effective on June 11, 2019 (ID: 87RI18_0025 (ExoReBLy) NCT03985696).

Isolation, morphological characterization and quantification of small EVs

EVs were isolated from 0.2 ml of plasma by differential centrifugations according to standard protocols (Théry and al., 2006) and update of the MISEV2014 guidelines (Théry et al., 2018). Briefly, samples were sequentially centrifuged (4°C) at 300g for 10 min, at 2000g for 10 min and at 10,000g for 30 min followed by filtration (0.22µm filter; Millipore).

Then, EVs were pelleted by ultracentrifugation at 120,000g for 80 min and washed in PBS by a repeated 120,000g centrifugation (SW28 rotor, Beckman Coulter). The final pellets, that contained small EVs including exosomes, were then resuspended immediately in PBS (0.5 mL for structural and quantitative analysis with the NanoSight technology, 200 μ L of sample buffer for ELISA) or in lysis buffer (20 μ L for western blotting analysis).

Size and concentration of EVs derived from 0.2 mL plasma of DLBCL patients and healthy volunteers were then analyzed with the NTA technology (Nanoparticles Tracking Analysis; NanoSight NS300, Malvern). Mean particule sizes, modus and concentration of EVs were determined using NTA 2.3 software in which 5 videos of 60 s were taken under controlled fluid flow with a pump speed set to 100. Plots represent the average value of the 5 recordings performed for each sample.

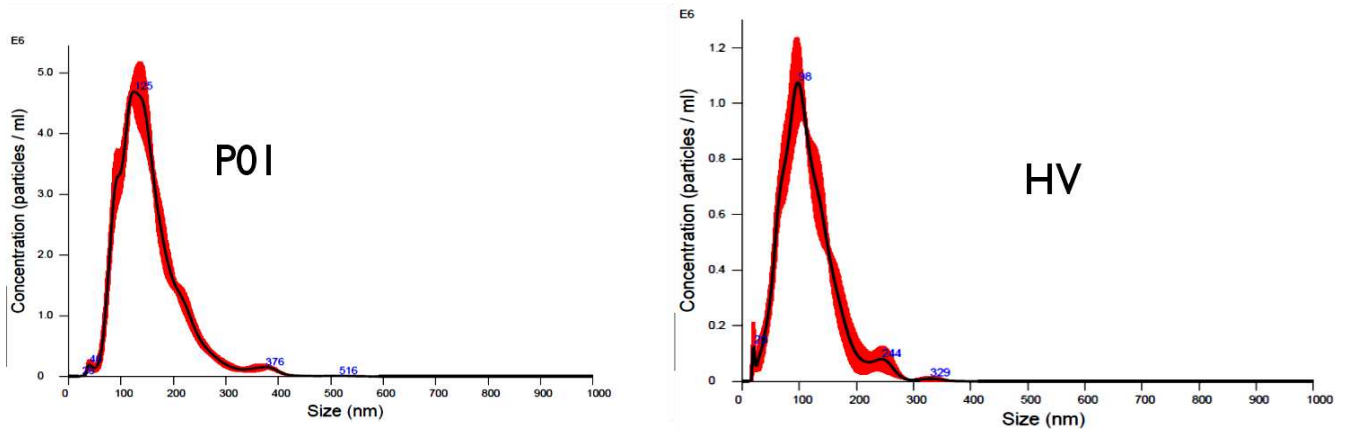
Western blotting analysis for detection of small EVs proteins and CD20

EVs preparations from 1 ml of plasma samples were resuspended in 20 μ L of lysis buffer (Cell Signaling Technology) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Sigma), and after centrifugation at 12,000g for 20 minutes the supernatant was collected. Proteins were separated by SDS-PAGE then transferred to PVDF membrane (Biorad). Characterization of small EVs and notably exosomes was performed by western blot analysis of flotillin-2 (rabbit monoclonal anti-flotillin 2- Cell Signaling Technology), and ALIX (mouse IgG1 anti-alix-Cell Signaling Technology). Moreover CD20 expression (mouse IgG2a anti-human CD20, Dako) was analyzed. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from DakoCytomation. Blotted proteins were detected and quantified using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) and a bioimaging system (GeneSnap; Syngene). Alternatively, after purification by ultracentrifugation, we realized immunocapture of exosome-enriched EVs on Dynabeads Protein G (Thermofisher) coated with anti-CD20 (mouse IgG2a anti-human CD20, Dako). After incubation and washes, samples were resuspended in 20 μ L of lysis buffer, denatured and separated by SDS-PAGE then transferred to PVDF membrane (Biorad).

Quantification of EV CD20 by ELISA

CD20 levels of purified small EVs from plasma samples (1 ml) were resuspended in ELISA sample buffer and were quantified using CD20/MS4A1 (human) ELISA kit (BioVision) according to the manufacturer's protocol. The limit of detection was 0.156 ng/ml.

A



B

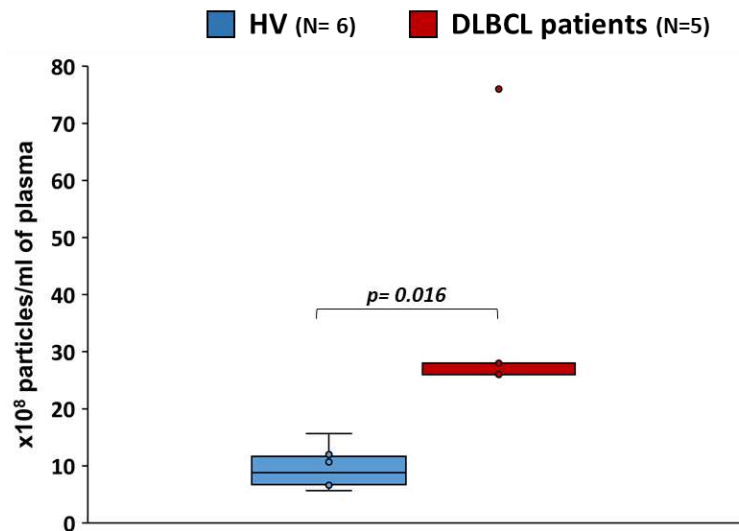


Fig.1 Nanoparticle Tracking Analysis of EVs preparations purified from DLBCL patients and healthy volunteers plasma samples. (A) Size distribution profiles of representative peripheral EVs of DLBCL patients (i.e. P01) and healthy volunteers (HV). Plots represent the mean value (black line) with standard error (red shaded area) of 5 recordings. (B) Concentrations of EVs in HV and DLBCL peripheral exosomes. Data are shown as box plots indicating median, quartiles and extreme values in the two groups.

Analysis of rituximab binding by flow cytometry

Small EVs were incubated overnight at 4°C with dynabeads CD81 or CD63 according to the manufacturer's instructions (Exosome – Human CD81 Isolation, Invitrogen). For analyse binding of rituximab, Alexa488-labeled rituximab antibody (Roche Institut) was used for 30 min at 4°C. After washing, bead-bound EVs were resuspended in 500 µl of PBS and rituximab positive beads were analyzed with a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson) acquiring 10 000 events after gating on light scatter properties (forward vs side: FSC/SSC) to eliminate the aggregates. As negative controls, beads without EVs in presence or not to rituximab-Alexa488 and beads with EVs and Alexa488–conjugated human IgG were also analyzed. The mean fluorescence intensity (MFI) values were used as a semiquantitative measure of the CD20 expression.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a Student's t test. Differences between healthy volunteers and DLBCL patients were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Characterization of EVs

Inclusion of patients are still in progress since July 2019. Our preliminary results (Table 1 and Fig.1A) showed enrichment of small EVs in the plasma EVs samples. Indeed, particle size and modus were in the range of expected values for small EVs, including for exosomes notably for the modus. These morphological features are very similar with the production of DLBCL cell lines that we previously reported (Aitamer et al., submitted). Finally, we showed, for the first time to our knowledge in DLBCL, a significant increase in small EV concentration in blood of patients as compared to healthy volunteers (Table 1 and Fig. 1B).

| | Particule size (nm) | Modus (nm) | Concentration (x10 ⁸ particules/ml of plasma) |
|-------------------------|------------------------|---------------|---|
| HV (N=6) | 136 ± 13 | 96 ± 10 | 9 ± 4 |
| DLBCL patients (N=5) | 145 ± 21 | 113 ± 21 | 34 ± 20 |

Table 1: Morphological characterization and quantification of EV preparations isolated from plasma samples of DLBCL patients as compared to healthy volunteers (HV). Data obtained using nanoparticle tracking analysis technology are expressed as means ± SD.

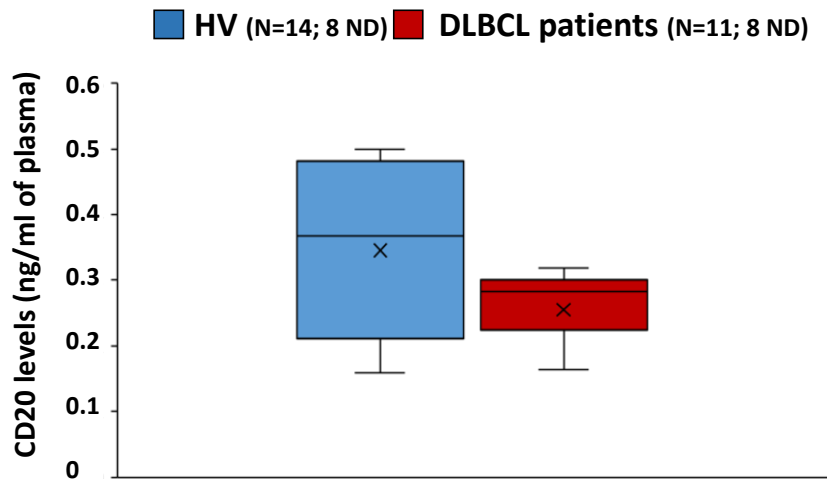


Fig.2 Quantification of CD20 level on small EVs by ELISA. Small EVs were purified from plasma samples (1 mL) of healthy volunteers (HV, N=14) and DLBCL patients (N=11) as described in materials and methods. EVs were resuspended in 200 μ L of sample dilution buffer and quantification was performed in duplicate. Box plots indicating median and quartiles are done for the two groups, and means are indicated by crosses. ND: non detected, limit detection was 0.156 ng/mL.

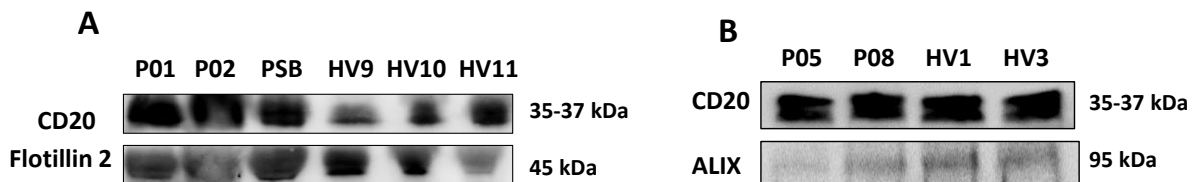


Fig.3 Analysis of CD20 level by western blotting. Small EVs were purified from plasma samples (1 mL) of healthy volunteers (HV) and DLBCL patients (P01, P02, PSB, P05, P08) as described in materials and methods. Western blot bands are shown for analysis of CD20 and exosome-marker proteins (flotillin-2, ALIX) in (A) total exosome lysates and (B) lysates of CD20-immunocaptured exosomes.

Analysis of CD20 expression

Preliminary data obtained by ELISA (Fig. 2) showed no significant difference in CD20 levels of plasma-derived small EV preparations in DLBCL patients (N=11) in comparison with healthy volunteers (N=14). However, of the 11 DLBCL patients 8 had a CD20 level that was under the limit of detection of the ELISA (< 0.156 ng/ml); this was also the case, but with a lesser extend, in healthy volunteers (8 cases among 14 samples) suggesting a lower expression of CD20 in EVs of DLBCL patients. However, this study is still ongoing and results must be confirmed.

We also analyzed CD20 expression in small EV lysates by western blotting (Fig. 3). Our preliminary data showed high CD20 levels in EVs from 1ml plasma of DLBCL patients compared to those of healthy volunteers. However, this strong CD20 expression was associated, in total EV lysates, with a higher flotillin 2 level (Fig. 3A), suggesting an increase in small EV concentration, as we observed by the NTA evaluation of particle concentrations. We have also analyzed CD20 expression in CD20-immunocaptured EVs from plasma samples (Fig. 3B). We observed homogeneous CD20 levels in patients and healthy volunteers, suggesting immunocapture of the same EV numbers. To further evaluate presence of exosomes in our preparations we analyzed ALIX expression. Preliminary results confirm the endosomal origin of at least some EVs in our plasma preparations, and thus exosomes.

Discussion

We have previously reported a comparative analysis of small EVs released by GCB and ABC DLBCL cell lines, and showed *in vitro* and *in vivo* their differential abilities to protect cell from rituximab cytotoxicity (Aitamer et al., submitted). In the present work, we characterized small EVs included exosomes in plasma samples from patients compared to healthy volunteers. No differences were observed for the size distribution and modus, that were expected for small EVs. Moreover, these peripheral EVs of patients are not different in size from those of DLBCL cell lines (Aitamer et al., submitted), emphasizing the interest of these cell lines for depth-study on small EVs. Interestingly, our results showed, for the first time to our knowledge, a significant higher small EV concentration in plasma of DLBCL patients in comparison with healthy volunteers. As these volunteers are age- and sex-matched controls, our data suggest that the highest small EV concentration in plasma of DLBCL patients is related to the lymphoma disease. Indeed, increased number of circulating EVs has been reported in patients with

hematological malignancies as acute myelogenous leukemia (AML), chronic lymphocytic leukemia (CLL) and multiple myeloma (MM) compared to healthy controls; furthermore, EV plasma concentration was associated with more severe disease states in CLL, WM and MM (Szczepanski et al., 2011; Caivano et al., 2015; Yeh et al., 2015; Longjohn et al., 2020).

Morphologic characterization of peripheral small EVs including exosomes was confirmed by western blot identification of several protein markers usually found in these EVs. Furthermore, using different approaches (WB or ELISA), we showed that small EVs derived from plasma of DLBCL patients carry, as expected, the therapeutic targets (i.e. CD20). Analysis of the differences between GCB and ABC patients and between patients and healthy volunteers is still in progress; furthermore, expression of CD20 in EVs will be analyzed in correlation with clinicobiological features of patients. Finally, anti-CD20 binding capacities of small EVs using flow cytometry (i.e. Alexa488 conjugated Roche Ab) on magnetic bead-bound EVs is in progress.

The cellular origin of these plasma small EVs in DLBCL must be confirmed. Indeed, it could be attributed to tumoral but also normal B cell release, as we found CD20 on the EV lysates. However, we can't exclude the presence of CD20 negative dendritic cells-derived exosomes produced during the anti-tumoral immune response.

Accumulating evidences suggest that specific miRNA profiles characterized each tumor, and several recent studies have reported that analysis of microRNAs (miRNAs) from plasma-derived exosomes of patients with DLBCL could provide important informations for disease monitoring and guide therapeutic decision making (Zare et al., 2019; Feng et al., 2019). Interestingly, analysis of RNA from peripheral EVs was proposed for understand the mutational profile of the parental DLBCL tumors (Rutherford et al., 2018). Eventhough preliminary, our data strengthen the suggestion for using small EV total concentration as an initial indicator of tumor burden, which may be of prognostic value particularly as a measure of the response of disease to treatment (Longjohn et al., 2020). Indeed, detecting tumor burden using EVs in peripheral blood could bypass the invasive sampling of biopsy tissues. Furthermore, these new liquid biopsies for DLBCL patients will provide access to potential diagnosis and prognosis biomarkers like genetic informations as well as therapeutic targets, or in our study for CD20 monitoring.

References

- Aung T, Chapuy B, Vogel D, Wenzel D, Oppermann M, Lahmann M, Weinhage T, Menck K, Hupfeld T, Koch R, Trümper L, Wulf GG. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(37):15336-41
- Bentayeb H, Aitamer M, Petit B, Dubanet L, Elderwish S, Désaubry L, de Gramont A, Raymond E, Olivrie A, Abraham J, Jauberteau MO, Troutaud D. Prohibitin (PHB) expression is associated with aggressiveness in DLBCL and flavagline-mediated inhibition of cytoplasmic PHB functions induces anti-tumor effects. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Nov 4;38(1):450.
- Bonavida B. Postulated mechanisms of resistance of B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab treatment regimens: strategies to overcome resistance. *Semin Oncol*. 2014; 41(5):667-677.
- Caivano A, Laurenzana I, De Luca L, La Rocca F, Simeon V, Trino S, D'Auria F, Traficante A, Maietti M, Izzo T, D'Arena G, Mansueto G, Pietrantuono G, Laurenti L, Musto P, Del Vecchio L. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. *Tumour Biol*. 2015 Dec;36(12):9739-52.
- Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011; 117(19):5019–32.
- Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019; 8(7):727.
- Dubanet L, Bentayeb H, Petit B, Olivrie A, Saada S, de la Cruz-Morcillo MA, Lalloué F, Gourin MP, Bordessoule D, Faumont N, Delage-Corre M, Fauchais AL, Jauberteau MO, Troutaud D. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Cancer*. 2015; 113(6):934–44.
- Feng Y, Zhong M, Zeng S, Wang L, Liu P, Xiao X, Liu Y. Exosome-derived miRNAs as predictive biomarkers for diffuse large B-cell lymphoma chemotherapy resistance. *Epigenomics*. 2019; 11(1):35-51.
- Fernandes M, Teixeira AL, Medeiros R. The opportunistic effect of exosomes on Non-Hodgkin Lymphoma microenvironment modulation. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019; 144:102825.

- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004; 103(1):275–82.
- Kharaziha P, Ceder S, Li Q, Panaretakis T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826(1):103–111.
- Longjohn MN, Hudson JBJ, Smith NC, Rise ML, Moorehead PC, Christian SL. Deciphering the messages carried by extracellular vesicles in hematological malignancies. *Blood Rev*. 2020;100734.
- Miyoshi H, Arakawa F, Sato K, Kimura Y, Kiyasu J, Takeuchi M, Yoshida M, Ichikawa A, Ishibashi Y, Nakamura Y, Nakashima S, Niino D, Sugita Y, Ohshima K. Comparison of CD20 expression in B-cell lymphoma between newly diagnosed, untreated cases and those after rituximab treatment. *Cancer Sci*. 2012; 103(8): 1567-73.
- Navarro-Tableros V, Gomez Y, Camussi G, Brizzi MF. Extracellular Vesicles: New Players in Lymphomas. *Int J Mol Sci*. 2018; 20(1):41
- Provencio M, Rodríguez M, Cantos B, Sabín P, Quero C, García-Arroyo FR, Rueda A, Maximiano C, Rodríguez-Abreu D, Sánchez A, Silva J, García V. mRNA in exosomas as a liquid biopsy in non-Hodgkin Lymphoma: a multicentric study by the Spanish Lymphoma Oncology Group. *Oncotarget*. 2017; 8(31):50949-50957.
- Rutherford SC, Fachel AA, Li S, Sawh S, Muley A, Ishii J, Saxena A, Dominguez PM, Caldas Lopes E, Agirre X, Chambwe N, Correa F, Jiang Y, Richards KL, Betel D, Shaknovich R. Extracellular vesicles in DLBCL provide abundant clues to aberrant transcriptional programming and genomic alterations. *Blood*. 2018; 132(7) :e13-e23.
- Szczepanski MJ, Szajnik M, Welsh A, Whiteside TL, Boyiadzis M. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1. *Haematologica*. 2011; 96(9):1302-9.
- Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015; 125(1):22-32.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006; Chapter 3:Unit 3.22.

- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018; 7(1):1535750.
- Yeh YY, Ozer HG, Lehman AM, Maddocks K, Yu L, Johnson AJ, Byrd JC. Characterization of CLL exosomes reveals a distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR signaling. *Blood*. 2015; 125(21):3297-305.
- Yu S, Cao H, Shen B, Feng J. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. *Oncotarget*. 2015; 6(35):37151–37168.
- Zare N, Eskandari N, Mehrzad V, Javanmard SH. The expression level of hsa-miR-146a-5p in plasma-derived exosomes of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Res Med Sci*. 2019; 24:10.

CONFIDENTIAL

Discussion – Conclusion – Perspectives

L'ensemble des travaux que nous avons effectués ont porté sur l'étude de la production de « small EVs » dont les exosomes dans un modèle de lymphome B agressif, le DLBCL. Nous avons abordé cette étude sous 3 axes : 1) Un axe portant sur l'étude de la **production des vésicules extracellulaires** par des lignées cellulaires représentatives de différents sous-types de DLBCL, GCB (SUDHL4 et SUDHL6) versus ABC (OCI-LY3, OCI-LY10 et U2932) et leur rôle **dans l'échappement** des cellules B tumorales vis à vis de l'immunothérapie anti-CD20. 2) un axe sur l'effet de l'activation de TrkB sur l'expression du CD20 au niveau cellulaire et des « small EVs », toujours en lien avec l'échappement aux rituximab et enfin 3) un axe, portant sur la signification clinique des « small EVs » chez les **patients atteints de DLBCL**. Cette dernière partie est au cœur du projet ExoReBly en collaboration avec l'Institut Roche et le service d'Hématologie clinique du CHU de Limoges. Elle a pour but de rechercher d'éventuelles corrélations entre l'expression du CD20 sur les « small EVs » dont les exosomes circulants (purifiés à partir du plasma) et celle retrouvée dans les biopsies tumorales, et/ou les paramètres clinico-biologiques des patients.

1. Production de « small EVs » par des lignées cellulaires de DLBCL, GCB versus ABC et expression du CD20.

L'isolement des « small EVs » dont les exosomes est essentiel pour comprendre leur structure, composition et fonctions ainsi que leur utilisation dans le domaine biomédical. Les surnageants de culture cellulaire contiennent plusieurs types de vésicules membranaires (corps apoptotiques liés à une apoptose basale bien que faible toujours présente, microvésicules, exosomes); par conséquent, avant d'effectuer une analyse fonctionnelle, il est essentiel de s'assurer que les vésicules purifiées sont des « small EVs » et si possible des exosomes, et de l'absence d'autres particules ou protéines contaminantes. Ainsi, la méthode choisie pour cette purification est déterminante pour l'analyse des résultats.

La purification et la caractérisation des vésicules extracellulaires (EVs) peut s'effectuer de différentes manières. La plupart des protocoles utilisés pour isoler les exosomes sont conçus pour isoler les petites vésicules et éliminer les plus grosses. Parmi les techniques utilisées pour faciliter l'isolement des exosomes nous retrouvons l'ultracentrifugation dont il existe deux modalités : l'ultracentrifugation différentielle et l'ultracentrifugation de gradient de densité, basée sur la séparation de particules en fonction de leur densité, le plus souvent dans un gradient de sucrose. L'ultracentrifugation différentielle est la méthode la plus couramment utilisée pour isoler les petites EVs à partir de fluides biologiques ou de milieux de culture cellulaire ; elle est

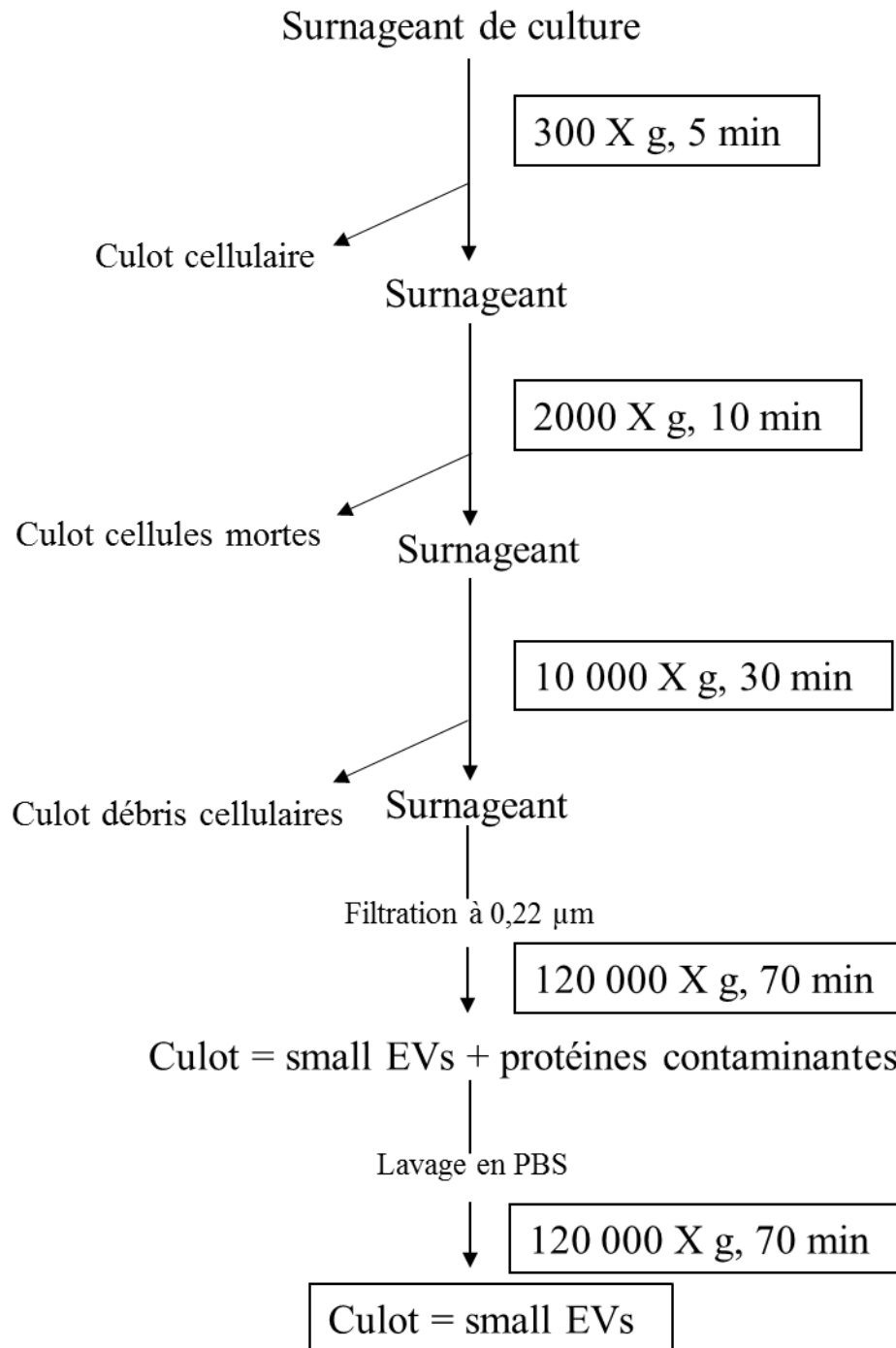


Figure 32 : Protocole de purification des « small EVs » adapté de (Théry et al., 2006).

aussi plus adaptée à des volumes d'échantillons assez importants. C'est pourquoi nous avons choisi de l'utiliser pour purifier les « small EVs » des surnageants de culture de DLBCL, et nous l'avons adaptée en modifiant la vitesse de centrifugation de la dernière étape de purification du protocole de Clotilde Théry (*figure 32*). A chaque étape de centrifugation, le culot est jeté et le surnageant est utilisé pour l'étape de purification suivante. Les premières étapes consistent à éliminer les cellules mortes et les gros débris cellulaires par centrifugations successives à des vitesses de 2 000g et 10 000g respectivement. A 2 000g un grand nombre des grandes EVs et corps apoptotiques se retrouvent dans le culot. La centrifugation à 10 000g permet de sédimenter dans le culot une grande partie des microvésicules, laissant dans le surnageant un mélange surtout composé de petites et moyennes vésicules. Avant d'effectuer la centrifugation permettant de sédimenter les exosomes, il est nécessaire de filtrer le surnageant avec un filtre de 0.22µm afin d'éliminer d'éventuelles grandes EVs et tous les débris cellulaires ou les fragments membranaires restants. Le surnageant final est ensuite soumis à une ultracentrifugation à 120 000 g pendant 70 minutes, générant un culot qui normalement est constitué en très grande majorité des EVs les plus petites (<150 nm) et donc les exosomes (Tkach et al., 2017). Le culot de « small EVs » est lavé en PBS afin d'éliminer les protéines contaminantes restantes, puis de nouveau ultracentrifugé pendant 70 min à 120 000 g. Enfin, le culot de « small EVs » est resuspendu dans un tampon (PBS, tampon de lyse etc) en adéquation avec l'approche de caractérisation utilisée.

Pour les échantillons dont la viscosité est élevée, comme les échantillons plasmatiques, une vitesse et une durée de centrifugation plus élevées sont nécessaires. Par conséquent, l'efficacité de l'isolement par ultracentrifugation différentielle des EVs dépend également de plusieurs paramètres qui peuvent influencer le type, la quantité et la qualité des EVs. De plus, la présence d'autres nanoparticules ou d'autres molécules (par exemple des lipoprotéines, des agrégats de protéines, des protéines solubles) ou des protéines qui se lient de manière non spécifique aux exosomes, sont souvent retrouvées dans les culots d'EVs et peuvent interférer avec une analyse ultérieure par spectrométrie de masse ou même par western blot. Pour remédier à cela, l'utilisation de gradients de densité, comme le gradient de sucrose, ou le gradient d'iodixanol peut être appliquée au protocole d'ultracentrifugation différentielle pour séparer les gros agrégats protéiques et autres nanoparticules des exosomes. En effet, même si la densité des microvésicules reste imprécise, la densité des exosomes est d'environ 1,08 à 1,19 g/mL, ce qui permet de concevoir ces stratégies supplémentaires basées sur la densité pour augmenter la pureté des exosomes.

D'autres outils d'isolement, qui conviennent parfois davantage à une utilisation avec de petits volumes d'échantillons, ont été développés comme : l'ultrafiltration, la chromatographie d'exclusion de taille, la précipitation à base de polymère ou bien la capture sur des billes magnétiques couplées à des anticorps (Gurunathan et al., 2019). En effet cette dernière technique pourrait nous permettre également de confirmer l'enrichissement en exosomes des échantillons purifiés en associant l'immunocapture au western blot par exemple. Ainsi, une première étape pourrait consister à réaliser une immunocapture des EVs sur des billes magnétiques couplées avec des anticorps dirigés contre un des marqueurs connus pour être présents à la surface des exosomes, comme par exemple CD63, CD81 ou CD9. Puis une 2^e étape pourrait consister en une lyse des exosomes ainsi capturés suivie d'un western blot pour révéler d'autres marqueurs contenus dans les exosomes comme TSG101 et/ou ALIX. Cela permettrait de montrer l'expression simultanée de plusieurs marqueurs des exosomes (membranaires et intra-vésiculaires reflétant leur origine endosomale) sur la même population d'EVs. De même, une analyse par cytométrie en flux suite à la première étape, pour révéler d'autres marqueurs membranaires des EVs, permettrait par le pourcentage d'EVs positives pour chacun de ces marqueurs d'avoir en plus une évaluation de l'hétérogénéité de l'échantillon purifié.

Ces différentes techniques peuvent aussi convenir pour des échantillons cliniques comme des sérums ou plasmas de patients. Nous avons eu l'occasion de tester des colonnes de chromatographie d'exclusion de taille (SEC) pour séparer/isoler les vésicules extracellulaires à partir de surnageants de culture ou de plasmas. Le principe de la SEC est de piéger les molécules de plus petite taille au sein des pores de la phase stationnaire. Les particules de plus grande taille sont éluées en premier lieu, leur taille étant trop importante pour pénétrer les pores du gel de sepharose. En revanche, les plus petites particules circulent à travers les pores du gel, et présentent des temps de rétention plus longs, ainsi, elles sont éluées avec un temps de latence proportionnel à leur taille. Les vésicules extracellulaires sont donc éluées avant les protéines libres. Cependant, après avoir analysé les échantillons récupérés, les profils de tailles obtenus présentaient une plus grande hétérogénéité dans les populations d'EVs purifiées, contrairement à l'ultracentrifugation différentielle qui permet d'avoir un culot de « small EVs » plus homogène en terme de taille. C'est pourquoi nous sommes restés sur cette technique de purification pour nos expérimentations.

Il est ensuite nécessaire **de caractériser les vésicules extracellulaires** préalablement isolées afin de s'assurer de la pureté de la population de « small EVs » obtenue. Pour cela,

diverses méthodes de caractérisation des exosomes ont été développées comprenant des méthodes biophysiques, des méthodes d'analyse moléculaire (protéique notamment) et microfluidiques. Les méthodes biophysiques sont utilisées pour caractériser la gamme de taille des vésicules. Cette approche consiste à suivre d'un point de vue optique les particules, comme la méthode par Nanoparticle tracking Analysis (NTA), qui peut mesurer la distribution de taille des vésicules extracellulaires allant de 10 nm à 2 µm. Cette méthode permet le suivi du mouvement brownien des nanoparticules dans une suspension liquide (Dragovic et al., 2011), en suivant chaque particule grâce à l'analyse d'image (Necochea-Campion et al., 2018). Cette technique permet donc d'obtenir la taille moyenne et la distribution des tailles ainsi que la concentration des particules. Un des avantages de l'utilisation de la NTA est que les échantillons peuvent être récupérés sous leur forme native après la réalisation des mesures, ce qui rend cette technique encore plus attractive (Szatanek et al., 2017). Au cours de notre thèse, grâce au financement que nous avons obtenu par la région Nouvelle Aquitaine et l'Institut Roche, nous avons pu nous équiper du Nanosight NS300 (Malvern). Cet équipement nous a permis, par la mesure notamment de la taille de la population majoritaire (« modus ») des EVs de nos préparations (entre 96 et 116 nm pour les EVs produites par les lignées de DLBCL et celles présentes dans le plasma des patients), de confirmer l'enrichissement en « small EVs » dans la gamme de taille attendue aussi pour des exosomes. En amont de cette caractérisation biophysique, notre première démarche avait été de réaliser une identification par microscopie électronique à transmission (MET, collaboration avec le CHU de Poitiers) ; l'analyse par MET avait montré à la fois l'intégrité des EVs présentes dans nos échantillons et leur taille compatible avec celle des exosomes pour la plupart. La caractérisation des « small EVs » de nos préparations a été confirmée ensuite par l'utilisation de méthodes d'analyse et/ou de quantification protéique (Western blot, ELISA, Cytométrie en flux après immunocapture). Pour normaliser la quantité d'EVs présentes dans les différents échantillons obtenus à partir des culots d'ultracentrifugation certaines équipes utilisent la quantification protéique totale des lysats de ces culots d'EVs, à l'aide d'un dosage colorimétrique habituellement utilisé pour doser des échantillons protéiques ; cependant, ce dosage peut être biaisé par la présence de protéines contaminantes comme l'albumine du sérum de veau fœtal utilisé dans les milieux de culture cellulaire ou d'autres protéines abondantes provenant de liquides biologiques. De plus, comme les préparations ne sont jamais pures en une catégorie de petites vésicules comme les exosomes, mais contiennent probablement un mélange de petites et moyennes EVs, cette méthode de normalisation n'est pas optimale. Face à ces limites, d'autres équipes ont fait le choix comme nous de normaliser leurs échantillons pour les études phénotypiques et fonctionnelles par un

même nombre de cellules produisant ces EVs, et donc un volume donné de milieu de culture (Tkach et al., 2017).

L'analyse par western blot des lysats de nos préparations d'EVs a permis de révéler plusieurs marqueurs des « small EVs », dont la taille avait été précédemment confirmée par l'analyse par la technologie NTA, comme le CD81 et la flotilline2. De plus, nous avons identifié aussi la présence de protéines plus spécifiques des exosomes, comme le CD63 ainsi qu'un marqueur de leur origine endosomale avec la présence de la protéine ALIX dans les EVs plasmatiques des patients, et plus récemment dans nos échantillons de « small EVs » issus des surnageants de culture des lignées cellulaires de DLBCL (données en cours de confirmation). Ainsi nous pouvons dire que notre étude a bien porté sur les « small EVs » avec sans doute des exosomes au sein de nos préparations, même si nous n'avons pas analysé l'expression simultanée de plusieurs marqueurs des exosomes au sein des mêmes EVs. Cette démarche est aussi nécessaire et sera mise en œuvre pour caractériser plus finement la population des « small EVs » purifiées à partir du plasma des patients.

Nous avons également pu mettre en évidence la présence du CD20 dans nos échantillons. Afin de préciser et confirmer cette expression, notamment à la surface des « small EVs », nous avons réalisé un test ELISA, et débuté une analyse par cytométrie de flux. Les cytomètres en flux conventionnels peuvent mesurer des particules supérieures à 300 nm, mais ne sont pas capables de détecter des particules plus petites. Par conséquent, ils ne permettent pas la détection directe des « small EVs », c'est pourquoi il est nécessaire de faire une immunocapture des exosomes sur des billes de sépharose ou des billes magnétiques détectables par le cytomètre.

Dans notre étude nous avons fait des essais d'immunocapture sur des billes magnétiques couplées avec un anticorps anti-CD81, puis nous avons marqué les « small EVs » avec un anti-CD20 couplé à un fluorochrome. Cette technique nous apporte des informations concernant le pourcentage de positivité des billes marquées ainsi que la moyenne de fluorescence émise par ces billes. Les premiers essais effectués nous permettent de valider la technique et de confirmer la présence du CD20 à la surface des « small EVs », ainsi que leur capacité à fixer des anti-CD20 thérapeutiques (rituximab conjugué à l'Alexa Fluor 488, fourni par notre partenaire industriel). La mise au point de cette technique doit cependant être finalisée pour notamment s'assurer des conditions de saturation des billes par les « small EVs », afin de pouvoir comparer cette capture en fonction des différentes lignées et par les « small EVs » des patients versus ceux des volontaires sains.

Les exosomes sont de plus en plus étudiés pour leur rôle dans le développement et la progression de certaines tumeurs malignes et notamment dans le cas du DLBCL (Fernandes et al., 2019). Dans ce contexte, l'originalité de nos travaux concerne l'aspect comparatif de cette analyse de la production de « small EVs » par des lignées cellulaires de type GCB versus ABC, en lien avec leur niveau de CD20 vésiculaire et l'échappement à l'immunothérapie. Nos résultats indiquent que la capacité de production des « small EVs » n'est pas corrélée avec le sous-type des lignées de DLBCL, bien qu'il faudrait sans doute augmenter encore le nombre de lignées cellulaires pour le confirmer définitivement. L'étude que nous avons commencée à réaliser sur des patients atteints de DLBCL devrait permettre de le confirmer aussi. Ainsi, dans le cas des lignées, les productions les plus importantes de « small EVs » sont retrouvées pour la lignée SUDHL6 de type GCB qui est sensible au rituximab et la lignée OCI-LY3 de type ABC connue pour sa faible sensibilité au rituximab. En revanche, nous retrouvons une variabilité d'expression du CD20 au niveau des « small EVs » produits par les lignées cellulaires de DLBCL qui semble refléter, comme on pouvait s'y attendre, l'expression membranaire du CD20 des cellules parentales ; de même nous n'observons pas de différence en fonction du sous-type de DLBCL. En effet, la lignée SUDHL6 qui présente la plus forte expression membranaire en CD20 est celle qui a aussi le niveau le plus fort de CD20 sur ses « small EVs » ; la lignée U2932 qui exprime le moins le CD20 à la surface de ses cellules est aussi la lignée qui a le moins de CD20 au niveau des EVs. Pour approfondir la relation entre le niveau du CD20 membranaire/cellulaire et celui des « small EVs », il serait intéressant de faire varier cette expression au niveau des cellules et d'observer les conséquences au niveau des EVs. Comme nous l'avons indiqué dans notre introduction bibliographique, plusieurs travaux montrent qu'il existe une régulation épigénétique de l'expression du CD20 qui pourrait être aussi impliquée dans la baisse induite par les anti-CD20 (Damm et al., 2015; Miyoshi et al., 2012; Shimizu et al., 2010). Ainsi, nous avons initié une étude avec un inhibiteur des HDAC, l'acide valproïque (VPA), dans le but d'augmenter l'expression du CD20 à la surface des cellules B tumorales et d'analyser les conséquences sur le niveau du CD20 présent sur les « small EVs ». Les résultats très préliminaires que nous avons semblent indiquer une augmentation du taux de transcrits du CD20 au niveau cellulaire, ainsi qu'une augmentation de l'expression du CD20 dans les « small EVs ». Si cette augmentation se confirme cela pourrait, comme pour les inhibiteurs de kinases de la signalisation du BCR, limiter l'utilisation en clinique des HDACi puisque déterminant, en même temps qu'une augmentation du CD20 cellulaire, celle au niveau des EVs ce qui pourrait diminuer la sensibilisation souhaitée aux anti-CD20.

Peu de choses sont connues sur le trafic membranaire et cellulaire du CD20, en dehors de son endocytose lors de la liaison aux anti-CD20, ou en lien avec l'activation du BCR. Le CD20 est présent à la surface cellulaire sous forme d'homodimères et d'homotétramères associés physiquement à d'autres protéines membranaires et transmembranaires, comme le CD40, MHCII, BCR et la CBP (C-terminal src kinase-binding protein) contribuant à la régulation de la transduction du signal issu du BCR (Pavlasova and Mraz, 2020). De plus, des expériences de transfert d'énergie indiquent que le CD20 est à proximité de tétraspanines telles que CD53, CD81 et CD82, formant des complexes supramoléculaires (Szöllósi et al., 1996). Or, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction bibliographique, les vésicules extracellulaires sont hautement enrichies en tétraspanines qui interagissent avec une grande variété de protéines de signalisation transmembranaires et cytosoliques ; les tétraspanines ont aussi été largement utilisées comme marqueurs exosomaux, même si elles ne suffisent pas à leur caractérisation spécifique (Andreu and Yáñez-Mó, 2014). Le lien structural entre la tétraspanine CD81 et le CD20 a été confirmé dans des modèles murins de lymphoblastes déficients en CD81. Ces cellules produisent des exosomes sans CD81 qui présentent aussi une déficience en CD20, sans que cela n'affecte la production des exosomes (Perez-Hernandez et al., 2013). De même, l'expression et le trafic de CD19 vers la membrane plasmique sont dépendants de l'expression de CD81, formant finalement à la membrane un complexe de signalisation co-récepteur du BCR, CD19-CD21-CD81 (Andreu and Yáñez-Mó, 2014). Ainsi, nous pouvons imaginer que le CD20 associé à certaines tétraspanines au niveau de la membrane cellulaire se retrouve après l'endocytose de celle-ci, internalisé, puis engagé dans la voie endosomale avec elles, pour au final être libéré dans le milieu extracellulaire au sein d'exosomes. Notre hypothèse s'appuie aussi sur le fait qu'il est admis maintenant que certaines tétraspanines auraient un rôle dans la sélection des « cargos » des EVs (Andreu and Yáñez-Mó, 2014). Finalement, et de manière intéressante, une étude a montré qu'un membre de la famille des gènes *MS4A* (*membrane spanning A4*), codant pour une protéine transmembranaire homologue du CD20 appelée MS4A4, facilite le trafic du récepteur tyrosine kinase KIT. Plus précisément, MS4A4 dirige le trafic de KIT vers les endosomes précoces et de recyclage pour sa ré expression membranaire, plutôt que de l'amener à sa dégradation par la fusion avec les lysosomes. Ces données révèlent une nouvelle fonction des protéines de la famille *MS4A* dans la régulation du trafic et de la signalisation de certains récepteurs (Cruse et al., 2015). Ainsi, nous pouvons nous demander si cette nouvelle fonction pourrait aussi s'appliquer au gène *MS4A1* codant pour le CD20.

En conclusion, par ces premiers travaux nous mettons en lien l'expression du CD20 présent au sein des « small EVs » avec le niveau membranaire de la cellule parentale, ce qui pourrait

permettre d'envisager les « small EVs » dont les exosomes comme des biomarqueurs de l'expression du CD20 des cellules de DLBCL.

2. Lien entre le niveau d'expression du CD20 dans les EVs et la résistance des cellules B tumorales aux anti-CD20.

En plus d'être un indicateur de l'expression protéique parentale comme nous venons de le suggérer pour le CD20, ou d'alterations génétiques avec des profils mutationnels comparables aux cellules parentales (Rutherford et al., 2018), les « small EVs » constituent des « éponges absorbantes » capturant des acteurs moléculaires impliqués dans l'efficacité des thérapies. Nous avons détaillé ce point dans l'introduction bibliographique, mais nous pensons ici plus spécifiquement aux anticorps thérapeutiques anti-CD20 qui se fixent sur le CD20 des « small EVs » constituant des « récepteurs leurres ». Il en est de même pour les facteurs du complément ou des régulateurs de cette cascade enzymatique (Aung et al., 2011). Cependant, il restait à démontrer cette interférence thérapeutique sur un modèle *in vivo*.

Nous avons par la suite concentré notre étude sur la teneur en CD20 au sein des « small EVs » en relation avec la capacité des EVs à protéger les cellules de DLBCL de la cytotoxicité du rituximab. Nous avons choisi d'étudier cette cytotoxicité dans le cadre de l'activation du complément (CDC). En effet, il a été démontré que l'activité CDC du rituximab dépend du niveau d'expression du CD20 (Tomita, 2016). Nous confirmons *in vitro* cet échappement à l'effet du rituximab pour les cellules DLBCL dites sensibles (SUDHL4, SUDHL6 et OCI-LY10) qui devenaient plus résistantes à la CDC médié par le rituximab par rapport au rituximab seul. De plus, les « small EVs » issus de la lignée SUDHL6, qui rappelons le, présentent les taux les plus importants de CD20 vésiculaire, permettent un échappement total à l'effet de la CDC des cellules autologues. Nous avons également montré que les « small EVs » hétérologues issus de lignée résistante OCI-LY3, qui produit des « small EVs » en forte concentration exprimant des niveaux élevés de CD20, permettent un meilleur échappement à la CDC des cellules SUDHL4 que les « small EVs » autologues. De façon intéressante et pour la première fois à notre connaissance, nous confirmons ces résultats *in vitro* dans un modèle *in vivo* de xénogreffe tumorale de SUDHL4 réalisée sur des souris immunodéficientes (CB17.SCID), déficientes en lymphocytes T et B. Plus précisément, nous retrouvons la capacité des « small EVs » hétérologues produits par les cellules OCI-LY3 à augmenter de façon très significative la protection déjà significative exercée par les « small EVs » autologues, sur la croissance tumorale. *In vivo* cette protection est totale car nous n'observons plus de différence significative avec la croissance tumorale des souris contrôles. Cette reproduction des données obtenues *in*

in vitro nous permet d'affirmer que cette protection est en lien direct avec une propriété intrinsèque des « small EVs », et notamment leur niveau d'expression du CD20. En perspective, et pour prouver définitivement le rôle du CD20 présent au niveau des « small EVs », il faudrait inhiber l'expression du CD20 des cellules SUDHL4 par exemple par siRNA ou shRNA et vérifier leur négativité aussi au niveau des EVs. Puis, il faudrait réaliser des xénogreffes avec les lignées parentales CD20 positives, et traiter les souris avec les « small EVs » de la lignée CD20 négative en présence ou non du rituximab.

3. Résistance aux anti-CD20 : implication de la voie BDNF/TrkB sur l'expression du CD20 et la sécrétion des « small EVs »

L'expression et l'implication des neurotrophines et de leurs récepteurs dans la tumorigenèse et la chimiorésistance ont été démontrées dans plusieurs tumeurs non neuronales. En particulier, des études *in vitro* et *in vivo*, effectuées par l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse, ont permis de mettre en évidence une signalisation autocrine de survie BDNF/TrkB/p75^{NTR} dans les DLBCL et qu'elle pouvait interférer avec les effets cytotoxiques du rituximab. De plus, l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trk déterminait *in vivo*, sur un modèle murin de xénogreffe tumorale de DLBCL, une diminution de l'effet cytotoxique du rituximab, aboutissant à un échappement des tumeurs (Bellanger et al., 2011; Dubanet et al., 2015). Afin d'aller plus loin dans la compréhension des effets de l'activation de TrkB sur les mécanismes de résistances au rituximab, nous avons utilisé un agoniste du TrkB, le 7,8-dihydroxyflavone (DHF), qui se fixe sur le même site de liaison que le ligand endogène physiologique, BDNF (Jang et al., 2010). Alternativement, nous avons aussi utilisé du BDNF exogène. De plus, l'activation des voies de signalisation de TrkB à savoir PI3K/AKT et ERK1/2 sont aussi impliquées dans la régulation de la transcription du gène *MS4A1* codant pour le CD20 (Winiarska et al., 2014). Nous avons mené notre étude au niveau cellulaire et au niveau des « small EVs » sécrétées par les cellules de DLBCL. L'activation du TrkB semble jouer un rôle dans la sécrétion des EVs, puisque nous avons retrouvé une tendance à l'augmentation de la concentration des EVs pour les lignées SUDHL4 et OCILY3 traitées par rapport aux contrôles ; de la même façon nous retrouvons une augmentation de la quantité de CD20 en western blot dans les lysats de « small EVs » totaux pour les différentes lignées cellulaires de DLBCL. En revanche, aucune modification de l'expression du CD20 au niveau cellulaire n'a été observée que ce soit au niveau protéique ou au niveau des transcrits du gène *MS4A1*. Ces résultats laissent donc penser que la signalisation de TrkB pourrait avoir un rôle dans le trafic vésiculaire et serait impliquée dans la libération de vésicules extracellulaires dans le milieu environnant. De façon

intéressante il a été montré, dans les neurones, que la signalisation BDNF/TrkB.FL (full length)/p75^{NTR} induisait une internalisation et une accumulation du récepteur p75^{NTR}, qui avait échappé à la voie lysosomale, dans des corps multivésiculaires (MVB) positifs pour CD63 pour la libération d'exosomes (Escudero et al., 2014; Ishii et al., 2019). Par conséquent nous pouvons émettre l'hypothèse que la signalisation BDNF/TrkB.FL/p75^{NTR}, préalablement identifiée dans les cellules de DLBCL (Dubanet et al., 2015), peut augmenter l'internalisation et le trafic post-endocytaire des récepteurs membranaires comme p75^{NTR} favorisant la formation de corps multivésiculaires spécialisés pour la libération d'exosomes. Ainsi, le CD20 pourrait se retrouver alors internalisé et libéré de la même manière que le récepteur p75^{NTR} au sein « small EVs » dont les exosomes. Cette hypothèse reste à démontrer, notamment en recherchant la présence de p75^{NTR} dans les « small EVs » suite au traitement des cellules de lignées de DLBCL par le DHF ou le BDNF. Finalement nos résultats *in vitro* et *in vivo* (xénogreffe tumorale de SUDHL4 dans des souris SCID) montrent que la forte expression du CD20 dans les « small EVs » issues de cellules SUDHL4 traitées au DHF est associée à un échappement significatif des cellules tumorales aux effets cytotoxiques du rituximab. Cette protection est même significativement supérieure à celle obtenue avec les « small EVs » issues de cultures contrôles. En perspective, comme dit précédemment pour les « small EVs » contrôles, il serait intéressant d'utiliser des « small EVs » autologues CD20 négatifs, mais issus de cultures traitées au DHF ou BDNF, pour confirmer le rôle spécifique des taux élevés de CD20 dans cette protection. Plus globalement, pour évaluer le rôle des « small EVs » dont les exosomes, il serait intéressant d'inhiber par shRNA la synthèse des EVs, comme cela a déjà été réalisé sur des lignées cellulaires de DLBCL (Aung et al., 2011). En effet, dans cette étude, les auteurs ont inhibé à l'aide de shRNA la synthèse du transporteur ABCA3 (ATP-binding cassette (ABC) transporter A3) impliqué dans l'étape de formation des MVB, lors du processus de production des exosomes dans les cellules. Ce travail a notamment porté sur la lignée SUDHL4 ; on pourrait envisager de greffer les cellules ayant perdu leur capacité à produire des exosomes sur des souris SCID, et comparer leur croissance *in vivo* et leur résistance au rituximab en comparaison aux souris contrôles, greffées avec des cellules SUDHL4 compétentes pour cette production.

4. Signification clinique des « small EVs » dont les exosomes chez les patients atteints de DLBCL

A partir de juillet 2019, suite à l'autorisation du démarrage de la procédure d'inclusion des patients dans le cadre du projet ExoReBly, nous avons débuté une analyse des EVs circulants (plasmatiques) chez des patients atteints de DLBCL. Notre population d'EVs contrôles

correspond aux EVs plasmatiques issus de volontaires sains ; ces derniers ont été recrutés par le Centre de la Recherche et de l'Innovation du CHU de Limoges, et sont caractérisés par une tranche d'âge et un ratio hommes/femmes correspondants à ceux des cohortes habituelles de patients atteints de DLBCL. La confirmation de la présence de « small EVs » dans nos échantillons a été validée sur le plan morphologique et par la présence de marqueurs protéiques que l'on retrouve aussi bien dans les « small EVs » que dans les exosomes (Flotilline 2 et ALIX) dont ceux issus de cellules B (CD20). Les premiers résultats portant sur la caractérisation des échantillons de plasma enrichis en « small EVs », provenant de patients par rapport à des volontaires sains, n'ont montré aucune différence au niveau la distribution de taille et de la taille des EVs majoritaires des échantillons (« modus »). De plus, ils sont très comparables à ceux que l'on avait caractérisés pour les lignées cellulaires de DLBCL. En revanche, l'analyse quantitative des échantillons a révélé, pour la première fois à notre connaissance dans les DLBCL, que la concentration en « small EVs » est significativement plus élevée dans le plasma des patients atteints de DLBCL par rapport aux volontaires sains. Bien qu'ayant identifié la présence du CD20 dans les lysats des « small EVs », par western blot ou par ELISA, nous ne pouvons affirmer que la totalité des EVs récupérés proviennent des cellules tumorales de DLBCL. Les EVs sont sécrétées par une grande majorité de cellules et notamment par des lymphocytes B normaux. De plus, nous n'écartons pas la possibilité de purifier des « small EVs » provenant de cellules CD20 négatives, comme les cellules dendritiques (DC) notamment en lien avec l'activation chronique du système immunitaire des patients dans la lutte anti-tumorale. En perspective, afin de préciser l'origine de ces « small EVs », il faudrait rechercher (Western blot, cytométrie en flux ou ELISA) l'expression de marqueurs spécifiques aux cellules B tumorales, pas ou peu présents sur les cellules B normales naïves (comme CD27) ; de même l'origine dendritique de ces « small EVs » pourrait être évaluée par l'analyse de l'expression par exemple du CD11c, et/ou la tétraspanine CD9 que l'on ne retrouve pas sur les « small EVs » de nos lignées de DLBCL. Nous avons démarré la mise au point du protocole qui va permettre l'analyse par cytométrie en flux de la capacité des « small EVs » périphériques de patients, dont les exosomes, de lier des anti-CD20 thérapeutiques (rituximab-Alexa488 fourni par notre partenaire industriel, le groupe Roche) après immunocapture sur des billes magnétiques. L'étude comparative de cette expression du CD20 présent au sein de ces « small EVs », entre les patients GCB et ABC ainsi qu'avec les volontaires sains, et la présence d'éventuelles corrélations avec des caractéristiques clinico-biologiques ne pourra se faire que lorsqu'on aura analysé suffisamment de patients. De même, la réalisation des courbes de survie en fonction du

niveau d'expression du CD20 des « small EVs » sera possible uniquement en toute fin d'étude, une fois tous les patients inclus.

En conclusion, l'ensemble de notre travail s'est inscrit dans la caractérisation des productions de « small EVs » dont les exosomes en fonction des 2 sous-types principaux de DLBCL en lien avec l'échappement aux anti-CD20, mais il avait aussi pour objectif d'aborder leur rôle en clinique chez les patients atteints de ce lymphome. Nos travaux ont de plus concerné les processus de régulation de l'expression du CD20 cellulaire et au sein de ces EVs (via l'axe BDNF/TrkB) qui sont sans doute très complexes et en partie liés à l'hétérogénéité des DLBCL. Par les perspectives qu'il ouvre et la finalisation des analyses sur les patients, nous espérons que ce travail permettra de répondre à la question de la signification clinique des « small EVs » CD20 positifs dans les DLBCL ; cette réponse pourrait alors rendre possible l'utilisation de ces EVs circulantes comme des « biopsies liquides » dans le suivi des malades, apportant notamment des informations indirectes sur le phénotype CD20 des cellules tumorales des malades, utiles dans l'orientation thérapeutique.

Références bibliographiques

- Abd Elmageed, Z.Y., Yang, Y., Thomas, R., Ranjan, M., Mondal, D., Moroz, K., Fang, Z., Rezk, B.M., Moparty, K., Sikka, S.C., Sartor, O., Abdel-Mageed, A.B., 2014. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 983–997. <https://doi.org/10.1002/stem.1619>
- Abels, E.R., Breakefield, X.O., 2016. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M.J., Krantz, B.A., Leppla, S.H., van der Goot, F.G., 2013. Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell Rep.* 5, 986–996. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.019>
- Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P.A., Scheynius, A., Gabrielsson, S., 2007. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 1969–1978. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1969>
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein, D., Brown, P.O., Staudt, L.M., 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503–511. <https://doi.org/10.1038/35000501>
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., Rak, J., 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 619–624. <https://doi.org/10.1038/ncb1725>
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., Wood, M.J.A., 2011. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 29, 341–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
- Alvaro-Naranjo, T., Jaén-Martínez, J., Gumá-Padró, J., Bosch-Príncipe, R., Salvadó-Usach, M.T., 2003. CD20-negative DLBCL transformation after rituximab treatment in follicular lymphoma: a new case report and review of the literature. *Ann. Hematol.* 82, 585–588. <https://doi.org/10.1007/s00277-003-0694-1>
- Amatu, A., Sartore-Bianchi, A., Siena, S., 2016. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* 1, e000023. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2015-000023>
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G., Fais, S., 2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J. Exp. Med.* 195, 1303–1316. <https://doi.org/10.1084/jem.20011624>
- Andreska, T., Lüningschrör, P., Sendtner, M., 2020. Regulation of TrkB cell surface expression—a mechanism for modulation of neuronal responsiveness to brain-derived neurotrophic factor. *Cell Tissue Res.* 382, 5–14. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03224-7>

- Andreu, Z., Yáñez-Mó, M., 2014. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.* 5, 442. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>
- Arévalo, J.C., Wu, S.H., 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 1523–1537. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6010-1>
- Arruga, F., Vaisitti, T., Deaglio, S., 2018. The NOTCH Pathway and Its Mutations in Mature B Cell Malignancies. *Front. Oncol.* 8, 550. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00550>
- Asea, A., Jean-Pierre, C., Kaur, P., Rao, P., Linhares, I.M., Skupski, D., Witkin, S.S., 2008. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J. Reprod. Immunol.* 79, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2008.06.001>
- Aukema, S.M., Kreuz, M., Kohler, C.W., Rosolowski, M., Hasenclever, D., Hummel, M., Küppers, R., Lenze, D., Ott, G., Pott, C., Richter, J., Rosenwald, A., Szczepanowski, M., Schwaenen, C., Stein, H., Trautmann, H., Wessendorf, S., Trümper, L., Loeffler, M., Spang, R., Kluin, P.M., Klapper, W., Siebert, R., Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project, 2014. Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica* 99, 726–735. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.091827>
- Aung, T., Chapuy, B., Vogel, D., Wenzel, D., Oppermann, M., Lahmann, M., Weinlage, T., Menck, K., Hupfeld, T., Koch, R., Trümper, L., Wulf, G.G., 2011. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15336–15341. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102855108>
- Babst, M., 2011. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 452–457. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.008>
- Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., Emr, S.D., 2002. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell* 3, 283–289. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00219-8](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00219-8)
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., David, G., 2012. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
- Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549–553.
- Barrans, S., Crouch, S., Smith, A., Turner, K., Owen, R., Patmore, R., Roman, E., Jack, A., 2010. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 3360–3365. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.3947>
- Barrans, S.L., Evans, P.A.S., O'Connor, S.J.M., Kendall, S.J., Owen, R.G., Haynes, A.P., Morgan, G.J., Jack, A.S., 2003. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 2133–2139.
- Barth, M.J., Hernandez-Ilizaliturri, F.J., Mavis, C., Tsai, P.-C., Gibbs, J.F., Deeb, G., Czuczman, M.S., 2012. Ofatumumab demonstrates activity against rituximab-sensitive

- and -resistant cell lines, lymphoma xenografts and primary tumour cells from patients with B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 156, 490–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08966.x>
- Basso, K., Dalla-Favera, R., 2015. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 172–184. <https://doi.org/10.1038/nri3814>
- Battke, C., Ruiss, R., Welsch, U., Wimberger, P., Lang, S., Jochum, S., Zeidler, R., 2011. Tumour exosomes inhibit binding of tumour-reactive antibodies to tumour cells and reduce ADCC. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 60, 639–648. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-0979-5>
- Béguelin, W., Sawh, S., Chambwe, N., Chan, F.C., Jiang, Y., Choo, J.-W., Scott, D.W., Chalmers, A., Geng, H., Tsikitas, L., Tam, W., Bhagat, G., Gascoyne, R.D., Shaknovich, R., 2015. IL10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs. *Leukemia* 29, 1684–1694. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.57>
- Beham-Schmid, C., 2017. Aggressive lymphoma 2016: revision of the WHO classification. *Memo* 10, 248–254. <https://doi.org/10.1007/s12254-017-0367-8>
- Bellanger, C., Dubanet, L., Lise, M.-C., Fauchais, A.-L., Bordessoule, D., Jauberteau, M.-O., Troutaud, D., 2011. Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS One* 6, e27213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027213>
- Benicky, J., Sanda, M., Brnakova Kennedy, Z., Goldman, R., 2019. N-Glycosylation is required for secretion of the precursor to brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) carrying sulfated LacdiNAc structures. *J. Biol. Chem.* 294, 16816–16830. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009989>
- Benito-Gutiérrez, E., Garcia-Fernández, J., Comella, J.X., 2006. Origin and evolution of the Trk family of neurotrophic receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.09.007>
- Beum, P.V., Kennedy, A.D., Williams, M.E., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., 2006. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 2600–2609. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.4.2600>
- Beum, P.V., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., 2008. 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. Baltim. Md 1950* 181, 2916–2924. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2916>
- Beum, P.V., Peek, E.M., Lindorfer, M.A., Beurskens, F.J., Engelberts, P.J., Parren, P.W.H.I., van de Winkel, J.G.J., Taylor, R.P., 2011. Loss of CD20 and bound CD20 antibody from opsonized B cells occurs more rapidly because of trogocytosis mediated by Fc receptor-expressing effector cells than direct internalization by the B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 3438–3447. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101189>
- Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F.J., Schorey, J.S., 2007. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 110, 3234–3244. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079152>
- Bil, J., Winiarska, M., Nowis, D., Bojarczuk, K., Dabrowska-Iwanicka, A., Basak, G.W., Sułek, K., Jakobisiak, M., Golab, J., 2010. Bortezomib modulates surface CD20 in B-cell

- malignancies and affects rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity. *Blood* 115, 3745–3755. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-244129>
- Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G., Hivroz, C., 2002. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 3235–3241. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3235>
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., Théry, C., 2011. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic Cph. Den.* 12, 1659–1668. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x>
- Bobrie, A., Théry, C., 2013. Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal? *Biochem. Soc. Trans.* 41, 263–267. <https://doi.org/10.1042/BST20120245>
- Bobrowicz, M., Dwojak, M., Pyrzynska, B., Stachura, J., Muchowicz, A., Berthel, E., Dalla-Venezia, N., Kozikowski, M., Siernicka, M., Miazek, N., Zapala, P., Domagala, A., Bojarczuk, K., Malenda, A., Barankiewicz, J., Graczyk-Jarzynka, A., Zagodzón, A., Gabrysiak, M., Diaz, J.-J., Karp, M., Lech-Maranda, E., Firczuk, M., Giannopoulos, K., Efremov, D.G., Laurenti, L., Baatout, D., Frenzel, L., Malinowska, A., Slabicki, M., Zenz, T., Zerrouqi, A., Golab, J., Winiarska, M., 2017. HDAC6 inhibition upregulates CD20 levels and increases the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Blood* 130, 1628–1638. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-736066>
- Bojarczuk, K., Siernicka, M., Dwojak, M., Bobrowicz, M., Pyrzynska, B., Gaj, P., Karp, M., Giannopoulos, K., Efremov, D.G., Fauriat, C., Golab, J., Winiarska, M., 2014. B-cell receptor pathway inhibitors affect CD20 levels and impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia* 28, 1163–1167. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.12>
- Bonavida, B., 2007. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene* 26, 3629–3636. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210365>
- Borges, F.T., Melo, S.A., Özdemir, B.C., Kato, N., Revuelta, I., Miller, C.A., Gattone, V.H., LeBleu, V.S., Kalluri, R., 2013. TGF- β 1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 24, 385–392. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012101031>
- Boukouris, S., Mathivanan, S., 2015. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 9, 358–367. <https://doi.org/10.1002/prca.201400114>
- Bresnahan, P.A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H.L., Brake, A.J., Barr, P.J., Thomas, G., 1990. Human furin gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J. Cell Biol.* 111, 2851–2859. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.6.2851>
- Brudno, J., Tadmor, T., Pittaluga, S., Nicolae, A., Polliack, A., Dunleavy, K., 2016. Discordant bone marrow involvement in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 127, 965–970. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-651968>
- Bubien, J.K., Zhou, L.J., Bell, P.D., Frizzell, R.A., Tedder, T.F., 1993. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found

- constitutively in B lymphocytes. *J. Cell Biol.* 121, 1121–1132. <https://doi.org/10.1083/jcb.121.5.1121>
- Buschow, S.I., Nolte-’t Hoen, E.N.M., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J.M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M.H.M., Stoorvogel, W., 2009. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic Cph. Den.* 10, 1528–1542. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x>
- Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., Bonnerot, C., 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* 17, 879–887. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh267>
- Caganova, M., Carrisi, C., Varano, G., Mainoldi, F., Zanardi, F., Germain, P.-L., George, L., Alberghini, F., Ferrarini, L., Talukder, A.K., Ponzoni, M., Testa, G., Nojima, T., Doglioni, C., Kitamura, D., Toellner, K.-M., Su, I.-hsin, Casola, S., 2013. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* 123, 5009–5022. <https://doi.org/10.1172/JCI70626>
- Calame, K.L., Lin, K.-I., Tunyaplin, C., 2003. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 205–230. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141138>
- Campanella, C., Caruso Bavisotto, C., Logozzi, M., Marino Gammazza, A., Mizzoni, D., Cappello, F., Fais, S., 2019. On the Choice of the Extracellular Vesicles for Therapeutic Purposes. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20020236>
- Campo, E., Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H., Jaffe, E.S., 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117, 5019–5032. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-293050>
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H., 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–758. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.3.754>
- Cartron, G., Watier, H., Golay, J., Solal-Celigny, P., 2004. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 104, 2635–2642. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1110>
- Challa-Malladi, M., Lieu, Y.K., Califano, O., Holmes, A.B., Bhagat, G., Murty, V.V., Dominguez-Sola, D., Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R., 2011. Combined genetic inactivation of β2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 20, 728–740. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.006>
- Chao, M.V., Hempstead, B.L., 1995. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18, 321–326.
- Chapuy, B., Koch, R., Radunski, U., Corsham, S., Cheong, N., Inagaki, N., Ban, N., Wenzel, D., Reinhardt, D., Zapf, A., Schweyer, S., Kosari, F., Klapper, W., Truemper, L., Wulf, G.G., 2008. Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. *Leukemia* 22, 1576–1586. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.103>

- Chavez, J.C., Bachmeier, C., Kharfan-Dabaja, M.A., 2019. CAR T-cell therapy for B-cell lymphomas: clinical trial results of available products. *Ther. Adv. Hematol.* 10, 2040620719841581. <https://doi.org/10.1177/2040620719841581>
- Chen, K.G., Valencia, J.C., Lai, B., Zhang, G., Paterson, J.K., Rouzard, F., Berens, W., Wincovitch, S.M., Garfield, S.H., Leapman, R.D., Hearing, V.J., Gottesman, M.M., 2006. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9903–9907. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600213103>
- Chen, W., Liu, X., Lv, M., Chen, L., Zhao, J., Zhong, S., Ji, M., Hu, Q., Luo, Z., Wu, J., Tang, J., 2014. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PloS One* 9, e95240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095240>
- Chen, Z., You, L., Wang, L., Huang, X., Liu, H., Wei, J.Y., Zhu, L., Qian, W., 2018. Dual effect of DLBCL-derived EXOs in lymphoma to improve DC vaccine efficacy in vitro while favor tumorigenesis in vivo. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 37, 190. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0863-7>
- Chinn, P., Braslawsky, G., White, C., Hanna, N., 2003. Antibody therapy of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 52, 257–280. <https://doi.org/10.1007/s00262-002-0347-6>
- Choi, W.W.L., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Piris, M.A., Banham, A.H., Delabie, J., Braziel, R.M., Geng, H., Iqbal, J., Lenz, G., Vose, J.M., Hans, C.P., Fu, K., Smith, L.M., Li, M., Liu, Z., Gascoyne, R.D., Rosenwald, A., Ott, G., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Jaye, D.L., Staudt, L.M., Chan, W.C., 2009. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 5494–5502. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0113>
- Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M.D., Hobot, J.A., Newman, G.R., Jasani, B., 2001. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 247, 163–174. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00321-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00321-5)
- Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Mason, M.D., Tabi, Z., 2007. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res.* 67, 7458–7466. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3456>
- Clayton, A., Turkes, A., Dewitt, S., Steadman, R., Mason, M.D., Hallett, M.B., 2004. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 977–979. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1094fje>
- Coiffier, B., 2007. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 26, 3603–3613. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210376>
- Coiffier, B., Pfreundschuh, M., Stahel, R., Vose, J., Zinzani, P.L., 2002. Aggressive lymphoma: improving treatment outcome with rituximab. *Anticancer. Drugs* 13 Suppl 2, S43-50. <https://doi.org/10.1097/00001813-200211002-00007>
- Coiffier, B., Sarkozy, C., 2016. Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do? *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2016, 366–378. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.366>

- Coiffier, B., Thieblemont, C., Van Den Neste, E., Lepeu, G., Plantier, I., Castaigne, S., Lefort, S., Marit, G., Macro, M., Sebban, C., Belhadj, K., Bordessoule, D., Fermé, C., Tilly, H., 2010. 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* 116, 2040–2045. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276246>
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Théry, C., Raposo, G., 2013. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* 126, 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- Colombo, M., Raposo, G., Théry, C., 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S.V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L., 2009. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459, 717–721. <https://doi.org/10.1038/nature07968>
- Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L., Eisenman, R.N., 2014. An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, a014357. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014357>
- Corcoran, C., Rani, S., O'Brien, K., O'Neill, A., Prencipe, M., Sheikh, R., Webb, G., McDermott, R., Watson, W., Crown, J., O'Driscoll, L., 2012. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PloS One* 7, e50999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050999>
- Corrigan, L., Redhai, S., Leiblich, A., Fan, S.-J., Perera, S.M.W., Patel, R., Gandy, C., Wainwright, S.M., Morris, J.F., Hamdy, F., Goberdhan, D.C.I., Wilson, C., 2014. BMP-regulated exosomes from *Drosophila* male reproductive glands reprogram female behavior. *J. Cell Biol.* 206, 671–688. <https://doi.org/10.1083/jcb.201401072>
- Cragg, M.S., Walshe, C.A., Ivanov, A.O., Glennie, M.J., 2005. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr. Dir. Autoimmun.* 8, 140–174. <https://doi.org/10.1159/000082102>
- Crawford, N., 1971. The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. *Br. J. Haematol.* 21, 53–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1971.tb03416.x>
- Cruse, G., Beaven, M.A., Music, S.C., Bradding, P., Gilfillan, A.M., Metcalfe, D.D., 2015. The CD20 homologue MS4A4 directs trafficking of KIT toward clathrin-independent endocytosis pathways and thus regulates receptor signaling and recycling. *Mol. Biol. Cell* 26, 1711–1727. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-07-1221>
- Czuczman, M.S., Olejniczak, S., Gowda, A., Kotowski, A., Binder, A., Kaur, H., Knight, J., Starostik, P., Deans, J., Hernandez-Ilizaliturri, F.J., 2008. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 1561–1570. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1254>

- Dai, J., Su, Y., Zhong, S., Cong, L., Liu, B., Yang, J., Tao, Y., He, Z., Chen, C., Jiang, Y., 2020. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduct. Target. Ther.* 5, 145. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00261-0>
- Damm, J.K., Gordon, S., Ehinger, M., Jerkeman, M., Gullberg, U., Hultquist, A., Drott, K., 2015. Pharmacologically relevant doses of valproate upregulate CD20 expression in three diffuse large B-cell lymphoma patients in vivo. *Exp. Hematol. Oncol.* 4, 4. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-4-4>
- Davis, R.E., Brown, K.D., Siebenlist, U., Staudt, L.M., 2001. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* 194, 1861–1874. <https://doi.org/10.1084/jem.194.12.1861>
- Davis, R.E., Ngo, V.N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R.M., Romesser, P.B., Kohlhammer, H., Lamy, L., Zhao, H., Yang, Y., Xu, W., Shaffer, A.L., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Jiang, J.-K., Thomas, C.J., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Johnson, N.A., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Wilson, W.H., Delabie, J., Smeland, E.B., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Tubbs, R.R., Cook, J.R., Weisenburger, D.D., Chan, W.C., Pierce, S.K., Staudt, L.M., 2010. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463, 88–92. <https://doi.org/10.1038/nature08638>
- de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., Vidal, M., 2003. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102, 4336–4344. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0871>
- De Silva, N.S., Klein, U., 2015. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148. <https://doi.org/10.1038/nri3804>
- de StGroth, S.F., Scheidegger, D., 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods* 35, 1–21. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(80)90146-5)
- Desdín-Micó, G., Mittelbrunn, M., 2017. Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis. *Cell Adhes. Migr.* 11, 127–134. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1251000>
- Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., Golay, J., 2003. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 171, 1581–1587. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1581>
- Doyle, L.M., Wang, M.Z., 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Doyotte, A., Mironov, A., McKenzie, E., Woodman, P., 2008. The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6308–6313. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707601105>
- Dragovic, R.A., Gardiner, C., Brooks, A.S., Tannetta, D.S., Ferguson, D.J.P., Hole, P., Carr, B., Redman, C.W.G., Harris, A.L., Dobson, P.J., Harrison, P., Sargent, I.L., 2011. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 7, 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>

- Du, J., Wang, H., Zhong, C., Peng, B., Zhang, M., Li, B., Huo, S., Guo, Y., Ding, J., 2007. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *J. Biol. Chem.* 282, 15073–15080. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701654200>
- Du, J., Yang, H., Guo, Y., Ding, J., 2009. Structure of the Fab fragment of therapeutic antibody Ofatumumab provides insights into the recognition mechanism with CD20. *Mol. Immunol.* 46, 2419–2423. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.04.009>
- Duan, S., Cermak, L., Pagan, J.K., Rossi, M., Martinengo, C., di Celle, P.F., Chapuy, B., Shipp, M., Chiarle, R., Pagano, M., 2012. FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas. *Nature* 481, 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature10688>
- Dubonet, L., Bentayeb, H., Petit, B., Olivrie, A., Saada, S., de la Cruz-Morcillo, M.A., Lalloué, F., Gourin, M.-P., Bordessoule, D., Faumont, N., Delage-Corre, M., Fauchais, A.-L., Jauberteau, M.-O., Troutaud, D., 2015. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br. J. Cancer* 113, 934–944. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.274>
- Ernst, J.A., Li, H., Kim, H.S., Nakamura, G.R., Yansura, D.G., Vandlen, R.L., 2005. Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. *Biochemistry* 44, 15150–15158. <https://doi.org/10.1021/bi0511078>
- Escudero, C.A., Lazo, O.M., Galleguillos, C., Parraguez, J.I., Lopez-Verrilli, M.A., Cabeza, C., Leon, L., Saeed, U., Retamal, C., Gonzalez, A., Marzolo, M.-P., Carter, B.D., Court, F.A., Bronfman, F.C., 2014. The p75 neurotrophin receptor evades the endolysosomal route in neuronal cells, favouring multivesicular bodies specialised for exosomal release. *J. Cell Sci.* 127, 1966–1979. <https://doi.org/10.1242/jcs.141754>
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G.H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M.A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D., Croce, C.M., 2012. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2110–2116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209414109>
- Fader, C.M., Sánchez, D.G., Mestre, M.B., Colombo, M.I., 2009. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1901–1916. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.011>
- Falguières, T., Luyet, P.-P., Bissig, C., Scott, C.C., Velluz, M.-C., Gruenberg, J., 2008. In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol. Biol. Cell* 19, 4942–4955. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0239>
- Fares, J., Kashyap, R., Zimmermann, P., 2017. Syntenin: Key player in cancer exosome biogenesis and uptake? *Cell Adhes. Migr.* 11, 124–126. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1225632>
- Fauchais, A.-L., Lalloué, F., Lise, M.-C., Boumediene, A., Preud'homme, J.-L., Vidal, E., Jauberteau, M.-O., 2008. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 3027–3038. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3027>
- Fauré, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., Kirchhoff, F., Raposo, G., Garin, J., Sadoul, R.,

2006. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 642–648. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.12.003>
- Feng, D., Zhao, W.-L., Ye, Y.-Y., Bai, X.-C., Liu, R.-Q., Chang, L.-F., Zhou, Q., Sui, S.-F., 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic Cph. Den.* 11, 675–687. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x>
- Feng, Y., Zhong, M., Zeng, S., Wang, L., Liu, P., Xiao, X., Liu, Y., 2019. Exosome-derived miRNAs as predictive biomarkers for diffuse large B-cell lymphoma chemotherapy resistance. *Epigenomics* 11, 35–51. <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0123>
- Fenner, B.M., 2012. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.01.002>
- Fernandes, M., Teixeira, A.L., Medeiros, R., 2019. The opportunistic effect of exosomes on Non-Hodgkin Lymphoma microenvironment modulation. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 144, 102825. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.102825>
- Feugier, P., Van Hoof, A., Sebban, C., Solal-Celigny, P., Bouabdallah, R., Fermé, C., Christian, B., Lepage, E., Tilly, H., Morschhauser, F., Gaulard, P., Salles, G., Bosly, A., Gisselbrecht, C., Reyes, F., Coiffier, B., 2005. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 4117–4126. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.131>
- Février, B., Raposo, G., 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.003>
- Fisher, R.I., Gaynor, E.R., Dahlborg, S., Oken, M.M., Grogan, T.M., Mize, E.M., Glick, J.H., Coltman, C.A., Miller, T.P., 1993. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 328, 1002–1006. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304083281404>
- Fisher, R.I., Miller, T.P., O'Connor, O.A., 2004. Diffuse aggressive lymphoma. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 221–236. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2004.1.221>
- Flowers, C.R., Sinha, R., Vose, J.M., 2010. Improving outcomes for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *CA. Cancer J. Clin.* 60, 393–408. <https://doi.org/10.3322/caac.20087>
- Fontán, L., Melnick, A., 2013. Molecular pathways: targeting MALT1 paracaspase activity in lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 6662–6668. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3869>
- Francke, U., de Martinville, B., Coussens, L., Ullrich, A., 1983. The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1. *Science* 222, 1248–1251. <https://doi.org/10.1126/science.6648531>
- Franzen, C.A., Simms, P.E., Van Huis, A.F., Foreman, K.E., Kuo, P.C., Gupta, G.N., 2014. Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells. *BioMed Res. Int.* 2014, 619829. <https://doi.org/10.1155/2014/619829>
- Gajos-Michniewicz, A., Duechler, M., Czyz, M., 2014. MiRNA in melanoma-derived exosomes. *Cancer Lett.* 347, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.02.004>

- Gascoyne, R.D., 1997. Pathologic prognostic factors in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 11, 847–862. [https://doi.org/10.1016/s0889-8588\(05\)70466-4](https://doi.org/10.1016/s0889-8588(05)70466-4)
- Gatto, D., Brink, R., 2010. The germinal center reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 898–907; quiz 908–909. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.007>
- Georgiou, K., Chen, L., Berglund, M., Ren, W., de Miranda, N.F.C.C., Lisboa, S., Fangazio, M., Zhu, S., Hou, Y., Wu, K., Fang, W., Wang, X., Meng, B., Zhang, L., Zeng, Y., Bhagat, G., Nordenskjöld, M., Sundström, C., Enblad, G., Dalla-Favera, R., Zhang, H., Teixeira, M.R., Pasqualucci, L., Peng, R., Pan-Hammarström, Q., 2016. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 127, 3026–3034. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-686550>
- Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C.B., Bouchet, J., Vitale, N., Slavík, J., Machala, M., Zimmermann, P., 2014. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat. Commun.* 5, 3477. <https://doi.org/10.1038/ncomms4477>
- Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton, R.G., Stenmark, H., 2000. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* 19, 4577–4588. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4577>
- Golay, J., Introna, M., 2012. Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays. *Arch. Biochem. Biophys.* 526, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.011>
- Grant, B.D., Donaldson, J.G., 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 597–608. <https://doi.org/10.1038/nrm2755>
- Griffin, N., Faulkner, S., Jobling, P., Hondermarck, H., 2018. Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. *Pharmacol. Res.* 135, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.07.019>
- Gross, J.C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., Boutros, M., 2012. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 1036–1045. <https://doi.org/10.1038/ncb2574>
- Gruenberg, J., 2003. Lipids in endocytic membrane transport and sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 382–388. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00078-4](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00078-4)
- Gruenberg, J., Griffiths, G., Howell, K.E., 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J. Cell Biol.* 108, 1301–1316. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.4.1301>
- Guan, X.-W., Wang, H.-Q., Ban, W.-W., Chang, Z., Chen, H.-Z., Jia, L., Liu, F.-T., 2020. Novel HDAC inhibitor Chidamide synergizes with Rituximab to inhibit diffuse large B-cell lymphoma tumour growth by upregulating CD20. *Cell Death Dis.* 11, 20. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2210-0>
- Gupta, V.K., You, Y., Gupta, V.B., Klistorner, A., Graham, S.L., 2013. TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10122–10142. <https://doi.org/10.3390/ijms140510122>
- Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., Kim, J.-H., 2019. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>

- Hallböök, F., Ibáñez, C.F., Persson, H., 1991. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6, 845–858. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90180-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90180-8)
- Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Campo, E., Braziel, R.M., Jaffe, E.S., Pan, Z., Farinha, P., Smith, L.M., Falini, B., Banham, A.H., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Connors, J.M., Armitage, J.O., Chan, W.C., 2004. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103, 275–282. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1545>
- Harding, C., Heuser, J., Stahl, P., 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- Hardy, R.R., Hayakawa, K., 2001. B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 595–621. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.595>
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C., 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361–1392.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., Sixma, J.J., 1999. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94, 3791–3799.
- Helenius, A., Mellman, I., Wall, D., Hubbard, A., 1983. Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* 8, 245–250. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(83\)90350-X](https://doi.org/10.1016/0968-0004(83)90350-X)
- Hempstead, B.L., 2014. Deciphering proneurotrophin actions. *Handb. Exp. Pharmacol.* 220, 17–32. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_2
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Emr, S.D., 2011. The ESCRT pathway. *Dev. Cell* 21, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>
- Henry, C., Deschamps, M., Rohrlich, P.-S., Pallandre, J.-R., Rémy-Martin, J.-P., Callanan, M., Traverse-Glehen, A., GrandClément, C., Garnache-Ottou, F., Gressin, R., Deconinck, E., Salles, G., Robinet, E., Tiberghien, P., Borg, C., Ferrand, C., 2010. Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. *Blood* 115, 2420–2429. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-229112>
- Hessvik, N.P., Llorente, A., 2018. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 193–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- Heyn, H., Esteller, M., 2013. EZH2: an epigenetic gatekeeper promoting lymphomagenesis. *Cancer Cell* 23, 563–565. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.028>
- Hillis, J., O'Dwyer, M., Gorman, A.M., 2016. Neurotrophins and B-cell malignancies. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 41–56. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2046-4>
- Himmelman, A., Riva, A., Wilson, G.L., Lucas, B.P., Thevenin, C., Kehrl, J.H., 1997. PU.1/Pip and basic helix loop helix zipper transcription factors interact with binding sites in the CD20 promoter to help confer lineage- and stage-specific expression of CD20 in B lymphocytes. *Blood* 90, 3984–3995.

- Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, T., Shimada, K., Ito, M., Nakamura, S., Kiyoi, H., Kinoshita, T., Naoe, T., 2009. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* 113, 4885–4893. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-175208>
- Hofmeister, J.K., Cooney, D., Coggeshall, K.M., 2000. Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells. Mol. Dis.* 26, 133–143. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2000.0287>
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., Barde, Y.A., 1990. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339–341. <https://doi.org/10.1038/344339a0>
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emler, D.R., Dieterich, R., Wong, A.J., 1997. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12419–12424. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12419>
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S.-I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Grønberg, M., Möbius, W., Rhee, J., Barr, F.A., Simons, M., 2010. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.* 189, 223–232. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>
- Hu, G., Drescher, K.M., Chen, X.-M., 2012. Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front. Genet.* 3, 56. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00056>
- Hu, L.-Y., Xu, X.-L., Rao, H.-L., Chen, J., Lai, R.-C., Huang, H.-Q., Jiang, W.-Q., Lin, T.-Y., Xia, Z.-J., Cai, Q.-Q., 2017. Expression and clinical value of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in diffuse large B cell lymphoma: a retrospective study. *Chin. J. Cancer* 36, 94. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0262-z>
- Hu, S., Xu-Monette, Z.Y., Tzankov, A., Green, T., Wu, L., Balasubramanyam, A., Liu, W., Visco, C., Li, Y., Miranda, R.N., Montes-Moreno, S., Dybkaer, K., Chiu, A., Orazi, A., Zu, Y., Bhagat, G., Richards, K.L., Hsi, E.D., Choi, W.W.L., Zhao, X., van Krieken, J.H., Huang, Q., Huh, J., Ai, W., Ponzoni, M., Ferreri, A.J.M., Zhou, F., Slack, G.W., Gascoyne, R.D., Tu, M., Variakojis, D., Chen, W., Go, R.S., Piris, M.A., Møller, M.B., Medeiros, L.J., Young, K.H., 2013. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 121, 4021–4031; quiz 4250. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-460063>
- Hu, W., Ge, X., You, T., Xu, T., Zhang, J., Wu, G., Peng, Z., Chorev, M., Aktas, B.H., Halperin, J.A., Brown, J.R., Qin, X., 2011. Human CD59 inhibitor sensitizes rituximab-resistant lymphoma cells to complement-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 71, 2298–2307. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3016>
- Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., Seregini, E., Valenti, R., Ballabio, G., Belli, F., Leo, E., Parmiani, G., Rivoltini, L., 2005. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 128, 1796–1804. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.045>

- Hugel, B., Martínez, M.C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J.-M., 2005. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiol. Bethesda Md* 20, 22–27. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2004>
- Huotari, J., Helenius, A., 2011. Endosome maturation. *EMBO J.* 30, 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Hurley, J.H., Hanson, P.I., 2010. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 556–566. <https://doi.org/10.1038/nrm2937>
- Iavello, A., Frech, V.S.L., Gai, C., Deregibus, M.C., Quesenberry, P.J., Camussi, G., 2016. Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *Int. J. Mol. Med.* 37, 958–966. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2488>
- Iqbal, J., Greiner, T.C., Patel, K., Dave, B.J., Smith, L., Ji, J., Wright, G., Sanger, W.G., Pickering, D.L., Jain, S., Horsman, D.E., Shen, Y., Fu, K., Weisenburger, D.D., Hans, C.P., Campo, E., Gascoyne, R.D., Rosenwald, A., Jaffe, E.S., Delabie, J., Rimsza, L., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Connors, J.M., Vose, J.M., McKeithan, T., Staudt, L.M., Chan, W.C., Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project, 2007. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 21, 2332–2343. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404856>
- Ishibashi, K., Suzuki, M., Sasaki, S., Imai, M., 2001. Identification of a new multigene four-transmembrane family (MS4A) related to CD20, HTm4 and beta subunit of the high-affinity IgE receptor. *Gene* 264, 87–93. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00598-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00598-9)
- Ishii, T., Warabi, E., Mann, G.E., 2019. Circadian control of BDNF-mediated Nrf2 activation in astrocytes protects dopaminergic neurons from ferroptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 133, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.002>
- Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gómez, M., Erkizia, I., Puertas, M.C., Borràs, F.E., Blanco, J., Martínez-Picado, J., 2010. HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog.* 6, e1000740. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000740>
- Janas, E., Priest, R., Malhotra, R., 2005. Functional role of lipid rafts in CD20 activity? *Biochem. Soc. Symp.* 165–175. <https://doi.org/10.1042/bss0720165>
- Jang, S.-W., Liu, X., Yepes, M., Shepherd, K.R., Miller, G.W., Liu, Y., Wilson, W.D., Xiao, G., Bianchi, B., Sun, Y.E., Ye, K., 2010. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2687–2692. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913572107>
- Janknecht, R., Ernst, W.H., Pingoud, V., Nordheim, A., 1993. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J.* 12, 5097–5104.
- Jazirehi, A.R., Vega, M.I., Bonavida, B., 2007. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res.* 67, 1270–1281. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2184>
- Jeppesen, D.K., Fenix, A.M., Franklin, J.L., Higginbotham, J.N., Zhang, Q., Zimmerman, L.J., Liebler, D.C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W.H., Patton, J.G., Rome, L.H., Burnette, D.T., Coffey, R.J., 2019. Reassessment of Exosome Composition. *Cell* 177, 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>

- Jimenez-Jimenez, S., Hashimoto, K., Santana, O., Aguirre, J., Kuchitsu, K., Cárdenas, L., 2019. Emerging roles of tetraspanins in plant inter-cellular and inter-kingdom communication. *Plant Signal. Behav.* 14, e1581559. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1581559>
- Johnson, N.A., Boyle, M., Bashashati, A., Leach, S., Brooks-Wilson, A., Sehn, L.H., Chhanabhai, M., Brinkman, R.R., Connors, J.M., Weng, A.P., Gascoyne, R.D., 2009a. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood* 113, 3773–3780. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-177469>
- Johnson, N.A., Leach, S., Woolcock, B., deLeeuw, R.J., Bashashati, A., Sehn, L.H., Connors, J.M., Chhanabhai, M., Brooks-Wilson, A., Gascoyne, R.D., 2009b. 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* 94, 423–427. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.001024>
- Johnson, N.A., Slack, G.W., Savage, K.J., Connors, J.M., Ben-Neriah, S., Rogic, S., Scott, D.W., Tan, K.L., Steidl, C., Sehn, L.H., Chan, W.C., Iqbal, J., Meyer, P.N., Lenz, G., Wright, G., Rimsza, L.M., Valentino, C., Brunhoeber, P., Grogan, T.M., Braziel, R.M., Cook, J.R., Tubbs, R.R., Weisenburger, D.D., Campo, E., Rosenwald, A., Ott, G., Delabie, J., Holcroft, C., Jaffe, E.S., Staudt, L.M., Gascoyne, R.D., 2012. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 3452–3459. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0985>
- Johnstone, R.M., 2006. Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells. Mol. Dis.* 36, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.12.001>
- Johnstone, R.M., 2005. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells. Mol. Dis.* 34, 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.03.002>
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412–9420.
- Jones, K.R., Reichardt, L.F., 1990. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8060–8064. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.8060>
- Joshi, B.S., de Beer, M.A., Giepmans, B.N.G., Zuhorn, I.S., 2020. Endocytosis of Extracellular Vesicles and Release of Their Cargo from Endosomes. *ACS Nano* 14, 4444–4455. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b10033>
- Kahlert, C., Kalluri, R., 2013. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91, 431–437. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1020-6>
- Kalra, H., Drummen, G.P.C., Mathivanan, S., 2016. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
- Kalra, H., Simpson, R.J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V.C., Borràs, F.E., Breakefield, X., Budnik, V., Buzas, E., Camussi, G., Clayton, A., Cocucci, E., Falcon-Perez, J.M., Gabrielsson, S., Gho, Y.S., Gupta, D., Harsha, H.C., Hendrix, A., Hill, A.F., Inal, J.M., Jenster, G., Krämer-Albers, E.-M., Lim, S.K., Llorente, A., Lötvall, J., Marcilla, A., Mincheva-Nilsson, L., Nazarenko, I., Nieuwland, R., Nolte-'t Hoen, E.N.M., Pandey, A., Patel, T., Piper, M.G., Pluchino, S., Prasad, T.S.K.,

- Rajendran, L., Raposo, G., Record, M., Reid, G.E., Sánchez-Madrid, F., Schiffelers, R.M., Siljander, P., Stensballe, A., Stoorvogel, W., Taylor, D., Thery, C., Valadi, H., van Balkom, B.W.M., Vázquez, J., Vidal, M., Wauben, M.H.M., Yáñez-Mó, M., Zoeller, M., Mathivanan, S., 2012. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 10, e1001450. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>
- Kanaoka, R., Iinuma, H., Dejima, H., Sakai, T., Uehara, H., Matsutani, N., Kawamura, M., 2018. Usefulness of Plasma Exosomal MicroRNA-451a as a Noninvasive Biomarker for Early Prediction of Recurrence and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology* 94, 311–323. <https://doi.org/10.1159/000487006>
- Karube, K., Campo, E., 2015. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin. Hematol.* 52, 97–106. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2015.01.009>
- Katzmann, D.J., Babst, M., Emr, S.D., 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145–155. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00434-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00434-2)
- Kharaziha, P., Ceder, S., Li, Q., Panaretakis, T., 2012. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim. Biophys. Acta* 1826, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.006>
- Kim, D.-K., Kang, B., Kim, O.Y., Choi, D.-S., Lee, J., Kim, S.R., Go, G., Yoon, Y.J., Kim, J.H., Jang, S.C., Park, K.-S., Choi, E.-J., Kim, K.P., Desiderio, D.M., Kim, Y.-K., Lötval, J., Hwang, D., Gho, Y.S., 2013. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 2. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20384>
- Kiyasu, J., Miyoshi, H., Hirata, A., Arakawa, F., Ichikawa, A., Niino, D., Sugita, Y., Yufu, Y., Choi, I., Abe, Y., Uike, N., Nagafuji, K., Okamura, T., Akashi, K., Takayanagi, R., Shiratsuchi, M., Ohshima, K., 2015. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 126, 2193–2201. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629600>
- Klein, C., Lammens, A., Schäfer, W., Georges, G., Schwaiger, M., Mössner, E., Hopfner, K.-P., Umaña, P., Niederfellner, G., 2013. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *mAbs* 5, 22–33. <https://doi.org/10.4161/mabs.22771>
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., Dalla-Favera, R., 2006. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 7, 773–782. <https://doi.org/10.1038/ni1357>
- Klein, U., Dalla-Favera, R., 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 22–33. <https://doi.org/10.1038/nri2217>
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., Dalla-Favera, R., 2003. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2639–2644. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437996100>
- Klumperman, J., Raposo, G., 2014. The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016857. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016857>

- Koch, R., Aung, T., Vogel, D., Chapuy, B., Wenzel, D., Becker, S., Sinzig, U., Venkataramani, V., von Mach, T., Jacob, R., Truemper, L., Wulf, G.G., 2016. Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 395–404. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0577>
- Koch, R., Demant, M., Aung, T., Diering, N., Cicholas, A., Chapuy, B., Wenzel, D., Lahmann, M., Güntsch, A., Kiecke, C., Becker, S., Hupfeld, T., Venkataramani, V., Ziepert, M., Opitz, L., Klapper, W., Trümper, L., Wulf, G.G., 2014. Populational equilibrium through exosome-mediated Wnt signaling in tumor progression of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 123, 2189–2198. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-523886>
- Koene, H.R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, A.E., de Haas, M., 1997. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90, 1109–1114.
- Kohrt, H.E., Sagiv-Barfi, I., Rafiq, S., Herman, S.E.M., Butchar, J.P., Cheney, C., Zhang, X., Buggy, J.J., Muthusamy, N., Levy, R., Johnson, A.J., Byrd, J.C., 2014. Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 123, 1957–1960. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-547869>
- Korkolopoulou, P., Vassilakopoulos, T., Milionis, V., Ioannou, M., 2016. Recent Advances in Aggressive Large B-cell Lymphomas: A Comprehensive Review. *Adv. Anat. Pathol.* 23, 202–243. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000117>
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., Ochiya, T., 2010. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 285, 17442–17452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107821>
- Kowal, J., Tkach, M., Théry, C., 2014. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 29, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>
- Kraan, W., Horlings, H.M., van Keimpema, M., Schilder-Tol, E.J.M., Oud, M.E.C.M., Scheepstra, C., Kluin, P.M., Kersten, M.J., Spaargaren, M., Pals, S.T., 2013. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J.* 3, e139. <https://doi.org/10.1038/bcj.2013.28>
- Krappmann, D., 2012. Attacking MALT1 for ABC-DLBCL therapy. *Oncotarget* 3, 1489–1490. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.794>
- Kumar, A., Kodidela, S., Tadrous, E., Cory, T.J., Walker, C.M., Smith, A.M., Mukherjee, A., Kumar, S., 2020. Extracellular Vesicles in Viral Replication and Pathogenesis and Their Potential Role in Therapeutic Intervention. *Viruses* 12. <https://doi.org/10.3390/v12080887>
- Kunigelis, K.E., Graner, M.W., 2015. The Dichotomy of Tumor Exosomes (TEX) in Cancer Immunity: Is It All in the ConTEXT? *Vaccines* 3, 1019–1051. <https://doi.org/10.3390/vaccines3041019>
- Küppers, R., Schmitz, R., Distler, V., Renné, C., Bräuninger, A., Hansmann, M.-L., 2005. Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Haematol. Suppl.* 26–33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2005.00451.x>
- Lam, L.T., Davis, R.E., Pierce, J., Hepperle, M., Xu, Y., Hottelet, M., Nong, Y., Wen, D., Adams, J., Dang, L., Staudt, L.M., 2005. Small molecule inhibitors of IκappaB kinase

- are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 28–40.
- Larabi, A., Barnich, N., Nguyen, H.T.T., 2020. Emerging Role of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Infectious and Inflammatory Bowel Diseases. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9051111>
- Lata, S., Schoehn, G., Solomons, J., Pires, R., Göttinger, H.G., Weissenhorn, W., 2009. Structure and function of ESCRT-III. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 156–160. <https://doi.org/10.1042/BST0370156>
- Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J.-P., Bonnerot, C., Perret, B., Record, M., 2004. PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Lett.* 572, 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.082>
- Lazar, I., Clement, E., Attane, C., Muller, C., Nieto, L., 2018. A new role for extracellular vesicles: how small vesicles can feed tumors' big appetite. *J. Lipid Res.* 59, 1793–1804. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083725>
- Lazar, I., Clement, E., Dauvillier, S., Milhas, D., Ducoux-Petit, M., LeGonidec, S., Moro, C., Soldan, V., Dalle, S., Balor, S., Golzio, M., Burlet-Schiltz, O., Valet, P., Muller, C., Nieto, L., 2016. Adipocyte Exosomes Promote Melanoma Aggressiveness through Fatty Acid Oxidation: A Novel Mechanism Linking Obesity and Cancer. *Cancer Res.* 76, 4051–4057. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0651>
- LeBien, T.W., Tedder, T.F., 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570–1580. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., Hempstead, B.L., 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948. <https://doi.org/10.1126/science.1065057>
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y.A., 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149–152. <https://doi.org/10.1038/341149a0>
- Lenz, G., Staudt, L.M., 2010. Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 362, 1417–1429. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0807082>
- Lenz, G., Wright, G., Dave, S.S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., Xu, W., Tan, B., Goldschmidt, N., Iqbal, J., Vose, J., Bast, M., Fu, K., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Armitage, J.O., Kyle, A., May, L., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Troen, G., Holte, H., Kvaloy, S., Dierickx, D., Verhoef, G., Delabie, J., Smeland, E.B., Jares, P., Martinez, A., Lopez-Guillermo, A., Montserrat, E., Campo, E., Braziel, R.M., Miller, T.P., Rimsza, L.M., Cook, J.R., Pohlman, B., Sweetenham, J., Tubbs, R.R., Fisher, R.I., Hartmann, E., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.-K., Wrench, D., Lister, T.A., Jaffe, E.S., Wilson, W.H., Chan, W.C., Staudt, L.M., Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project, 2008. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 359, 2313–2323. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802885>
- Lessmann, V., Gottmann, K., Malcangio, M., 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341–374. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(03\)00019-4](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00019-4)
- Léveillé, C., AL-Daccak, R., Mourad, W., 1999. CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur. J. Immunol.* 29, 65–74.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199901\)29:01<65::AID-IMMU65>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<65::AID-IMMU65>3.0.CO;2-E)

- Levi-Montalcini, R., 1964. THE NERVE GROWTH FACTOR. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 118, 149–170. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb33978.x>
- Levi-Montalcini, R., Hamburger, V., 1951. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 116, 321–361. <https://doi.org/10.1002/jez.1401160206>
- Li, B., Zhao, L., Guo, H., Wang, C., Zhang, X., Wu, L., Chen, L., Tong, Q., Qian, W., Wang, H., Guo, Y., 2009. Characterization of a rituximab variant with potent antitumor activity against rituximab-resistant B-cell lymphoma. *Blood* 114, 5007–5015. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-225474>
- Li, H., Ayer, L.M., Lytton, J., Deans, J.P., 2003. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 278, 42427–42434. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308802200>
- Li, H., Ayer, L.M., Polyak, M.J., Mutch, C.M., Petrie, R.J., Gauthier, L., Shariat, N., Hendzel, M.J., Shaw, A.R., Patel, K.D., Deans, J.P., 2004. The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts: antibody binding increases the affinity of the association through an epitope-dependent cross-linking-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 279, 19893–19901. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400525200>
- Li, S., 2005. Src kinases as targets for B cell acute lymphoblastic leukaemia therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 9, 329–341. <https://doi.org/10.1517/14728222.9.2.329>
- Li, S., Lin, P., Young, K.H., Kanagal-Shamanna, R., Yin, C.C., Medeiros, L.J., 2013. MYC/BCL2 double-hit high-grade B-cell lymphoma. *Adv. Anat. Pathol.* 20, 315–326. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3182a289f2>
- Li, S., Young, K.H., Medeiros, L.J., 2018. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology (Phila.)* 50, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.09.006>
- Li, X.-H., Zhang, J., Li, D.-F., Wu, W., Xie, Z.-W., Liu, Q., 2020. Physiological and pathological insights into exosomes in the brain. *Zool. Res.* 41, 365–372. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.043>
- Liu, C., Yu, S., Zinn, K., Wang, J., Zhang, L., Jia, Y., Kappes, J.C., Barnes, S., Kimberly, R.P., Grizzle, W.E., Zhang, H.-G., 2006. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 1375–1385. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1375>
- Liu, Y., Barta, S.K., 2019. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am. J. Hematol.* 94, 604–616. <https://doi.org/10.1002/ajh.25460>
- Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., Sandvig, K., 2013. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1302–1309. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.04.011>
- Lobb, R.J., Lima, L.G., Möller, A., 2017. Exosomes: Key mediators of metastasis and pre-metastatic niche formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 67, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.004>

- Locke, F.L., Ghobadi, A., Jacobson, C.A., Miklos, D.B., Lekakis, L.J., Oluwole, O.O., Lin, Y., Braunschweig, I., Hill, B.T., Timmerman, J.M., Deol, A., Reagan, P.M., Stiff, P., Flinn, I.W., Farooq, U., Goy, A., McSweeney, P.A., Munoz, J., Siddiqi, T., Chavez, J.C., Herrera, A.F., Bartlett, N.L., Wiezorek, J.S., Navale, L., Xue, A., Jiang, Y., Bot, A., Rossi, J.M., Kim, J.J., Go, W.Y., Neelapu, S.S., 2019. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol.* 20, 31–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30864-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30864-7)
- Loddenkemper, C., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Jöhrens-Leder, K., Foss, H.-D., Jundt, F., Wirth, T., Dörken, B., Stein, H., 2004. Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J. Pathol.* 202, 60–69. <https://doi.org/10.1002/path.1485>
- Longjohn, M.N., Hudson, J.-A.B.J., Smith, N.C., Rise, M.L., Moorehead, P.C., Christian, S.L., 2020. Deciphering the messages carried by extracellular vesicles in hematological malignancies. *Blood Rev.* 100734. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100734>
- Lossos, I.S., 2005. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 6351–6357. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.012>
- Luberg, K., Wong, J., Weickert, C.S., Timmusk, T., 2010. Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J. Neurochem.* 113, 952–964. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06662.x>
- Lundholm, M., Schröder, M., Nagaeva, O., Baranov, V., Widmark, A., Mincheva-Nilsson, L., Wikström, P., 2014. Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression on natural killer cells and CD8+ T cells: mechanism of immune evasion. *PloS One* 9, e108925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108925>
- Mageswaran, S.K., Dixon, M.G., Curtiss, M., Keener, J.P., Babst, M., 2014. Binding to any ESCRT can mediate ubiquitin-independent cargo sorting. *Traffic Cph. Den.* 15, 212–229. <https://doi.org/10.1111/tra.12135>
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., Yancopoulos, G.D., 1990. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247, 1446–1451. <https://doi.org/10.1126/science.2321006>
- Mallia, A., Gianazza, E., Zoanni, B., Brioschi, M., Barbieri, S.S., Banfi, C., 2020. Proteomics of Extracellular Vesicles: Update on Their Composition, Biological Roles and Potential Use as Diagnostic Tools in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Diagn. Basel Switz.* 10. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100843>
- Maloney, D.G., Smith, B., Rose, A., 2002. Rituximab: mechanism of action and resistance. *Semin. Oncol.* 29, 2–9.
- Mandelbaum, J., Bhagat, G., Tang, H., Mo, T., Brahmachary, M., Shen, Q., Chadburn, A., Rajewsky, K., Tarakhovskiy, A., Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R., 2010. BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 18, 568–579. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.030>
- Marleau, A.M., Chen, C.-S., Joyce, J.A., Tullis, R.H., 2012. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J. Transl. Med.* 10, 134. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-134>

- Martelli, M., Ferreri, A.J.M., Agostinelli, C., Di Rocco, A., Pfreundschuh, M., Pileri, S.A., 2013. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 87, 146–171. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.12.009>
- Mashouri, L., Yousefi, H., Aref, A.R., Ahadi, A.M., Molaei, F., Alahari, S.K., 2019. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol. Cancer* 18, 75. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0991-5>
- Mathivanan, S., Fahner, C.J., Reid, G.E., Simpson, R.J., 2012. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* 40, D1241–1244. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr828>
- Mathivanan, S., Simpson, R.J., 2009. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 9, 4997–5000. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900351>
- Mattila, P.K., Feest, C., Depoil, D., Treanor, B., Montaner, B., Otipoby, K.L., Carter, R., Justement, L.B., Bruckbauer, A., Batista, F.D., 2013. The actin and tetraspanin networks organize receptor nanoclusters to regulate B cell receptor-mediated signaling. *Immunity* 38, 461–474. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.019>
- Maxfield, F.R., Yamashiro, D.J., 1987. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 225, 189–198. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5442-0_16
- McLellan, A.D., 2009. Exosome release by primary B cells. *Crit. Rev. Immunol.* 29, 203–217. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v29.i3.20>
- Melchers, F., 2015. Checkpoints that control B cell development. *J. Clin. Invest.* 125, 2203–2210. <https://doi.org/10.1172/JCI78083>
- Melo, S.A., Sugimoto, H., O’Connell, J.T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L.T., Melo, C.A., Lucci, A., Ivan, C., Calin, G.A., Kalluri, R., 2014. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 26, 707–721. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.005>
- Metsis, M., 2001. Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 1014–1020. <https://doi.org/10.1007/PL00000916>
- Micallef, I.N.M., Maurer, M.J., Wiseman, G.A., Nikcevich, D.A., Kurtin, P.J., Cannon, M.W., Perez, D.G., Soori, G.S., Link, B.K., Habermann, T.M., Witzig, T.E., 2011. Epratuzumab with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 118, 4053–4061. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-336990>
- Middlemas, D.S., Lindberg, R.A., Hunter, T., 1991. trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol. Cell. Biol.* 11, 143–153. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.1.143>
- Milpied, N., Deconinck, E., Gaillard, F., Delwail, V., Foussard, C., Berthou, C., Gressin, R., Lucas, V., Colombat, P., Harousseau, J.-L., Groupe Ouest-Est des Leucémies et des Autres Maladies du Sang, 2004. Initial treatment of aggressive lymphoma with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell support. *N. Engl. J. Med.* 350, 1287–1295. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031770>
- Miyoshi, H., Arakawa, F., Sato, K., Kimura, Y., Kiyasu, J., Takeuchi, M., Yoshida, M., Ichikawa, A., Ishibashi, Y., Nakamura, Y., Nakashima, S., Niino, D., Sugita, Y., Ohshima, K., 2012. Comparison of CD20 expression in B-cell lymphoma between

- newly diagnosed, untreated cases and those after rituximab treatment. *Cancer Sci.* 103, 1567–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02307.x>
- Möbius, W., Ohno-Iwashita, Y., van Donselaar, E.G., Oorschot, V.M.J., Shimada, Y., Fujimoto, T., Heijnen, H.F.G., Geuze, H.J., Slot, J.W., 2002. Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 50, 43–55. <https://doi.org/10.1177/002215540205000105>
- Möbius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H.F.G., Slot, J.W., Geuze, H.J., 2003. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic Cph. Den.* 4, 222–231. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00072.x>
- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L.G., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O.A., Divito, S.J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S.C., Morelli, A.E., 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756–766. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338004>
- Monti, S., Savage, K.J., Kutok, J.L., Feuerhake, F., Kurtin, P., Mihm, M., Wu, B., Pasqualucci, L., Neuberg, D., Aguiar, R.C.T., Dal Cin, P., Ladd, C., Pinkus, G.S., Salles, G., Harris, N.L., Dalla-Favera, R., Habermann, T.M., Aster, J.C., Golub, T.R., Shipp, M.A., 2005. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 105, 1851–1861. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2947>
- Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J., Wolfman, A., 1993. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260, 1658–1661. <https://doi.org/10.1126/science.8503013>
- Moon, P.-G., Lee, J.-E., Cho, Y.-E., Lee, S.J., Jung, J.H., Chae, Y.S., Bae, H.-I., Kim, Y.-B., Kim, I.-S., Park, H.Y., Baek, M.-C., 2016. Identification of Developmental Endothelial Locus-1 on Circulating Extracellular Vesicles as a Novel Biomarker for Early Breast Cancer Detection. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 1757–1766. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0654>
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L.G., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., Thomson, A.W., 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257–3266. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>
- Morin, R.D., Assouline, S., Alcaide, M., Mohajeri, A., Johnston, R.L., Chong, L., Grewal, J., Yu, S., Fornika, D., Bushell, K., Nielsen, T.H., Petrogiannis-Haliotis, T., Crump, M., Tosikyan, A., Grande, B.M., MacDonald, D., Rousseau, C., Bayat, M., Sesques, P., Froment, R., Albuquerque, M., Monczak, Y., Oros, K.K., Greenwood, C., Riazalhosseini, Y., Arseneault, M., Camlioglu, E., Constantin, A., Pan-Hammarstrom, Q., Peng, R., Mann, K.K., Johnson, N.A., 2016. Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 2290–2300. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2123>
- Morotti, A., Mila, S., Accornero, P., Tagliabue, E., Ponzetto, C., 2002. K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene* 21, 4885–4893. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205622>

- Mukherjee, S., Maxfield, F.R., 2004. Lipid and cholesterol trafficking in NPC. *Biochim. Biophys. Acta* 1685, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.009>
- Muller, L., Hong, C.-S., Stolz, D.B., Watkins, S.C., Whiteside, T.L., 2014. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J. Immunol. Methods* 411, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.06.007>
- Muller, L., Simms, P., Hong, C.-S., Nishimura, M.I., Jackson, E.K., Watkins, S.C., Whiteside, T.L., 2017. Human tumor-derived exosomes (TEX) regulate Treg functions via cell surface signaling rather than uptake mechanisms. *Oncoimmunology* 6, e1261243. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1261243>
- Muppidi, J.R., Schmitz, R., Green, J.A., Xiao, W., Larsen, A.B., Braun, S.E., An, J., Xu, Y., Rosenwald, A., Ott, G., Gascoyne, R.D., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Delabie, J., Smeland, E.B., Braziel, R.M., Tubbs, R.R., Cook, J.R., Weisenburger, D.D., Chan, W.C., Vaidehi, N., Staudt, L.M., Cyster, J.G., 2014. Loss of signalling via Gα13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature* 516, 254–258. <https://doi.org/10.1038/nature13765>
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00078-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00078-7)
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., Honjo, T., 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18470>
- Nabhan, C., Kay, N.E., 2011. The emerging role of ofatumumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Med. Insights Oncol.* 5, 45–53. <https://doi.org/10.4137/CMO.S4087>
- Nagarajah, S., 2016. Exosome Secretion - More Than Simple Waste Disposal? Implications for Physiology, Diagnostics and Therapeutics. *J. Circ. Biomark.* 5, 7. <https://doi.org/10.5772/62975>
- Nakagawara, A., Liu, X.G., Ikegaki, N., White, P.S., Yamashiro, D.J., Nycum, L.M., Biegel, J.A., Brodeur, G.M., 1995. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics* 25, 538–546. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80055-q](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80055-q)
- Navarro-Tableros, V., Gomez, Y., Camussi, G., Brizzi, M.F., 2018. Extracellular Vesicles: New Players in Lymphomas. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20010041>
- Necochea-Campion, R. de, Gonda, A., Kabagwira, J., Mirshahidi, S., Cao, H., Reeves, M.E., Wall, N.R., 2018. A practical approach to extracellular vesicle characterization among similar biological samples. *Biomed. Phys. Eng. Express* 4, 065013. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/aad6d8>
- Nemazee, D.A., Bürki, K., 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337, 562–566. <https://doi.org/10.1038/337562a0>
- Ngo, V.N., Davis, R.E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., Lenz, G., Lam, L.T., Dave, S., Yang, L., Powell, J., Staudt, L.M., 2006. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 441, 106–110. <https://doi.org/10.1038/nature04687>

- Ngo, V.N., Young, R.M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K.-H., Kohlhammer, H., Xu, W., Yang, Y., Zhao, H., Shaffer, A.L., Romesser, P., Wright, G., Powell, J., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Delabie, J., Smeland, E.B., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Tubbs, R.R., Cook, J.R., Weisenburger, D.D., Chan, W.C., Staudt, L.M., 2011. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470, 115–119. <https://doi.org/10.1038/nature09671>
- Nogai, H., Dörken, B., Lenz, G., 2011. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 1803–1811. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.3252>
- Noren Hooten, N., Evans, M.K., 2020. Extracellular vesicles as signaling mediators in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 318, C1189–C1199. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00536.2019>
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., Hempstead, B.L., Petersen, C.M., 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843–848. <https://doi.org/10.1038/nature02319>
- Oflazoglu, E., Audoly, L.P., 2010. Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology. *mAbs* 2, 14–19. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.1.10789>
- Ogawa, Y., Miura, Y., Harazono, A., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., Yamaguchi, T., Toda, T., Endo, T., Tsubuki, M., Yanoshita, R., 2011. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 13–23. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.13>
- Oksvold, M.P., Kullmann, A., Forfang, L., Kierulf, B., Li, M., Brech, A., Vlassov, A.V., Smeland, E.B., Neuraater, A., Pedersen, K.W., 2014. Expression of B-cell surface antigens in subpopulations of exosomes released from B-cell lymphoma cells. *Clin. Ther.* 36, 847-862.e1. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.05.010>
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M.C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L.F., Thery, C., 2010. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* 12, 19–30; sup pp 1-13. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>
- Ozçelik, T., Rosenthal, A., Francke, U., 1991. Chromosomal mapping of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 genes in man and mouse. *Genomics* 10, 569–575. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90437-j](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90437-j)
- Palade, G.E., 1955. A small particulate component of the cytoplasm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 59–68. <https://doi.org/10.1083/jcb.1.1.59>
- Pan, B.T., Johnstone, R.M., 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967–978. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., Johnstone, R.M., 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101, 942–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942>
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., Lu, B., 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential

- for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.1100135>
- Pant, S., Hilton, H., Burczynski, M.E., 2012. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1484–1494. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.037>
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Mito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., Fais, S., 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 284, 34211–34222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041152>
- Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H.C., Nussenzweig, M.C., Dalla-Favera, R., 2008. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat. Genet.* 40, 108–112. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.35>
- Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S.V., Aster, J.C., Murty, V.V., Shipp, M.A., Dalla-Favera, R., 2006. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 203, 311–317. <https://doi.org/10.1084/jem.20052204>
- Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R., 2018. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 131, 2307–2319. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-764332>
- Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R., 2015. The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin. Hematol.* 52, 67–76. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2015.01.005>
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., Dalla-Favera, R., 1998. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11816–11821. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11816>
- Patapoutian, A., Reichardt, L.F., 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 272–280. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00208-7](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00208-7)
- Pavlasova, G., Mraz, M., 2020. The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica* 105, 1494–1506. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.243543>
- Pérez-Callejo, D., González-Rincón, J., Sánchez, A., Provencio, M., Sánchez-Beato, M., 2015. Action and resistance of monoclonal CD20 antibodies therapy in B-cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancer Treat. Rev.* 41, 680–689. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.05.007>
- Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J., Yáñez-Mó, M., 2013. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem.* 288, 11649–11661. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445304>
- Peters, P.J., Geuze, H.J., Van der Donk, H.A., Slot, J.W., Griffith, J.M., Stam, N.J., Clevers, H.C., Borst, J., 1989. Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 19, 1469–1475. <https://doi.org/10.1002/eji.1830190819>

- Petrie, R.J., Deans, J.P., 2002. Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 2886–2891. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.2886>
- Pfeffer, S.R., 1999. Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* 1, E17–22. <https://doi.org/10.1038/8967>
- Pfeifer, M., Grau, M., Lenze, D., Wenzel, S.-S., Wolf, A., Wollert-Wulf, B., Dietze, K., Nogai, H., Storek, B., Madle, H., Dörken, B., Janz, M., Dirnhofer, S., Lenz, P., Hummel, M., Tzankov, A., Lenz, G., 2013. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12420–12425. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305656110>
- Pfreundschuh, M., Trümper, L., Kloess, M., Schmits, R., Feller, A.C., Rube, C., Rudolph, C., Reiser, M., Hossfeld, D.K., Eimermacher, H., Hasenclever, D., Schmitz, N., Loeffler, M., German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group, 2004. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood* 104, 634–641. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2095>
- Pierpont, T.M., Limper, C.B., Richards, K.L., 2018. Past, Present, and Future of Rituximab—The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front. Oncol.* 8, 163. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00163>
- Piper, R.C., Lehner, P.J., 2011. Endosomal transport via ubiquitination. *Trends Cell Biol.* 21, 647–655. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.08.007>
- Pisitkun, T., Shen, R.-F., Knepper, M.A., 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13368–13373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101>
- Platta, H.W., Stenmark, H., 2011. Endocytosis and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.03.008>
- Polito, L., Bortolotti, M., Maiello, S., Battelli, M.G., Bolognesi, A., 2014. Rituximab and Other New Anti-CD20 MAbs for Non-Hodgkin's Lymphoma Treatment. *Eur. Med. J. Oncol.* 2.
- Pols, M.S., Klumperman, J., 2009. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* 315, 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>
- Polyak, M.J., Li, H., Shariat, N., Deans, J.P., 2008. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 18545–18552. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800784200>
- Prevodnik, V.K., Lavrenčak, J., Horvat, M., Novaković, B.J., 2011. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. *Diagn. Pathol.* 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-6-33>
- Provencio, M., Rodríguez, M., Cantos, B., Sabín, P., Quero, C., García-Arroyo, F.R., Rueda, A., Maximiano, C., Rodríguez-Abreu, D., Sánchez, A., Silva, J., García, V., 2017. mRNA in exosomes as a liquid biopsy in non-Hodgkin Lymphoma: a multicentric study by the Spanish Lymphoma Oncology Group. *Oncotarget* 8, 50949–50957. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16435>
- Pyrzynska, B., Dwojak, M., Zerrouqi, A., Morlino, G., Zapala, P., Miazek, N., Zagodzón, A., Bojarczuk, K., Bobrowicz, M., Siernicka, M., Machnicki, M.M., Gobessi, S.,

- Barankiewicz, J., Lech-Maranda, E., Efremov, D.G., Juszczynski, P., Calado, D., Golab, J., Winiarska, M., 2018. FOXO1 promotes resistance of non-Hodgkin lymphomas to anti-CD20-based therapy. *Oncoimmunology* 7, e1423183. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1423183>
- Rahmé, R., Benayoun, E., Pautas, C., Cordonnier, C., Wagner-Ballon, O., Maury, S., 2013. Treatment with 5-azacytidin upregulates the expression of CD20 in CD20-negative B cell acute lymphoblastic leukemia: a case report. *Exp. Hematol.* 41, 505–507. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.02.011>
- Raiborg, C., Bache, K.G., Mehlum, A., Stenmark, H., 2001. Function of Hrs in endocytic trafficking and signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 472–475. <https://doi.org/10.1042/bst0290472>
- Raiborg, C., Stenmark, H., 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445–452. <https://doi.org/10.1038/nature07961>
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C., 2004. AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118, 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.006>
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., Geuze, H.J., 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183, 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Raposo, G., Stoorvogel, W., 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., Desaymard, C., 1997. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol. Biol. Cell* 8, 2631–2645. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.12.2631>
- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., Silvente-Poirot, S., 2014. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 108–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.10.004>
- Record, M., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., Wakelam, M.J.O., 2018. Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *J. Lipid Res.* 59, 1316–1324. <https://doi.org/10.1194/jlr.E086173>
- Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., 2011. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem. Pharmacol.* 81, 1171–1182. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.02.011>
- Reddy, A., Zhang, J., Davis, N.S., Moffitt, A.B., Love, C.L., Waldrop, A., Leppa, S., Pasanen, A., Meriranta, L., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Nørgaard, P., Pedersen, M., Gang, A.O., Høgdall, E., Heavican, T.B., Lone, W., Iqbal, J., Qin, Q., Li, G., Kim, S.Y., Healy, J., Richards, K.L., Fedoriw, Y., Bernal-Mizrachi, L., Koff, J.L., Staton, A.D., Flowers, C.R., Paltiel, O., Goldschmidt, N., Calaminici, M., Clear, A., Gribben, J., Nguyen, E., Czader, M.B., Ondrejka, S.L., Collie, A., Hsi, E.D., Tse, E., Au-Yeung, R.K.H., Kwong, Y.-L., Srivastava, G., Choi, W.W.L., Evens, A.M., Pilichowska, M., Sengar, M., Reddy, N., Li, S., Chadburn, A., Gordon, L.I., Jaffe, E.S., Levy, S., Rempel, R., Tzeng, T., Happ, L.E., Dave, T., Rajagopalan, D., Datta, J., Dunson, D.B., Dave, S.S., 2017.

- Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell* 171, 481-494.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.027>
- Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., Anderson, D.R., 1994. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83, 435–445.
- Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1545–1564. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
- Rezvani, A.R., Maloney, D.G., 2011. Rituximab resistance. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 24, 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2011.02.009>
- Rialland, P., Lankar, D., Raposo, G., Bonnerot, C., Hubert, P., 2006. BCR-bound antigen is targeted to exosomes in human follicular lymphoma B-cells. *Biol. Cell* 98, 491–501. <https://doi.org/10.1042/BC20060027>
- Ribeiro, M.L., Reyes-Garau, D., Armengol, M., Fernández-Serrano, M., Roué, G., 2019. Recent Advances in the Targeting of Epigenetic Regulators in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Front. Genet.* 10, 986. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00986>
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C.M., Blendy, J.A., Ginty, D.D., 1999. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286, 2358–2361. <https://doi.org/10.1126/science.286.5448.2358>
- Rimsza, L.M., Roberts, R.A., Miller, T.P., Unger, J.M., LeBlanc, M., Braziel, R.M., Weisenberger, D.D., Chan, W.C., Muller-Hermelink, H.K., Jaffe, E.S., Gascoyne, R.D., Campo, E., Fuchs, D.A., Spier, C.M., Fisher, R.I., Delabie, J., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Grogan, T.M., 2004. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 103, 4251–4258. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2365>
- Robbins, P.D., Morelli, A.E., 2014. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 195–208. <https://doi.org/10.1038/nri3622>
- Rolink, A.G., Andersson, J., Melchers, F., 2004. Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development. *Immunol. Rev.* 197, 41–50. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0101.x>
- Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K.W., Konnerth, A., 2003. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426, 74–78. <https://doi.org/10.1038/nature01983>
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltane, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Powell, J., Duffey, P.L., Longo, D.L., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Montserrat, E., López-Guillermo, A., Grogan, T.M., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T., Staudt, L.M., Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project, 2002. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 346, 1937–1947. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012914>

- Roviello, G., D'Angelo, A., Sciortino, M., Mini, E., Nobili, S., De Logu, F., Massi, D., 2020. TRK fusion positive cancers: From first clinical data of a TRK inhibitor to future directions. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 152, 103011. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103011>
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G., Schlessinger, J., Pawson, T., 1992. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360, 689–692. <https://doi.org/10.1038/360689a0>
- Ruiz-Martinez, M., Navarro, A., Marrades, R.M., Viñolas, N., Santasusagna, S., Muñoz, C., Ramírez, J., Molins, L., Monzo, M., 2016. YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7, 51515–51524. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9862>
- Rutherford, S.C., Fachel, A.A., Li, S., Sawh, S., Muley, A., Ishii, J., Saxena, A., Dominguez, P.M., Caldas Lopes, E., Agirre, X., Chambwe, N., Correa, F., Jiang, Y., Richards, K.L., Betel, D., Shaknovich, R., 2018. Extracellular vesicles in DLBCL provide abundant clues to aberrant transcriptional programming and genomic alterations. *Blood* 132, e13–e23. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-821843>
- Safaei, R., Larson, B.J., Cheng, T.C., Gibson, M.A., Otani, S., Naerdemann, W., Howell, S.B., 2005. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 4, 1595–1604. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0102>
- Sagar, G., Sah, R.P., Javeed, N., Dutta, S.K., Smyrk, T.C., Lau, J.S., Giorgadze, N., Tchkonina, T., Kirkland, J.L., Chari, S.T., Mukhopadhyay, D., 2016. Pathogenesis of pancreatic cancer exosome-induced lipolysis in adipose tissue. *Gut* 65, 1165–1174. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308350>
- Saunderson, S.C., Schuberth, P.C., Dunn, A.C., Miller, L., Hock, B.D., MacKay, P.A., Koch, N., Jack, R.W., McLellan, A.D., 2008. Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 8146–8152. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.8146>
- Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., Colombo, M.I., 2005. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic Cph. Den.* 6, 131–143. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00257.x>
- Schmidt, M.H.H., Hoeller, D., Yu, J., Furnari, F.B., Cavenee, W.K., Dikic, I., Böglér, O., 2004. Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8981–8993. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.20.8981-8993.2004>
- Schmitz, R., Wright, G.W., Huang, D.W., Johnson, C.A., Phelan, J.D., Wang, J.Q., Roulland, S., Kasbekar, M., Young, R.M., Shaffer, A.L., Hodson, D.J., Xiao, W., Yu, X., Yang, Y., Zhao, H., Xu, W., Liu, X., Zhou, B., Du, W., Chan, W.C., Jaffe, E.S., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Campo, E., Lopez-Guillermo, A., Rosenwald, A., Ott, G., Delabie, J., Rimsza, L.M., Tay Kuang Wei, K., Zelenetz, A.D., Leonard, J.P., Bartlett, N.L., Tran, B., Shetty, J., Zhao, Y., Soppet, D.R., Pittaluga, S., Wilson, W.H., Staudt, L.M., 2018. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 378, 1396–1407. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801445>
- Scott, D.W., Mottok, A., Ennishi, D., Wright, G.W., Farinha, P., Ben-Neriah, S., Kridel, R., Barry, G.S., Hother, C., Abrisqueta, P., Boyle, M., Meissner, B., Telenius, A., Savage, P.

- K.J., Sehn, L.H., Slack, G.W., Steidl, C., Staudt, L.M., Connors, J.M., Rimsza, L.M., Gascoyne, R.D., 2015. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 2848–2856. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.2383>
- Scott, D.W., Wright, G.W., Williams, P.M., Lih, C.-J., Walsh, W., Jaffe, E.S., Rosenwald, A., Campo, E., Chan, W.C., Connors, J.M., Smeland, E.B., Mottok, A., Braziel, R.M., Ott, G., Delabie, J., Tubbs, R.R., Cook, J.R., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Glinzmann-Gibson, B.J., Fu, K., Staudt, L.M., Gascoyne, R.D., Rimsza, L.M., 2014. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 123, 1214–1217. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-536433>
- Segura, E., Guérin, C., Hogg, N., Amigorena, S., Théry, C., 2007. CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 1489–1496. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1489>
- Sehn, L.H., 2012. Paramount prognostic factors that guide therapeutic strategies in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2012, 402–409. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2012.1.402>
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chrétien, M., Murphy, R.A., 1996. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.* 314 (Pt 3), 951–960. <https://doi.org/10.1042/bj3140951>
- Seyfizadeh, Narges, Seyfizadeh, Nayer, Hasenkamp, J., Huerta-Yepez, S., 2016. A molecular perspective on rituximab: A monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 97, 275–290. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.09.001>
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltnane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., Staudt, L.M., 2002. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51–62. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00335-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00335-7)
- Shaknovich, R., Melnick, A., 2011. Epigenetics and B-cell lymphoma. *Curr. Opin. Hematol.* 18, 293–299. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834788cf>
- Shan, D., Ledbetter, J.A., Press, O.W., 2000. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 48, 673–683. <https://doi.org/10.1007/s002620050016>
- Shields, S.B., Piper, R.C., 2011. How ubiquitin functions with ESCRTs. *Traffic Cph. Den.* 12, 1306–1317. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01242.x>
- Shimizu, R., Kikuchi, J., Wada, T., Ozawa, K., Kano, Y., Furukawa, Y., 2010. HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells. *Leukemia* 24, 1760–1768. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.157>
- Shinohara, H., Kuranaga, Y., Kumazaki, M., Sugito, N., Yoshikawa, Y., Takai, T., Taniguchi, K., Ito, Y., Akao, Y., 2017. Regulated Polarization of Tumor-Associated Macrophages by miR-145 via Colorectal Cancer-Derived Extracellular Vesicles. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 199, 1505–1515. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700167>

- Singh, V., Gupta, D., Almasan, A., 2015. Development of Novel Anti-Cd20 Monoclonal Antibodies and Modulation in Cd20 Levels on Cell Surface: Looking to Improve Immunotherapy Response. *J. Cancer Sci. Ther.* 7, 347–358. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000373>
- Siomi, H., Siomi, M.C., 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457, 396–404. <https://doi.org/10.1038/nature07754>
- Skaper, S.D., 2018. Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1727, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_1
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., Breakefield, X.O., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>
- Skotland, T., Sandvig, K., Llorente, A., 2017. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* 66, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>
- Słabicki, M., Lee, K.S., Jethwa, A., Sellner, L., Sacco, F., Walther, T., Hüllelein, J., Dietrich, S., Wu, B., Lipka, D.B., Oakes, C.C., Mamidi, S., Pyrzyńska, B., Winiarska, M., Oleś, M., Seifert, M., Plass, C., Kirschfink, M., Boettcher, M., Gołąb, J., Huber, W., Fröhling, S., Zenz, T., 2016. Dissection of CD20 regulation in lymphoma using RNAi. *Leukemia* 30, 2409–2412. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.230>
- Sonoki, T., Li, Y., Miyanishi, S., Nakamine, H., Hanaoka, N., Matsuoka, H., Mori, I., Nakakuma, H., 2009. Establishment of a novel CD20 negative mature B-cell line, WILL2, from a CD20 positive diffuse large B-cell lymphoma patient treated with rituximab. *Int. J. Hematol.* 89, 400–402. <https://doi.org/10.1007/s12185-009-0295-4>
- Stashenko, P., Nadler, L.M., Hardy, R., Schlossman, S.F., 1980. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 125, 1678–1685.
- Stebegg, M., Kumar, S.D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V.R., Linterman, M.A., Graca, L., 2018. Regulation of the Germinal Center Response. *Front. Immunol.* 9, 2469. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>
- Steinhardt, J.J., Gartenhaus, R.B., 2012. Promising personalized therapeutic options for diffuse large B-cell Lymphoma Subtypes with oncogene addictions. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 4538–4548. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0217>
- Stoilov, P., Castren, E., Stamm, S., 2002. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1054–1065. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6301>
- Street, J.M., Barran, P.E., Mackay, C.L., Weidt, S., Balmforth, C., Walsh, T.S., Chalmers, R.T.A., Webb, D.J., Dear, J.W., 2012. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J. Transl. Med.* 10, 5. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-5>
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., Brech, A., 2009. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic Cph. Den.* 10, 925–937. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>
- Sugimoto, T., Tomita, A., Hiraga, J., Shimada, K., Kiyoi, H., Kinoshita, T., Naoe, T., 2009. Escape mechanisms from antibody therapy to lymphoma cells: downregulation of CD20

- mRNA by recruitment of the HDAC complex and not by DNA methylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.059>
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., Jaffe, E.S., 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
- Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., Baran, J., 2017. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>
- Szöllösi, J., Horejsí, V., Bene, L., Angelisová, P., Damjanovich, S., 1996. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 157, 2939–2946.
- Takei, K., Yamazaki, T., Sawada, U., Ishizuka, H., Aizawa, S., 2006. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leuk. Res.* 30, 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2005.09.008>
- Tam, W., Gomez, M., Chadburn, A., Lee, J.W., Chan, W.C., Knowles, D.M., 2006. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 107, 4090–4100. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3778>
- Tapley, P., Lamballe, F., Barbacid, M., 1992. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7, 371–381.
- Taylor, D.D., Gercel-Taylor, C., 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 110, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.04.033>
- Taylor, R.P., Lindorfer, M.A., 2015. Fcγ-receptor-mediated trogocytosis impacts mAb-based therapies: historical precedence and recent developments. *Blood* 125, 762–766. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-569244>
- Tedder, T.F., Engel, P., 1994. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol. Today* 15, 450–454. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90276-3](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90276-3)
- Tedder, T.F., Klejman, G., Schlossman, S.F., Saito, H., 1989. Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 142, 2560–2568.
- Tedder, T.F., Schlossman, S.F., 1988. Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 10009–10015.
- Teeling, J.L., Mackus, W.J.M., Wiegman, L.J.J.M., van den Brakel, J.H.N., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., Parren, P.W.H.I., Glennie, M.J., van de Winkel, J.G.J., 2006. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 362–371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.362>
- Testoni, M., Zucca, E., Young, K.H., Bertoni, F., 2015. Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 1069–1080. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv019>

- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A., 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3, Unit 3.22. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., Ayre, D.C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N.N., Baxter, A.A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A.C., Bergese, P., Bielska, E., Blenkiron, C., Bobis-Wozowicz, S., Boilard, E., Boireau, W., Bongiovanni, A., Borràs, F.E., Bosch, S., Boulanger, C.M., Breakefield, X., Breglio, A.M., Brennan, M.Á., Brigstock, D.R., Brisson, A., Broekman, M.L., Bromberg, J.F., Bryl-Górecka, P., Buch, S., Buck, A.H., Burger, D., Busatto, S., Buschmann, D., Bussolati, B., Buzás, E.I., Byrd, J.B., Camussi, G., Carter, D.R., Caruso, S., Chamley, L.W., Chang, Y.-T., Chen, C., Chen, S., Cheng, L., Chin, A.R., Clayton, A., Clerici, S.P., Cocks, A., Cocucci, E., Coffey, R.J., Cordeiro-da-Silva, A., Couch, Y., Coumans, F.A., Coyle, B., Crescitelli, R., Criado, M.F., D’Souza-Schorey, C., Das, S., Datta Chaudhuri, A., de Candia, P., De Santana, E.F., De Wever, O., Del Portillo, H.A., Demaret, T., Deville, S., Devitt, A., Dhondt, B., Di Vizio, D., Dieterich, L.C., Dolo, V., Dominguez Rubio, A.P., Dominici, M., Dourado, M.R., Driedonks, T.A., Duarte, F.V., Duncan, H.M., Eichenberger, R.M., Ekström, K., El Andaloussi, S., Elie-Caille, C., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J.M., Fatima, F., Fish, J.E., Flores-Bellver, M., Försonits, A., Frelet-Barrand, A., Fricke, F., Fuhrmann, G., Gabrielsson, S., Gámez-Valero, A., Gardiner, C., Gärtner, K., Gaudin, R., Ghossein, Y.S., Giebel, B., Gilbert, C., Gimona, M., Giusti, I., Goberdhan, D.C., Görgens, A., Gorski, S.M., Greening, D.W., Gross, J.C., Gualerzi, A., Gupta, G.N., Gustafson, D., Handberg, A., Haraszti, R.A., Harrison, P., Hegyesi, H., Hendrix, A., Hill, A.F., Hochberg, F.H., Hoffmann, K.F., Holder, B., Holthofer, H., Hosseinkhani, B., Hu, G., Huang, Y., Huber, V., Hunt, S., Ibrahim, A.G.-E., Ikezu, T., Inal, J.M., Isin, M., Ivanova, A., Jackson, H.K., Jacobsen, S., Jay, S.M., Jayachandran, M., Jenster, G., Jiang, L., Johnson, S.M., Jones, J.C., Jong, A., Jovanovic-Talisman, T., Jung, S., Kalluri, R., Kano, S.-I., Kaur, S., Kawamura, Y., Keller, E.T., Khamari, D., Khomyakova, E., Khvorova, A., Kierulf, P., Kim, K.P., Kislinger, T., Klingeborn, M., Klinker, D.J., Kornek, M., Kosanović, M.M., Kovács, Á.F., Krämer-Albers, E.-M., Krasemann, S., Krause, M., Kurochkin, I.V., Kusuma, G.D., Kuypers, S., Laitinen, S., Langevin, S.M., Languino, L.R., Lannigan, J., Lässer, C., Laurent, L.C., Lavie, G., Lázaro-Ibáñez, E., Le Lay, S., Lee, M.-S., Lee, Y.X.F., Lemos, D.S., Lenassi, M., Leszczynska, A., Li, I.T., Liao, K., Libregts, S.F., Ligeti, E., Lim, R., Lim, S.K., Linē, A., Linnemannstöns, K., Llorente, A., Lombard, C.A., Lorenowicz, M.J., Lörincz, Á.M., Lötvall, J., Lovett, J., Lowry, M.C., Loyer, X., Lu, Q., Lukomska, B., Lunavat, T.R., Maas, S.L., Malhi, H., Marcilla, A., Mariani, J., Mariscal, J., Martens-Uzunova, E.S., Martin-Jaular, L., Martinez, M.C., Martins, V.R., Mathieu, M., Mathivanan, S., Maugeri, M., McGinnis, L.K., McVey, M.J., Meckes, D.G., Meehan, K.L., Mertens, I., Minciacchi, V.R., Möller, A., Møller Jørgensen, M., Morales-Kastresana, A., Morhayim, J., Mullier, F., Muraca, M., Musante, L., Mussack, V., Muth, D.C., Myburgh, K.H., Najrana, T., Nawaz, M., Nazarenko, I., Nejsum, P., Neri, C., Neri, T., Nieuwland, R., Nimrichter, L., Nolan, J.P., Nolte-’t Hoen, E.N., Noren Hooten, N., O’Driscoll, L., O’Grady, T., O’Loghlen, A., Ochiya, T., Olivier, M., Ortiz, A., Ortiz, L.A., Osteikoetxea, X., Østergaard, O., Ostrowski, M., Park, J., Pegtel, D.M., Peinado, H., Perut, F., Pfaffl, M.W., Phinney, D.G., Pieters, B.C., Pink, R.C.,

- Pisetsky, D.S., Pogge von Strandmann, E., Polakovicova, I., Poon, I.K., Powell, B.H., Prada, I., Pulliam, L., Quesenberry, P., Radeghieri, A., Raffai, R.L., Raimondo, S., Rak, J., Ramirez, M.I., Raposo, G., Rayyan, M.S., Regev-Rudzki, N., Ricklefs, F.L., Robbins, P.D., Roberts, D.D., Rodrigues, S.C., Rohde, E., Rome, S., Rouschop, K.M., Rughetti, A., Russell, A.E., Saá, P., Sahoo, S., Salas-Huenuleo, E., Sánchez, C., Saugstad, J.A., Saul, M.J., Schiffelers, R.M., Schneider, R., Schøyen, T.H., Scott, A., Shahaj, E., Sharma, S., Shatnyeva, O., Shekari, F., Shelke, G.V., Shetty, A.K., Shiba, K., Siljander, P.R.-M., Silva, A.M., Skowronek, A., Snyder, O.L., Soares, R.P., Sódar, B.W., Soekmadji, C., Sotillo, J., Stahl, P.D., Stoorvogel, W., Stott, S.L., Strasser, E.F., Swift, S., Tahara, H., Tewari, M., Timms, K., Tiwari, S., Tixeira, R., Tkach, M., Toh, W.S., Tomasini, R., Torrecilhas, A.C., Tosar, J.P., Toxavidis, V., Urbanelli, L., Vader, P., van Balkom, B.W., van der Grein, S.G., Van Deun, J., van Herwijnen, M.J., Van Keuren-Jensen, K., van Niel, G., van Royen, M.E., van Wijnen, A.J., Vasconcelos, M.H., Vechetti, I.J., Veit, T.D., Vella, L.J., Velot, É., Verweij, F.J., Vestad, B., Viñas, J.L., Visnovitz, T., Vukman, K.V., Wahlgren, J., Watson, D.C., Wauben, M.H., Weaver, A., Webber, J.P., Weber, V., Wehman, A.M., Weiss, D.J., Welsh, J.A., Wendt, S., Wheelock, A.M., Wiener, Z., Witte, L., Wolfram, J., Xagorari, A., Xander, P., Xu, J., Yan, X., Yáñez-Mó, M., Yin, H., Yuana, Y., Zappulli, V., Zarubova, J., Žekas, V., Zhang, J.-Y., Zhao, Z., Zheng, L., Zheutlin, A.R., Zickler, A.M., Zimmermann, P., Zivkovic, A.M., Zocco, D., Zuba-Surma, E.K., 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* 7, 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thévenin, C., Lucas, B.P., Kozlow, E.J., Kehrl, J.H., 1993. Cell type- and stage-specific expression of the CD20/B1 antigen correlates with the activity of a diverged octamer DNA motif present in its promoter. *J. Biol. Chem.* 268, 5949–5956.
- Thompson, C.A., Purushothaman, A., Ramani, V.C., Vlodaysky, I., Sanderson, R.D., 2013. Heparanase regulates secretion, composition, and function of tumor cell-derived exosomes. *J. Biol. Chem.* 288, 10093–10099. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.444562>
- Tian, T., Zhu, Y.-L., Hu, F.-H., Wang, Y.-Y., Huang, N.-P., Xiao, Z.-D., 2013. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J. Cell. Physiol.* 228, 1487–1495. <https://doi.org/10.1002/jcp.24304>
- Tkach, M., Kowal, J., Théry, C., 2018. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 373. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0479>
- Tkach, M., Théry, C., 2016. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164, 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>
- Tomita, A., 2016. Genetic and Epigenetic Modulation of CD20 Expression in B-Cell Malignancies: Molecular Mechanisms and Significance to Rituximab Resistance. *J. Clin. Exp. Hematop. JCEH* 56, 89–99. <https://doi.org/10.3960/jslrt.56.89>
- Tomita, A., Hiraga, J., Kiyoi, H., Ninomiya, M., Sugimoto, T., Ito, M., Kinoshita, T., Naoe, T., 2007. 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.* 86, 49–57. <https://doi.org/10.1532/IJH97.07028>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., Simons, M., 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into

- multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244–1247.
<https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Tricarico, C., Clancy, J., D’Souza-Schorey, C., 2017. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* 8, 220–232.
<https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283>
- Trinh, D.L., Scott, D.W., Morin, R.D., Mendez-Lago, M., An, J., Jones, S.J.M., Mungall, A.J., Zhao, Y., Schein, J., Steidl, C., Connors, J.M., Gascoyne, R.D., Marra, M.A., 2013. Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 121, 3666–3674. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-479865>
- Uchida, J., Lee, Y., Hasegawa, M., Liang, Y., Bradney, A., Oliver, J.A., Bowen, K., Steeber, D.A., Haas, K.M., Poe, J.C., Tedder, T.F., 2004. Mouse CD20 expression and function. *Int. Immunol.* 16, 119–129. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh009>
- Unruh, T.L., Li, H., Mutch, C.M., Shariat, N., Grigoriou, L., Sanyal, R., Brown, C.B., Deans, J.P., 2005. Cholesterol depletion inhibits src family kinase-dependent calcium mobilization and apoptosis induced by rituximab crosslinking. *Immunology* 116, 223–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02213.x>
- Vaillant, A.R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 1999. Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J. Cell Biol.* 146, 955–966. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.955>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Valentine, M.A., Meier, K.E., Rossie, S., Clark, E.A., 1989. Phosphorylation of the CD20 phosphoprotein in resting B lymphocytes. Regulation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 264, 11282–11287.
- van der Kolk, L.E., Grillo-López, A.J., Baars, J.W., Hack, C.E., van Oers, M.H., 2001. Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *Br. J. Haematol.* 115, 807–811. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.03166.x>
- van Dommelen, S.M., Vader, P., Lakhal, S., Kooijmans, S. a. A., van Solinge, W.W., Wood, M.J.A., Schiffelers, R.M., 2012. Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 161, 635–644. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.021>
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., Raposo, G., 2011. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev. Cell* 21, 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., 2001. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337–349. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.26263>
- Vance, J.E., 2015. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic Cph. Den.* 16, 1–18. <https://doi.org/10.1111/tra.12230>
- Vega, J.A., García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M., Germanà, A., 2003. Neurotrophins and the immune system. *J. Anat.* 203, 1–19. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00203.x>

- Velichutina, I., Shaknovich, R., Geng, H., Johnson, N.A., Gascoyne, R.D., Melnick, A.M., Elemento, O., 2010. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood* 116, 5247–5255. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-280149>
- Verweij, F.J., Middeldorp, J.M., Pegtel, D.M., 2012. Intracellular signaling controlled by the endosomal-exosomal pathway. *Commun. Integr. Biol.* 5, 88–93. <https://doi.org/10.4161/cib.18452>
- Viardot, A., Goebeler, M.-E., Hess, G., Neumann, S., Pfreundschuh, M., Adrian, N., Zettl, F., Libicher, M., Sayehli, C., Stieglmaier, J., Zhang, A., Nagorsen, D., Bargou, R.C., 2016. Phase 2 study of the bispecific T-cell engager (BiTE) antibody blinatumomab in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 127, 1410–1416. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-651380>
- Viatour, P., Bentires-Alj, M., Chariot, A., Deregowski, V., de Leval, L., Merville, M.-P., Bours, V., 2003. NF- κ B/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia* 17, 1349–1356. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402982>
- Vietri, M., Radulovic, M., Stenmark, H., 2020. The many functions of ESCRTs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 25–42. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0177-4>
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F., 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4, 2980. <https://doi.org/10.1038/ncomms3980>
- Visco, C., Li, Y., Xu-Monette, Z.Y., Miranda, R.N., Green, T.M., Li, Y., Tzankov, A., Wen, W., Liu, W., Kahl, B.S., d'Amore, E.S.G., Montes-Moreno, S., Dybkær, K., Chiu, A., Tam, W., Orazi, A., Zu, Y., Bhagat, G., Winter, J.N., Wang, H.-Y., O'Neill, S., Dunphy, C.H., Hsi, E.D., Zhao, X.F., Go, R.S., Choi, W.W.L., Zhou, F., Czader, M., Tong, J., Zhao, X., van Krieken, J.H., Huang, Q., Ai, W., Ezzell, J., Ponzoni, M., Ferreri, A.J.M., Piris, M.A., Møller, M.B., Bueso-Ramos, C.E., Medeiros, L.J., Wu, L., Young, K.H., 2012. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia* 26, 2103–2113. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.83>
- Walshe, C.A., Beers, S.A., French, R.R., Chan, C.H.T., Johnson, P.W., Packham, G.K., Glennie, M.J., Cragg, M.S., 2008. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 16971–16984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708459200>
- Wandinger-Ness, A., Zerial, M., 2014. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a022616. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022616>
- Wang, L., Qin, W., Huo, Y.-J., Li, X., Shi, Q., Rasko, J.E.J., Janin, A., Zhao, W.-L., 2020. Advances in targeted therapy for malignant lymphoma. *Signal Transduct. Target. Ther.* 5, 15. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0113-2>
- Wang, W., Lotze, M.T., 2014. Good things come in small packages: exosomes, immunity and cancer. *Cancer Gene Ther.* 21, 139–141. <https://doi.org/10.1038/cgt.2014.14>

- Weiner, G.J., 2010. Rituximab: mechanism of action. *Semin. Hematol.* 47, 115–123. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.01.011>
- White, I.J., Bailey, L.M., Aghakhani, M.R., Moss, S.E., Futter, C.E., 2006. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *EMBO J.* 25, 1–12. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600759>
- Whiteside, T.L., 2018. Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. *Semin. Immunol.* 35, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.12.003>
- Wieckowski, E.U., Visus, C., Szajnik, M., Szczepanski, M.J., Storkus, W.J., Whiteside, T.L., 2009. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 3720–3730. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900970>
- Wilson, W.H., Young, R.M., Schmitz, R., Yang, Y., Pittaluga, S., Wright, G., Lih, C.-J., Williams, P.M., Shaffer, A.L., Gerecitano, J., de Vos, S., Goy, A., Kenkre, V.P., Barr, P.M., Blum, K.A., Shustov, A., Advani, R., Fowler, N.H., Vose, J.M., Elstrom, R.L., Habermann, T.M., Barrientos, J.C., McGreivy, J., Fardis, M., Chang, B.Y., Clow, F., Munneke, B., Moussa, D., Beaupre, D.M., Staudt, L.M., 2015. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Med.* 21, 922–926. <https://doi.org/10.1038/nm.3884>
- Winiarska, M., Bil, J., Nowis, D., Golab, J., 2010. Proteolytic pathways involved in modulation of CD20 levels. *Autophagy* 6, 810–812. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-244129>
- Winiarska, M., Bojarczuk, K., Pyrzynska, B., Bil, J., Siernicka, M., Dwojak, M., Bobrowicz, M., Miazek, N., Zapala, P., Zagozdzon, A., Krol, M., Syta, A., Podszywalow-Bartnicka, P., Pilch, Z., Dabrowska-Iwanicka, A., Juszczyński, P., Efremov, D.G., Slabicki, M., Zenz, T., Le Roy, A., Olive, D., Rygiel, T.P., Leusen, J.H.W., Golab, J., 2014. Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *mAbs* 6, 1300–1313. <https://doi.org/10.4161/mabs.32106>
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S., Zitvogel, L., 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* 7, 297–303. <https://doi.org/10.1038/85438>
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., Hurley, J.H., 2009. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458, 172–177. <https://doi.org/10.1038/nature07836>
- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., Stoorvogel, W., 2003. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* 278, 10963–10972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207550200>
- Xia, B., Li, M., Yang, R., Wang, X., Shun, C., Zhang, Y., 2018. The central roles of exosomes in hematological malignancies: A new frontier review. *Biosci. Biotechnol. Res. Commun.* 11, 347–355. <https://doi.org/10.21786/bbrc/11.3/1>
- Xia, D., Li, W., Zhang, L., Qian, H., Yao, S., Qi, X., 2014. RNA interference-mediated knockdown of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes cell cycle arrest and apoptosis in B-cell lymphoma cells. *Neoplasma* 61, 523–532. https://doi.org/10.4149/neo_2014_064

- Xia, Y., Zhang, X., 2020. The Spectrum of MYC Alterations in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Acta Haematol.* 1–9. <https://doi.org/10.1159/000505892>
- Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L., Rajewsky, K., 2008. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat. Immunol.* 9, 405–414. <https://doi.org/10.1038/ni1575>
- Yamano, G., Funahashi, H., Kawanami, O., Zhao, L.X., Ban, N., Uchida, Y., Morohoshi, T., Ogawa, J., Shioda, S., Inagaki, N., 2001. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett.* 508, 221–225. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)03056-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03056-3)
- Ye, B.H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R.S., Rothman, P., Stall, A.M., Pandolfi, P.P., Dalla-Favera, R., 1997. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat. Genet.* 16, 161–170. <https://doi.org/10.1038/ng0697-161>
- Ying, C.Y., Dominguez-Sola, D., Fabi, M., Lorenz, I.C., Hussein, S., Bansal, M., Califano, A., Pasqualucci, L., Basso, K., Dalla-Favera, R., 2013. MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Immunol.* 14, 1084–1092. <https://doi.org/10.1038/ni.2688>
- Yu, S., Cao, H., Shen, B., Feng, J., 2015. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. *Oncotarget* 6, 37151–37168. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6022>
- Yu, S., Liu, C., Su, K., Wang, J., Liu, Y., Zhang, L., Li, C., Cong, Y., Kimberly, R., Grizzle, W.E., Falkson, C., Zhang, H.-G., 2007. Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 6867–6875. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6867>
- Zare, N., Haghjooy Javanmard, S.H., Mehrzad, V., Eskandari, N., Andalib, A.R., 2020. Effect of Plasma-Derived Exosomes of Refractory/Relapsed or Responsive Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma on Natural Killer Cells Functions. *Cell J.* 22, 40–54. <https://doi.org/10.22074/cellj.2020.6550>
- Zhang, J., Grubor, V., Love, C.L., Banerjee, A., Richards, K.L., Mieczkowski, P.A., Dunphy, C., Choi, W., Au, W.Y., Srivastava, G., Lugar, P.L., Rizzieri, D.A., Lagoo, A.S., Bernal-Mizrachi, L., Mann, K.P., Flowers, C., Naresh, K., Evens, A., Gordon, L.I., Czader, M., Gill, J.I., Hsi, E.D., Liu, Q., Fan, A., Walsh, K., Jima, D., Smith, L.L., Johnson, A.J., Byrd, J.C., Luftig, M.A., Ni, T., Zhu, J., Chadburn, A., Levy, S., Dunson, D., Dave, S.S., 2013. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1398–1403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205299110>
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., Mi, S., 2015. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., Reinberg, D., 1999. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* 13, 1924–1935. <https://doi.org/10.1101/gad.13.15.1924>

- Zhou, X., Hu, W., Qin, X., 2008. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *The Oncologist* 13, 954–966. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0089>
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Amigorena, S., 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* 4, 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>

Annexes

Annexe 1 : Les protéines de la famille ESCRT, leurs interactions et leurs fonctions au cours de l'invagination de la membrane de l'endosome multivésiculaire adapté de (Hurley and Hanson, 2010; Vietri et al., 2020)

| Activité ESCRT | Levure | Mammifères | Interaction | Fonction |
|------------------|--------------|--------------------------------|---|---|
| ESCRT-0 | Vps27 | HRS (HGS) | Interaction avec le Pi3P, ESCRT-I, l'ubiquitine et la clathrine | Regroupement des molécules à internaliser |
| | Hse1 | STAM1, STAM2 | Ubiquitine | |
| ESCRT-I | Vps23 | VPS23 (TSG101) | Interaction avec l'ubiquitine et ESCRT-0 | Bourgeonnement de la membrane avec ESCRT-II |
| | Vps28 | VPS28 | Interaction avec ESCRT-II | |
| | Vps37 | VPS37A, VPS37B, VPS37C, VPS37D | Interaction avec les membranes | |
| | Mvb12 | MVB12A ou B | Stabilise les oligomères d'ESCRT-I et interaction avec l'ubiquitine | |
| ESCRT-II | Vps22 | EAP30 | Interaction avec les membranes | Bourgeonnement de la membrane avec ESCRT-I |
| | Vps25 | EAP25 | Recrute ESCRT-III via l'interaction avec Vps20 | |
| | Vps36 | EAP45 | Interaction avec les membranes, l'ubiquitine et ESCRT-I | |
| ESCRT-III | Vps20 | CHMP6 | Initie l'assemblage ESCRT-III et la scission | Constriction et Scission de la membrane |
| | Snf7 (Vps32) | CHMP4A CHMP4B CHMP4C | Principal acteur de la scission membranaire, Interaction avec Alix | |
| | Vps24 | CHMP3 | Complète la scission membranaire | |
| | Vps2 | CHMP2A CHMP2B | Recrute Vps4 et initie la dissociation d'ESCRT-III | |

RESEARCH

Open Access



Prohibitin (PHB) expression is associated with aggressiveness in DLBCL and flavagline-mediated inhibition of cytoplasmic PHB functions induces anti-tumor effects

Hafidha Bentayeb¹, Marine Aitamer¹, Barbara Petit², Lydie Dubanet¹, Sabria Elderwish³, Laurent Désaubry^{3,4}, Armand de Gramont⁵, Eric Raymond^{5,6}, Agnès Olivrie⁷, Julie Abraham⁷, Marie-Odile Jauberteau^{1,8} and Danielle Troutaud^{1*}

Abstract

Background: Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) are aggressive lymphomas accounting for approximately a third of non-Hodgkin lymphomas. Prohibitin 1 (PHB1) and prohibitin 2 (PHB2) are scaffold proteins that promote mitochondria homeostasis and consequently cell survival, but biological functions of cytoplasmic PHBs remain largely unknown in DLBCL.

Methods: PHB expression was analyzed in 82 DLBCL biopsies and five DLBCL cell lines by immunohistochemistry (IHC) and Western blotting. Pharmacological inhibition of PHB using the synthetic flavagline FL3 was realized in vitro to gain insight PHB cellular functions. Effects of FL3 on DLBCL cell line viability, apoptosis, C-Raf-ERK-MNK-*elF4E* signaling pathway and *elF4F* complex formation and activity were evaluated by XTT assay, annexin V-FITC/*PI* dual staining and Western blotting respectively. Subcutaneous DLBCL xenograft model in SCID mice was also performed to determine in vivo FL3 effect.

Results: As in DLBCL cell lines, PHB1 and PHB2 were expressed in germinal center B-cell-like (GCB) and activated B-cell-like (ABC) subtypes. In patient samples, high PHB levels were associated with higher serum LDH (PHB1 and PHB2), *IP1aa* (PHB2), and Ki-67 (PHB2) expression. Higher PHB1 expression tends to be associated with shorter event-free survival (EFS) in patients, especially in male patients. FL3 induced apoptosis of DLBCL cell lines that was associated with inhibition of the ERK-MNK-*elF4E* signaling pathway, including aggressive double/triple-hit DLBCL cell lines. This resulted in altered *elF4F* complex formation and activity leading to a reduction of Bcl-2 and c-Myc expression levels. Moreover, FL3 strongly downregulated DLBCL cellular levels of Akt protein and *AKT* mRNA. FL3 antitumor activity was also confirmed in vivo in a murine xenograft model.

Conclusion: Our data indicate that PHB overexpression is associated with markers of tumor aggressiveness in DLBCL, and that targeting PHBs may be a therapeutic option, notably in aggressive subtypes.

Keywords: DLBCL, PHB, FL3, ERK signaling, Akt, Apoptosis

* Correspondence: danielle.troutaud@unilim.fr

¹EA3842, Université de Limoges, Limoges, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Résumé

Le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) est un des lymphomes B non-Hodgkiniens le plus agressif et le plus fréquent chez l'adulte avec deux sous-groupes principaux (GCB et ABC) sur le plan biologique et clinique. Malgré les avancées thérapeutiques apportées par l'immunochimiothérapie R-CHOP (anti-CD20, rituximab, associé à la chimiothérapie CHOP), 30 à 40 % des patients échappent ou sont réfractaires au traitement. Des données récentes montrent que des petites vésicules extracellulaires, « small EVs » libérées par les cellules de DLBCL portent l'antigène CD20 jouant le rôle de « récepteur leurre » vis-à-vis de l'immunothérapie. L'objectif de cette thèse était d'étudier la production de ces « small EVs », dont font parti les exosomes, de façon comparative par les cellules de type GCB et ABC, ainsi que leur rôle dans l'échappement des cellules tumorales à la cytotoxicité du rituximab dépendante de l'activation du complément (CDC). Nous avons de plus poursuivi les travaux précédents de l'équipe sur le rôle de la voie de signalisation BDNF/TrkB dans ce processus. Dans ce contexte, nous avons analysé la production des « small EVs », et leur niveau d'expression du CD20, par les cellules traitées avec un agoniste de TrkB, le 7,8-DHF. Aucune différence significative de taille et de concentration de ces vésicules des lignées de type GCB et ABC n'a été observée. Le niveau de CD20 dans les « small EVs » était corrélé à l'expression du CD20 membranaire des cellules parentales, indépendamment du sous-type de DLBCL. De manière intéressante, une expression plus élevée du CD20 au sein de ces vésicules et de la concentration en « small EVs » ont été observées dans les cultures traitées au 7,8-DHF comparativement aux cultures contrôles. Nous avons montré *in vitro* et *in vivo* (xénogreffe de SUDHL4 chez des souris SCID) que l'association de « small EVs » autologues ou hétérologues au rituximab protégeait les cellules tumorales et les tumeurs de la cytotoxicité du rituximab. De plus, la protection était significativement améliorée lorsque les exosomes étaient produits par des cellules traitées au 7,8-DHF. Enfin, une étude préliminaire a été initiée sur la signification clinique des « small EVs », dont les exosomes plasmatiques et leur niveau d'expression du CD20 chez des patients atteints de DLBCL comparativement à des volontaires sains (VS). Nous montrons pour la première fois dans le DLBCL une augmentation de leur concentration périphérique par rapport aux VS. L'ensemble des travaux confirment *in vivo* le rôle des « small EVs » dans l'échappement à l'immunothérapie des tumeurs de DLBCL, et mettent en évidence à travers la voie BDNF/TrkB l'influence de circuits de régulations sur ce processus. Finalement ils apportent des arguments sur l'utilisation potentielle des « small EVs », dont les exosomes, comme biomarqueurs non-invasifs de la charge tumorale et de l'expression de cibles thérapeutiques comme le CD20, dans le suivi de la maladie et l'orientation thérapeutique.

Mots-clés : DLBCL, small EVs, rituximab, TrkB, CD20

Abstract

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is one of the most aggressive and common non-Hodgkin B lymphomas in adults with two major biologically and clinically subgroups (GCB and ABC). Despite the therapeutic advances provided by R-CHOP immunochemotherapy (combination of an anti-CD20, rituximab, with CHOP chemotherapy), 30 to 40% of patients escape or are refractory to treatment. Recent data show that small extracellular vesicles, "small Evs", released by DLBCL cells carry the CD20 antigen playing as a "decoy receptor" for immunotherapy. The objective of this thesis was to study comparatively the production of these "small EVs" including exosomes, by GCB and ABC cell lines, as well as their role in the escape of tumor cells from complement dependent cytotoxicity (CDC) of rituximab. We have further extended the team's previous work in analyzing the role of the BDNF/TrkB pathway in this process. In this context, production of "small Evs" and their CD20 level were studied in cells treated or not with a TrkB agonist, 7,8-DHF. No significant difference in size and concentration of these vesicles of GCB and ABC type lines was observed. The level of CD20 in "small Evs" was correlated with CD20 surface expression in parental cells, independently of the DLBCL subtype. Interestingly, higher expression of CD20 within these vesicles and the concentration of "small Evs" were found in cultures treated with 7,8-DHF compared to control cultures. We demonstrated *in vitro* and *in vivo* (SUDHL4 xenograft in SCID mice) that combination of autologous or heterologous "small Evs" with rituximab protects tumor cells and tumors from the rituximab cytotoxicity. In addition, protection was significantly improved when "small Evs" were produced by cells treated with 7,8-DHF. Finally, a preliminary study was initiated on the clinical significance of plasma "small Evs" including exosomes, and their CD20 level in patients with DLBCL compared to healthy volunteers (VS). We show for the first time in DLBCL an increase in their peripheral concentration compared to VS. Altogether, our results confirm *in vivo* the role of "small Evs" in DLBCL cell evasion from immunotherapy that could be modulated by environmental factors as shown in the present study for BDNF/TrkB pathway. Finally, they argue that "small Evs" including exosomes could be used as non-invasive biomarkers of tumor burden and expression of therapeutic targets such as CD20, for disease monitoring and therapeutic orientation.

Keywords : DLBCL, exosome, rituximab, TrkB, CD20

