THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*
Discipline ou spécialité :
IMMUNOLOGIE

Présentée et soutenue par
Camille Laurent
Le *20 Décembre 2012*

Titre :
Etude de l'Immuno-infiltration et du Rôle Fonctionnel des Lymphocytes T Cytotoxiques dans les Lymphomes Folliculaires.

JURY
Président du Jury : Professeur Joost van Meerwijk
Rapporteur : Professeur Karin Tarte
Rapporteur : Professeur Thierry Molina
Directeur de thèse : Professeur Salvatore Valitutti

Ecole doctorale : *Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)*
Unité de recherche : *INSERM U1043*
Directeur(s) de Thèse : *Professeur Salvatore Valitutti / Professeur Pierre Brousset*
Rapporteurs :
- Rapporteur : Professeur Karin Tarte
- Rapporteur: Professeur Thierry Molina

Remerciements

A Toulouse le 10 décembre 2012.

Je remercie tous les membres du Jury qui ont accepté de juger mon travail.
Je voudrais tout d'abord remercier le *Pr Joost van Meerwijk* d'avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse. Petite pensée pour le monde si complexe des T régulateurs, effleuré du bout des doigts au début de mon parcours en immunologie.
Je voudrais remercier également mes deux rapporteurs : le *Pr Karin Tarte et le Pr Thierry Molina* pour non seulement vos remarques attentives et constructives mais aussi pour vos encouragements dans cette dernière ligne droite sacrément « dénivelée ».
Enfin, je voudrais remercier mes deux directeurs de thèse. Le premier *Pr. Salvatore Valitutti* qui m'a initiée à l'immunologie entrecoupée d'un dialecte « macaronien » parfois complexe (…) mais qui m'a donné l'opportunité de « grandir » à ses côtés. Le second, *Pr. Pierre Brousset* qui m'a permis d'avancer, parfois au pied du mur, et qui a toujours été présent tout au long de ma thèse jusqu'à sa concrétisation. Merci.

Je voudrais remercier l'ensemble de l'équipe S. Valitutti. Tout d'abord, je remercie particulièrement, *Sabina* pour toutes ses qualités tant sur le plan professionnel (son aide, ses encouragements, ses conseils, ses manips, ses cellules « non « contaminées, ses passages de cellules surtout le WE, et j'en passe …: l'excellente et précieuse « béquille » de chacun, j'aurai pu dire « la mère » mais je sais qu'elle n'aime pas) que sur le plan personnel (nos connivences, nos discussions de jeunes femmes, d'épouses et de mères, nos soirées trop peu fréquentes à mon goût). Je remercie *Magda* aux doigts de fée, que j'ai appris à connaitre tout au long de ces mois, répondant présente à tout moment, une aide tout aussi précieuse…(au fait, tu n'aurais pas la fig 1 en TIFF ?). Merci.
Je remercie l'équipe masto-boys *Eric et Nico* avec qui j'ai partagé de « grands » moments scientifiques (vous comprendrez aisément que je ne recopierai pas la phrase chérie du Dr Espinosa « ces manips tu peux… ») et de nombreux fous rires (allooo Eric c'est C…): Good Luck Nico !!!Je remercie aussi *Cécile* (et ses gâteaux), l'équipe WASP avec comme chef de fil *Loïc* pour ses commentaires et ses critiques scientifiques (la caspase des FL !), la petite Waspette *Fanny* (bonne chance à toi) et *Zilton* (sur un air brésilien). Je remercie aussi les nouveaux-anciens arrivants : *Roxanna* (The killeuse du mélanome), *Claire* (on n'a toujours rien compris à la fonction f=3/%++ !§gc…), et « les petits » *Régis* et *Mickaël* (bon courage les gars !). Une petite pensée va aussi pour les anciens : Micka, Florie et Sophie.
Je voudrais également remercier tous les plateaux techniques et particulièrement *Talal* et *Flo* pour leurs précieux conseils sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour.
Je remercie également tous les médecins et techniciens du labo d'anapath qui m'ont aidée à collecter mes échantillons de FL et pour leurs encouragements jusqu'au bout du bout, tout particulièrement, *Laurence* qui m'a épaulée plus d'une fois tant sur le plan professionnel que personnel (alors comme çà « Wonder Woman » n'existe pas?!) et *Michel*, magicien de l'IHC, technicien hors-pair, sans qui la couverture de Blood n'aurait jamais vu le jour. Merci.
Enfin je tenais à remercier ma famille, mes parents (sans qui, je n'aurai pas pu faire **tout** çà), mes amours de frère-sœurs (*Ju* et sa petite princesse *Lucie*, *Pau* et *Zaza*).
Sans oublier, mon amour *Alain* et mes bébés *Jeanne* et *Lucien*. Merci pour être là et pardonnez-moi si parfois (en ce moment surtout) je n'y suis pas. Je vous aime.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 11

1. LE LYMPHOME FOLLICULAIRE 13

1.1 Généralités épidémiologie-clinique 13
1.2 Lymphomagénèse et translocation t(14;18) 17
1.3 Classification anatomo-pathologique du lymphome folliculaire 19
1.3.1 Analyse morphologique
1.3.2 Phénotype
1.3.3 Anomalie moléculaire : FISH/PCR
1.4 Biologie des cellules de lymphome folliculaire 22
1.4.1 Lymphome folliculaire et régulation de l'apoptose
1.4.2 Lymphome folliculaire et prolifération : rôle du BCR
1.4.3 Lymphome folliculaire et microenvironnement cellulaire
1.4.4 Lymphome folliculaire et structuration 3D
1.5 Place de l'immunothérapie 41
1.5.1 Les anticorps
1.5.2 La greffe allogénique
1.5.3 Les vaccins

2. LES LYMPHOCYTES T CYTOXIQUES 45

2.1 Génération du répertoire T 45
2.1.1 Développement et sélection des lymphocytes T αβ
2.1.2 Récepteur des cellules T αβ
2.1.3 Voies de transduction du signal induites par le TCR
2.2 Synapse immunologique 51
2.2.1 Structure de la synapse immunologique
2.2.2 Dynamique et mécanismes de formation de la synapse immunologique
2.2.3 Fonctions de la synapse immunologique
2.3 Mécanisme d'inhibition de l'activation des lymphocytes T 58
2.4 Fonctions effectrices des lymphocytes T CD8$^+$ 59
2.4.1 Réponse cytotoxique des lymphocytes T cytotoxiques
2.4.2 Sécrétion de médiateurs des lymphocytes T cytotoxiques

3. MECANISMES D'ECHAPPEMENT TUMORAL 65

3.1 « Camouflage » de la cellule cancéreuse 65
3.2 Résistance à la mort cellulaire 65
3.3 Milieu ambiant « pro-tumoral » 67
3.4 Détournement de l'immuno-surveillance 68

4. MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LES TUMEURS SOLIDES **71**

4.1 Généralités sur le concept d'immuno-infiltration **71**
4.2 Rôle des chémokines dans l'immuno-infiltration **73**
4.3 Immuno-infiltration et chimiothérapie **75**
4.4 Influence des traitements sur l'immuno-infiltration **76**
4.5 Rôle de l'hypoxie sur l'immuno-contrôle **78**
4.6 Contribution de l'imagerie cellulaire dynamique **78**

OBJECTIFS **83**

RESULTATS **87**

DISCUSSION **101**

1. VALIDATION DES OBJECTIFS DE L'ETUDE **103**

2. COMMENTAIRES DE L'ETUDE DE L'IMMUNO-INFILTRATION DES CTL DANS LES LYMPHOMES FOLLICULAIRES **104**
2.1 La machinerie immunologique dans le lymphome folliculaire **104**
2.2 Fonction des CTL dans le lymphome folliculaire **106**
2.3 Immunothérapie et le lymphome folliculaire **106**
2.4 Topographie de l'immuno-infiltration et le lymphome folliculaire **107**
2.5 CTL et chimiothérapie **108**
2.6 Rôle du granzyme B dans la fonction des CTL **109**

PERPSECTIVES **111**

1. APPROCHES IMMUNOHISTOCHMIQUES COMPLEMENTAIRES **114**
Application au lymphome B diffus à grandes cellules **114**
Suivi de la réponse cytotoxique post traitement dans les lymphomes folliculaires **115**

2. CREATION DE MODELES 3D
2.1 Les sphéroïdes **118**
2.2 Le projet FLIC/Follicular Lymphoma Immune Cells **119**

3. L'IMMUNO-PHARMACOLOGIE **122**
3.1 Synapse immunologique et immunomodulateurs **122**
3.2 Immuno-infiltration et chémokines **123**
3.3 Les nouveaux anticorps **124**

REFERENCES **125**

ANNEXES **139**

ABREVIATIONS

ADCC : Anticorps dependant cell cytotoxicity
Arg1 : Arginase1
BCR : B cell receptor
BOM : Biopsie ostéo-médullaire
Btk : Bruton tyrosine kinase
CD- : Cluster differentiation
CDR : Complementary determining region
CFD : Cellule folliculaire dendritique
CMS : Cellule mésenchymateuse stromale
CRF : Cellule réticulaire fibroblastique
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CTL : Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4: Coreceptor cytotoxic T lymphocyte–associated antigen 4
FADD: FAS associated death domain
FLIC : Follicular lymphoma immune cells
FLIPI : Follicular lymphoma international prognostic index
GELF : Groupe d'étude des lymphomes folliculaires
IDO: Indolamine 2,3-dioxygenase
IFN : Interferon
Ig : Immunoglobuline
IHC : Immunohistochimie
IL- : Interleukine
iNOS : Inducible nitric oxide synthase
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LAT : Linker for T cell activation
LBDGC : Lymphome B diffus à grandes cellules
LF : Lymphome folliculaire
LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1
LH : Lymphome de Hodgkin
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
MALC : Multicellular aggregates of lymphoma cells
MDSC : Myeloid derived suppressor cell
MTOC : Microtubules organizing center
NFAT: Nuclear Factor of activated T cell
NK : Natural killer
PD-1 : Programmed death receptor
R : Rituximab
SI : Synapse immunologique
T_{FH} : lymphocyte T helper folliculaire
$T_{\alpha\beta}$: Lymphocyte T alpha beta
$T_{\gamma\delta}$: Lymphocyte T gamma delta
T_H : Lymphocyte T helper
T_{reg} : Lymphocyte T régulateur
TAM : Tumor associated macrophage
TCR : T cell receptor
TGF : Transforming growth factor

TIL : Tumor infiltrating lymphocyte
TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand
TLR : Toll like receptor
TNF : Tumor necrosis factor
VEGF : Vascular endothelial growth factor

FIGURES ET TABLEAUX

Liste des Tableaux :

Tableau 1 : Classification histologique des LF selon WHO 2008. **19**

Tableau 2 : Rôle des chémokines et cytokines dans le microenvironnement immunitaire des cancers. **74**

Tableau 3 : Effets immuno-modulateurs des traitements anti-cancéreux. **76**

Liste des Figures :

Figure 1 : Physiopathologie du LF. **18**

Figure 2 : Diagnostic anatomo-pathologique des LF. **21**

Figure 3 : Signalisation du BCR dans les LF. **26**

Figure 4 : Rôle des cellules stromales dans le LF. **31**

Figure 5 : Rôle des lymphocytes T_{reg} dans les LF. **36**

Figure 6 : Schématisation des interactions cellulaires et moléculaires entre LF et son microenvironnement cellulaire. **38**

Figure 7 : Représentation d'une synapse immunologique. **53**

Figure 8 : Mécanismes de lyse des cellules cibles induits par les CTL. **62**

Figure 9 : Fonctions immuno-suppressives des lymphocytes $T_{regs.}$ **69**

Figure 10 : Impact pronostique des différentes sous populations immunitaires dans les cancers. **73**

Figure 11 : Dynamique d'infiltration et de migration des CTL intra-tumoraux. **80**

Figure 12 : Exemple d'immuno-infiltration par des CTL fortement chargés en

granules cytotoxiques dans un LBDGC ganglionnaire. **115**

Figure 13 : Présence de CTL dans les BOM de patients LF en réponse complète 6 mois après Rituximab+chimiothérapie. **117**

Figure 14 : Schématisation du modèle « Coupe de tissu» du Projet FLIC. **120**

Figure 15 : Etude dynamique de l'infiltration des CTL et de leur fonction SI dans les tissus lymphoïdes humains. **121**

INTRODUCTION

1. LYMPHOME FOLLICULAIRE

1.1 Généralités épidémiologie-clinique

Les proliférations lymphomateuses malignes sont de deux types : le lymphome de Hodgkin (LH), caractérisé par la présence de cellules de Reed-Sternberg ou de cellules de Hodgkin, et les lymphomes non Hodgkiniens (LNHs).

Les LNHs se situent au sixième rang des tumeurs chez l'homme (après les cancers de la prostate, du recto-colon, du poumon, du mélanome et du cancer de la vessie) et au cinquième rang chez la femme (après les cancers du sein, du recto-colon, du mélanome et du cancer du poumon). Les LNHs représentent 90% des tumeurs hématopoïétiques.

Entre 1970 et 1990, l'incidence des LNHs a fortement augmenté (3 à 4% par an). Même si le taux d'accroissement s'est stabilisé autour de 1 à 2%, l'incidence des LNHs dans la population continue de progresser et atteint actuellement un taux de 14/100.000 aux Etats-Unis.[1] En Europe, 72800 cas ont été enregistrés en 2006 contre 66230 en 2004. Les LNHs représentaient 3,2% des cancers en Europe en 2006 et la 10ème cause de décès par cancer.[2]

Le lymphome folliculaire (LF) est le second LNH en fréquence et le plus fréquent des LNHs de bas grade de malignité. Le LF représente 30 à 40% des hémopathies lymphoïdes B avec une incidence de 4 pour 100.000 habitants par an en France.[3] L'incidence des LF a augmenté de 4,6% de 1985 à 1992 en Europe. Les facteurs qui favorisent cette augmentation d'incidence restent mal connus. La responsabilité de certains facteurs environnementaux a été évoquée. Des études ont suggéré par exemple une association entre LF et exposition aux pesticides, solvants et benzène. La liaison n'est toutefois pas démontrée.[1]

L'âge médian au diagnostic est compris entre 55 et 60 ans, avec une atteinte ganglionnaire diffuse dans deux tiers des cas. L'atteinte médullaire est fréquemment retrouvée au diagnostic

(40%). L'histoire naturelle de la maladie se caractérise par la lenteur de l'évolution, voire de longues phases de stabilité. Des régressions spontanées transitoires ne sont pas exceptionnelles. La lenteur de l'évolution est cohérente avec l'index de prolifération cellulaire relativement bas, distinguant ainsi le LF du LBDGC. L'extension est classée par stades basés sur l'examen clinique, la tomodensitométrie et à présent le PETscan devenu en une décennie un examen d'imagerie de routine basé sur l'avidité des cellules de LF pour le glucose. Cette avidité pour le FDG glucose est assez surprenante compte tenu de l'index de prolifération bas. De fait, le LF folliculaire est un des rares lymphomes indolents fixant le FDG glucose. En fonction du nombre et de la localisation des organes atteints par le lymphome, le LF peut être classé en quatre stades:

Stade I : la maladie est présente dans un seul groupe de ganglions lymphatiques ou plus rarement dans un organe non lymphoïde.

Stade II : le lymphome est présent dans deux groupes de ganglions lymphatiques ou plus, mais situés du même côté du diaphragme.

Stade III : atteinte des ganglions lymphatiques des deux côtés du diaphragme ou atteinte d'un organe adjacent ou de la rate.

Stade IV : la moelle osseuse, l'os, les séreuses, le tube digestif, les poumons ou d'autres organes sont touchés.

Les études cliniques menées dans les années 80 ont montré que, contrairement aux LHs par exemple, le stade d'extension présente une valeur pronostique toute relative. Ainsi, un LF stade IV par la moelle associé à des adénopathies de petite taille peut rester stable pendant des années. Le groupe français GELF (Groupe Français des Lymphomes Folliculaires) sous la direction de Philippe Solal-Céligny a identifié une série de paramètres regroupés sous forme d'un score dit FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) tenant compte non seulement du stade mais aussi de l'âge (> 60 ans), du nombre de sites atteints (4 ou plus),

du taux de LDH (normal vs élevé) et enfin d'un taux d'hémoglobine < 12 g/dl. Le score FLIPI permet d'identifier trois groupes de risque : le groupe à faible risque (facteur 0-1), le groupe à risque intermédiaire, (facteur = 2) et le groupe à risque élevé (facteur 3-5). Dans l'étude fondatrice du FLIPI, les survies à 10 ans étant de 71%, 51% et 36% respectivement.[4] Il est frappant de constater que malgré l'introduction de nouvelles thérapeutiques efficaces, le score FLIPI reste encore à ce jour un outil simple, fiable, reproductible et décisionnel pour définir le traitement. Toutefois, il ne fait pas de doute que le score FLIPI intégrera dans le futur d'autres marqueurs et par exemple, la réponse scintigraphique, éminemment prédictive de la durée de réponse. A ce jour aucun bio-marqueur n'a fait la preuve de sa supériorité face au FLIPI.

Le score GELF complète le score FLIPI. Le score GELF reflète moins le risque évolutif que l'agressivité naturelle de la maladie. A ce titre, il est utilisé pour définir le projet thérapeutique et par exemple discriminer l'attitude abstentionniste vis-à-vis d'un LF dit « faible masse » de l'attitude activiste face à un LF dit de « forte masse ». Un seul critère GELF représente un motif de traitement. Le score GELF tient compte de la taille des adénopathies et de la rate, des cytopénies, de la présence d'épanchements, des signes généraux, du taux de lactate déshydrogénases (LDH).

Tout index confondu, la survie globale estimée à 10 ans est de 49%.[4] En réalité, l'évolution est très hétérogène et la durée de survie est profondément influencée non seulement par le score FLIPI mais aussi par les co-morbidités (le LF est une maladie du sujet âgé). Après des décennies de pratiques basées sur l'équivalence de traitement, il est apparu depuis les années 2000 que certains médicaments ou combinaisons de médicaments pouvaient impacter la survie. Ainsi l'association du Rituximab à la chimiothérapie (R-chimiothérapie) montre une supériorité en termes de survie en comparaison avec la chimiothérapie seule. Il pourrait en être de même avec l'association R-bendamustine par comparaison avec R-CHOP. Les LF de stade I / FLIPI de faible risque sont virtuellement guéris par la seule chirurgie ou

radiothérapie. A l'opposé, les LF avancés (dit de forte masse, FLIPI élevé et GELF+) ont des évolutions bien moins favorables sur la durée. Certes, ces formes agressives répondent bien aux traitements modernes de première ligne (ex : R-CHOP) mais rechutent invariablement et sont toujours considérés comme incurables. En première ligne, les chimiothérapies actuelles induisent un taux de réponse de 80-85% dont seulement la moitié de réponse complète définie par la disparition des images scintigraphiques au PETScan. La durée de réponse a été certes allongée par le traitement d'entretien par Rituximab mais n'excède pas 3 à 5 ans dans les LF à risque. Après la première rechute, les chimiothérapies de seconde ligne de type R-DHAOX, R-fludarabine ou R-bendamustine donnent également des taux élevés de réponse (autour de 70%) mais des durées de réponse plus courtes sauf pour les malades intensifiés par chimiothérapie haute dose et autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, stratégie de traitement qui induit non seulement des taux de réponse élevés sur l'ensemble de la procédure (80-85%) mais aussi des durées de seconde réponse intéressante (médiane = 5 ans). Toutefois, ces stratégies de soins ne concernent que les malades < 60 ans et donc une fraction minoritaire des patients. Enfin, il convient de noter que le LF peut évoluer vers une transformation en lymphome de haut grade (20% des cas). Cette évolution est tardive et ne semble pas être influencée par la nature des traitements. Le plus souvent, le LF se transforme en LBDGC à variante centroblastique ou immunoblastique, plus rarement en lymphome de type Burkitt.

Au total, on retient de ces considérations que si l'immunochimiothérapie a introduit de réels progrès, il existe encore des besoins thérapeutiques dans cette maladie, en particulier pour convertir les réponses partielles en réponse complète ou allonger la durée de première réponse. Des stratégies d'immunothérapie pourraient prendre place dans ce contexte.

1.2 Lymphomagénèse et translocation t(14 ;18)

Le LF est associé dans 80 à 90 % des cas à la translocation t(14;18)(q32;q21) juxtaposant l'oncogène *BCL2* situé sur le chromosome 18q21 et la région codant pour les chaînes lourdes des Ig en 14q32 (*IgH*, segment JH). Cette translocation entraine la surexpression du gène et de la protéine BCL2.[5,6] Le point de cassure se situant en dehors de la région codante en 18q21 la protéine synthétisée correspond à la protéine physiologique mais produite en quantité anormale. La surexpression de la protéine BCL2, protéine transmembranaire mitochondriale intervenant dans la mort cellulaire en inhibant la voie mitochondriale apoptotique, entraine une résistance à l'apoptose des cellules tumorales. Associées à la translocation t(14;18)(q32 ;q21), d'autres anomalies génétiques sont retrouvées et responsables du second hit oncogénétique et du développement du lymphome folliculaire. Il peut s'agir d'altérations chromosomiques : perte du chromosome 1p, 6q, 10q, et 17p ou gains chromosomiques 1, 6p, 7, 8, 12q, X et 18q/dup. Il peut également s'associer à des réarrangements du gène *BCL6*.

Au total, le lymphome folliculaire est développé à partir de cellules B immatures porteuses de la t(14;18)(q32 ;q21 responsable de la surexpression de BCL2, à laquelle s'associent d'autres évènements génétiques additionnels (schématisation de la lymphomagénèse du LF, Figure 1) .

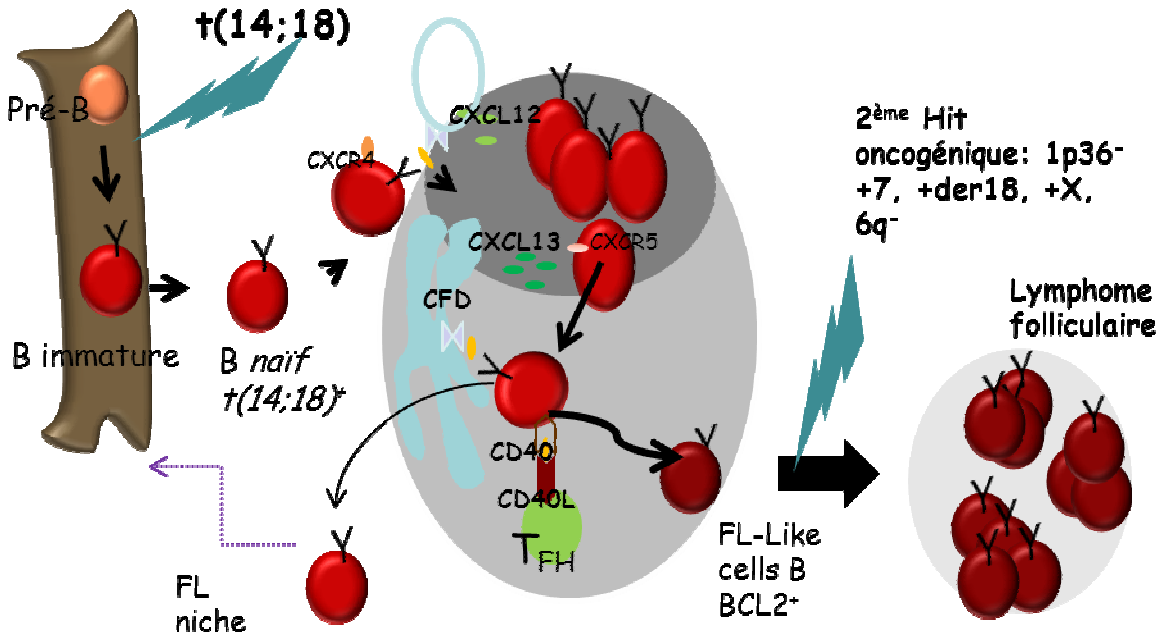


Figure 1 : Physiopathologie du LF.

Le LF est développé à partir de cellules B immatures porteuses de la t(14;18) acquise dans la moelle osseuse lors des réarrangements des gènes des immunoglobulines et induisant la surexpression de BCL2. Par la suite, et après migration dans le ganglion, la cellule B poursuit sa maturation dans le centre germinatif en pénétrant dans la zone sombre via CXCL12 secrétée par les cellules folliculaires dendritiques (CFD) se fixant à son récepteur CXCR4. A ce niveau, la cellule B à l'état de centroblaste subit les mécanismes d'hypermutations somatiques des gènes des immunoglobulines (Ig). Puis via CXCL13, la cellule B pénètre dans la zone claire à l'état de centrocyte où elle teste leur BCR (B cell receptor) en rentrant en contact avec l'antigène présenté sous forme de complexes immuns par la CFD. Puis la cellule B le présente à son tour via ses molécules du CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité) au lymphocyte T helper folliculaire ($T_{FH)}$. Ce dernier notamment par l'interaction CD40L-CD40 lui envoie des signaux de survie et de différenciation en cellule pré-FL puis FL cell-like qui lors d'un second évènement génétique (2ème hit oncogenique), peut engendrer un lymphome folliculaire.

1.3 Classification anatomopathologique du lymphome folliculaire

1.3.1 Analyse Morphologique

Le LF correspond à une prolifération lymphomateuse d'architecture folliculaire et/ou diffuse développée aux dépens de cellules du centre germinatif (CG) (Figure 2A). Il est constitué d'une prolifération de cellules tumorales de taille petite à moyenne, aux noyaux hyperchromatiques d'allure centrocytique, mêlées à des cellules de plus grande taille aux noyaux ronds ou ovoïdes, à chromatine vésiculeuse et contenant un ou plusieurs nucléoles collés contre la membrane (Figure 2B). La proportion de centroblastes (Figure 2C) définit le grade histologique du LF (Tableau 1).[7] Ces cellules tumorales sont intimement mêlées à un réseau de cellules follicules dendritriques (CFD) hyperplasique et dissocié responsable de l'architecture folliculaire du LF.

Classification Morphologique	Définition
Grade	Nombre de centroblastes/champ (x400)
Grade 1-2 (bas grade)	0-15 centroblastes
1	0-5
2	5-15
Grade 3 (haut grade)	>15 centroblastes
3A	centrocytes persistants
3B	plages de centroblates
Architecture	Proportion de follicules
Folliculaire	>75%
Folliculaire et diffus	25-75%
Focalement folliculaire	< 25%
Diffus	0

Tableau 1 : Classification histologique des LF (WHO 2008).[7]

A côté de la forme commune du LF, d'autres variants ont été décrits : le LF « in situ » correspondant à la présence de cellules tumorales porteuses de t(14;18)(q32 ;q21) situées dans des follicules lymphoïdes ganglionnaires non tumoraux[8] ; la forme pédiatrique de LF, de très bon pronostic, qui ne surexprime pas BCL2 et non associée à la t(14;18), correspondant sur le plan cytologique à une lympho-prolifération d'architecture folliculaire constituée essentiellement de centroblastes.[9] Le LF primitif intestinal siégeant habituellement dans le duodénum sous forme de polypes intestinaux, ou les autres lymphomes folliculaires extra-ganglionnaires, étant le plus souvent de bon pronostic se présentent avec un aspect immuno-morphologique identique. En revanche, les lymphomes centrofolliculaires primitivement cutanés sont classés comme une entité clinico-morphologique différente des LF systémiques dans lesquels on retrouve une lympho-prolifération tumorale de centroblastes et de centrocytes dérivant également des lymphocytes B du CG.

1.3.2 Phénotype

Les cellules tumorales du LF sont de phénotype B CG en associant l'expression des antigènes B (CD19, CD20, CD79a) et des antigènes du CG : centerine, CD10 et BCL6 (Figure 2D). Dans plus de 80% des cas, elles surexpriment la protéine BCL2 (Figure 2E) secondaire à la translocation t(14;18). En revanche, elles sont habituellement négatives avec les antigènes CD5, CD43, FOXP1 et MUM1. Ces cellules tumorales s'associent à un réseau de CFD hyperplasique et dissocié mis en évidence par les anticorps anti-CD21 et CD23.

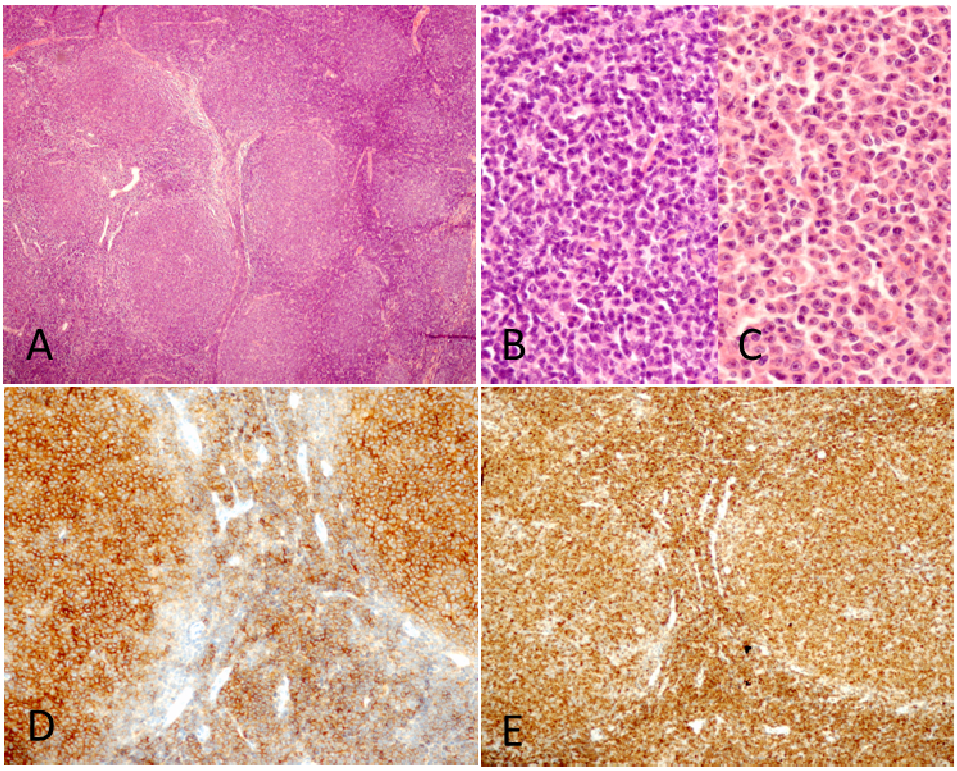


Figure 2 : Diagnostic anatomo-pathologique des LF.

Diagnostic histologique et immunohistochimique des LF; **Figure 2A:** infiltration du parenchyme ganglionnaire par une prolifération lymphomateuse d'architecture folliculaire (H&E x40); **Figure 2B:** aspect cytologique centrocytique des cellules LF (H&E x400); **Figure 2C:** aspect cytologique centroblastique des cellules LF (H&E x400); **Figure 2D:** expression membranaire du CD10 par les cellules LF (immunohistochimie avec anticorps anti-CD10 x200); **Figure 2E:** sur-expression de la protéine BCL2 (immunohistochimie avec anticorps anti-BCL2 x200).

1.3.3 Anomalie moléculaire : FISH/PCR

Le LF est associé dans 70-90% des cas à la translocation t(14;18)(q32;q21). Cette dernière entraine la surexpression de la protéine par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps anti-BCL2. Dans 10 à 15 % des cas, le LF peut être négatif avec l'anticorps anti-BCL2, en raison

par exemple d'un point de cassure intéressant le gène codant pour les épitopes reconnus par l'anticorps.

Sur le plan moléculaire, la détection de réarrangement *BCL2/IgH* peut être réalisée par FISH en utilisant une sonde BCL2 détectant près de 95% des mutations *BCL2* sur le chromosome 18q21. En revanche, les techniques de PCR utilisant les amorces sur les différents points de cassures du gène *BCL2* (MBR = major breakpoint region ; Mcr = minor cluster region ; Vcr = variant cluster region) sont moins performantes ne détectant que près de 70% des réarrangements dus entre autres à la multiplicité des point de cassures du gène *BCL2*.

Au total, le LF est un lymphome B à petites cellules d'architecture le plus souvent folliculaire constitué de centrocytes mêlés à une proportion variable de centroblastes et exprimant les antigènes CD10 et BCL6, surexprimant la protéine BCL2 secondaire à la translocation t(14;18).

1.4 Biologie des cellules de lymphome folliculaire

1.4.1 Lymphome folliculaire et régulation de l'apoptose : rôle de la translocation t(14 ;18)

La translocation t(14;18) est responsable de la surexpression du gène et de la protéine BCL2 (voir ci-dessus). La protéine BCL2 synthétisée correspond à la protéine physiologique mais produite en quantité anormale.[5,6] En dépit de son très haut niveau d'expression, il n'a pas été montré que BCL2 puisse représenter un antigène tumoral. La résultante fonctionnelle de cette translocation est le déséquilibre de la balance entre la survie et la mort cellulaire. En effet, BCL2 est une protéine transmembranaire mitochondriale qui intervient dans la régulation de

la mort cellulaire en inhibant le phénomène d'apoptose (voie mitochondriale). Elle est contrôlée négativement par d'autres molécules comme Bak, Bax et Bad, (protéines mitochondriales pro-apoptotiques). La protéine BCL2 étant produite en quantité excessive, la balance entre les composants pro-survie de la famille BCL2 et les composants pro-mort est déséquilibrée au profit des premiers, conduisant ainsi à la régulation négative de la mort par apoptose. L'implication de BCL2 dans cette maladie n'est pas restreinte à l'oncogénèse. L'inhibition de l'apoptose joue aussi un rôle dans la tolérance aux dommages induits par la chimiothérapie et donc à la chimiorésistance tout à fait particulière du LF en comparaison, par exemple, avec le LBDGC. Dans le LF, BCL2 représente donc une cible moléculaire de chimiosensibilisation comme le suggère les études pré-cliniques explorant le potentiel d'inhibiteurs de BCL2 (oligonucléotides anti-sens, peptides interférant avec le domaine BH3). Dans certains modèles, BCL2 est efficace pour inhiber l'apoptose induit par le système FAS/FAS-L. Toutefois, il a été montré que les cellules de LF restaient sensibles aux effecteurs cellulaires de l'immunité.[10] Ces observations expérimentales corrèlent les observations cliniques issues de la pratique de la greffe allogénique et des approches vaccinales (voir plus loin). Toutefois, dans près de 10 % des cas, la translocation t(14;18) n'est pas détectable par les techniques conventionnelles et la majorité de ces cas n'expriment pas BCL2.[10,11] Il a été documenté que la présentation clinique et l'évolution des LF négatifs pour la translocation t(14;18) sont similaires à celles des LF conventionnels. Sans remettre en cause le rôle oncogénique de la translocation t(14;18), cette observation suggère pour le moins la contribution d'autres événements oncogéniques dans le LF.[12,13]

1.4.2 Lymphome folliculaire et prolifération : rôle du BCR

Dans cette perspective, il est important de rappeler que, le réarrangement *BCL2/IgH* a été retrouvé par PCR dans le sang périphérique chez des sujets âgés sains ainsi que dans les amygdales et la rate de sujets sains de tout âge sans pathologie lymphomateuse sous-jacente.[14] Ces clones de lymphocytes B normaux portant la translocation peuvent persister pendant plusieurs années chez un individu sain,[15] suggérant effectivement que la translocation t(14;18) ne résume pas la physiopathologie du LF. Cette observation a soulevé beaucoup d'hypothèses. En premier lieu, il a été évoqué la contribution d'une stimulation chronique du récepteur B à l'antigène, BCR (B cell receptor), par un antigène « public » par analogie avec la leucémie lymphoïde chronique (LLC). De fait, l'équipe de Gianelli a montré que les traitements anti-viraux administrés à des patients atteints par le virus de l'hépatite C ont pour effet d'éliminer les clones B sains portants la translocation t(14;18).[16] Toutefois, cette observation est restée anecdotique et l'hypothèse générale d'une stimulation antigénique chronique n'a pas eu de suite. De plus, contrairement à la LLC, les cellules de LF n'utilisent pas une recombinaison VDJ préférentielle. L'évolution des concepts s'est alors orientée vers des anomalies intrinsèques de la fonction du BCR.[17] Le concept de BCR « tonique » a été pour l'essentiel développé dans le contexte du LBDGC. Toutefois, la signalisation BCR est aussi anormalement amplifiée dans les cellules de LF. Dans une étude très originale, utilisant du matériel frais d'origine humaine, l'équipe de Ronald Levy a montré que l'activation du BCR est plus intense et plus durable dans les cellules de LF (mesurée sur le niveau de phosphorylations des tyrosines kinases du module BCR) comparativement aux cellules B normales du même ganglion (Figure 3A).[18] Cette observation a également été confirmée dans d'autres modèles de LF dans un travail plus récent.[19] Dans cette même étude, les investigateurs montrent que cette amplification est relative à la dérégulation des composants proximaux du BCR (Lyn et Syk). Le mécanisme par lequel le BCR est intrinsèquement dérégulé n'est pas bien compris. Toutefois, il est possible que la structure même du BCR soit

anormale. De fait, il a été montré que les cellules de LF expriment anormalement des sites de glycosylation dans la région *IgVH*. Par la suite, l'équipe de Stevenson a confirmé que 79% des LF sont porteurs d'une mutation dans la région *IgVH* générant des sites de N-glycosylation.[20] Ce taux de mutation est significativement plus élevé dans les LF que dans les LBDGC (41%), les LLC (13%), les myélomes multiples (8%) ou les lymphocytes B normaux (9%).[20] La N-glycosylation pourrait être responsable soit d'une activation directe du BCR, soit d'une activation indirecte en autorisant des interactions entre les sites de N-glycosylation et les lectines présentes dans le microenvironnement du LF (Figure 3B).[21 22]

Un second mécanisme pourrait impliquer la surexpression de Syk, une tyrosine kinase non récepteur, et composant essentiel de la signalisation BCR, située immédiatement en aval de sa partie intracellulaire.[19] Si le mécanisme par lequel Syk est surexprimé n'est pas connu, la conséquence fonctionnelle de ce phénomène a été documentée. Par exemple, en 2008, Leseux *et al,*[23] ont montré que la surexpression de Syk sous sa forme phosphorylée a pour conséquence de stimuler un module Syk/mTOR avec ses conséquences significatives en termes de survie, migration, et production de facteurs angiogéniques.[23] Un troisième mécanisme implique la sous-expression dans les LF de la protéine phosphatase SHP-1, régulateur négatif essentiel du signal BCR. Cette sous-expression est due à l'hyperméthylation du promoteur de son gène.[24]

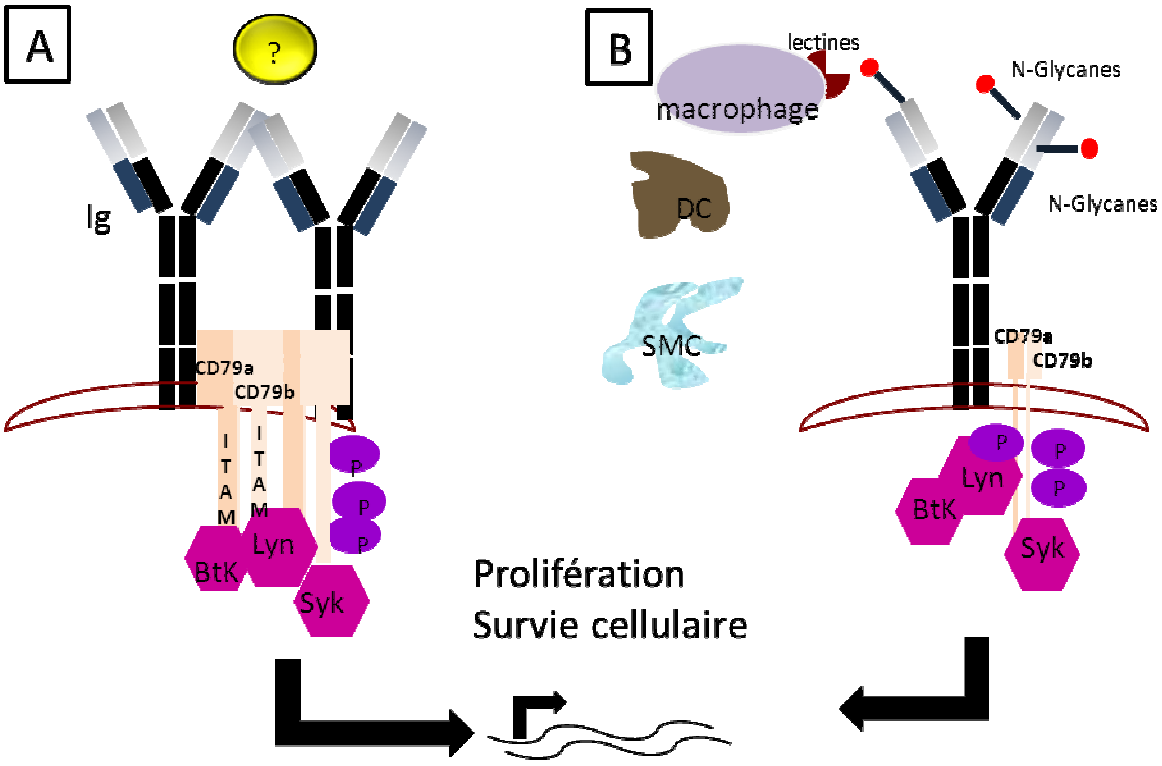


Figure 3 : Signalisation du BCR dans les LF

Figure 3A : BCR « hyperactif » : le BCR de la cellule LF va répondre de manière exacerbée à une stimulation[18] (antigène, lectine ?) conduisant à l'activation des motifs ITAMS (immunoreceptor tyrosines-based activation motifs) des molécules CD79a et CD79b, qui vont recruter des kinases (Lyn et Syk), 1ères étapes de la cascade de signalisation impliquant notamment la kinase Bruton tyrosine kinase (Btk), PI-3K/Akt, PLCγ2, PKCβ. Ces modules régulent la transcription de gènes contrôlant la prolifération, l'apoptose ou la différenciation de la cellule B. **Figure 3B : BCR N-Glycosylé** : le BCR du LF comporte des sites de N-glycosylation[20,22] essentiellement situés au niveau des régions hypervariables des chaines légères ou des chaines lourdes des immunoglobulines (Ig) et pouvant se lier aux lectines du microenvironnement (macrophage, cellule dendritique DC ou cellule stromale mésenchymateuse SMC).[22]

1.4.3 Lymphome folliculaire et microenvironnement cellulaire

Les cellules de LF ne se caractérisent pas par leurs seules anomalies intrinsèques. En effet, les cellules de LF se caractérisent aussi par de riches interactions fonctionnelles avec leur microenvironnement. A ce titre, le LF apparaît comme un des modèles les plus caractéristiques de la relation réciproque hôte-tumeur dans les maladies hématologiques au même titre que le myélome [25,26] ou plus récemment la LLC.[27,28]

Ainsi les cellules de LF interagissent avec plusieurs types cellulaires dont les cellules folliculaires dendritiques (CFD), les cellules réticulaires dendritiques (CRD), les cellules de l'immunité innée et adaptative, et les cellules endothéliales. Ces interactions peuvent se réaliser via des contacts directs, des intégrines, ou des facteurs solubles. Ces interactions sont essentielles pour l'expansion tumorale comme le suggère la difficulté de cultiver in vitro les cellules de LF en l'absence de cellules stromales ou de stimulation du récepteur CD40.

Les cellules endothéliales : Comme pour la plupart des tumeurs humaines, les lymphomes, y compris les LF, se caractérisent par une néo-angiogénèse stimulée par la production de facteurs pro-angiogéniques par les cellules lymphomateuses dont le VEGF-α.[29] Le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales mais exerce aussi un effet trophique sur les cellules de LF.[30,31,32] Le principal facteur qui conduit les cellules tumorales à produire du VEGF est l'hypoxie via HIF-1. Toutefois, ce paramètre métabolique n'a pas reçu d'attention particulière dans les LF alors que la réalité de l'hypoxie a été documentée dans les LBDGC.[33]

Une première tentative que nous avons réalisée n'a pas été concluante, possiblement du fait de la qualité de l'anticorps anti-HIF-1 utilisé. Si la réalité de l'hyperplasie des vaisseaux sanguins dans les LF ne fait pas de doute, les modifications éventuelles de la densité et de l'architecture des vaisseaux lymphatiques n'ont pas été étudiées. Cette inconnue devrait être levée compte tenu du rôle important des lymphatiques dans la migration des cellules tumorales (de fait, les cellules de LF présentent un potentiel migratoire élevé in vivo) mais aussi compte tenu du rôle des lymphatiques afférents pour l'accès à la tumeur des cellules immuno-compétentes. Il en est de même des structures vasculaires telles que les « high endothelial veinules (HEV)» nécessaires au transit des lymphocytes T de la circulation vers les tissus lymphoïdes et que l'on sait détériorées dans les cancers.[34] Une analyse de la structuration des HEV et leur rôle potentiel dans l'immuno-contrôle dans les LF est également à notre programme.[35,36]

Les cellules myéloïdes immunosuppressives appelées MDSC (myeloid-derived suppressor cells) sont caractérisées par l'expression de marqueurs myéloïdes immatures tels que CD34, CD33, CD15, CD16 et le plus souvent $CD14^{+}$ $HLA\text{-}DR^{-/low}$.[37] Bien que peu documentées dans les lymphomes, les MDSC apparaissent dans les tumeurs solides comme de puissants immunosuppresseurs.[38] En effet, elles ont la capacité d'inhiber la réponse immunitaire, notamment les lymphocytes T effecteurs en produisant 2 enzymes : iNOS (inducible nitric oxide synthase) qui convertit la L-arginine en monoxyde d'azote (NO) et en L-citrulline, et l'arginase1 (Arg1) qui prive le milieu en L-arginine. Ces deux enzymes ont pour effet d'inhiber la prolifération cellulaire et/ou d'induire l'apoptose des lymphocytes T.[39,40] L'absence de L-arginine résulte en la perte de la chaîne CD3ζ du récepteur des cellules T[41,42]

entrainant le blocage de l'activation du TCR et de la production d'IL-2. D'autre part, la privation en arginine et la production d'urée altèrent également la stabilité des ARNm des lymphocytes T notamment de l'ARNm de l'IL-2. De plus, le NO libéré, inhibe la phosphorylation, et donc l'activation, des protéines de signalisation impliquées dans la voie du récepteur de l'IL-2.[43,44] Il a été par ailleurs montré que les MDSC empêchent la liaison du complexe peptide-CMH au TCR, via la nitrosylation de résidus tyrosines sur le complexe TCR-CD8.[45] Ce mécanisme fait intervenir la production de radicaux oxygènes et de peroxynitrites et dépend d'un contact cellulaire direct. Les MDSC peuvent également indirectement inhiber l'activation et la prolifération des cellules T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ directement[46] ou via les T_{reg}. En effet, les MDSC facilitent le recrutement via l'interaction CCL5/CCR5[47] et l'expansion des T_{reg}.[48,49] Elles permettent aussi la conversion des T en T_{reg} induits notamment via le TFGβ,[50] ou via l'expression de l'enzyme indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) intervenant dans le catabolisme du tryptophane[51] qui, activé, entraine une libération de médiateurs immunosuppresseurs tels que la kynurenine (toxique pour les T) et donc une diminution du tryptophane (nécessaire à la prolifération des T). La sécrétion des cytokines TGFβ et IL-10 par les MDSC entraine respectivement une diminution des propriétés cytotoxiques des CTL[52] et une polarisation des macrophages de type M2 (voir chapitre *macrophages* ci-dessous).[53]

Cellules stromales mésenchymateuses (CSM): Cellules Folliculaires Dendritiques (CFD) et les Cellules Réticulaires Fibroblastiques (CRF). Les CSM ont des propriétés chémo-attractantes. En effet, elles permettent le recrutement via CXCL12 (ligand de CXCR4) des LF exprimant $CXCR4^{hi}$, $CXCR5^{hi}$ et $CCR7^{lo}$.[54] Associée à la production de CXCL12, CXCL13 secrétée par les CSM contribue au recrutement des cellules LF à l'intérieur des follicules lymphomateux.[54,55] Les CSM participent également à l'expansion des cellules LF en se liant aux molécules LFA-1 et VLA-4 présentes sur les cellules de LF via leurs molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM-1/CD106 uprégulées dans le LF. D'autre part, VLA-4 ainsi activé pourrait induire un signal de survie aux cellules LF.[56] Les CFD présentent aussi l'antigène aux cellules de LF et leur fournissent des molécules stimulatrices comme l'IL-15, BAFF et le HGF (hepatocyte growth factor) qui pourraient toutes jouer un rôle dans la promotion de l'expansion des cellules folliculaires dans le CG et contribueraient à la résistance des cellules LF à l'apoptose.[55,57,58] Les cellules de LF permettent aussi le développement de CSM pro-tumorales de différenciation CRF secondaire à la sécrétion de TNFα et lymphotoxine LT-α1β2, cytokines participant à la différenciation et à la croissance des organes lymphoïdes secondaires.[54] De plus, les cellules de LF sont susceptibles notamment par l'IL4 de moduler la signalisation et le métabolisme des CFD.[59,60] Réciproquement, ces cellules stromales de type CRF-like favoriseraient à leur tour la croissance et la survie des cellules de LF.[61] Le rôle des cellules stromales est complexe permettant aussi bien le recrutement des cellules LF que leur expansion, en induisant notamment un milieu environnant favorable à leur développement (Figure 4).

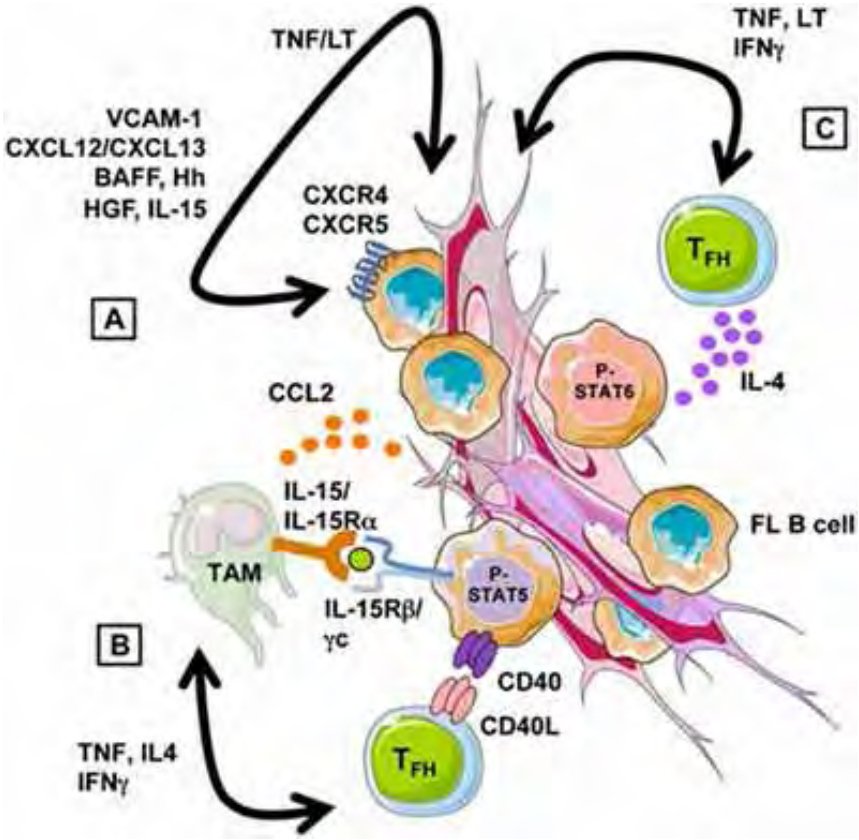


Figure 4 : Rôle des cellules stromales en coopération avec les T_{FH} et les TAM dans le LF. Mourcin *et al*.[55]

Les cellules stromales favorisent le recrutement des cellules LF (FL B cells) via des cytokines telles que CXCL12 et CXCL13 et leur croissance réciproque (BAFF et HGF). En retour, les LF secrètent des lymphotoxines (LT-α1β2) et TNFα induisant la différenciation des cellules stromales en cellules supportives du LF (appelées CRF-like). Ces cellules secrètent CCL2, qui favorise le recrutement de monocytes et leur polarisation in situ en macrophages immunosuppresseurs type M2 ou TAM2 (voir chapitre *macrophages* ci-dessous). Ces derniers secrètent de l'IL-15, et en coopération avec les T_{FH} (qui eux entrent en contact direct via CD40L-CD40 avec les FL-B cells), activent la voie STAT5 dépendante dans les cellules de LF. De plus, les T_{FH} participent à cet environnement immunosuppresseur en secrétant non seulement les lymphotoxines (LT-α1β2) et TNFα favorisant le développement des cellules CRF-like mais aussi l'IL-4 qui favorise la polarisation des macrophages de type M2 (voir chapitre *macrophages* ci-dessous) et la survie des FL-B cells via la voie STAT6 dépendante.

Les macrophages :

Schématiquement, on oppose les macrophages de type M1 ou « classically activated cells » (induits via IFNγ ou l'interaction des Toll Like Receptor/TLR) stimulant une réponse immune de type T_H1 via la sécrétion IL-12 ou IL-23 et participant à la régression tumorale ou anti-infectieuse, et les macrophages de type M2 ou « alternatively activated cells » (induits par IL-10, IL-4 ou IL-13) sécrétant IL-10, CCL17, CCL22, favorisant l'angiogenèse, la réparation et contribuant à l'immunosuppression en favorisant une réponse de type T_H2.[62,63] Dans les tumeurs, on observe une forte proportion de TAM (Tumeur associated macrophages) de type M2 participant à la progression tumorale. Ces derniers sont recrutés dans la tumeur par des chimiokines telles que CCL2,[64] CXCL12, des cytokines IL-6 ou des facteurs de croissance M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) et VEGF (Vascular endothelial growth factor**).**[65] Les TAM2 vont favoriser d'une part le recrutement des T_{reg} en sécrétant par exemple CCL22, une réponse de type Th2 en sécrétant par exemple CCL17 et CCL22, et induire un environnement cytokinique immunosuppresseur en sécrétant TGFβ ou IL-10.[66,67] Les TAM peuvent également inhiber la fonction des T $CD8^+$ directement via l'interaction avec PD-1 (programmed death receptor) ou en activant le métabolisme de L-Arginine (voir chapitre *des MDSC*).[67] Enfin, ils produisent également des facteurs angiogéniques pro-tumoraux et libèrent des enzymes participant à la progression tumorale ou à l'évolution métastatique tels que les métalloprotéases (MMPs) ou des cytokines TNFα ou IL-1.[62]

Dans un travail pionnier réalisé par le groupe de L. Staudt, l'analyse pangénomique des LF avait détecté deux types de signatures prédictives du devenir des patients : une signature « immune-response 1 » impliquant les lymphocytes T de bon pronostic et une signature

« immune-response 2 » impliquant les macrophages de mauvais pronostic.[68] Ce travail représentait la première démonstration de la réalité fonctionnelle du microenvironnement dans les LF, évoquait une contribution importante de l'immunité adaptative dans le contrôle de cette maladie et suggérait une fonction délétère des macrophages résidents, une des toutes premières observations expérimentales qui convergeront vers le concept de TAM. Nous reviendrons sur l'immuno-infiltration T lymphocytaire puisqu'elle représente l'objet de cette thèse. Pour les macrophages, signalons que, les premières études réalisées en immunohistochimie corrélaient la densité en macrophages ($CD68^+$) avec une évolution péjorative du LF.[69] Cette corrélation péjorative n'a pas été toujours confirmée comme par exemple dans un des deux groupes de patient traités par l'association R-CHOP au cours de l'étude FL2000 menée par le groupe du GELA-P.[70] Ce débat est important à considérer dans la mesure où les macrophages représentent de fait des effecteurs puissants pour la lyse par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) induite par le Rituximab. Il est donc probable que la densité en TAM conditionne au moins en partie l'efficacité du médicament.[71,72] Leur fonction dans les LF traités est donc ambiguë selon que l'on considère par exemple l'évolution naturelle ou l'évolution des malades traités. Sur le plan fonctionnel, il a été récemment décrit que le recrutement des monocytes et leur polarisation en TAM2 dans les LF sont induits par la sécrétion de CCL2 par les cellules stromales[61] et la polarisation en TAM2 est également favorisée par les T_{FH} via la sécrétion d''IL-4.[60,73] La même équipe a montré que les TAM coopèrent avec les T_{FH} pour favoriser la survie et la prolifération des cellules LF via la sécrétion d'IL15.[74] De plus, il a été récemment observé que dans d'autres lymphomes, tels que les lymphomes B diffus à grandes cellules, les macrophages pourraient directement participer à la croissance tumorale en sécrétant les cytokines BAFF (B-cell activating factor of TNF family) ou APRIL (proliferation inducing-ligand) favorisant l'activation et la

prolifération des cellules B.[57] Enfin, les TAM2 favorisent au moins en partie la dissémination tumorale et l'angiogenèse tumorale (VEGF, FGF).[32,75]

Les lymphocytes T et Natural Killer (NK) : l'immuno-infiltration par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL ; cytotoxic T lymphocytes) faisant l'objet de cette thèse, sera donc aborder tout au long de ce travail. En résumé, Ces derniers jouent un rôle essentiel dans la réponse anti-tumorale non hématopoïétique[76] et un nombre important de lymphocytes T CD8 serait un faveur d'un bon pronostic.[77-79] L'infiltration par les CTL des LF avait été déjà documentée avant l'initiation de notre travail mais les conséquences fonctionnelles n'avaient pas été évaluées.[80] De plus la manière dont les lymphocytes T $CD8^+$ infiltrent le tissu tumoral ou se distribuent autour des cellules LF et leur rôle fonctionnel, notamment leur capacité à lyser les cellules tumorales ou à établir des contacts synaptiques, restent à définir. Par contre, de nombreuses études immunohistochimiques ou de profils d'expression génique soulignent l'influence architecturale ou fonctionnelle des cellules immunitaires vis-à-vis du pronostic du LF.[81,82] Les premières corrélations ont pu déterminer qu'une prédominance de cellules T ou de l'expression de gènes dépendant d'une réponse T serait d'un meilleur pronostic qu'une réponse induite par les macrophages.[68,70,77,78,83-85] Par la suite de nombreux travaux ont permis de définir les différentes sous populations corrélées au pronostic de la maladie en étudiant successivement les lymphocytes T $CD4^+$: lymphocytes T helper 1 (T_H1) ou T helper 2 (T_H2), lymphocytes T régulateurs (T_{regs}) (sur la base de leur phénotype immunohistochimique FOXP3), lymphocytes T folliculaires helper (T_{FH}) (sur la base de leur phénotype PD1 ou CD57) et les lymphocytes T $CD8^+$.[68,70,77,78,81-85] Par exemple, de multiples travaux ont décrit l'accumulation de lymphocytes T_{regs} $FOXP3^+$ dans les LF [83,85,86,87] mais sans caractérisation

précise de leur fonction in vivo.[88] Cela étant, il est admis que les lymphocytes T_{regs} participent à l'atténuation des fonctions effectrices des lymphocytes T_H1 et des CTL et à induire un environnement immunosuppresseur pro-tumoral.[89-91] Les mécanismes immunosuppresseurs des T_{reg} sont variés : la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles qu'IL-10, TGFβ et IL-35, la consommation d'IL-2 via l'expression du récepteur à l'IL-2 de haute affinité, l'atténuation des fonctions effectrices des cellules T soit directement, par exemple via l'interaction PD-L1/PD-1 soit en stimulant l'action suppressive des cellules dendritiques après l'interaction du CTLA-4 (coreceptor cytotoxic T lymphocyte–associated antigen 4) et des molécules B7 qui induit non seulement la sécrétion de cytokines pro-tumorales IL-6 mais aussi par exemple, l'activation de IDO entrainant la libération de médiateurs immunosuppresseurs tels que la kynurenine, substance toxique pour les lymphocytes T (voir chapitre des MDSC).[90,91,92] Dans les LF, il a été rapporté que les lymphocytes $T_{regs,}$ via leur interaction PD-L1/PD-1, inhiberaient non seulement la prolifération des T effecteurs mais aussi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la fonction de lyse des CTL (figure 5).[93,94] De plus les cellules LF favoriseraient leur recrutement en sécrétant CCL22 se fixant au répéteur CCR4 des T_{reg}[93] et stimuleraient la conversion des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T_{regs} via leur interaction CD70-CD27 (figure 5).[95] Des études in vitro, montrent que la population T_{regs} va inhiber l'activation des T effecteurs $CD4^+$ et $CD8^+$ et favoriser un milieu immunosuppresseur soit directement via par exemple l'interaction PD-L1/PD-1 ou en sécrétant des cytokines pro-tumorales telles que TGFβ et IL-10.[93,94] Aux côtés des lymphocytes T_{regs}, les lymphocytes T_{FH} participeraient activement à l'activation des cellules de LF via les interactions CD40L-CD40 et TCR-CMH II ainsi que par la sécrétion d'IL-4 qui en se fixant sur le récepteur à IL-4 des cellules LF activerait les phosphorylations de ERK et STAT6 (figure 4).[60,96] Enfin, il a été observé une population T_{reg} tout à fait particulière au sein des follicules lymphomateux qui exprime par exemple CXCR5 mais aussi CD25 appelée

T_{FR} (figure 5). Seule cette dernière population de T_{FR} aurait des propriétés immunosuppressives alors que les T_{FH} contribueraient non seulement à l'activation des cellules LF via l'activation de STAT5 et à leur survie mais aussi leur permettraient de résister à l'apoptose induite par le rituximab.[96]

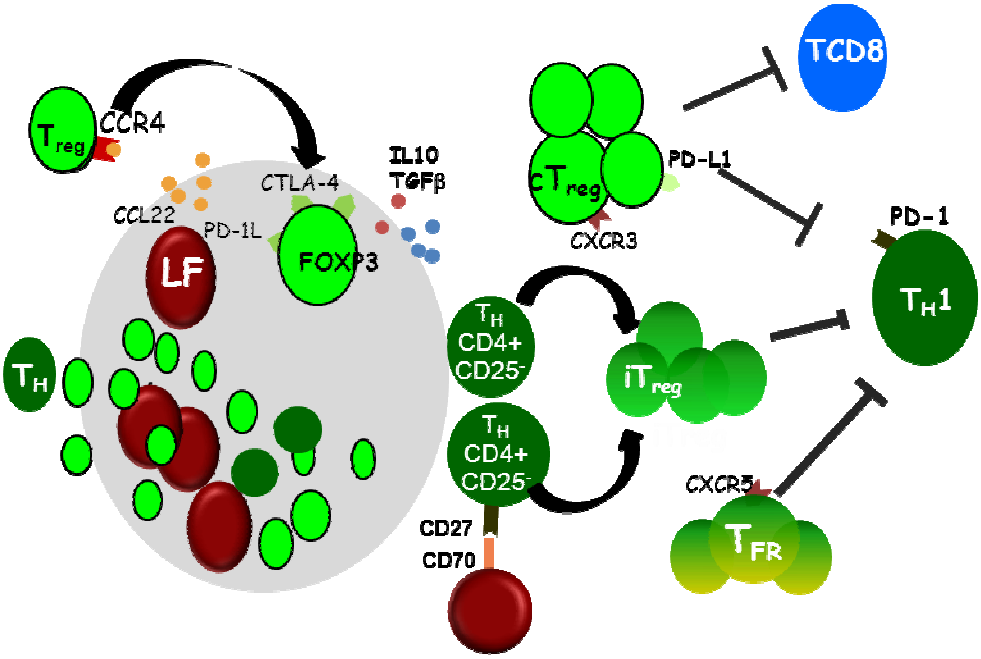


Figure 5 : Rôle des lymphocytes T_{reg} dans les LF.

Dans le microenvironnement des LF, les lymphocytes T_{reg} ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$) peuvent être recrutés par les cellules tumorales sécrétant la chimiokine CCL22 qui se fixe à son récepteur CCR4 exprimé par les T_{reg}.[93] L'expansion des T_{reg} (exprimant CTLA-4 et PD-L1) est due en partie à la prolifération des natural T_{reg} (nT_{reg}) mais aussi à la conversion des lymphocytes T_H ($CD4^+$ $CD25^-$) en T_{reg} induits (iT_{reg}) notamment par les cellules LF via l'interaction CD70-CD27.[95] Les lymphocytes T_{reg} ont la capacité d'inhiber la réponse T $CD8^+$ *in vitro*.[94] Ils inhibent également la réponse T_H1 via l'interaction PD-L1/PD-1.[93] Enfin une nouvelle population de T régulatrice appelée T_{FR} exprimant CXCR5 inhibe également la population T_H1 effectrice.[96]

L'infiltration par les lymphocytes T gamma delta (Tγδ) n'a fait l'objet que d'une seule étude dont il ressort que l'infiltration par ces cellules semble réduite en comparaison avec les organes lymphoïdes réactionnels.[97] Cette information est d'autant plus importante à considérer que les lymphocytes Tγδ présentent une activité cytotoxique naturelle contre les cellules de LF et sont d'excellents candidats pour l'immuno-intervention du fait de leur capacité à être activés in vivo par les phospho-antigènes (ex : IPH 1101, Innate Pharma). Associé à l'IL2, les phospho-antigènes auraient pour effet d'induire l'expansion des lymphocytes Tγδ dans le sang des malades, d'augmenter l'expression du CD16 dans ces mêmes cellules ainsi que leur capacité ADCC induite par le rituximab in vitro.[98] Comme les lymphocytes Tγδ, les cellules Natural Killer (NK) ont reçu peu d'attention dans les LF. Ainsi, on connaît mal le degré d'infiltration et d'activation des cellules NK dans les tissus lymphomateux. Les cellules NK sont pourtant essentielles pour l'immuno-contrôle et de plus elles sont considérées comme les principaux effecteurs de l'ADCC induite par le rituximab. Notre ignorance quant à la problématique LF/NK est d'autant plus regrettable que les NK, comme les Tγδ, se prêtent bien à l'immuno-intervention via l'administration de cytokines (IL2, IFNα, IL15).[99]

Le lymphome folliculaire apparaît comme un des modèles les plus caractéristiques de la relation réciproque hôte-tumeur dans les maladies hématologiques et se caractérisent ainsi par de riches interactions fonctionnelles avec son microenvironnement pouvant favoriser sa croissance, son potentiel de dissémination ainsi que son éventuelle transformation en lymphome B de haut grade (Figure 6).

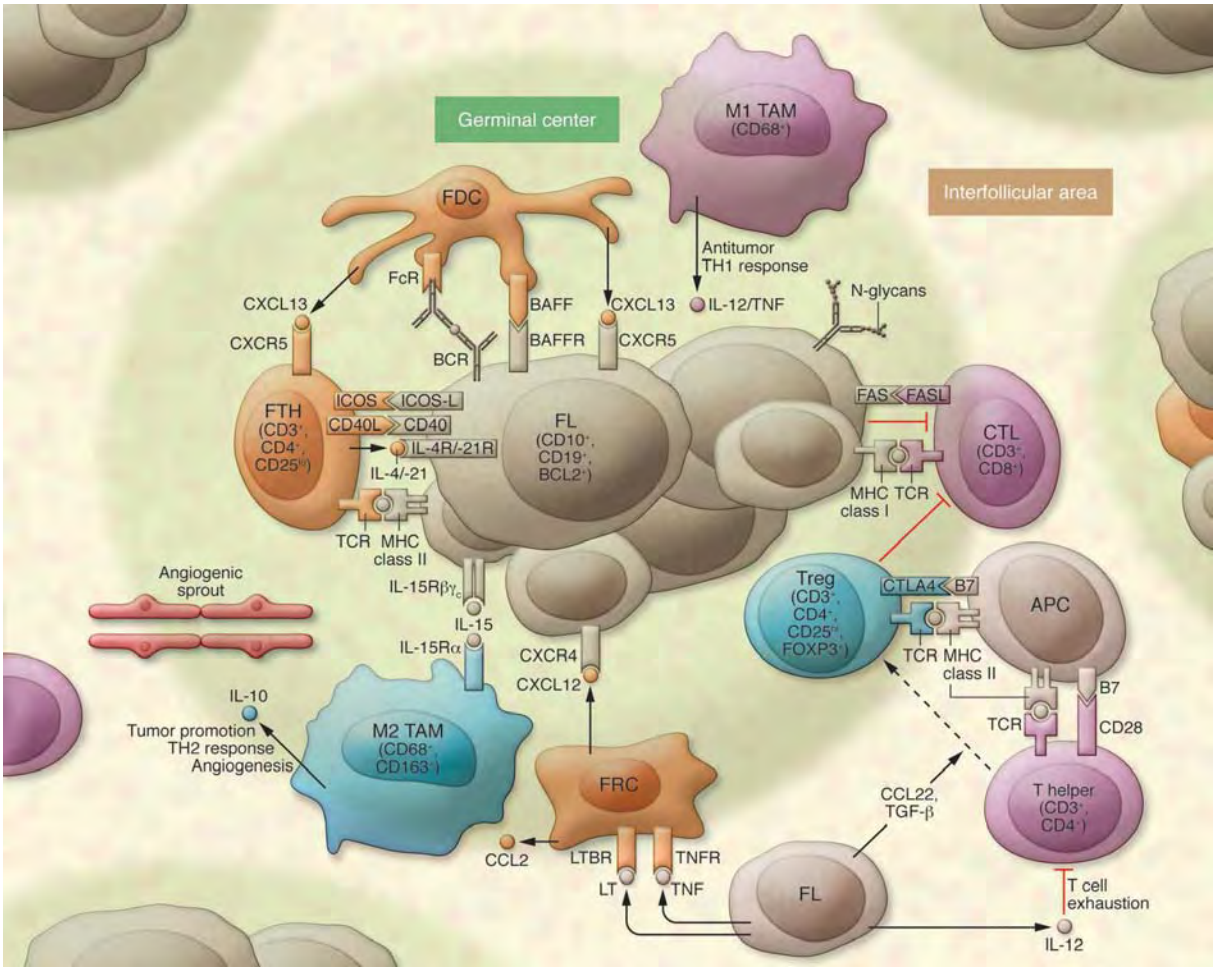


Figure 6 : Schématisation des interactions cellulaires et moléculaires entre le LF et son microenvironnement cellulaire. Kridel R *et al.*[100]

La cellule LF (FL) est en relation étroite avec son microenvironnement cellulaire composé de cellules immunitaires: les lymphocytes (T_{FH} et T_{reg}), macrophages de type M2 (TAM2), mais également des cellules folliculaires dendritiques (FDC) et autres cellules dendritiques, favorisant leur croissance et leur survie via des signaux d'activation (CD40-CD40L, N -glycosylation du BCR) ou la sécrétion de cytokines (IL4, IL21) et en favorisant un environnement immunosuppresseur pro-tumoral (inhibition de la réponse de type T_H1 et des CTL).

1.4.4 Lymphome folliculaire et structuration 3D

Sur la base de l'expérience acquise dans les carcinomes, il est désormais reconnu que l'organisation spatiale des tumeurs influence notablement le profil d'expression génique, la prolifération, la réponse au stress, la capacité à synthétiser la matrice extracellulaire et l'interaction avec les cellules immunitaires (synthèse de chimiokines, expression des molécules de reconnaissance et immuno-infiltration). Dans le LF, Jean C. *et collaborateurs* (U1037, CRCT, Toulouse Brevet INSERM 2010) ont développé des sphéroïdes de LF (appelés MALC pour multicellular agregates of lymhoma cells) à partir d'une approche originale dérivée de la technique du « hanging drop ». En utilisant ces modèles, Gravelle P. *et al* (manuscrit en préparation) ont montré que la croissance des MALC s'opère en deux temps : une première phase d'une semaine caractérisée par une intense prolifération suivie d'une phase de régulation négative de la prolifération liée à la sortie de cycle d'une fraction progressivement croissante de cellules (50% des cellules sont négatives pour Ki67 à J21). Ces cellules quiescentes apparaissent comme protégées via la surexpression de gènes tels que des enzymes de détoxification ou des inhibiteurs de l'apoptose dont relA et Bcl-2. Enfin, l'analyse pan-génomique des MALC montre une signature génique très comparable à celle décrite dans les follicules de LF par Compagno *et al*.,[21] y compris la signature hypoxique (Gravelle P. *et al*, manuscrit en préparation). L'ensemble de ces données suggère que lors de son développement, l'organisation spatiale conditionne en grande partie la biologie des cellules de LF via une réponse collective adaptative au stress. Les conditions de stress semblent être dominées par l'hypoxie mais d'autres facteurs de stress peuvent s'ajouter (stress métabolique, stress mécanique). Ce travail a permis aussi d'identifier la production intense de matrice

extracellulaire dans les cellules de LF, ce phénomène contribuant largement à la rigidité du sphéroïde. En définitive, il est donc probable que la croissance du LF dans la « vraie vie » s'associe à une série de modifications majeures de l'expression génique et du microenvironnement matriciel favorisant ainsi un « développement durable » de la tumeur confrontée à une diminution des nutriments et au stress mécanique. Ces modèles 3D représentent par ailleurs des outils commodes pour analyser l'infiltration et la fonction cytotoxique des effecteurs de l'immunité.

Au total, on retient de ces considérations sur la biologie des LF que cette maladie offre de multiples cibles potentielles pour les biothérapies susceptibles d'interférer directement avec la cellule mais aussi avec le microenvironnement et en particulier avec son composant immunitaire. Ces stratégies d'immunothérapie viseraient par exemple à renforcer les capacités de reconnaissance et de destruction des effecteurs de l'immunité innée (macrophages, NK, Tγδ) ou adaptative (CTL).

1.5 Place de l'immunothérapie

1.5.1. Les anticorps

Le LF est une maladie emblématique pour l'immunothérapie par anticorps puisque c'est dans cette indication qu'un anticorps monoclonal, ici le rituximab, s'est avéré pour la première fois susceptible d'induire un taux élevé de réponse globale (réponse partielle + réponse complète) (70%), un taux non négligeable de réponse complète (15-30%) et des durées de réponse intéressantes (médiane de 3 à 5 ans pour les LF de masse intermédiaire non antérieurement traités). Ces résultats obtenus en monothérapie sont très supérieurs à ceux obtenus avec d'autres anticorps monoclonaux dans d'autres tumeurs, et par exemple avec le trastuzimab dans les cancers du sein. Le mécanisme d'action du rituximab apparaît complexe. Il ressort de multiples travaux que ce médicament agit par 3 mécanismes distincts identifiés in vitro sans que l'on sache précisément quel est l'importance relative de chacun in vivo : effet direct, ADCC et lyse dépendante du complément.[101] Il ne fait pas de doute que le rituximab agit directement sur les cellules de LF in vitro en réduisant la prolifération via l'activation de signaux inhibiteurs liés à la production de seconds messagers lipidiques, tels que le céramide ou la sphingosine.[101] De plus, le rituximab se comporte comme un « poison » du BCR dans les cellules de LF puisqu'il atténue la « tonicité » du BCR.[19] L'effet direct du rituximab est sans doute important pour la synergie rituximab + chimiothérapie in vivo, l'anticorps monoclonal « primant » ainsi les cellules à l'apoptose chimio-induite. Toutefois, il est encore considéré que le principal mécanisme d'action in vivo réside dans l'effet ADCC sans que l'on ait identifié précisément la population effectrice (monocytes ? NK ? autres ?).

Au total, il convient de reconnaître que plusieurs inconnues persistent dont certaines sont directement liées à notre sujet. Par exemple, sur la base de ce que qui a été observé avec les lymphocytes Tγδ (expression du CD16 après activation par les phospho-antigènes + IL2), est-il possible que certaines sous-populations de lymphocytes T alpha beta ($T_{\alpha\beta}$) puissent exprimer au moins dans certaines régions de la tumeur un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines (Ig), ce qui les rendrait compétentes pour une éventuelle capacité ADCC ? Par ailleurs, est-il possible que les T_{regs} ou les TAM puissent réellement moduler les capacités cytotoxiques des effecteurs de l'immunité innée puisqu'il a été montré que les TAM peuvent inhiber l'ADCC du rituximab dirigée contre des cellules de LLC.[102] Toutes ces questions illustrent les points de convergence entre la problématique « anticorps » et la problématique « immunologie cellulaire », celle-ci s'étant quelque peu effacée au fil du développement industriel du rituximab de plus en plus perçu comme un médicament anti-tumoral et non plus comme un agent biothérapique.

1.5.2 La greffe allogénique

Ce paragraphe n'a pas pour objectif de faire l'état des lieux de cette stratégie de soins à la fois complexe et discutée. Toutefois, l'expérience de plusieurs décennies dans le LF suggère que les cellules de LF sont sensibles à l'effet allogénique (effet Graft Versus Leukemia ou GVL). Cette observation est encourageante pour de futures immuno-interventions. Hélas, ce domaine n'a pas reçu une attention soutenue et de nombreuses questions restent ouvertes : quels sont les antigènes ciblés dans l'effet GVL dirigé contre les LF ? Quelles sont les populations cellulaires qui supportent ou au contraire qui contrent l'effet GVL ? Quelles sont les médiateurs cytokiniques impliqués ? Quels sont les mécanismes de reconnaissance sur les

cellules cibles ? Tout projet d'immunothérapie tirerait un grand profit de connaître la réponse à ces questions.

1.5.3 Les vaccins

Le LF partage avec le mélanome le privilège d'être une des premières maladies où des stratégies vaccinales ont été développées. L'hypothèse initiale de Ronald Lévy,[103] était de considérer que la séquence idiotypique (Id) des Ig de surface représentait une structure spécifique de la tumeur. Cette même équipe avait aussi montré que certains LF peuvent partager des séquences Id, cette observation soulevant la possibilité d'une stratégie vaccinale à grande échelle à partir d'un seul hybridome. En réalité, le développement du concept s'est avéré particulièrement laborieux. En premier lieu, le concept d'Id « public » ne s'est pas vérifié à grande échelle : chaque patient nécessite un vaccin correspondant à la séquence Id individuelle. La fabrication devenait dès lors fastidieuse. Ensuite, les premières expériences ont montré que l'injection de l'Id libre en suspension ne suffisait pas à induire une réponse anti-tumorale efficace. Seule l'adjonction d'une protéine dite protéine vecteur permet d'obtenir une réponse anti-Id spécifique chez l'homme. Cette protéine est le KLH. Cependant seule une des trois études phase III basées sur l'administration de KLH/Id a permis de démontrer un allongement global de la durée de réponse.[104] Dans cette étude, la vaccination KLH/Id a été réalisée après la chimiothérapie dans le contexte de LF contrôlé, ce qui explique peut-être son succès et l'échec des deux autres études où la vaccination était réalisée en même temps que le traitement. Même si les résultats de la vaccination Id ne sont pas spectaculaires, ils suffisent pour démontrer la réalité d'une réponse immunitaire spécifique anti-Id dans les LF.

Il ressort de ces observations qu'il existe une série d'arguments pour évoquer une sensibilité naturelle des cellules de LF aux effecteurs de l'immunité adaptative. Il parait légitime de postuler que les CTL jouent un rôle dans l'histoire naturelle de la maladie (progression, stabilité, régression spontanée), sont impliqués dans l'efficacité anti-tumorale des médicaments utilisés, et représentent des cibles potentielles pour des stratégies d'immuno-intervention.

2. LES LYMPHOCYTES T CYTOXIQUES

2.1 Génération du répertoire T

Les lymphocytes T, reconnaissant les antigènes de façon spécifique, sont à l'origine des réponses immunitaires adaptatives. On distingue les lymphocytes Tαβ fortement majoritaires et les lymphocytes Tγδ (10% des lymphocytes totaux) présents dans le sang, les muqueuses et la peau.

2.1.1 Développement et sélection des lymphocytes Tαβ

Les cellules T dérivent de cellules souches de la moelle osseuse et subissent des réarrangements des gènes afin de produire un TCR, récepteur à l'antigène, unique à chaque cellule. La différenciation des lymphocytes T se poursuit dans le thymus[105] où ils subissent une double sélection : sélection positive et sélection négative qui permettent d'éliminer des cellules réagissant fortement contre le soi et de sélectionner les cellules capables de reconnaitre les peptides antigéniques présentées par les molécules du CMH.[106, 107,106,108,109] Les lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$ sortent du thymus sous forme de cellules matures naïves qui peuvent par exemple migrer dans les organes lymphoïdes secondaires[110] où les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) vont leur présenter un peptide antigénique lié aux molécules du CMH I (pour le lymphocytes T $CD8^+$) et du CMH II (pour les lymphocytes T $CD4^+$).[111] En fonction du microenvironnement cytokinique dans lequel ils se trouvent et des molécules de co-stimulations présentes à la membrane de la CPA, les lymphocytes T $CD4^+$ (T_H0) peuvent se différencier en plusieurs sous-types spécialisés.[112-114] De nos jours, environ six sous-types de lymphocytes T_H sont considérés comme des lignages à part entière exprimant des facteurs de transcription bien précis. Les cellules T $CD8^+$ peuvent également se différencier en

lymphocytes T cytotoxiques CTL capables d'éliminer les cellules infectées par un virus ou les cellules cancéreuses.

2.1.2 Récepteur des cellules Tαβ : TCR

Le TCR est le récepteur des lymphocytes T matures grâce auquel ils peuvent engager une réponse immunitaire adaptative en reconnaissant un antigène présenté par les molécules du CMH des CPA.

Le TCR αβ comporte deux chaines α et β glycoprotéines de type I appartenant à la superfamille des Ig.[115] Chaque chaine est composée d'un domaine extracellulaire (amino-terminal) contenant une région variable (V), une région constante (C) et une région charnière, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine intra-cytoplasmique. La partie hypervariable des domaines Vα et Vβ constitue le site de reconnaissance à l'antigène et plus précisément les boucles CDR1, CDR2 et CDR3. Le domaine transmembranaire du TCR s'associe au complexe CD3 permettant la transduction du signal.[116] Le complexe CD3 est formé de 6 sous unités assemblées en deux hétérodimères CD3εδ, et CD3εγ et un homodimère CD3ζζ.[117] Chaque dimère possède des motifs intracytoplasmiques ITAM (immunoreceptor tyrosines-based activation motifs) intervenant dans la transduction du signal.[118] L'interaction TCR-CMH-peptide est renforcée par la présence d'un des corécepteurs CD4 ou CD8 qui lie les molécules de classe II ou I du CMH respectivement. Outre la stabilisation du complexe TCR-CMH cette interaction approche la tyrosine kinase lck au complexe CD3-CMH et permet la phosphorylation des motifs ITAM des chaînes du CD3.[119,120]

L'activation des lymphocytes naïfs nécessite en plus des signaux délivrés par le TCR également un signal de co-stimulation lié à l'interaction entre des molécules de costimulation situées à la surface du lymphocyte et leur ligand situé sur les CPA professionnelles: CD28 du lymphocyte T se liant au CD80 et au CD86 de la CPA.[121]

2.1.3 Voies de transduction du signal induites par le TCR

La transduction du signal est un ensemble d'événements biochimiques qui assure la transmission d'un signal à des effecteurs intracellulaires mettant en jeu des seconds messagers qui modifient l'activité biologique de la cellule.

a- Evénements proximaux :

Les événements proximaux sont rapides et correspondent à l'activation des tyrosines kinases, à la phosphorylation du complexe CD3 et au recrutement des molécules adaptatrices. La signalisation du TCR implique successivement trois kinases appartenant à trois familles distinctes ; Lck, ZAP70 et Itk :

La kinase Lck appartient à la famille Src kinase. Au repos, Lck est maintenue inactive par la phosphorylation de sa tyrosine inhibitrice par une kinase Csk. Lors de l'engagement du TCR, la kinase Csk est relarguée dans le cytoplasme permettant ainsi la déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice par la phosphatase CD45 qui permet à son tour l'autophosphorylation de Lck par sa tyrosine activatrice.[122] Par la suite, Lck phosphoryle les tyrosines des motifs ITAM du complexe CD3.[123]

La kinase ZAP70 appartient à la famille Syk kinase. Le recrutement de ZAP70 conduit après autophosphorylation à un site de liaison à Lck et un site de liaison à Vav. Lck phosphoryle ZAP70 qui se fixe sur les motifs ITAM phosphorylés de la chaine ζ.[124] ZAP70 activée va permettre la phosphorylation de deux molécules adaptatrices : LAT et SLP-76. ZAP70 permet en outre l'inhibition de la réponse T car elle est nécessaire à l'internalisation du TCR et à la dégradation de la chaine ζ.

La kinase Itk appartient à la famille Tec et intervient dans la transduction du signal en permettant la phosphorylation de phospholipase C et notamment la PLC γ.
L'activation des molécules adaptatrices permet la coordination du signal TCR. Dépourvues d'activité d'enzymatique, elles permettent l'ancrage de nombreuses protéines de signalisation : LAT, les protéines adaptatrices la famille Grb2 et SLP76 :

La protéine adaptatrice LAT est une protéine membranaire exprimée par les lymphocytes T, les mastocytes, les mégacaryocytes et les cellules NK. Son long domaine intracytoplasmique, où se trouvent 9 tyrosines qui après phosphorylation, permet l'ancrage de composants de la signalisation (PLC γ1, Grb2, PI3K, etc...) ainsi que la liaison à des molécules impliquées dans la voie Ras-MAPKinase ou de la voie calcique.[125]

Les protéines adaptatrices la famille Grb2 (Growth factor receptor-bound protein2) telles que Grb2, Gads et Grap sont impliquées dans la transduction du signal.[126] Grb2 interagissant avec LAT participe à l'activation des MAP kinases.[125] Gads exprimé par les cellules hématopoïétiques interagit avec la molécule adaptatrice SLP76.

La molécule SLP76 exprimée par les cellules hématopoïétiques et activée par la phosphorylation de LAT va former les complexes Gads/SLP76 et SLP76/ PLCγ1 permettant la phosphorylation de PLCγ1 par Itk mais aussi par ZAP70. Cette activation PLCγ1permet le déclenchement de la voie calcique.[127]

b- Evénement distaux :

Les événements distaux correspondent à l'induction des différentes voies du signal conduisant à l'activation des facteurs de transcription (NFAT ou Nuclear Factor of activated T cells), NFkB et AP-1) qui induit la transcription de gènes nécessaires à la réponse cellulaire T : prolifération, production d'interleukines et différenciation. A la suite de l'engagement du TCR plusieurs voies de signalisation sont mises en place : la voie de la PLC γ1, la voie de la PKCθ, la voie des MAPKinases et la voie de la PI3K.

La voie de la PLC γ1 : PLC γ1 activée va hydrolyser le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) impliqués dans l'activation de 3 voies de transduction du signal : *i) la voie calcique*, indispensable à la réponse cellulaire T, nécessaire à la régulation des gènes contribuant notamment à la synthèse de cytokines[128,129] ou à la sécrétion de granules cytotoxiques,[130] et à la mobilité de la cellule et la réorganisation du cytosquelette d'actine responsable du stop signal lors du contact T/CPA ; *ii) la voie de la PKCθ,* où le DAG en induisant un translocation de la PKCθ à la membrane plasmatique autorise son activation ; et *iii) la voie des MAPKinases*, par l'activation de Ras déclenchée par la protéine GRP elle-même activée par le DAG. Plus précisément, la voie calcique est déclenchée par l'activation PLC γ1 qui clive PIP2 membranaire en IP3 et DAG. IP3 diffuse jusqu'au réticulum où il ouvre les canaux calciques laissant sortir le calcium (Ca)

du réticulum endoplasmique responsable de l'élévation transitoire de la [Ca].Cette augmentation [Ca] est à son tour responsable de l'ouverture des canaux calciques CRAC présents à la surface de la cellule T qui conduit à une augmentation durable du [Ca] intracellulaire. D'autre part, le Ca ainsi libéré va se fixer sur la calmoduline activant la phosphatase calcineurine qui déphosphoryle la forme cytosolique inactive du facteur de transcription NFAT permettant sa translocation au noyau.[131]

La voie de la PKCθ : La PKC θ est activée par le DAG et active le complexe IKK conduisant à la phosphorylation et à la dégradation d'IkB, protéines inhibitrices du facteur de transcription NFkB. L'élimination d'IkB permet la translocation de NFkB dans le noyau où il participe à la transcription de nombreux gènes.[132,133]

La voie des MAPKinases : MAPKinases sont des enzymes regroupant 3 groupes : Erk, 1 et 2, p38 MAPKinase, et JNK 1, 2 et 3, qui sont activés à la suite de cascades de phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine. Les MAPKinases Erk1 et 2 activent le facteur de transcription c-Fos dans le noyau.

c- Evénements de transcription génique :

L'ensemble des voies de signalisation décrits ci-dessus induit une translocation dans le noyau (ou l'activation dans le noyau) de différents facteurs de transcription impliqués dans la transcription des gènes cytokiniques ou d'autres molécules participant à la réponse des cellules T : 1) NFAT impliqué dans la voie du calcique/calcineurine ; 2) NF-kB impliqué dans

le voie de la PKC θ ; 3) c-Fos impliqué dans la voie Ras/ERK ; 4) Jun impliqué dans la voie de signalisation de Vav/JNK.[134,135]

2.2 Synapse immunologique

Le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative nécessite l'interaction entre la CPA et la cellule T. Lors de cette interaction, la CPA présente des peptides antigéniques liés à ses molécules du CMH aux lymphocytes T. Si le TCR est capable de lier le CMH avec une bonne affinité, le contact entre la cellule T et CPA se poursuit entrainant la formation d'un complexe d'activation supramoléculaire à l'interface CPA – lymphocytes, appelé la synapse immunologique (SI).

2.2.1 Structure de la synapse immunologique

Après 5 à 30 minutes après l'engagement du TCR, la SI est constituée de 3 zones[136,137] :

- une zone centrale ou c-SMAC permettant la transduction du signal et contenant plusieurs molécules impliquées dans l'activation des cellules T : TCR, CD2, CD28, CD4 ou CD8 et PKCθ
- une zone périphérique ou p-SMAC renfermant des molécules d'adhésion ; LFA1 et taline (protéine de liaison à l'actine)
- une zone distale ou d-SMAC constituée de molécules de grande taille comme les phosphatases CD45 et CD148 ou le CD43 exclus de la zone d'interaction car elles pourraient contrer l'action des kinases lors du déclenchement des cascades des voies de signalisation.

La SI mature (figure 7) est une réorganisation membranaire avec une redistribution des composants intracellulaires intervenant soit dans les voies de signalisation, convergeant alors vers la zone de contact CPA/T : Lck, ZAP70, LAT, PKCθ, Ptyr,[138] soit dans la structure cellulaire comme le cytosquelette d'actine ou le MTOC se polarisant alors vers la SI.[139]

En effet, lors d'une SI entre un CTL et sa cellule cible, les granules cytotoxiques se dirigent également vers la zone de contact entre CTL/cellule cible[140] pour former une SI sécrétrice et lyser plus efficacement la cellule cible. Cependant notre équipe a montré que les CTL pouvaient lyser les cellules cibles présentant de faible quantité d'antigène en polarisant uniquement leurs microtubules et leurs granules lytiques sans former une SI mature.[141]

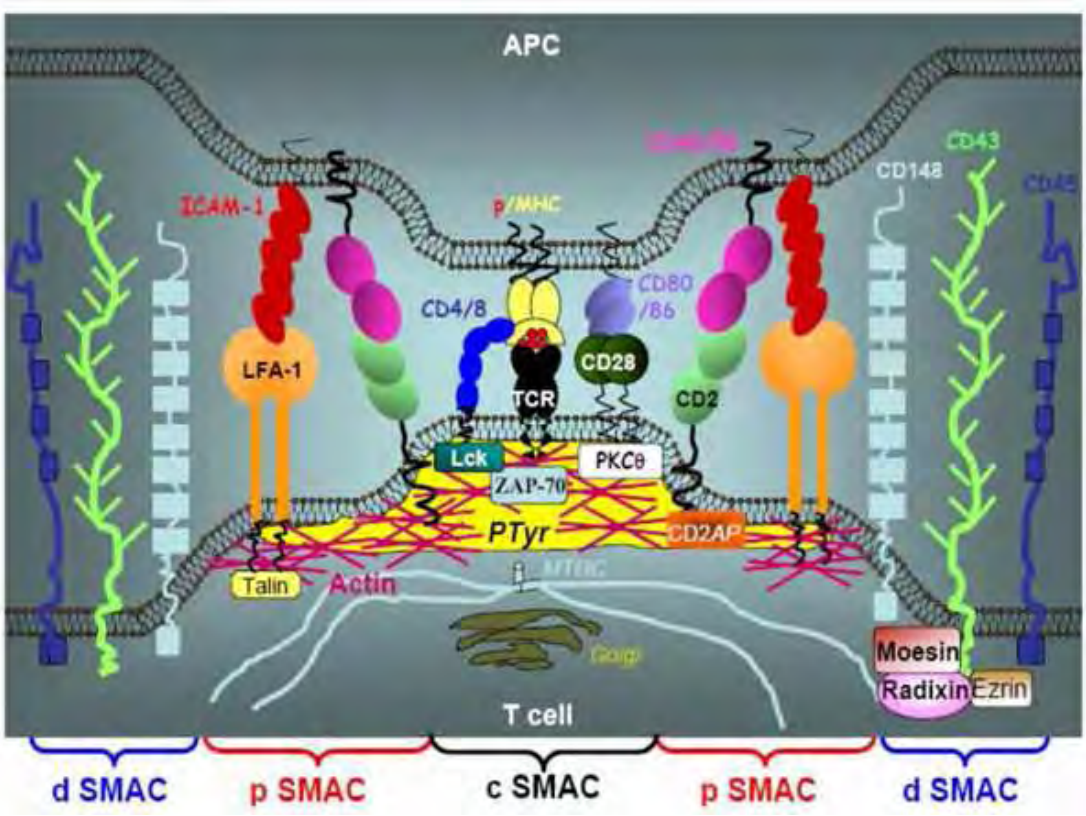


Figure 7 : Représentation d'une synapse immunologique (SI). Valitutti et Espagnole. Encyclopedia of life sciences 2005.

La SI représente une aire de contact supramoléculaire entre la cellule T et la cellule présentatrice de l'antigène (CPA). Elle est constituée de 3 zones distinctes : c-SMAC (zone centrale permettant la transduction d'un signal associant les molécules impliquées dans l'activation des T : TCR, CD2, CD4 ou CD8 et CD28, les kinases Lck ZAP-70, et PKC θ Phosphotyrosine, et le MTOC), p-SMAC (zone périphérique regroupant les molécules d'adhésion LFA-1 ou taline, protéine de liaison se liant à l'actine) et d-SMAC (zone distale, qui exclue de la zone de contact des phosphatases pouvant gêner l'action des kinases de la SI).

2.2.2 Dynamique et mécanismes de formation de la synapse immunologique

Le rapprochement entre les lymphocytes et la CPA est permis grâce à la libération des chimiokines attractives (ex : CCL19 et CCL21 liées par CCR7 ou CXCL12 liée par CXCR4). Ces signaux induisent une désorganisation du cytosquelette d'actine qui se rétracte vers le MTOC permettant la formation de lamellipodes ou filopodes motiles qui tractent la cellule vers la CPA enrichie en molécules d'adhésion, LFA1, et en TCR. Si le TCR ne reconnait pas l'antigène présenté par les molécules du CMH de la CPA, le lymphocyte se détache de la CPA. En revanche si le TCR est spécifique du CMH- peptide un signal est transmis via le TCR qui induit alors une réorganisation de l'architecture du lymphocyte T conduisant à la maturation de la SI.

La maturation de la SI s'établit avec la réorganisation des cytosquelette d'actine et de tubuline qui assurent d'une part la migration et le regroupement des complexes TCR/CD3 et des molécules participant à la signalisation (CD28, CD2) et d'autre part, la repolarisation des organites de la cellule avec notamment la relocalisation du MTOC face à la CPA entrainant la polarisation de l'appareil de Golgi, des mitochondries et des lysosomes sécrétoires vers la CPA. La zone de contact prend alors la forme d'un disque constitué des complexes supramoléculaires c-SMAC et p-SMAC où se regroupent les molécules de signalisation.[142]

2.2.3 Fonctions de la synapse immunologique

a) La synapse immunologique et fonction sécrétoire :

La SI constitue une zone de communication spécifique entre un lymphocyte T et une CPA.[143] Plusieurs hypothèses fonctionnelles imputées à la SI ont été proposées. Tout d'abord, la SI permettrait la transduction du signal TCR mais aussi de soutenir ce signal et d'y apporter certaines modulations.[136,142,144,145] La SI pourrait également avoir un rôle dans le maintien de la transduction du signal par notamment une accumulation à son niveau de molécules intervenant directement dans la transduction du signal (ZAP70, Lck, LAT, PLC, PKC et Pi3K).[136,145] Elle permet également la sécrétion polarisée de cytokines ou de granules sécrétrices vers la CPA due à la relocalisation du MTOC et de la machinerie sécrétoire, ou des granules cytotoxiques.[140] Par exemple, lors de la SI lytique induite lors de l'engagement du TCR des CTL avec une cellule cible, la SI permet de diriger la machinerie lytique et de déverser les granules lytiques vers la cellule cible.[146] Cependant la SI lytique apparait différente de celle observée avec les lymphocytes T $CD4^+$ du fait de l'extrême rapidité qu'elle assure lors d'une interaction cellulaire spécifique mais transitoire que l'on nomme « le baiser de la mort » ou « coup létal » au cours duquel le CTL se polarise vers sa cible en dirigeant le MTOC et l'appareil de Golgi vers la zone de contact et libère ses granules lytiques au niveau de la fente synaptique en l'absence de la réorganisation moléculaire typique d'une SI mature.[145] En revanche, lors d'une forte concentration d'antigène, le CTL peut former une SI mature avec la CPA qui s'accompagnera d'une polarisation de sa machinerie lytique et d'une réorganisation moléculaire au niveau de la zone de contact pour établir une SI activatrice.

Cette dernière aurait, en plus d'une fonction sécrétoire, un rôle dans l'activation de la production de cytokines par les CTL.

b) La synapse immunologique et rôle dans la différenciation des LT :

La SI, jouant un rôle dans la différenciation thymique, l'activation et la sélection clonale des lymphocytes T, pourrait également intervenir dans la différenciation des T_H effecteurs ou en T_H mémoires et dans le lignage des différentes sous-populations des lymphocytes T en association avec les autres paramètres de différenciation (cytokines produites par la CPA et le lymphocyte, molécules de costimulations présentes à la membrane des cellules, facteurs de transcription, etc …).[142 ,147]

De la même manière, la SI, induite après un contact initial entre le lymphocyte T CD8 naïf et la CPA, entraine une réponse cytotoxique programmée qui permet d'assurer la maturation des lymphocytes CD8 naïfs.

Bien que le rôle de la SI dans la différenciation ait été peu étudié, il est admis que la structure de la SI soit différente selon le stade d'activation des lymphocytes T. Par exemple, il a été montré que les cellules T $CD8^+$ recevant un puissant signal antigénique associé aux signaux de co-stimulations, peuvent produire de l'IL-2 et proliférer sans former de ségrégation synaptique des zones c-SMAC/p-SMAC de leur SI.[148] Ainsi, les cellules T $CD8^+$ naïves pourraient être activées lors de leur contact avec la CPA sans former de SI mature et concentrique et induire une réponse cytotoxique efficace.

De plus, en ce qui concerne la différenciation des lymphocytes T_H naïfs, Maldonado, *et al.* [149] ont montré que, lors de la formation de la SI entre les cellules T $CD4^+$ naïves et les cellules dendritiques, il existait une co-polarisation du TCR et de récepteurs à l'IFNγ (IFNγ-R) à l'aire de contact. Cet enrichissement d'IFNγ-R à la SI serait à l'origine d'une différenciation

préférentielle des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T_H1. En revanche, l'addition de cytokines telles que l'IL-4, impliquée dans la différenciation T_H2, inhiberait la différenciation en T_H1 en bloquant la co-polarization du TCR et IFNγ-R à la SI.

Enfin, les étapes de sélection thymique intervenant dans la maturation des lymphocytes semblent être associées à une structure de type synaptique. En effet, il a été montré que les thymocytes interagissent avec les cellules stromales du thymus en formant une SI partiellement concentrique dans laquelle la chaine CD3ζ du TCR serait située en périphérie de la zone de contact.[150]

En définitive, la SI semblerait avoir plusieurs fonctions dans les interactions entre les lymphocytes et les CPA. De la même manière, on ne retrouverait pas qu'un un seul type de SI dit mature mais plusieurs types de SI. Notre équipe a contribué à établir la notion que les SI sont des aires de signalisations dynamiques et adaptatives où les cellules T reçoivent des signaux des CPA, les décodent et induisent des réponses biologiques multiples.[151,152,153]

2.3 Mécanismes d'inhibition de l'activation des lymphocytes T

L'activation des lymphocytes lors de la SI conduit à la phase effectrice de la réponse adaptative. Cependant, cette activation secondaire au signal soutenu de l'interaction TCR/CMH est régulée afin d'optimiser la réponse de l'hôte par rapport à l'agression.

Les cellules T expriment des récepteurs inhibiteurs tels que CTLA et PD-1 (Program Death receptor 1). Lors de l'engagement du TCR, les vésicules de CTLA-4 fusionnent avec la membrane plasmique et se lient aux molécules co-activatrices B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) entrainant une diminution de sécrétion de l'IL2 après le recrutement des phosphatases au niveau de CTLA-4. PD-1 exprimé par les cellules T activées, mais aussi les cellules B et les macrophages interagissent avec ses deux ligands PD-L1 et PD-L2 recrutant la tyrosine phosphatase inhibitrice et phosphorylant son motif ITIM (immunoreceptor based inhibitory motif). D'autres récepteurs inhibiteurs sont également exprimés à la surface des lymphocytes T tels que les KIRs (Killing Ig like Receptor) ou LIRs/ILTs (leucocyte Ig like Receptors/Ig like transcripts). Les complexes TCR/CMH sont ensuite dégradés après étape d'ubiquitination.

D'autres mécanismes assurent l'arrêt de la réponse T avec notamment la mort de la cellule T induite par l'activation conduisant à l'apoptose de la cellule T ayant engagé son TCR.

Enfin il existe des lymphocytes T CD4 régulateurs qui ont pour fonction d'inhiber ces réponses immunes en sécrétant notamment des cytokines immunosuppressives: comme par exemple les lymphocytes T_{regs}[154] impliqués dans le contrôle de l'immunité en régulant négativement la fonction des autres cellules.[155,156] Ils exercent cette action par l'expression de récepteurs inhibiteurs à leur membrane et par la sécrétion de facteurs solubles tels que l'IL-10 ou le TGF-β.[156]

2.4 Fonctions effectrices des lymphocytes T CD8$^+$

2.4.1 Réponse cytotoxique des lymphocytes T cytotoxiques

La réponse adaptative cytotoxique met en jeu plusieurs populations de lymphocytes douées de cytotoxicité : des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), Tγδ, les lymphocytes TNK et plus rarement les lymphocytes T CD4$^+$. Les CTL sont les plus nombreux et souvent impliqués dans les réponses antivirales et antiparasitaires intracellulaires. Ils interviennent aussi dans les mécanismes de rejet de greffe et dans les défenses anti-tumorales. Suite à leur interaction avec un complexe CMH de classe I/peptide présenté par une CPA, les CTL détruisent sélectivement les cellules infectées ou tumorales reconnues spécifiquement en préservant les cellules saines.

Lors du contact entre CTL-CPA, les CTL éliminent les cellules cibles en induisant l'apoptose par l'intermédiaire de 2 voies : la voie perforine/granzyme avec exocytose des granules lytiques (voie dominante) et la voie des récepteurs de mort avec expression de ligands récepteurs de mort : FAS-L (ligand membranaire de FAS), TNFα (ligand membranaire du TNF-R) ou TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand).[157,158]

a) La voie perforine/granzyme

La voie perforine/granzyme est la voie majeure des CTL et des cellules NK. Bien que les NK soient constitutivement activés après stimulation de leur récepteur activateur, les CD8 naïfs

doivent être activés par la stimulation du TCR qui permet l'expression de la perforine et des granzymes. Ainsi armés, les CTL vont, lors de leur prochaine rencontre avec l'antigène, polariser leur machinerie lytique vers le site de contact CTL/cellules cibles et déclencher l'exocytose des granules lytiques dans la fente synaptique. Cette libération localisée assure la fonction essentielle de la perforine dont la structure possède une forte homologie de séquence avec celle de la fraction C9 du complément et qui permet de former des pores dans la membrane cytoplasmique de la cellule cible. Ces derniers permettent le passage des granzymes dans le cytoplasme déclenchant alors l'apoptose.

D'autres mécanismes favoriseraient la pénétration des granules lytiques dans le cytoplasme de la cellule cible : soit un déséquilibre membranaire induit par la formation des pores qui permettrait l'endocytose des vésicules de perforine et de granzyme avoisinants, soit les récepteurs de granzyme qui permettraient l'endocytose des vésicules de granules lytiques. Les granzymes sont des serines protéases impliquées dans la lyse cellulaire induite par les CTL. Il en existe plusieurs dont le granzyme A et B qui sont les principales. Le granzyme A induit l'apoptose par des voies indépendantes des caspases. Les granzymes B induisent l'apoptose par deux voies principales : voie mitochondriale après le clivage de la molécule pro-apoptique Bid en tBid ou l'activation de la pro-caspase 3 (Figure 8).

De manière intéressante, la perforine joue un rôle primordial dans l'induction de l'apoptose par les CTL hypothèse soutenue par le fait que les souris perforine-/- ont du mal à se défendre contre une infection virale et semblent développer spontanément des tumeurs comme par exemple des lymphomes B.[159,160] Parallèlement les souris granzyme AB-/- garderaient leur capacité à éliminer une cellule infectée sans développer de maladie sous entendant que d'autres molécules pourraient intervenir pour compenser l'absence de granzyme A ou B.[161]

b) La voie des récepteurs de morts : FAS/FAS-L

Les récepteurs de morts appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF dont les deux principaux impliqués dans les mécanismes de lyse induits par les CTL sont FAS et TNF-R (Figure 8). Ces deux récepteurs ont un domaine de mort intra-cytoplasmique appelé DD (Death Domaine) qui lors de la fixation à leurs ligands FASL ou TNF α déclenche l'apoptose en activant la cascade des caspases en s'associant à l'adaptateur FADD (FAS Associated Death Domain) et à la caspase 8 pour former le complexe de mort DISC (Figure 8).

Aux côtés de FAS-L et TNFα, le ligand TRAIL peut se fixer à ses récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (DR4 et DR5) et induire l'apoptose par activation des caspases après formation du complexe DISC.[157,162] En revanche, si TRAIL se lie aux récepteurs antagonistes (TRAIL-R3, TRAIL-R4 et OPG) dépourvus de domaine de mort (TRAIL-R3)[163,164] ou présentant un domaine de mort tronqué (TRAIL-R4),[164] l'apoptose induite par TRAIL est inhibée soit en entrant en compétition avec les récepteurs agonistes soit en inhibant directement la caspase 8.[165]

L'activation des caspases effectrices et de nombreuses nucléases entrainent la lyse de la cellule cible par désorganisation ou destruction de son cytosquelette, l'arrêt de la machinerie de réparation de l'ADN, l'atteinte des protéines de signalisations ou anti-apoptotiques, le clivage de l'ADN,… Ceci induit le passage des phospatidylsérines sur les feuillets externes de la membrane plasmique (par arrêt des flippases) permettant la fixation des corps aptotiques aux récepteurs scavengers des macrophages puis leur digestion.

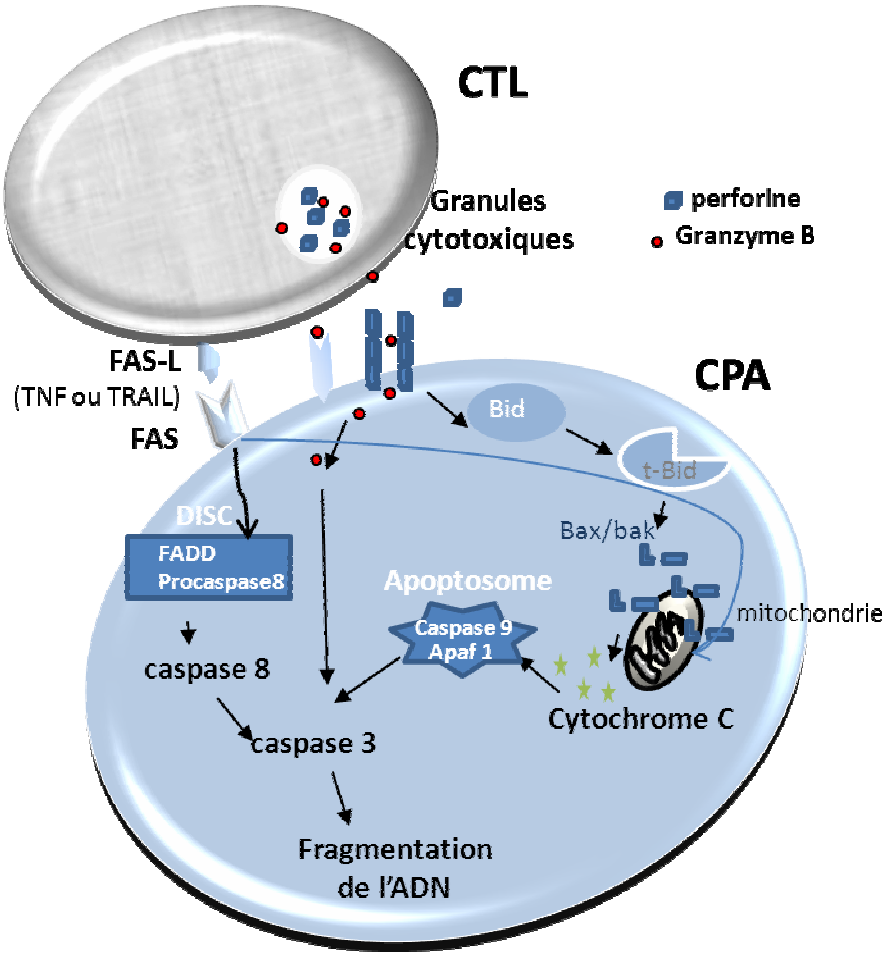


Figure 8 : Mécanismes de lyse des cellules cibles induits par les CTL.

Lors du contact entre CTL et cellule présentatrice de l'antigène (CPA) la CTL élimine les cellules cibles en induisant l'apoptose par l'intermédiaire de 2 voies : la voie perforine/granzyme avec exocytose des granules lytiques de perforine et de granzyme et la voie des récepteurs de mort avec l'expression de ligands récepteurs de mort : FAS-L (ligand membranaire de FAS), TNFα (ligand membranaire du TNF-R) ou TRAIL (ligand des TRAIL-R). La perforine ( ) libérée par le CTL établit des pores membranaires dans la CPA et permet le passage du granzyme B ( ) dans la CPA qui va entrainer son apoptose soit par la voie mitochondriale après le clivage de la molécule pro-apoptique Bid en tBid avec relargage du cytochrome C ( ) permettant la formation de l'apoptosome en s'associant à l'Apaf 1 et à la caspase 9 induisant l'activation de la caspase 3 ou directement par l'activation de la pro-caspase 3. La voie des récepteurs de mort est induite par la liaison de FAS-L (ou TNF ou TRAIL) sur leurs récepteurs induisant leur possible activation et s'associant alors à son adaptateur FADD (FAS Associated Death Domain). Ce dernier se lie avec la caspase 8 pour former le complexe de mort DISC qui active à son tour la caspase 3 et induit l'apoptose de la CPA.

2.4.2 Sécrétion de médiateurs des lymphocytes T cytotoxiques

Les CTL produisent de nombreuses cytokines et chimiokines en réponse à leur activité cytotoxique. Cette production dépendante de la stimulation du TCR nécessite une signalisation du TCR plus soutenue et plus importante que le coup létal induit par la voie perforine/granzyme. IFN-γ et TNF-α sont les principales cytokines délivrées par les CTL lors de leur stimulation permettant d'activer les propriétés antimicrobiennes et anti tumorales et de délivrer un signal de mort. L'IFN-γ est par exemple un puissant activateur des macrophages et des neutrophiles, stimule la différenciation des lymphocytes T_H1 CD4+, augmente la présentation des antigènes par les cellules présentatrices en régulant positivement le CMH et les molécules associées au CMH. Les CTL produisent également des chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5 ou CXCL8, CXCL9 et CXCL10. Ces chimiokines permettent de recruter les autres cellules effectrices de l'immunité : les CPA exprimant l'antigène CCR5, les lymphocytes T_H1 exprimant CXCR3 et CCR5 favorisant ainsi leur activation, mais également d'autres CTL.

Au total, la SI est une aire de contact de signalisation spécialisée entre un lymphocyte et une CPA. La SI lytique permet la polarisation de la machinerie sécrétoire et lytique des CTL vers la cellule cible induisant sa lyse par deux mécanismes principaux : granzyme/perforine et FAS/FAS-L. De par sa fonction d'élimination, la SI lytique pourrait jouer un rôle majeur dans les mécanismes d'immunothérapie dirigée.

3. MECANISMES D'ECHAPPEMENT TUMORAL

Les cellules tumorales sont capables de développer au cours de leur évolution des mécanismes d'échappement tumoral leur permettant de contourner l'immuno-surveillance et même de la modifier à leur profit.

3.1 « Camouflage » de la cellule cancéreuse

Au cours de la progression tumorale, des mécanismes moléculaires vont permettre aux cellules cancéreuses d'échapper à la reconnaissance des cellules du système immunitaire. La plus communément représentée est la perte ou la diminution des molécules de CMH à la surface des cellules cancéreuses qui va contribuer à la survie et à l'infiltration sur le front d'invasion ou à la progression métastatique.[166,167] De nombreux mécanismes aboutissant à la perte d'expression de molécules du CMH ont été décrits. Il peut s'agir soit de dérégulations dans les composantes du protéasome (telles LMP-2, LMP-7), soit de dérégulations des transporteurs peptidiques TAP1 et TAP2, soit de dérégulations transcriptionnelles ou enfin de mutations du gène codant le CMH I ou du gène codant pour la bêta-2 microglobuline. Un autre mécanisme décrit est l'expression hétérogène voire une diminution progressive des antigènes tumoraux exprimés à la surface des cellules tumorales.

3.2 Résistance à la mort cellulaire

Les mécanismes de résistance tumorale aboutissant à la dérégulation des signaux d'apoptose, induits principalement par les cellules CTL ou NK, permettent à la cellule cancéreuse de survivre. Comme décrit ci-dessus, les CTL ainsi que les cellules NK participent activement à

la lyse des cellules cibles en transmettant des signaux apoptotiques via par exemple la voie FAS/FAS-L. Les mécanismes de résistance à l'apoptose induite par FAS-L sont nombreux : diminution de l'expression des récepteurs de morts (FAS, TNF-R ou TRAIL), ou expression d'un récepteur FAS muté retrouvé notamment dans les LF[168,169] ou sécrétion « paradoxale » de FAS-L qui se fixe à son tour sur le récepteur FAS exprimé à la surface des cellules cytotoxiques induisant leur lyse par « contre-attaque » tumorale.[170] D'autres mécanismes impliquant l'action de TRAIL sont également décrits avec une expression anormalement élevée de TRAIL-R antagoniste bloquant l'apoptose induite par TRAIL.[171] Un autre mécanisme, déclenché par l'interaction FAS/FAS-L, se traduit par le phénomène d'AICD (Activation-Induced Cell Death) des cellules T anti-tumorales qui va induire le suicide des cellules cytotoxiques, ainsi que l'apoptose « fratricide » des cellules T voisines FAS positives, après reconnaissance des antigènes tumoraux et engagement de leur TCR.[172] La cellule cancéreuse peut également bloquer l'attaque des CTL via la voie perforine/granzyme par exemple en empêchant la fixation de perforine à sa surface membranaire.[173]

D'autres mécanismes induisant la mort cellulaire programmée situés en aval des récepteurs de morts peuvent être également impliqués : l'expression d'un inhibiteur de la caspase 8 de mort cellulaire, la protéine cFLIP (cellular FLICE-inhibitory protein) les rendant ainsi résistantes à l'apoptose induite par FAS[174] dont la sécrétion par exemple dans les LF peut être favorisée par l'activation de la voie NF-κB secondaire à l'interaction CD40-CD40L[175] ou la mutation de gènes codants pour la cascade des caspases.[176] Enfin l'oncogène *BCL2* codant pour la protéine anti-apoptotique BCL2 peut également être muté entrainant la surexpression de BCL2 comme c'est le cas dans les LF.

3.3 Milieu ambiant « pro-tumoral »

Les cellules tumorales peuvent sécréter des cytokines ou chimiokines qui vont affecter de manière négative la maturation et les fonctions des cellules immunitaires. Ainsi, par exemple, l'IL10 va favoriser la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ en lymphocytes T_H2, en inhibant la présentation antigénique, la production d'IL-12 et l'induction d'une réponse T_H1.[177]

L'IL-10 protège également les tumeurs de la lyse induite par les CTL en diminuant l'expression des molécules du CMH I et II et de la protéine d'adhésion ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) à la surface des cellules tumorales.[178]

Le TGF_β est sécrété par les cellules tumorales mais aussi par les cellules immunitaires immunosuppressives comme par exemple les cellules myéloïdes immunosuppressives ou les sous-populations de lymphocytes T régulateurs : natural lymphocytes T_{regs} $FOXP\ 3^+$ et les induced lymphocytes T régulateurs $FOXP3^-$ (lymphocytes T_r1) ou $FOXP3^+$ (lymphocytes T_H3). Le TGF_β inhibe l'activation, la prolifération et l'activité des lymphocytes. Il favorise également la maturation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T_{regs} $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ou l'expansion des TAM2 et des cellules myéloïdes immunosuppressives.[179]

Les cellules tumorales peuvent également sécréter des facteurs de croissance indispensables à leur progression tels que la molécule VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), responsable de l'angiogenèse tumorale. VEGF possède également une activité inhibitrice sur la maturation et la différenciation des cellules dendritiques, en bloquant le facteur de transcription NF-κB.[180]

3.4 Détournement de l'immuno-surveillance

Loin d'être exhaustif, nous citerons principalement le rôle des lymphocytes T_{regs} qui, recrutés par CCL22, cytokine se fixant au récepteur CCR4 exprimé à la surface des T_{regs}, et activés par les cellules tumorales, vont participer à leur survie en régulant négativement l'immunosurveillance anti-tumorale (Figure 9). Les T_{regs} sécrètent TGF_{β}, l'IL10, IL35, cytokines immunosuppressives inhibant une réponse T_H1 et diminuant les propriétés cytotoxiques des CTL ou des NK. Les T_{regs} sont également capables de transmettre un signal négatif via des molécules de costimulation exprimées à leur surface, telles que PD-L1 et CTLA-4, qui activées atténuent la réponse cellulaire.[181] Les T_{regs} sont également capables de contrer l'attaque des CTL en sécrétant à leur tour des granules cytotoxiques perforine/granzyme.[182,183]

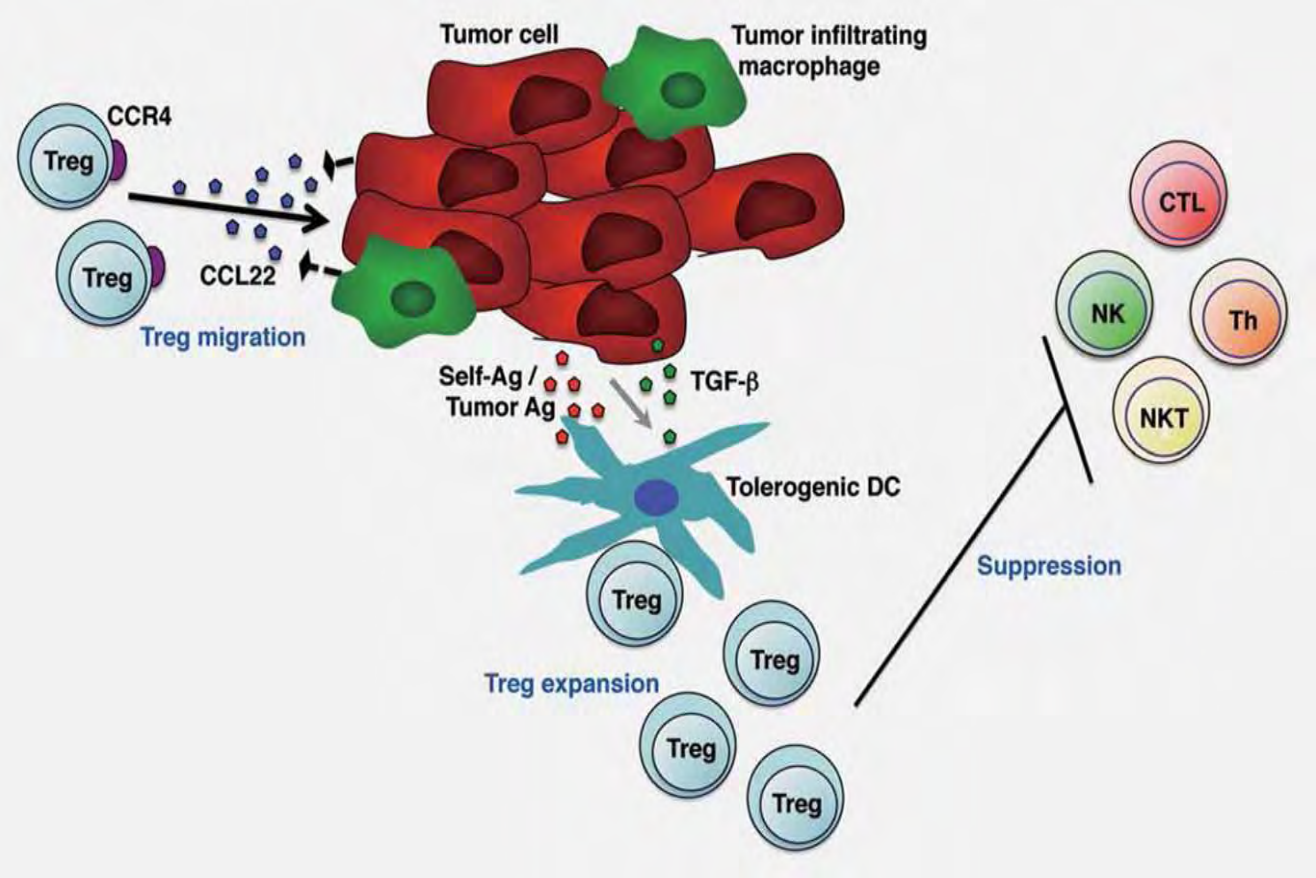


Figure 9 : Fonctions immuno-suppressives des lymphocytes $T_{regs.}$

Nishikawa H *et al*.[184]

Les T_{regs} sont recrutés par des chimiokines libérées par la tumeur telles que CCL22 se fixant à son récepteur CCR4 exprimé à la surface des T_{regs} . Ainsi recrutés les T_{regs} secrètent des cytokines immunosuppressives qui inhibent une réponse T_H1 et qui diminuent les propriétés cytotoxiques des CTL, NKT ou des NK. La tumeur favorise l'expansion des T_{regs} par exemple en secrétant du TGFβ qui induit une différenciation tolérogéniques des DC.

Au total, les nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires d'échappement tumoral participent à la progression tumorale et à son évolution métastatique. Nous retiendrons qu'en créant un microenvironnement suppressif notamment en sécrétant des cytokines ou en favorisant le recrutement ou l'activation de populations immuno-suppressives, principalement les lymphocytes T_{regs} ou les TAM2, les cellules cancéreuses sont capables d'échapper à l'immuno-surveillance notamment en bloquant ou en diminuant les propriétés cytotoxiques des CTL ou NK voire de les contre attaquer.

4. MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LES TUMEURS SOLIDES

4.1 Généralités sur le concept d'immuno-infiltration

Au cours de la dernière décennie, des progrès considérables ont été réalisés dans la caractérisation des cellules immunitaires au sein des tumeurs humaines. Dans l'extrême majorité des cas, ces travaux ont été réalisés en immunohistochimie grâce au développement d'anticorps monoclonaux performants dirigés contre des sous-populations de plus en plus spécifiques au plan phénotypique comme au plan fonctionnel. Ces travaux ont porté essentiellement sur les tumeurs solides, carcinomes ou mélanomes, mais peu dans les lymphomes. Ces études ont fait l'objet de nombreuses revues. Nous nous sommes largement inspirés pour ce texte de la revue récente réalisée de Fridman et Pages,[185] cette équipe française ayant fortement contribué à l'avancée du sujet, notamment dans sa valence clinique. Dans leur revue, le terme retenu a été celui d' « immune contexture », ce néologisme illustre la notion de réseau fonctionnel tissé entre les différentes sous-populations. Il apparait que tous les types de cellules immunitaires sont présents dans les tumeurs humaines : macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, NK, des lymphocytes B, des lymphocytes T incluant des T_H, T_H1 et T_H2, T_H17, T_{regs}, T_{FH} et bien sûr les CTL. Ces cellules peuvent siéger au centre de la tumeur, à sa périphérie ou dans les tissus lymphoïdes adjacents. La localisation, la densité et l'orientation fonctionnelle de ces cellules ont été corrélées à l'évolution clinique, en particulier dans les tumeurs solides. Ainsi, ce domaine a dépassé le stade descriptif pour rentrer dans la vaste problématique des biomarqueurs de maladie cancéreuse.

Les cellules d'origine myéloïde infiltrent généralement le centre de la tumeur mais se retrouvent aussi dans le front d'invasion. Les cellules NK sont localisées dans le stroma, les lymphocytes B dans le front d'invasion, les lymphocytes CD8 dans la zone d'invasion ou au centre de la tumeur mais très peu dans les tissus lymphoïdes adjacents, au contraire des cellules dendritiques. Toutefois, la localisation des sous-populations varie en fonction du type de tumeur. Dans sa revue, Fridman et collègues[185] colligent 124 articles qui analysent la corrélation entre les différents types d'immuno-infiltration et l'évolution. Dans la majorité des cas, la densité en lymphocytes $CD8^+$ CD45RO et en lymphocytes T_H1 est corrélée avec un meilleur pronostic (cancers colo-rectaux, de l'ovaire, de la prostate, de la vessie, du sein, les cancers ORL, le mélanome) (voir Figure 10) avec une exception notable, le cancer du rein où la corrélation est inverse. Des résultats bien plus contradictoires ont été obtenus avec les T_H2. La richesse en T_{regs} (sur la base de leur phénotype FOXP3) est un facteur péjoratif dans le cancer de l'ovaire, le cancer du sein et le carcinome hépatique mais la corrélation inverse est trouvée dans le cancer de la vessie ou le lymphome de Hodgkin. Il convient de noter qu'il est difficile de typer convenablement cette population de lymphocytes T régulateurs sur la seule base de l'expression de FOXP3 il apparait maintenant clair que certains lymphocytes T activés sont également capables d'exprimer FOXP3.

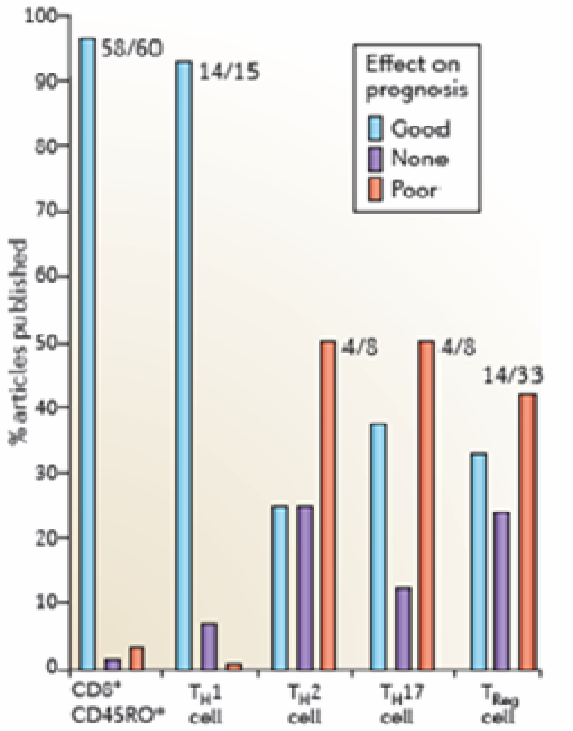


Figure 10 : Impact pronostique des différentes sous populations immunitaires dans les cancers. Fridman *et al.*[185]

4.2 Rôle des chémokines dans l'immuno-infiltration

La migration des cellules immunitaires vers la tumeur est conditionnée par une large variété de chemokines produites par la tumeur et les cellules accessoires. Ce domaine est tout à fait central et a fait l'objet de nombreux travaux. Les données sont résumées dans le tableau ci-dessous (tableau 2) issu de la revue de Fridman et Pages.[185] La plupart de ces chémokines sont exprimées dans les cellules de LF. Toutefois, la distribution et le rôle fonctionnel de ces chémokines dans les LF a fait l'objet d'études limitées[186] contrairement au lymphome de Hodgkin et à la LLC où ce domaine a reçu bien plus d'attention. Un intérêt particulier doit

être toutefois accordé à CCL3 dont l'expression est accrue après traitement par Rituximab et ce phénomène favoriserait l'infiltration par les NK et donc l'ADCC.[187]

Cells	Chemoattractants	Main receptors	Attracted cells
CD138$^+$ plasma cells, M2 macrophages and tumour cells	CCL17 and CCL22	CCR4	T_H cells and T_{Reg} cells
Mature dendritic cells and tumour cells	CCL19 and CCL21	CCR7	T cells in SLO and dendritic cells
T_{FH} cells, CD21$^+$ FDCs and tumour cells	CXCL13	CXCR5	B cells in SLO and T_{FH} cells
Lymphocytes and tumour cells	IL-16	CD4	Dendritic cells, macrophages and T_H cells
Endothelial cells, macrophages, memory T cells and tumour cells	CCL5	CCR5, CCR1 and CCR3	T_H1 cells, macrophages and memory T cells
Endothelial cells, M1 macrophages and tumour cells	CXCL9 and CXCL10	CXCR3	Memory T cells and macrophages
Endothelial cells, macrophages and tumour cells	CX3CL1	CX3CR1	T_H1 cells, NK cells and cytotoxic T cells

FDCs, follicular dendritic cells; IL-16, interleukin-16; NK cells, natural killer cells; SLO, secondary lymphoid organ; T_{FH} cells, T follicular helper cells; T_H, T helper; T_{Reg} cells, regulatory T cells.

Tableau 2 : Rôle des chémokines et cytokines dans le microenvironnement immunitaire des cancers. Fridman *et al*.[185]

4.3 Immuno-infiltration et chimiothérapie

La densité en CD8 corrèle aussi la réponse à la chimiothérapie dans le cancer du sein et les cancers secondaires du foie, mais aussi la réponse vaccinale dans le contexte des mélanomes. Cette corrélation étaye plus encore le concept nouveau développé autour du thème de l'effet immunogène des chimiothérapies par Kroemer et collègues.[188] Le postulat consiste à considérer que la destruction même d'une partie des cellules tumorales va induire une libération massive d'antigènes tumoraux intracellulaires uniques ou partagés, susceptible d'induire une réponse T spécifique. Dans ce contexte, le mode de présentation aux CTL par le CMH de classe I se fait généralement via le processus de cross-présentation.[189] La réponse des CTL est d'autant plus efficace que le stress génotoxique en général, et les chimiothérapies en particulier, ont pour effet d'augmenter l'expression des récepteurs de mort et faciliter la voie de signalisation en aval, notamment pour le système FAS/FAS-L.[190] Ainsi, l'action des lymphocytes T $CD8^+$ résidents compléterait la cytoréduction induite par la chimiothérapie. Cette hypothèse pourrait expliquer les réponses retardées telles qu'elles sont précisément observées dans les LF. Bien que séduisante, cette hypothèse alliant chimiothérapie et immunologie, se heurte toutefois à une difficulté conceptuelle : la nécessité d'imaginer que les CTL résidents puissent survivre à la chimiothérapie, sauf par exemple à considérer que les CTL à un stade particulier de leur activation sont résistants à l'apoptose.

4.4 Influence des traitements sur l'immuno-infiltration

Il apparait en effet que certains médicaments anti-cancéreux sont susceptibles de modifier quantitativement ou qualitativement l'immuno-infiltration. Les données sont résumées dans le tableau ci-dessous (tableau 3).

- Immunogenic chemotherapies, such as oxaliplatin, which induce calreticulin expression on the tumour cell membrane, result in an increased uptake of the tumour cell by phagocytic cells and improved antigen presentation, which helps to clear cancer cells.
- Anti-angiogenic drugs decrease the levels of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), as well as circulating and intratumoural regulatory T (T_{Reg}) cells, which modulate anti-tumour immunity.
- Immune checkpoint-blocking antibodies (which target cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4), programmed cell death protein 1 (PD1), PD1 ligand 1 (PDL1) and CD137, for example) and specific depletion of T_{Reg} cells increase the infiltration of the tumour microenvironment by T cells, particularly $CD8^+$ T cells, which increases immune responses to tumour cells.
- Tumour vaccines increase T cell infiltration within tumours, which increases cytotoxic immune responses to tumour cells[9].
- Tumour-specific monoclonal antibodies can induce an adaptive immune response to tumour cells

Tableau 3 : Effets immuno-modulateurs des traitements anti-cancéreux.

Fridman *et al.*[185]

Appliqué à la problématique des LF, cette question est d'importance. Toutefois, en dehors de rares études soulignant une modulation du microenvironnement après adjonction du Rituximab, rien n'est connu sur l'effet immuno-modulateur de la R-chimiothérapie ou de la vaccination Id. On peut rapprocher cette problématique de l'aptitude de certains médicaments, tel le lénalidomide, à faciliter la synapse immunologique.[191,192] Par ailleurs, il est probable que certains médicaments anti-cancéreux influencent l'immuno-infiltration en modifiant le réseau vasculaire, sanguin ou lymphatique. En effet, les cellules endothéliales sont très vulnérables au stress génotoxique. Il est probable aussi que la désorganisation de l'angiogénèse ait des répercussions sur l'accessibilité des cellules immunitaires aux cellules tumorales. Il en est de même des stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques ou même seulement anti-inflammatoires.

4.5 Rôle de l'hypoxie sur l'immuno-contrôle

Le micro-environnement péri-tumoral n'est pas caractérisé par la seule composante cellulaire. Il convient en effet de rappeler que le développement tumoral se réalise dans un espace confiné et des conditions environnementales hostiles dominées par le stress mécanique lié à l'hyperdensité cellulaire, à la densification de la matrice extracellulaire et à l'engagement des intégrines. Le confinement a aussi pour effet de réduire les ressources et en particulier l'oxygène. Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature d'éléments susceptibles de relier stress mécanique et modulation de l'efficacité des CTL. Par contre, plusieurs travaux récents dont ceux réalisés par l'équipe de Salem Chouaib[193] montrent que l'hypoxie réduit la sensibilité des cellules cibles aux CTL via l'amplification HIF-1 dépendante de STAT3.[194,193] Sur la base des données fournies par les sphéroïdes et la signature hypoxique retrouvée dans les follicules des LF, il est possible que l'hypoxie représente un élément limitant l'efficacité des CTL.

4.6 Contribution de l'imagerie cellulaire dynamique

Si l'immunohistochimie a représenté la technique de choix pour étudier l'immuno-infiltration dans les tumeurs humaines, d'autres techniques ont été utilisées dans des modèles expérimentaux et par exemple, la microscopie bi-photonique intravitale. Ces techniques ont permis de montrer que, dans les ganglions, les lymphocytes T sont très mobiles évoluant à des vitesses très élevées (jusqu'à 25 microM/min) avec des capacités migratoires amiboïdes bien plus efficaces que les cellules dendritiques ou les cellules tumorales. Cette grande mobilité permet au lymphocyte T de « scanner » un grand nombre de cellules dendritiques à la

recherche d'un ligand potentiel CMH-peptide. La durée de contact entre lymphocyte T et cellule cible varie en fonction de l'état de maturation du LT et de la présence de cellules régulatrices, de plusieurs heures pour un premier priming efficace à quelques minutes. Au cours de la réponse anti-tumorale, on retrouve ces phénomènes.

Dans un travail réalisé en microscopie intravitale par l'équipe de Sebastian Amigorena,[195] il a été décrit en temps réel la destruction d'une tumeur par des CTL spécifiques (Figure 11).[196] Il ressort de ce travail que les CTL participent à l'élimination de la tumeur en deux phases : une phase précoce au cours de laquelle les CTL se regroupent d'abord à la périphérie tumorale où ils rentrent en contact avec la cellule cancéreuse qui lui présente son peptide antigénique. Une fois reconnue, le CTL peut détruire la cellule tumorale dans la phase tardive et poursuit sa migration en pénétrant progressivement au cœur de la tumeur pour la détruire. Après avoir détruit les cellules tumorales, les CTL poursuivent leur migration en suivant les vaisseaux et les fibres de collagène. Fait essentiel, ces phénomènes sont totalement abrogés si les cellules tumorales n'expriment pas l'antigène spécifique.[196] On retient de ces travaux l'extrême efficacité de la réponse cytotoxique induite par les CTL mais également le nombre de paramètres susceptibles d'influencer l'éradication des cellules tumorales, en particulier l'efficacité de la présentation mais aussi l'organisation matricielle et la qualité du réseau vasculaire.

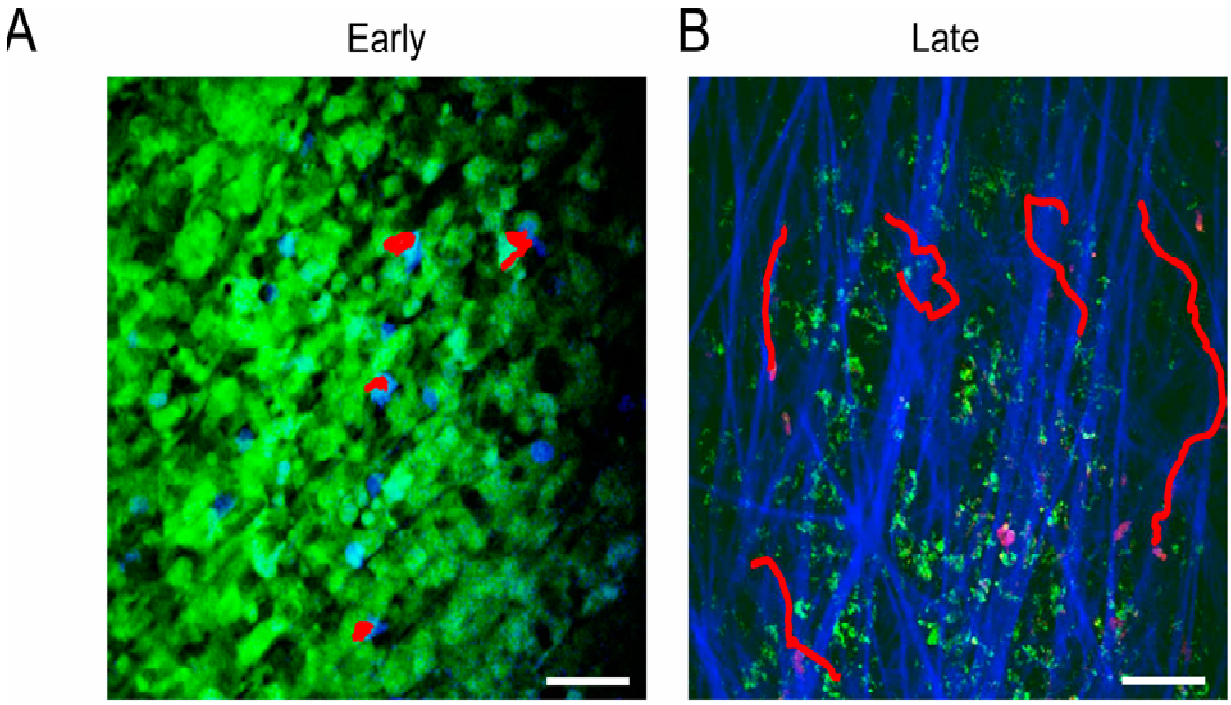


Figure 11 : Dynamique d'infiltration et de migration des CTL intra-tumoraux au microscope biphotonique. Boissonnas *et al*.[196]

Figure 11 A (phase précoce) : trajet migratoire en rouge des CTL (bleu) au contact des cellules tumorales (vert). **Figure 11** B (phase tardive) : destruction de la tumeur et migration des CTL le long des fibres de collagène (faisceaux en bleu).

La plupart de ces études dynamiques ont été réalisées chez la souris, et il reste à ce jour, peu d'études dynamiques faites sur les tissus humains explantés, à l'exception de certains travaux réalisés dans les cancers du poumon chez l'homme rapportés par l'équipe d'E Donnadieu et collaborateurs.

Ces travaux ont largement influencés les perspectives de mon travail. L'élégant travail de E. Donnadieu a montré en par microscopie biphotonique en temps réel que la matrice extracellulaire (MEC) des tumeurs pulmonaires joue un rôle clé dans la localisation péri-tumorale préférentielle des lymphocytes T. En effet, d'une part la MEC se densifie autour de la tumeur constituant une barrière plus difficile à franchir par les cellules T et d'autre part, elle influence le trajet migratoire des T qui au lieu de franchir cette barrière stromale vers la tumeur, migrent parallèlement à la tumeur le long des fibres péri-vasculaires et semblent être maintenus en périphérie du moins en partie par des chimiokines répulsives.[197]

OBJECTIFS

OBJECTIFS DE L'ETUDE DU MICROENVIRONNEMENT DANS LES LYMPHOMES FOLLICULAIRES

1.2 Objectif principal

L'objectif général est d'évaluer :

La place des lymphocytes T dans la biologie et l'évolution des LF.

1.2 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques sont d'évaluer :

*La localisation et la représentation des sous-populations T lymphocytaires notamment des CTL ainsi que leur fonction présumée dans des échantillons de ganglions lymphatiques inclus en paraffine issus de patients LF (n=80) au sein d'une cohorte bi-centrique (Laboratoire de Pathologie CHU Toulouse, France et Laboratoire de Pathologie de l'Université Catholique de Rome). A l'aide de techniques immunohistochimiques traditionnelles (simple ou double marquage) j'ai pu apprécier le mode d'infiltration des CTL vis-à-vis des follicules lymphomateux, la densité des CTL ainsi que l'expression à leur surface des protéines associées aux granules cytotoxiques qui m'a permis d'établir un score Granzyme B.

* L'étude des propriétés cytotoxiques des CTL. J'ai pu tout d'abord quantifier la densité de CTL et leur niveau d'expression de granzyme B sur des échantillons de ganglions de LF non inclus en paraffine (n=10) versus ganglions réactionnels à l'aide de techniques d'imagerie confocale. Puis dans un deuxième temps j'ai étudié la fonctionnalité des lymphocytes T $CD8^{+}Granzyme^{+}$ résidents et en particulier leur aptitude à former synapse avec les cellules tumorales adjacentes ainsi que leur performance de lyse. Cette étude a été réalisée in « tissu » échantillons de ganglions de LF non inclus en paraffine et in vitro en utilisant des CTL

autologues dirigés contre des cellules de LF autologues ou des lignées de LF, et quantifiés soit par imagerie confocale soit par cytométrie.

*La valeur pronostique de l'immuno-infiltration par les CTL. Enfin je me suis attachée à rechercher un éventuel impact pronostique des CTL dans l'évolution ou la progression de la maladie après traitement par R-chimiothérapie.

Les autres objectifs spécifiques sont en cours d'évaluation ou restent à définir :

*La distribution des cytokines et chémokines : pour connaitre l'orientation de la réponse et les facteurs susceptibles d'expliquer un déficit d'immuno-infiltration des populations cytotoxiques ou un excès de recrutement de populations régulatrices.

* L'organisation des vaisseaux afférents médiateurs de l'immuno-infiltration avec mention particulière pour la lymphangiogénèse et la distribution des HEV (High Endothelial Venules).

*La modélisation générale du système pour visualiser les interactions CTL-cellules tumorales et évaluer l'influence de certains médicaments (Rituximab, lenalidomide) sur la diffusion et l'interaction des CTL avec les cellules tumorales.

L'objectif principal et les objectifs spécifiques s'intègrent dans une perspective d'immuno-pharmacologie.

RESULTATS

Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study

Camille Laurent,[1-3] Sabina Müller,[1,2] Catherine Do,[4] Talal Al-Saati,[5] Sophie Allart,[6] Luigi Maria Larocca,[7] Stefan Hohaus,[8] Sophie Duchez,[1,2] Anne Quillet-Mary,[2,9] Guy Laurent,[2,9,10] Pierre Brousset,[2,3] and Salvatore Valitutti[1,2]

[1]Inserm, U1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Section Dynamique Moléculaire des Interactions Lymphocytaires, Toulouse, France; [2]Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France; [3]Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Purpan, Toulouse, France; [4]Inserm, U858, Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France; [5]Plateau technique d'histopathologie expérimentale, CHU Purpan, Toulouse, France; [6]Plateau technique imagerie cellulaire, CHU Purpan, Toulouse, France; [7]Istituto di Anatomia Patologica and [8]Ematologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy; [9]Inserm, U1037, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Immunité innée et hémopathies malignes, Toulouse, France; and [10]Service d'Hématologie Clinique, CHU Purpan, Toulouse, France

CD8$^+$ CTLs are thought to play a role in the control of follicular lymphoma (FL). Yet, the link between CTL tissue distribution, activation status, ability to kill FL cells in vivo, and disease progression is still elusive. Pretreatment lymph nodes from FL patients were analyzed by IHC (n = 80) or by 3-color confocal microscopy (n = 10). IHC revealed a rich infiltrate of CD8$^+$ granzyme B$^+$ (GrzB) cells in FL interfollicular spaces. Accordingly, confocal microscopy showed an increased number of CD3$^+$CD8$^+$GrzB$^+$ CTLs and a brighter GrzB staining in individual CTL in FL samples compared with reactive lymph nodes. CTLs did not penetrate tumor nodules. In 3-dimensional (3-D) image reconstructions, CTLs were detected at the FL follicle border where they formed lytic synapse-like structures with FL B cells and with apoptotic cells, suggesting an in situ cytotoxic function. Finally, although GrzB expression in CTLs did not correlate with risk factors, high GrzB content correlated with prolonged progression free-survival (PFS) after rituximab-combined chemotherapy. Our results show the recruitment of armed CTLs with a tumor-controlling potential into FL lymph nodes and suggest that CTL-associated GrzB expression could influence PFS in FL patients having received rituximab-combined chemotherapy. (*Blood.* 2011;118(20):5371-5379)

Introduction

Follicular lymphoma (FL) is the second most frequent B-cell lymphoma in adults. It is based on the tumoral proliferation of B lymphocytes that are organized in neoplastic nodules with a follicular structure. It is considered an "indolent" lymphoma, based on nonaggressive initial presentation. The introduction of therapeutic strategies combining chemotherapy and rituximab, a mAb directed against the B-cell membrane-associated CD20 Ag, has significantly improved both response rate and progression free-survival in large phase 3 studies.[1-3] However, despite the indolent course and evident therapeutic benefits, FL is still considered an incurable disease because patients invariably relapse and ultimately die, particularly in the aggressive forms of the disease, characterized by high tumor burden correlated with risk factors as measured by the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI)[4] or the Follicular Lymphoma Study Group (Groupe d'Etude du Lymphome Folliculaire [GELF]) scores.[5]

Although the mechanisms of relapse and tumor progression are likely to be manifold, several lines of evidences indicate a role for the antitumor immune response in FL clinical outcome. IHC and gene-expression studies have contributed to establish the notion that, in FL, immune cell infiltration strongly influences the clinical behavior, including FL transformation into aggressive lymphomas[6] and patient survival[6] (reviewed in Relander et al[7]). A predominance of T cells or of T cell–related genes correlates with good prognosis, whereas predominance of accessory cells (dendritic cells and monocytes) is associated with aggressive course.[8-14] The T-cell infiltrate in FL displays heterogeneous phenotypic markers including CD4, CD8, CD57, and Foxp3, and the activation marker CD69, suggesting an intense functional interaction between various T-cell populations and neoplastic B cells.[6-14] Among T-cell populations, it is generally considered that CD8$^+$ T cells play an essential role in antitumor immune response as described in other tumor models.[15] Accordingly, an increased CD8$^+$ cell infiltrate was found to correlate with a better FL prognosis.[8,14,16]

CD8$^+$ cytotoxic T cells (CTLs) are important actors of the immune response against virally infected and tumor cells. They are activated by the engagement of their Ag receptors (TCR) with complexes formed between antigenic peptides and MHC class I molecules displayed on the surface of target cells. TCR signaling leads to the rapid secretion of the pore-forming protein perforin, granzyme B, and other proteases stocked in CTL cytoplasmic granules (named lytic granules) at the CTL/target cell contact site.[17,18] Penetration of granzyme B in target cells triggers an apoptotic cascade ultimately leading to target cell annihilation.[19]

Several important questions remain unresolved concerning the role of CD8$^+$ T cells in FL, including 3-dimensional (3-D) tissue distribution, cytotoxic equipment, lytic capacity, ability to form

Submitted March 31, 2011; accepted July 13, 2011. Prepublished online as Blood First Edition paper, August 19, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-04-345777.

An Inside *Blood* analysis of this article appears at the front of this issue.

The online version of this article contains a data supplement.

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

© 2011 by The American Society of Hematology

functional contacts with FL tumor cells as well as the relationship between these parameters and the clinical outcome.

In this study we used conventional IHC and 3-D confocal microscopy to investigate, in FL lymph nodes, the number and location of infiltrating CTLs as well as the cytolytic potential of individual CTL. Our results show that CTLs are enriched in interfollicular spaces in FL, express—at the individual cell level—high amounts of GrzB, form lytic synapse-like structures in contact with FL B cells, and exhibit lytic potential. Our study also indicates that GrzB expression correlates with prolonged PFS in FL patients treated with immunochemotherapy.

Methods

Patients

For IHC analysis, 80 FL patients diagnosed within 2 institutions (Department of Hematology, CHU Toulouse, France; and Department of Hematology, Catholic University, Rome, Italy) were included in this study between 2000 and 2009. All patient clinical data are described in Table 1. All patients were treated with immunochemotherapy (R-chemo) by combining rituximab with either CVP (cyclophosphamide, vincristine, and prednisone) (n = 15) or CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; n = 58) or fludarabine mitoxantrone (n = 7). R-chemo was given as 6 (RCHOP) or 8 (RCVP) cycles. Patients treated with fludarabine and mitoxantrone received 6 cycles when aged < 60 years (n = 5) or 4 cycles when aged > 60 years (n = 2). Twelve patients received rituximab maintenance therapy (RCHOP + R or fludarabine mitoxantrone + R) in the context of the PRIMA study.[20] Response to treatment was assessed according to the Cheson 1999 criteria.[21]

For confocal microscopy analysis, 10 additional FL patients diagnosed between 2008 and 2010 in 2 institutions (n = 8 in Department of Hematology, CHU Toulouse and n = 2 in Department of Hematology, Catholic University, Rome) were included in this study. The median age was 62 years (ranged from 42 to 74 years). The male/female ratio was 1/1. According to Ann Arbor staging, 8 patients (80%) were in advanced stages (stage III-IV).

All patients, included in both IHC and confocal microscopy analysis, were studied at the time of diagnosis. Institutional ethical approval from Inserm U1043 and informed consent were obtained in compliance with the Helsinki protocol.

IHC

For IHC examination, 3-μm-thick sections from paraffin-embedded whole tissue of 80 FL lymph nodes fixed in 10% formalin or Dubosq-Brazil (alcohol-based Bouin) were tested using either a Ventana Benchmark XT immunostainer (Ventana) or a TechMate (DAKO). In parallel, 3-μm-thick sections from the same patients were H&E stained. For IHC, the panel included Abs directed against CD3 (A452 Poly, dilution 1:25; DAKO), CD8 (clone C8/144b, dilution 1:10; DAKO), and GrzB (clone GrB-7, dilution 1:30; DAKO). To characterize $CD8^+GrzB^+$ cells, double staining was performed with anti-CD8 and anti-GrzB Abs. For GrzB staining, samples were grouped according to their scores as indicated in Table 2. GrzB staining was scored by 3 pathologists (C.L., P.B., and L.M.L.) in a blinded fashion. Interrater agreement was estimated by Cohen κ coefficient (κ), according to Landis and Koch magnitude guidelines.[22] Agreement for the GrzB score was almost "perfect" ($\kappa = 0.84$, $P < .0001$). However, agreement for intensity staining and percentage of $GrzB^+$ cells were "substantial" ($\kappa = 0.74$, $P < .0001$ and $\kappa = 0.6616$, $P < .0001$, respectively).

Confocal microscopy

For confocal microscopy, samples from 10 FL lymph nodes and 5 reactive lymph nodes were fixed in 4% paraformaldehyde and frozen to perform 10 to 15-μm-thick cryostat cutting sections. Samples were pretreated by microwave incubation in pH 6.0, 0.1M sodium citrate. Samples were then permeabilized with 0.1% saponin (in PBS 3% BSA/HEPES, 10% goat serum, and 10% human serum), and stained overnight at 4°C with the following 3 primary Abs: CD3 (A452 Poly, dilution 1:25; DAKO), CD8 (clone C8/144b, dilution 1:10; DAKO) and Granzyme B (clone GrB-7, dilution 1:30; DAKO); CD79a (clone JCB117, dilution 1:25; DAKO); CD20 (clone L26, dilution 1:40; DAKO); active caspase 3 (a-CASP3; rabbit polyclonal, dilution 1:1000 Abcam); CD137 (clone BBK-2, dilution 1:30; Abcam) in PBS 3% BSA/HEPES, 0.1% saponin. Primary Abs were followed by goat anti–mouse isotype-specific Ab or goat anti–rabbit Abs labeled with Alexa 488, Alexa 633, and Alexa 555 (Molecular Probes) for 2 hours at room temperature.

In some experiments, $CD8^+$ T cells were obtained from patient peripheral blood or from FL lymph nodes by negative selection using microbeads (Miltenyi Biotec). Freshly isolated $CD8^+$ T-cell populations were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 5% human serum and IL-2 (250 U/mL) in the presence of anti-CD3/CD28 mAb-coated Dynabeads (Invitrogen) at a ratio of 1 bead for 10 T cells. Expanded T cells were used between 15 and 20 days of culture. CTLs from FL peripheral blood or from lymph node tissue were cocultured with either EBV-transformed B cells (JY)[23] or with autologous FL B cells, respectively, which were either unpulsed or pulsed with bacterial superantigen cocktail (SAg, 100 ng/mL TSST-1, SEC 1, SEB, SEE). After 1 hour of culture, cells were stained with Abs directed against a-CASP3, CD8 (clone UCH-T4, 1:40; Santa Cruz Biotechnology) and GrzB (clone GB11, 1:40; Santa Cruz Biotechnology).[23] The samples were mounted in Fluorescence Mounting Medium (DAKO) and examined using a Zeiss LSM 510 or a Zeiss LSM 710 confocal microscope with a 63× Plan-Apochromat objective (1.4 oil). An argon laser at 488 nm was used to detect Alexa 488 fluorochrome. To detect Alexa 555 fluorescence, a helium laser was filtered at 543 nm. To detect Alexa 633 fluorescence, a helium laser was filtered at 633 nm. Under standard imaging conditions no signal from one fluorochrome could be detected with the other filter set. For each pair of Abs used, standardized conditions for pinhole size, and for gain and offset (brightness and contrast), were used for image capture. For 3-D images, a series of 15 to 25 z-sections taken at 0.5-μm distance was acquired for each T-cell–APC conjugate. Three-dimensional reconstruction of the images was performed using the Zeiss LSM software.

Confocal image quantification

All analyses were performed using Metamorph Imaging System software (Molecular Devices Corp). Ten FL versus 5 reactive lymph nodes were analyzed. To score $CD3^+CD8^+GrzB^+$ cells, at least 5 fields were quantified for each sample. The number of $CD3^+CD8^+GrzB^+$ cells was obtained as follows: $CD3^+CD8^+$ positive cells were identified by superposing for each field the CD3 (blue) staining with the CD8 (green) staining. The mask corresponding to $CD3^+CD8^+$ positive cells was superimposed to the GrzB (red) staining. $CD3^+CD8^+GrzB^+$ cells were scored manually. The mean intensity of GrzB red fluorescence of individual $CD3^+CD8^+GrzB^+$ cells, present in each field, was calculated by dividing the total $GrzB^+$ red pixels by the number of $CD3^+CD8^+GrzB^+$ cells scored. For the different samples standardized conditions for pinhole size, and for gain and offset (brightness and contrast), were used for image capture.

To score a-$CASP3^+$ cells in contact with $CD8^+GrzB^+$ 13 to 19 confocal z-sections were acquired from 5 fields of 7 FL lymph nodes. The contact between cells was scored on 3-D reconstructed images by visual inspection.

Measurement of CTL-mediated cytoxicity

FL lymph nodes were gently teased in RPMI 1640 medium (Invitrogen) to obtain single-cell suspensions. The sheep RBCs (SRBCs) rosette method was used to separate T cells from B cells. SRBC rosette-based T-cell selection allowed the parallel isolation of FL B cells and $CD8^+$ cells from relatively small fragments of FL lymph nodes and was instrumental to enhance the efficiency of $CD8^+$ cell purification by negative selection. Briefly, FL lymph node cell suspensions were incubated with AET-SRBC during 30 minutes at 4°C and separated on a Ficoll gradient. FL B cells localized at the interface while T cells/AET-SRBC rosettes localized in the

Table 1. Clinical and histological features of the 80 FL cases

Variables	No. (%)	PFS		*P* value for PFS	
		Median, mo	2-year survival, % (95 CI%)	Univariate analysis	Multivariate analysis
Center				.0396	.657
French	50 (63)	62	73 (58-84)		
Italian	30 (37)	85	85 (65-94)		
Age, y		NC	NC	.18	.179
Median	58				
Range	26-83				
Hazard ratio	1.02				
Sex				.0742	.003
Male	39 (49)	40	70 (53-82)		
Female	41 (51)	76	86 (69-94)		
Histologic grade				.8519	
1	42 (53)	62	79 (62-89)		
2	24 (30)	NR	86 (62-95)		
3	14 (17)	76	63 (33-83)		
Architectural pattern				.9560	
Follicular	71 (90)	70	76 (64-85)		
Follicular and diffuse	6 (8)	NR	83 (27-97)		
Diffuse	3 (2)	62	100		
Stage				.7422	
I	2 (2)	19	50 (1-91)		
II	7 (9)	NR	83 (27-97)		
III	16 (20)	76	66 (37-84)		
IV	55 (69)	70	82 (68-90)		
B symptoms				.0982	.252
Present	28 (35)	70	68 (47-83)		
Absent	52 (65)	85	83 (69-91)		
BM involvement				.9270	
Present	48 (60)	70	79 (64-89)		
Absent	32 (40)	76	76 (56-88)		
FLIPI*				.9797	
Low risk (0-1)	15 (19)	62	86 (54-96)		
Intermediate risk (2)	26 (33)	NR	79 (57-91)		
High ($\geq$ 3)	38 (48)	70	74 (55-85)		
GELF				.3138	
GELF = 0	14 (18)	62	85 (52-96)		
GELF > 0	65 (82)	70	76 (62-85)		
Primary treatment				.2685	.015
R-chemotherapy	68 (85)	70	77 (64-86)		
R-chemotherapy + R	12 (15)	NR	82 (45-95)		
Treatment response*				.0015	.004
CR or CRu†	61 (76)	70	87 (74-93)		
PR‡	18 (23)	28	50 (26-70)		
CD8				.0202	
< 10%	4 (5)	12	50 (6-84)		—
10%-30%	39 (49)	40	69 (50-81)		.627
$\geq$ 30%	37 (46)	85	91 (75-97)		.300
GrzB score				.0008	< .0001
Low	32 (40)	40	59 (40-74)		
High	48 (60)	85	93 (79-98)		

Final cox model contains score, treatment response, primary treatment, and sex.

FL indicates follicular lymphoma; PFS, progression free-survival; CI, confidence interval; NC, not calculated; NR, not reached; FLIPI, Follicular Lymphoma International Prognostic Index; GELF, Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires; CR, complete response; PR, partial response; CRu, CR unconfirmed; R-CHOP, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; R-CVP, rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone; R-CHOP + R, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone and rituximab maintenance; R-Fludarabine-mitoxantrone + R, rituximab, fludarabine, mitoxantrone, rituximab maintenance; and GrzB, granzyme B.

*One patient had no remission after treatment.

†Complete response and complete response undefined (according to Cheson criteria [18]).

‡Partial response.

pellet. SRBC rosettes containing T cells were briefly incubated with sterile distilled water to destroy SRBC and then washed 2 times in PBS. $CD8^+$ T cells were obtained by negative selection using microbeads (Miltenyi Biotec). T-cell and FL B cell purity was > 95%.

Freshly isolated $CD8^+$ T-cell populations were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 5% human serum and IL-2 (250 U/mL) in the presence of anti-CD3/CD28 mAb-coated Dynabeads (Invitrogen) at a ratio of 1 bead for 10 T cells. Expanded T cells were used between 15 and 20 days of culture.

In vitro–expanded CTLs were conjugated with target cells either unpulsed or pulsed with a bacterial superantigen cocktail (SAg, 100 ng/mL TSST-1, SEC 1, SEB, SEE) for 4 hours at a 2:1 E T ratio. To be excluded

Table 2. Clinical features and IHC score for CD8 and GrzB staining of the 80 FL cases

	Immunohistochemical analysis		
	Group A	Group B	
	High GrzB	Low GrzB	
Variable	% [95% CI], N = 48	% [95% CI], N = 32	*P*
Median age (range), y	57.5 (26-83)	58 (33-78)	.8742*
Sex			.121†
Male	58 (n = 28) [43-72]	41 (n = 13) (24-59]	
Female	42 (n = 20) [28-57]	59 (n = 19) [41-76]	
Stage			.628‡
I	4 (n = 2) [1-14]	0 (0-11]	
II	8 (n = 4) [1-20]	9 (n = 3) [2-25]	
III	17 (n = 8) [7-30]	25 (n = 8) [11-43]	
IV	71 (n = 34) [56-83]	66 (n = 21) [47-81]	
FLIPI			.183†
Low risk (0-1)	26 (n = 12) [14-40]	9 (n = 3) [2-25]	
intermediate risk (2)	32 (n = 15) [19-47]	35 (n = 11) [19-53]	
High (≥ 3)	42 (n = 20) [28-58]	56 (n = 18) [38-74]	
GELF			.109*
GELF = 0	23 (n = 11) [12-38]	9 (n = 3) [2-25]	
GELF > 0	77 (n = 36) [62-88]	91 (n = 29) [75-98]	
BM involvement	58 (n = 28) [43-72]	63 (n = 20) [44-79]	.748*
Treatment			.592‡
R-CHOP	65 (n = 31) [49-78]	50 (n = 16) [32-68]	
R-CVP	17 (n = 8) [7-30]	22 (n = 7) [9-40]	
R Fludarabine-mitoxantrone	6 (n = 3) [13-17]	9 (n = 3) [2-25]	
R-CHOP + R	10 (n = 5) [3-23]	19 (n = 6) [7-36]	
R Fludarabine-mitoxantrone + R	2 (n = 1) [0-11]	0 (0-11)	
Immunochemistry			
% of CD8-positive cells			.001‡
1: < 10%	0 (0-7)	12 (n = 4) [4-29]	
2: 10%-30%	37 (n = 18) [24-53]	66 (n = 21) [47-81]	
3: 30%-40%	44 (n = 21) [29-59]	16 (n = 5) [5-33]	
4: > 40%	19 (n = 9) [9-33]	6 (n = 2) [8-21]	
Score GrzB			
% of GrzB-positive cells			NC
1: < 10%	8 (n = 4) [2-20]	66 (n = 21) [47-81]	
2: 10%-30%	48 (n = 23) [33-63]	34 (n = 11) [19-53]	
3: > 30%	44 (n = 21) [29-59]	0 (0-11)	
Intensity of GrzB staining			NC
1: +	6 (n = 3) [1-17]	75 (n = 24) [57-89]	
2: ++	44 (n = 21) [29-59]	25 (n = 8) [11-43]	
3: +++	50 (n = 24) [35-65]	0 (0-15)	

On the basis of *GrzB* staining patients were classified in two groups: group A (high GrzB score) and group B (low GrzB score). Group A (high GrzB score) includes patients having score 4, 5, or 6. Group B (low GrzB score) includes patients having score 1, 2, or 3. Scores were calculated by adding values corresponding to: (i) the number of $GrzB^+$ cells (ranging from 1 to 3: with 1 = < 10% $GrzB^+$ cells; 2 = 10%-30% $GrzB^+$ cells; 3 = > 30% $GrzB^+$ cells out of the $CD8^+$ cells) and (ii) values corresponding to the intensity of GrzB staining (ranging from 1 to 3: with 1 = +; 2 = ++; 3 = +++, as shown in supplemental Figure 1).

FL indicates follicular lymphoma; IHC, immunohistochemistry; CI, confidence interval; NC, not calculated; NR, not reached; FLIPI, Follicular Lymphoma International Prognostic Index; GELF, Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires; R-CHOP, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; R-CVP, rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone; R-CHOP + R, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone and rituximab maintenance; R-Fludarabine-mitoxantrone + R, rituximab, fludarabine, mitoxantrone, rituximab maintenance; and GrzB, granzyme B.

*Student test.

†χ^2 test.

‡Fischer exact test.

from the analysis, CTLs were labeled before conjugation with 1 μM CMFDA (Molecular Probes) for 20 minutes at 37°C. Before FACS analysis, 0.125 μg/mL propidium iodide (PI; Molecular Probes) was added to each sample.

Statistical methods

The Student *t* test or the Wilcoxon-Mann-Whitney tests were used to compare FL lymph nodes with reactive lymph nodes for CTL infiltration as indicated in the Figure 2 legend. Analyses of T cells/a-CASP3+ cell contacts and killing assay measurement were performed using the paired *t* test (see Figure 3, supplemental Figure 4, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). To compare clinical and histological characteristics between patients of group A and B, we performed a χ^2 test or a Fischer exact test for qualitative variables and a Student *t* test for quantitative variables (Table 2).

For time-to-event analyses (see Figure 4, supplemental Figure 5), primary end point for PFS analysis was defined as time from the end of R-chemotherapy to progression. For univariate analysis, we performed Kaplan-Meier curves and log-rank test to assess association of granzyme B score with progression. We used the same tests to assess significance of GELF or FLIPI parameters, and number of $CD8^+$ cells. Cox proportional-hazards model and Cox proportional-hazards regression curve were performed to test the simultaneous influence of all covariates on PFS with a *P* value < .30 in the univariate analysis. Using a backward stepwise

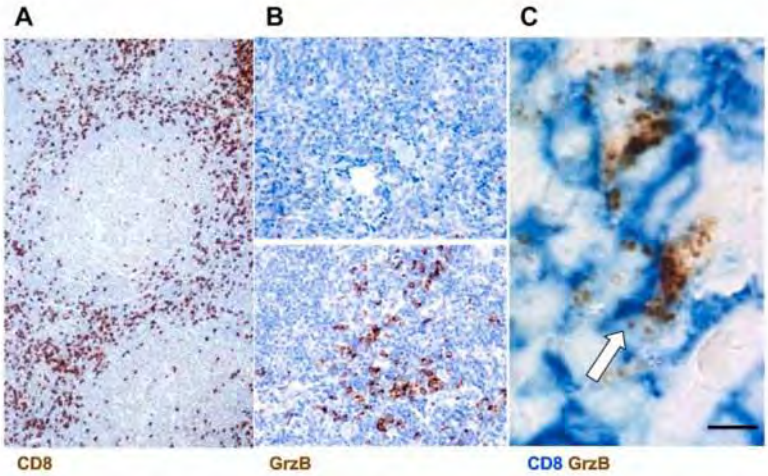


Figure 1. Infiltration of CD8$^+$ GrzB$^+$ cells in the interfollicular spaces of FL lymph nodes. (A) Representative section from FL lymph nodes of cells positive for CD8 as detected by IHC (original magnification ×200). (B) Examples of low (top panel) and high GrzB (bottom panel) staining (Original magnification, 400). (C) Double staining for CD8$^+$GrzB$^+$ cells. White arrow indicates double-positive cells (Original magnification, ×1000).

removal method, only significant covariates were kept in the final Cox model.

All tests were 2-sided and statistical significance was set at a P value of .05. Analyses were performed using STATA Version 11.

Results

Infiltration of CD8$^+$ granzyme B$^+$ cells in the interfollicular spaces of FL lymph nodes

We investigated, on pretreatment lymph node biopsies of 80 FL patients (Table 1) CD8$^+$GrzB$^+$ cell infiltration by IHC. The majority of patients included in our study were referred to our institutions for treatment. For this reason, most of the patients displayed intermediate- or high-risk factors based on both FLIPI and GELF stratification as depicted in Table 1. The criterion of inclusion of a given patient in the study was treatment with R-chemotherapy. Three pathologists, ignoring patient clinical data, scored biopsies in a blinded fashion (see "IHC").

This analysis showed a rich infiltrate of CD8$^+$ cells in the interfollicular spaces of FL lymph nodes (Figure 1A). CD8$^+$ cells represented ~ 30% of the total immune cell infiltrate ranging from 10% to 50% in the different patients (Table 2). In parallel, we scored the number and distribution of GrzB$^+$ cells and the intensity of GrzB staining. This analysis showed that GrzB$^+$ cells were enriched in the interfollicular spaces. They represented ~ 15% of the total immune cells ranging from 1% to 30% in the different patients. The number of positive cells and the intensity of GrzB staining allowed us to calculate GrzB score for each patient as described in Table 2.

Scores were calculated by adding values corresponding to: (1) the number of GrzB$^+$ cells (ranging from 1 to 3: with 1 = < 10% GrzB$^+$ cells; 2 = 10%-30% GrzB$^+$ cells; 3 = > 30% GrzB$^+$ cells out of the CD8$^+$ cells) and (2) values corresponding to the intensity of GrzB staining (ranging from 1 to 3: with 1 = $^+$; 2 = $^{++}$; 3 = $^{+++}$, as shown in supplemental Figure 1).

This GrzB score (based on percentage of GrzB$^+$ cells out of CD8$^+$ cells and on the intensity of GrzB staining) also allowed us to define 2 groups of patients: one exhibiting high GrzB staining in the interfollicular spaces (group A, corresponding to a GrzB score ≥ 4) and the other exhibiting a low GrzB staining (group B, corresponding to a GrzB score < 4, Table 2). Typical examples of low and high GrzB staining are depicted in Figure 1B.

Double staining for CD8 and GrzB confirmed the single staining data by showing that CD8$^+$ cells, enriched in the FL interfollicular spaces, exhibited a granular intracellular GrzB staining (Figure 1C).

Taken together, the above results show a rich infiltrate of CD8$^+$ and GrzB$^+$ cells in the interfollicular spaces of FL lymph nodes and identify 2 groups of patients based on GrzB staining characteristics.

3-D distribution and activation status of CTL-infiltrating FL lymph nodes

The above-presented data, by showing that CD8$^+$GrzB$^+$ cells infiltrated FL interfollicular spaces, suggested that lytic granule-positive CTLs might be recruited to areas surrounding FL tumor nodules.

To better define the phenotype and the localization of these cells and to score their number using a nonsubjective method, we used confocal laser scanning microscopy allowing 3-color staining and 3-D reconstruction of acquired images.

Cryostat sections of new cohort of 10 FL and 5 control reactive lymph nodes were stained for CD3, CD8, and GrzB and inspected by acquiring high magnification fields in the interfollicular spaces. As shown in Figure 2A and supplemental Video 1, in FL lymph nodes a significant fraction of CD3$^+$CD8$^+$ T cells contained GrzB$^+$ lytic granules, whereas GrzB$^+$ cells were rare in reactive lymph nodes. Scoring of the total number of CD3$^+$CD8$^+$GrzB$^+$ cells in at least 5 fields per each patient showed that in FL lymph nodes the number of armed CTLs was significantly increased (Figure 2B). To better characterize the microanatomy of CTL infiltration in FL lymph nodes, we performed 3-D reconstruction of confocal microscopy images taken at the follicular border. For this analysis, FL B cells were detected by CD79a staining and CTLs were detected by double staining for CD3 and GrzB. As shown in supplemental Video 2, this analysis showed that most of GrzB$^+$ cells did not enter the FL nodules but were mostly located around the nodules, where they appeared to "attack" FL B cells. Interestingly, the establishment of contacts between CTLs and FL B cells, reminiscent of lytic synapses formed in vitro by human CTLs,[23,24] was observed (supplemental Video 3).

We also investigated whether, at the individual cell level, CTLs present in FL interfollicular spaces might be "more armed" than CTLs in reactive lymph nodes. To address this question, we measured by confocal microscopy the expression of GrzB in

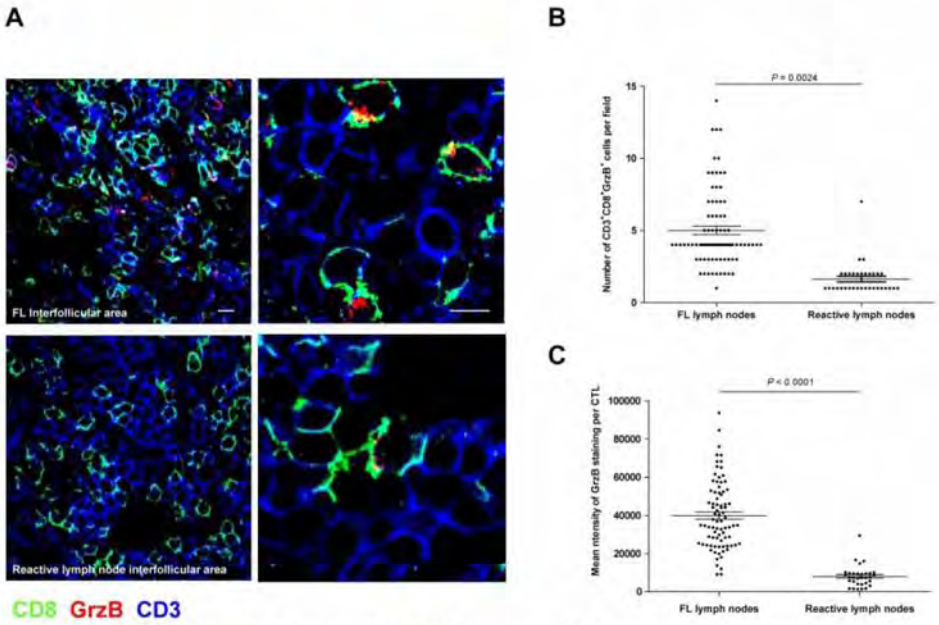


Figure 2. Accumulation of activated CTLs expressing high levels of GrzB in FL nodes as quantified by confocal laser scanning microscopy. Tissue sections from FL or reactive lymph nodes were stained for CD8 (green), CD3 (blue), and GrzB (red). (A) Representative staining of $CD3^+CD8^+GrzB^+$ cells in FL (top panels) or reactive (bottom panels) lymph nodes (bar = 10 μm in left panels and 5 μm in right panels). (B) Scoring of $CD3^+CD8^+GrzB^+$ cells in the interfollicular area of 10 FL and 5 reactive lymph nodes. More than 5 fields from each of the 10 FL and of the 5 control lymph nodes were randomly scored. Statistical significance of difference between groups was evaluated by a Wilcoxon-Mann-Whitney test using STATA Version 11; $P = .0024$. (C) Measurement of GrzB expression in $CD3^+CD8^+$ cells in the interfollicular area of 10 FL and 5 reactive lymph nodes. Measurements for GrzB fluorescence intensity were performed as described in "Confocal Image Quantification." More than 5 fields from each of the 10 FL and of the 5 control lymph nodes were randomly scored. Statistical significance of difference between groups was evaluated by a Student t test using STATA Version 11; $P < .0001$.

individual CTL. This analysis was performed by measuring the mean fluorescence intensity of GrzB staining in the $CD3^+$ and $CD8^+$ cells present in > 5 fields (from each of the 10 FL and of the 5 control lymph nodes). As shown in Figure 2C, the mean fluorescence intensity of GrzB in FL cells was significantly higher.

Taken together, the above results extend the results of IHC by showing an enrichment of armed CTLs, exhibiting a strong content of GrzB, in the interfollicular spaces of FL lymph nodes.

FL-infiltrating CTLs exhibit a cytotoxic potential

We next investigated whether the CTLs enriched in the FL infiltrate were endowed of cytotoxicity potential. In a first step we used an in situ approach. We asked whether the presence of a rich infiltrate of $GrzB^+$ CTLs could correlate with an increased induction of cell death in FL tissues. To address this question, lymph nodes from 7 FL patients were stained with an Ab directed against the activated form of caspase 3 (a-CASP3, a marker of apoptosis) in parallel with Abs directed against $CD8^+$ and GrzB. Samples were visualized by 3-color confocal microscopy. As illustrated in Figure 3A and supplemental Video 4, $a\text{-}CASP3^+$ cells, that exhibited cytosolic and/or nuclear staining, could be found at the follicular borders. Scoring of $a\text{-}CASP3^+$ cells in 35 fields showed that the number of $a\text{-}CASP3^+$ cells in contact with $CD8^+GrzB^+$ cells was significantly higher than the number of $a\text{-}CASP3^+$ cells that were found

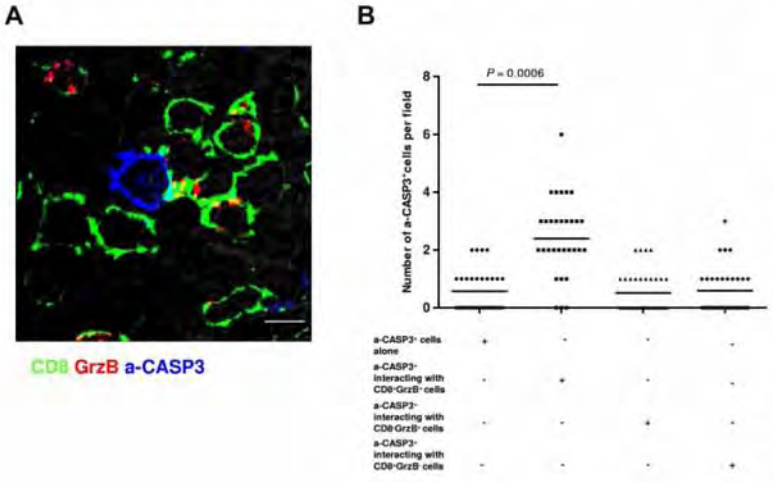


Figure 3. A significant fraction of $a\text{-}CASP3^+$ cells is detected in contact with $CD8^+GrzB^+$ cells. Tissue sections from FL lymph nodes were stained for CD8 (green), a-CASP3 (blue) and GrzB (red). (A) Representative staining showing contact formation between $CD8^+GrzB^+$ cells and $a\text{-}CASP3^+$ cells in a FL lymph node (bar = 5 μm). (B) Scoring of the total number of $a\text{-}CASP3^+$ cells interacting with $CD8^+$ or $GrzB^+$ cells in 7 FL lymph nodes. The analysis was performed by scoring the fields using 3-D reconstructed images to unambiguously define cellular contacts (see "Confocal Image Quantification"). Statistical significance of difference between groups was evaluated by a paired Student t test using STATA Version 11; $P = .0006$.

not in contact with $CD8^+GrzB^+$ (Figure 3B). It should be noted that this analysis was performed by scoring the fields using 3-D reconstructed images to unambiguously define cellular contacts (see "Methods"). Nevertheless, this 3-color analysis did not allow the simultaneous visualization of CD8, GrzB, a-CASP3, and B-cell markers, raising the question of whether the a-$CASP3^+$ cells were actually FL B cells. Two lines of evidence indicate that the scored a-$CASP3^+$ cells are bona fide FL B cells. First, we performed this analysis at the border between the interfollicular space and the FL nodules were a "confrontation" between CTLs and FL B cells occurs (supplemental Videos 2-3). Second, parallel staining of FL samples for CD20, CD8, and a-CASP3 showed $CD20^+$ a-$CASP3^+$ cells in contact with $CD8^+$ cells (supplemental Figure 2). We also investigated whether activation of CASP3 resembling to that observed in tissue staining could also be observed when the interaction of CTLs with target cells was studied in vitro. We initially addressed this question by using in vitro expanded $CD8^+$ cells from patient peripheral blood with EBV-transformed B cells as target cells. CTLs were cocultured with target cells either unpulsed or pulsed with a cocktail of bacterial SAg. After 1 hour of culture, cells were stained with Abs directed against a-CASP3, CD8, and GrzB. Confocal laser-scanning visualization of cell-cell conjugates showed that CTL/target cell cognate interaction in vitro resulted in caspase 3 activation in target cells (supplemental Figure 3A-B). Similar results were obtained when in vitro–expanded $CD8^+$ T cells from FL lymph nodes and autologous FL B cells were used (supplemental Figure 3C-D).

In a second step we used an in vitro approach. We investigated whether primary cell lines generated from $CD8^+$ T cells infiltrating FL lymph nodes could exert cytotoxicity against autologous FL B cells pulsed with a cocktail of SAg. The rationale for this approach was to establish whether the balance between the in vitro efficiency of FL CTLs and intrinsic FL B cells resistance to cytotoxicity could be compatible with an in vivo cytotoxic activity. As shown in supplemental Figure 4, in vitro–expanded $CD8^+$ T cells from FL lymph nodes exhibited cytotoxicity against SAg pulsed FL B cells.

Taken together, the above results show that FL-infiltrating CTLs establish cellular contacts with apoptotic cells in tissues and exhibit a cytotoxic activity against FL B cells in vitro. They suggest that FL CTLs play a role in the control of disease progression.

Infiltration of granzyme B+ cells in the interfollicular spaces of FL lymph nodes correlates with longer PFS

We finally asked whether GrzB staining in diagnostic biopsies might correlate with clinical outcome in our FL patient cohort. According to Cheson 1999 criteria,[21] complete response (CR) or complete response unconfirmed (CRu) was observed in 76% whereas 23% of cases displayed partial response (PR). One patient died early. Mean and median follow-up were 32 and 26 months, respectively. The 2-year PFS and median PFS of this cohort was 78% (95% CI = 66-86) and 70 months, respectively (95% CI = 40-85).

The comparison between group A (high GrzB staining score, as detected by IHC) and group B (low GrzB staining score, Figure 1) revealed no significant differences for BM infiltration, stage, FLIPI, or GELF profiles (Table 2), as well as for response rate. However, based on the entire cohort, group B patients displayed shorter PFS, compared with group A (Figure 4). Two-year PFS rates were also significantly different between group B and group A patients: 59% (95% CI = 40-74) versus 93% (95% CI = 70.5-97.9), (not adjusted $P = .0008$). Multivariate analysis revealed that

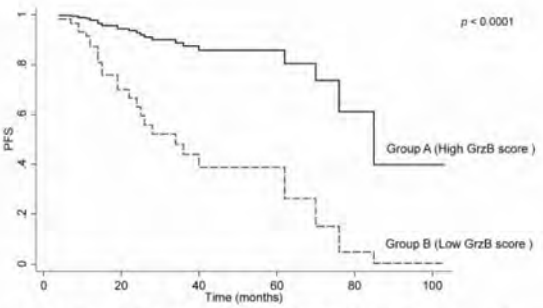


Figure 4. Granzyme B is a prognostic marker of PFS in FL. The graph shows progression-free survival (PFS) in the 80 patients scored by IHC after R-combined chemotherapy. According to the GrzB scoring system, as described in "IHC," association was found between a poor outcome of treatment and a low GrzB score.

only sex (HR = 4.3, 95% CI = 1.6-11.3, $P = .003$), R maintenance (HR = 0.15, 95% CI = 0.03-0.7, $P = .015$), response (PR versus CR or CRu; HR = 3.4, 95% CI = 1.5-8.1, $P = .004$) and GrzB score are independent predictors of PFS (HR = 6.8, 95% CI = 2.5-18.1, $P < .0001$). It should be noted that even though the analysis of GrzB score related to $CD8^+$ cells correlated with clinical outcome, we did not find a significant correlation between the number of interfollicular $CD8^+$ T cells and PFS of FL patients (Table 1).

This study was performed before the publication of the PRIMA study,[20] which has shown PFS improvement in rituximab maintenance arm, compared with controls, in FL patients initially treated by R-chemotherapy whatever the design of chemotherapy (R-CHOP, R-CVP, R-fludarabine based). In our study, only 12 patients received rituximab in the context of the PRIMA study.[20] Interestingly, in patients treated with R-chemotherapy without maintenance (n = 68), GrzB score also correlated with prolonged PFS (supplemental Figure 5).

Discussion

This work shows that CTLs are enriched in the interfollicular spaces of FL lymph nodes and that individual CTLs express high levels of GrzB. An IHC GrzB score was found to be highly predictive for PFS in FL patients treated with R-chemotherapy. It is interesting to note that, in the present study, while the score of GrzB related to $CD8^+$ cells correlated with clinical outcome, the number of interfollicular $CD8^+$ T cells did not correlate by itself with PFS (Table 1). These results suggest that the analysis of combined phenotypic and activation markers might be a suitable strategy to investigate CTL correlation with clinical outcome.

An innovative technical aspect of our study is that we investigated immune infiltration of FL lymphoid organs using both IHC and confocal microscopy, a technique rarely applied to the study of immunologic signatures in lymphomas. Using this approach, we show immunologic synapse-like CTL/B-cell contacts at the follicle border that have not been previously described.

The infiltration of FL lymph nodes by $CD8^+$ cells, their preferential location in the interfollicular spaces, and the presence of CTLs in FL lymph nodes specimens have all been reported in earlier studies.[8,13,14,25]

However, our study characterizes these $CD8^+$ cells as functional CTLs. First, a significant fraction of $CD8^+$ cells displayed a high content of GrzB-containing cytotoxic granules, even though

the percentage of $CD3^+CD8^+GrzB^+$ cells, as well as the GrzB content per cell, varied among specimens. Second, primary cell lines of $CD8^+$ T cells isolated from FL specimens exhibited cytotoxicity against autologous malignant B cells. Third, synapse-like contacts between CTLs and apoptotic cells were detected, in 3-D reconstructed confocal microscopy images, at the follicle border.

These results, taken together with the observation of a link between a strong CTL infiltration and a favorable disease course, suggest that activated CTLs could exhibit a "tonic control" over malignant FL B cells and therefore contribute to delay or limit disease development and/or relapses.

The sensitivity of FL cells to immune effectors is also suggested by the relative success of idiotype vaccination[26] and the low rate of relapse after allogeneic stem cell transplantation performed in this context.[27] This suggests that antiapoptosis equipment of FL cells, including Bcl-2 overexpression, deregulated Akt- or mTOR-dependent survival pathways,[28] might not confer a high degree of protection against cellular cytotoxicity mediators such as the GrzB/perforin system. This idea is compatible with the observation that perforin deficient mice have a high incidence of malignancy in different lymphoid cell lineages, indicating a specific requirement for functional killer cells in the protection against lymphomagenesis.[29]

The correlation between CTL infiltration and favorable disease course does not exclude the possibility that FL B cells might exhibit a certain level of resistance to CTL attack. Indeed it has been described that both $CD4^+$ and $CD8^+$ human T cells from CLL and FL patients exhibit activation defects and defective immunologic synapses when conjugated with neoplastic B cells.[30,31] We speculate that the observed strong enrichment of CTLs in interfollicular spaces could compensate for possible defects in CTL activation and/or effector function thus leading to a more favorable disease outcome.

Where does the "confrontation" between CTLs and FL take place? Our IHC and confocal microscopy analyses indicate that CTLs do not enter tumoral nodules but rather "intercept" FL B cells at the border of the nodules.

Our observations raise the question of whether the CTL-infiltrating FL lymph nodes are specific for Ags expressed in the tumor microenvironment. A first answer to this question came from our observation that a few $CD3^+GrzB^+$ cells are positive for the activation marker CD137 (data not shown). CD137 up-regulation has been recently proposed as an accurate marker for CTL activation via TCR.[32] Thus a small, but significant, fraction of CTLs detected in FL lymph nodes might have been recently activated via TCR engagement with Ag displayed in the tumor microenvironment.

Previous studies described a correlation between the intensity of $CD8^+$ cell infiltration and patient survival for solid tumors, including colon, breast, and ovarian carcinomas,[15] as well as for FL.[8,14,16] However, GrzB expression as a biomarker has received little attention since the study of Lee et al who showed using a TMA approach, no correlation between GrzB staining and FL survival in a 60 patient cohort.[13] The latter study is in apparent contrast with our study because we show that $CD8^+$-associated GrzB expression predicts a more favorable clinical outcome in FL patients, all treated with R-chemotherapy. This discrepancy can be explained by the different techniques used and, more importantly, by the type of patients (less advanced forms) as well as the longer period of recruitment (1974-1999) in the study by Lee et al,[13] suggesting that most patients had not been treated with R-chemotherapy. However, we have to concede that most of our patients (85%) did not receive rituximab maintenance, a modality of treatment that is now part of FL therapy based on the PRIMA study.[20] Whether granzyme B might serve as a biomarker beside other immunologic signatures[33] at the era of R-chemotherapy plus rituximab maintenance remains to be investigated in prospective studies.

It is interesting to note that the granzyme B score was not found to correlate with initial FLIPI or GELF profile, suggesting that the activation status of $CD8^+$ T cells influences more significantly the progression of the disease after R-chemotherapy than the natural history of the FL. This is an intriguing, but potentially important, observation because it suggests that R-chemotherapy could favor $CD8^+$-mediated antitumor response. The role of chemotherapy as a stimulator of antitumor adoptive immunity has been recently proposed.[34] It is also possible that rituximab renders more efficient CTL-mediated anti-FL response as suggested by a recent study in which rituximab attack of FL cells resulted in the induction of lymphoma idiotype-specific T-cell responses.[35]

In conclusion, we show that FL displays a potent CTL-mediated immune response and that a strong CTL infiltrate correlates with a positive FL prognosis after R-combined chemotherapy. Further research is required to define the cellular and molecular mechanisms by which activated CTLs might synergize with R-combined chemotherapy to influence FL outcome. Our results also provide a basis for future immune intervention strategies aiming at CTL stimulation in combination with rituximab.

Acknowledgments

The authors thank L. Dupré and L. Ysebaert for discussion, and M. March for IHC experiments. They also thank the Plateau technique de cytométrie Inserm U1063.

This work was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer, Fondation Banque Nationale de Paris Paribas, Institut National du Cancer (S.V.) and by a grant from the Société Française de Pathologie (C.L.).

Authorship

Contribution: C.L., S.M., T.A.-S., S.A., L.M.L., S.H., S.D., A.Q.-M., and G.L. collected and analyzed data; C.L., G.L., and S.V. designed the research and wrote the paper; C.L. and S.M. performed experiments; C.D. provided expert statistic analysis; S.H. and G.L. provided patient sample clinical information and analysis of outcome; and C.L., L.M.L., and P.B. provided expert histopathologist analysis.

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

Correspondence: Salvatore Valitutti, Inserm U1043, CHU Purpan, 31059 Toulouse Cedex 3, France; e-mail: salvatore.valitutti@inserm.fr.

References

1. Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*. 2005;105(4):1417-1423.

2. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade

Lymphoma Study Group. *Blood*. 2005;106(12): 3725-3732.

3. Salles G, Mounier N, de Guibert S, et al. Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood*. 2008; 112(13):4824-4831.
4. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*. 2004;104(5):1258-1265.
5. Solal-Celigny P, Lepage E, Brousse N, et al. Recombinant interferon alfa-2b combined with a regimen containing doxorubicin in patients with advanced follicular lymphoma. Groupe dÆEtude des Lymphomes de lÆAdulte. *N Engl J Med*. 1993;329(22):1608-1614.
6. Glas AM, Knoops L, Delahaye L, et al. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25(4):390-398.
7. Relander T, Johnson NA, Farinha P, Connors JM, Sehn LH, Gascoyne RD. Prognostic factors in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010;28(17): 2902-2913.
8. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, et al. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol*. 2006;24(34):5350-5357.
9. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004;351(21):2159-2169.
10. Canioni D, Salles G, Mounier N, et al. High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial. *J Clin Oncol*. 2008;26(3):440-446.
11. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2006;108(9):2957-2964.
12. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, et al. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009; 27(9):1470-1476.
13. Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, et al. Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol*. 2006;24(31):5052-5059.
14. Wahlin BE, Aggarwal M, Montes-Moreno S, et al. A unifying microenvironment model in follicular lymphoma: outcome is predicted by programmed death-1û positive, regulatory, cytotoxic, and helper T cells and macrophages. *Clin Cancer Res*. 2010;16(2):637-650.
15. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29(8): 1093-1102.
16. Wahlin BE, Sander B, Christensson B, Kimby E. CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 Pt 1):388-397.
17. Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I, et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*. 2010; 468(7322):447-451.
18. Griffiths GM, Tsun A, Stinchcombe JC. The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J Cell Biol*. 2010;189(3):399-406.
19. Rousalova I, Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *Int J Oncol*. 2010;37(6):1361-1378.
20. Salles G, Seymour JF, Offner F, et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet*. 2011; 377(9759):42-51.
21. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol*. 1999;17(4):1244.
22. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-174.
23. Faroudi M, Utzny C, Salio M, et al. Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(24):14145-14150.
24. Wiedemann A, Depoil D, Faroudi M, Valitutti S. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(29):10985-10990.
25. Leger-Ravet MB, Devergne O, Peuchmaur M, et al. In situ detection of activated cytotoxic cells in follicular lymphomas. *Am J Pathol*. 1994; 144(3):492-499.
26. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*. 2002;99(5):1517-1526.
27. Toze CL, Barnett MJ, Connors JM, et al. Long-term disease-free survival of patients with advanced follicular lymphoma after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol*. 2004; 127(3):311-321.
28. Leseux L, Hamdi SM, Al Saati T, et al. Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. *Blood*. 2006;108(13):4156-4162.
29. Bolitho P, Street SE, Westwood JA, et al. Perforin-mediated suppression of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(8):2723-2728.
30. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2427-2437.
31. Ramsay AG, Clear AJ, Kelly G, et al. Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood*. 2009;114(21): 4713-4720.
32. Wolfl M, Kuball J, Ho WY, et al. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood*. 2007;110(1):201-210.
33. de Jong D, Koster A, Hagenbeek A, et al. Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica*. 2009;94(1): 70-77.
34. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):59-73.
35. Hilchey SP, Hyrien O, Mosmann TR, et al. Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a "vaccinal effect" of rituximab. *Blood*. 2009; 113(16):3809-3812.

FIGURES SUPPLEMENTAIRES Laurent C *et al.* Blood 2011

Figure S1. Examples of +, ++ and +++ GrzB staining intensity
+, ++ and +++ GrzB staining intensity are shown in panel A, B and C respectively (Original magnification ×400).

Figure S2. $CD20^+$ a-$CASP3^+$ cells are detected in contact with $CD8^+$ cells
Tissue sections from FL lymph nodes were stained for CD8 (green), a-CASP3 (blue) and CD20 (red). Panel A and B show representative interactions between $CD8^+$ cells and $CD20^+$ a-$CASP3^+$ cells in a FL lymph node (Bar = 5µm). Results are from one experiment representative of five independent experiments with similar results.

Figure S3. Visualization of a-$CASP3^+$ in target B cells after *in vitro* conjugation with CTL isolated from FL patients
(A, B) CTL generated from $CD8^+$ cells isolated from FL patient peripheral blood were conjugated with EBV-transormed B cells, either unpulsed (-SAg, panel A) or pulsed with a cocktail of bacterial superantigens (+ SAg, panel B). Cells were fixed, permeabilized and stained for a-CAPS3 (blue), CD8 (green) and GrzB (red). (C, D) CTL generated from $CD8^+$ T cells obtained from FL lymph node were conjugated with autologous FL B cells, either unpulsed (-SAg, panel C) or pulsed with a cocktail of bacterial superantigens (+SAg, panel D). Cells were fixed, permeabilized and stained for a-CAPS3 (blue), CD8 (green) and GrzB (red). Representative interactions between $CD8^+GrzB^+$ cells and a-$CASP3^+$ cells are shown.

Figure S4. Measurement of cytotoxic function of CTL isolated from FL lymph nodes
CTL cell lines generated from isolated $CD8^+$ T cells from lymph nodes of three FL patients were conjugated with autologous FL B cells at E/T ratio of 2:1. The frequency of FL B cells either unpulsed (-SAg) or pulsed with a cocktail of bacterial superantigens (+SAg) that incorporated PI after 4 hours conjugation was determined by flow cytometry. Statistical significance of difference between groups was evaluated by a paired Student's t test using STATAv11. p=0.02.

Figure S5. Granzyme B is a prognostic marker of PFS in FL.
The graph shows progression-free survival (PFS) in the 68 patients scored by IHC after R-combined chemotherapy without R-maintenance. According to the GrzB scoring system, as described in Material and Methods section, association was found between a poor outcome of treatment and a low GrzB score.

Figure S1

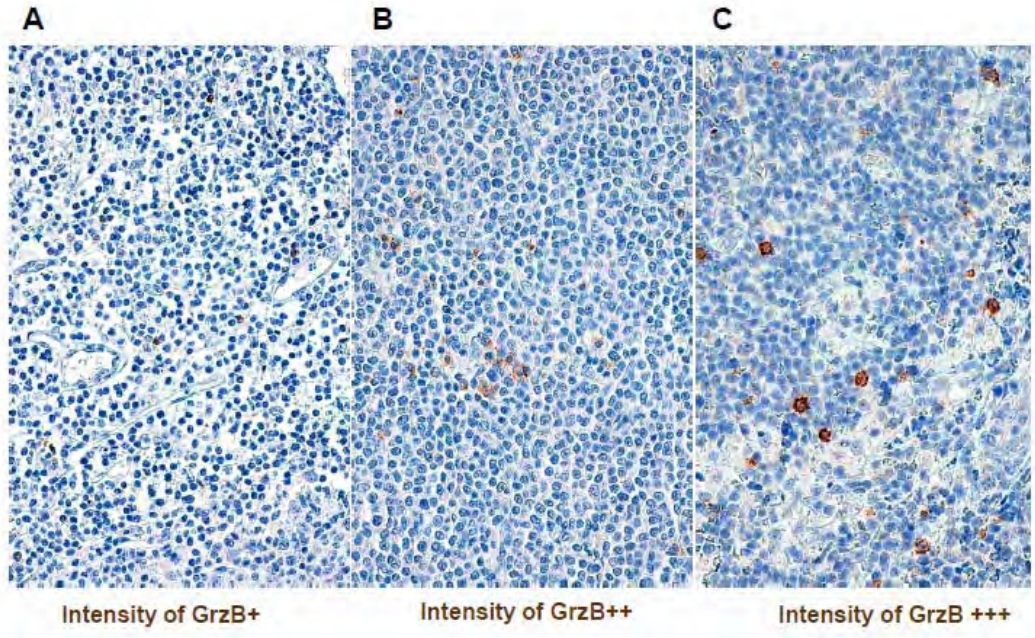


Figure S2

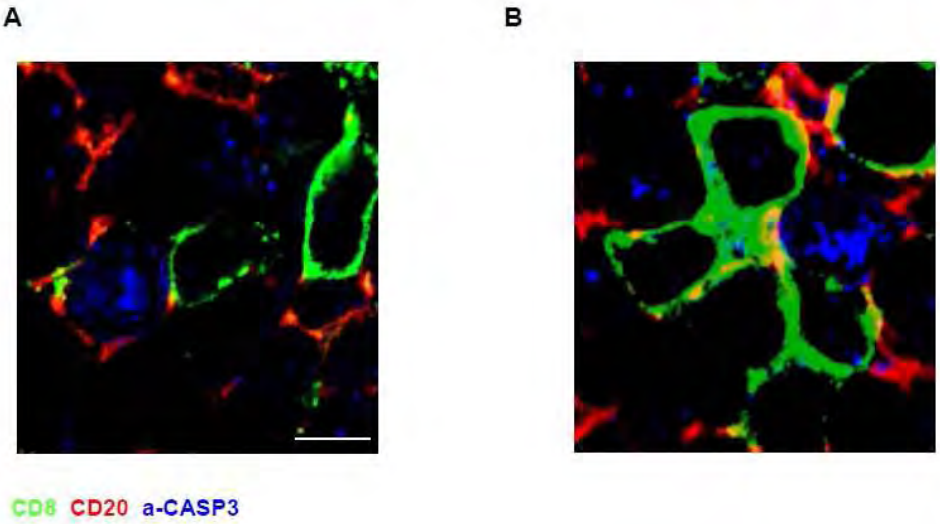


Figure S3

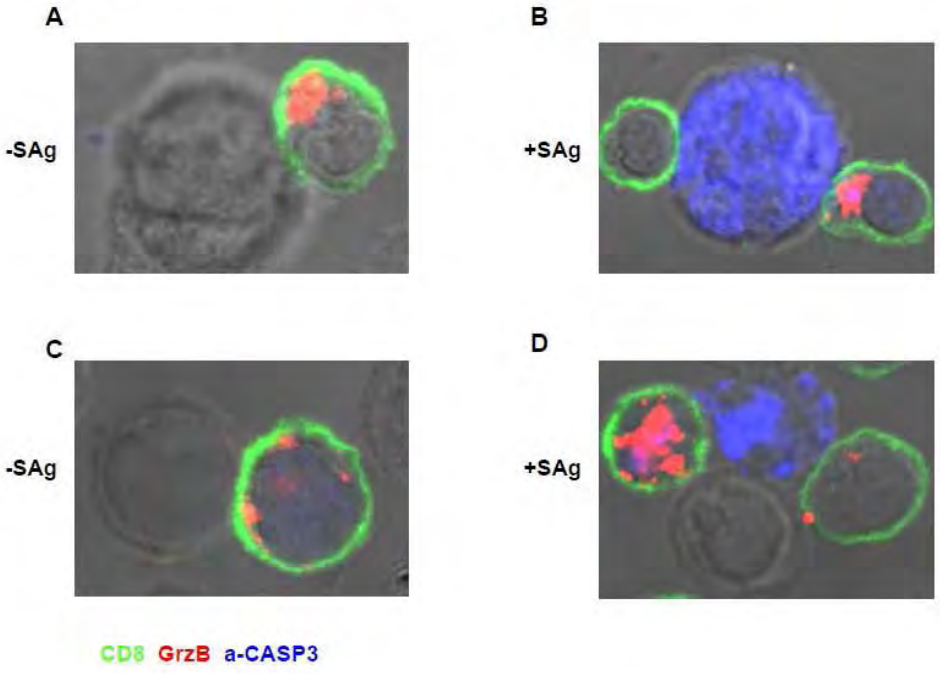


Figure S4

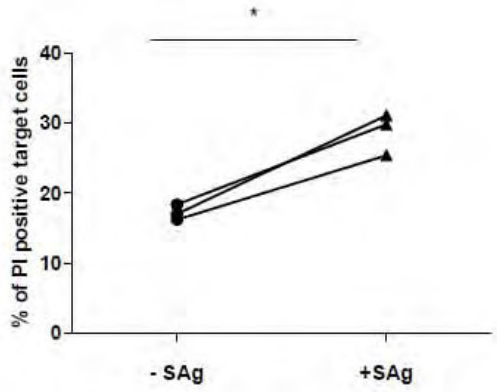
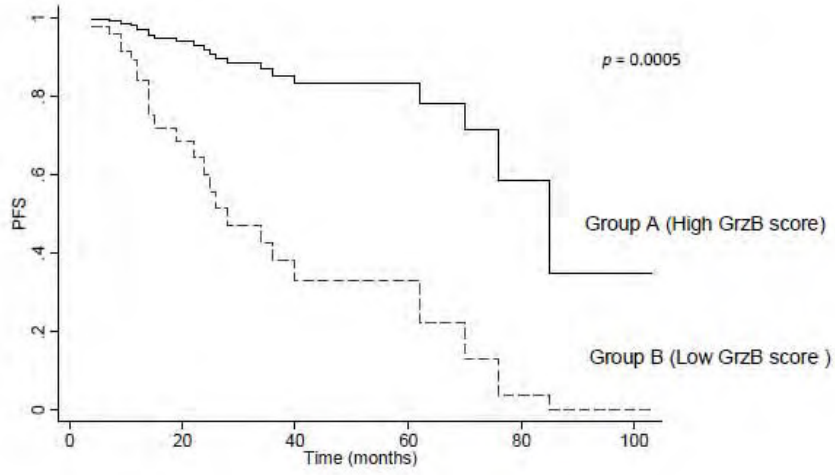


Figure S5



DISCUSSION

1. VALIDATION DES OBJECTIFS DE L'ETUDE

Ce premier travail présente trois composantes : une composante méthodologique, une composante immunologique et une composante clinique.

La composante méthodologique visait à développer une approche d'imagerie cellulaire combinant le potentiel de la microscopie confocale appliquée aux marquages multicouleurs et les exigences d'une analyse histologique sur coupe épaisse. Cet objectif plaçait délibérément notre travail dans le cadre d'une étude anatomo-pathologique, conformément à ma vocation et à ma compétence. La méthode sera validée.

La composante immunologique visait à déterminer les caractéristiques de l'immuno-infiltration T dans les LF en faisant l'hypothèse que, dans cette maladie, le microenvironnement était riche en CTL $CD8^+$ capables de former synapse et d'induire la mort des cellules tumorales. L'hypothèse sera confirmée.

La composante clinique explorait le lien susceptible d'exister entre d'une part la densité en CTL et d'autre part, l'histoire de la maladie. L'hypothèse était que la densité en CTL était corrélée avec une histoire naturelle indolente (scores FLIPI et GELF faible) et/ou un meilleur contrôle de la maladie après traitement. L'hypothèse sera confirmée : la densité en CTL est un biomarqueur prédictif de l'évolution du LF traité.

2. COMMENTAIRES DE L'ETUDE DE L'IMMUNO-INFILTRATION DES CTL DANS LES LYMPHOMES FOLLICULAIRES

Cette étude montre pour la première fois que, dans un échantillon de tissu tumoral humain, une sous-population de lymphocytes T $CD8^+$ activés peut former des contacts synapse-like in vivo avec des cellules tumorales, celles-ci engageant dès lors un programme d'apoptose. Pour décrire cette interaction, les éditorialistes du Journal ont repris le terme du « baiser de la mort » en référence à l'expression habituellement utilisée pour décrire l'interaction CTL/cellules cibles in vitro. Cette observation démontre l'existence de CTL $CD8^+$ fonctionnels dirigés contre les cellules de LF.

2.1 La machinerie immunologique dans le LF

Cette première observation démontre que dans une fraction de LF, la machinerie immunologique fonctionne, suggérant que les cellules tumorales ont des propriétés antigéniques, que des cellules CPA intègrent le matériel cellulaire contenant les antigènes (corps apoptotiques par exemple), que les CPA présentent aux cellules $CD8^+$ le complexe CMH-I/peptide et que les molécules de co-stimulation sont fonctionnelles. Il est aisé d'identifier dans cette séquence d'événements une série de mécanismes susceptible de bloquer ce processus de reconnaissance et de destruction.

Par exemple, l'expression des molécules CMH-I est un paramètre limitant pour la reconnaissance des cellules cibles par les CTL. L'influence du niveau d'expression des molécules CMH-I dans l'immuno-contrôle des tumeurs solides a été largement documentée. Les cellules tumorales expriment généralement de faible niveau d'expression des molécules

CMH-I facilitant ainsi l'immuno-évasion. L'expression de ces molécules est hautement régulée par des mécanismes génétiques et épigénétiques. Pourtant, l'expression de ces molécules dans les lymphomes en général et dans les LF en particulier n'a pas reçu l'attention méritée. Dans les LF, seul le polymorphisme CMH-I a fait l'objet de quelques études dans le contexte du risque de lymphomagénèse.[198] Un seul travail mentionne une relation possible entre le niveau d'expression du CMH-I et l'agressivité de la maladie lymphomateuse.[199] Ce sujet mériterait d'être revisité. En effet, l'expression de CMH-I est elle-même conditionnée par l'expression de la beta2 microglobuline. Or, dans un travail récent (portant il est vrai sur les LBDGC et non sur les LF), il a été établi que le gène codant pour la beta2 microglobuline est délété ou muté dans 30% des cas.[200] Il serait donc important de savoir si cette observation pourrait être transposable aux LF.

Enfin, signalons que l'IFN, une des principales cytokines régulatrices de CMH-I a montré une activité anti-LF lorsque ce médicament est utilisé seul ou surtout en combinaison avec la chimiothérapie.[201] Il est possible que l'effet thérapeutique de l'IFN soit en rapport avec l'impact de cette molécule sur l'expression de CMH-I.

Dans le contexte du LF, on peut également s'interroger sur l'identité des CPA. Potentiellement, toutes les sous-populations du microenvironnement sont candidates, à commencer par les lymphocytes B, les CFD, les CSM, les macrophages... Il a même été décrit une infiltration par des cellules dendritiques plasmocytoïdes.[202] Ces cellules sont des CPA professionnelles et leur rôle potentiel dans le LF doit être approfondi. De plus, malgré leur terminologie, rien n'indique que les CFD puissent jouer un rôle critique dans la réponse immune cytotoxique. Possiblement, l'obtention récente de lignée immortalisée de CFD permettrait d'explorer leur potentiel CPA.[58]

Si la machinerie immunologique fonctionne dans le LF, il est raisonnable de proposer que chaque étape puisse constituer une cible d'immuno-intervention grâce à des techniques déjà

développées dans d'autres pathologies : stratégies vaccinales, anticorps anti-CTLA-4 (Ipilimumab)[203] bloquant la fonction inhibitrice de cette molécule, ou la thérapie cellulaire basée sur l'utilisation de TIL préparés ex-vivo.[204]

2.2 Fonction CTL et lymphome folliculaire

Notre étude suggère que des CTL sont impliqués dans le contrôle de la maladie. Toutefois, il n'est pas exclu que des clones T $CD4^+$ puissent également jouer un rôle. L'existence de clones autologues cytotoxiques T $CD4^+$ a été documentée dans certains LF.[205] Il est vrai que ce résultat n'a pas été à ce jour exploité. Les cellules T $CD4^+$ restent davantage considérées comme des cellules régulatrices. Dans ce contexte, il serait important de vérifier que les cellules $CD4^+$ infiltrant le tissu lymphomateux ne contiennent pas de granules cytotoxiques mais plus volontiers des cytokines immunosuppressives telles que le TGF_β ou IL10.

2.3 Immunothérapie et lymphome folliculaire

Si les CTL jouent le rôle majeur que nous proposons, le potentiel de ces cellules peut être exploité par plusieurs types d'approche immuno-thérapeutique. Dans ce contexte, il nous parait important de souligner tout l'intérêt des anticorps bi-spécifiques. Un exemple est fourni par le BiTE antibody ou blinatumomab dirigé à la fois contre le CD3 et contre le CD19. Cette approche a été validée chez le singe (activation des T et immunodépletion des B) puis chez l'homme et notamment dans les leucémies aigues lymphoblastiques.[206] Les résultats sont encourageants avec une réduction spectaculaire de la maladie résiduelle dans les LAL.[207] On peut imaginer d'autres approches couplant une spécificité B (ex : anti-CD20) et une spécificité T / CTL (anti-CMH-I, anti-CD8, anti-Ox, etc ..).[208]

2.4 Topographie de l'immuno-infiltration et lymphome folliculaire

Notre étude montre des résultats inattendus au regard de la topographie de l'immuno-infiltration. En effet, dans les échantillons riches en CTL, notre étude montre que ces cellules se disposent volontiers autour des nodules lymphomateux. Cette disposition a été déjà décrite pour d'autres tumeurs. Cette observation rend perplexe quant à sa signification et plus encore quant à sa conséquence : disposition optimale ou défaillante ?

Il peut s'agir d'une disposition optimale réalisant un encerclement de la tumeur. En effet, on peut également imaginer, comme proposé dans l'article, que cette disposition périphérique facilite « l'interception » puis la destruction des cellules tumorales durant leur recirculation. Il est intéressant de souligner que dans les adénites réactionnelles les CTL restent majoritairement à la périphérie du CG suggérant que dans la physiologie l'immuno-infiltration reste périphérique. Cette observation renforce l'hypothèse que la disposition périphérique des CTL est celle que l'on attend et possiblement la plus efficace.

A l'inverse, on ne peut exclure que cette disposition illustre l'incapacité des CTL à pénétrer dans la tumeur, l'attaque de quelques cellules périphériques reflétant une réponse futile. Dans cette perspective, on peut s'interroger sur les raisons éventuelles d'un tel déficit. Plusieurs pistes peuvent être avancées, toutes difficiles à explorer dans le contexte de la « vraie vie », et pour ne citer que les principales, on peut évoquer une perturbation du réseau vasculaire, une altération extrinsèque des capacités migratoires liée à la texture de la matrice extracellulaire (dense et rigide) ou à l'hyperdensité cellulaire, ou encore un déficit en facteurs chémo-attractants ou un excès de facteurs chémo-répulsifs. Ce dernier paramètre est davantage accessible à l'investigation. Il serait par exemple possible de déterminer s'il existe une corrélation entre la densité en CTL et l'expression de certaines chémokines (ex : CCL2) ou

certaines cytokines, telles que l'IL15 pour ne citer que ces deux facteurs clairement identifiés comme influençant le trafic des lymphocytes CTL.[209] De fait, l'expression de CCL2 ou d'IL15 a été récemment étudiée dans les LF par l'équipe de K. Tarte. Ainsi, Tarte et coll. montrent que, dans les LF, CCL2 est produite par les cellules stromales mésenchymateuses (CSM).[61] La même équipe rennaise a récemment décrit que, dans les LF, l'IL15 est produite en abondance par les macrophages associés à la tumeur (TAM).[74] Il est donc possible que les CSM ou les TAM puissent contribuer positivement au recrutement des CTL, même si cette hypothèse est rendue contre-intuitive par l'interprétation promue par Tarte *et coll*. que le déterminisme des CSM et des TAM est de favoriser l'expansion du lymphome.

Au-delà des corrélations, l'idéal serait de pouvoir modéliser l'infiltration par les CTL. La difficulté de ce sujet tient au développement des techniques d'imagerie tissulaire ad hoc soit à l'in-vivo, comme la microscopie intra-vitale récemment appliquée à l'immuno-infiltration par les CTL,[210] soit aux cultures 3D de type « sphéroïdes »[211] ou encore aux cultures organo-typiques.[212] Ce point sera développé dans le chapitre *Perspective*.

2.5 CTL et chimiothérapie

Notre étude montre que la densité des CTL activés (score Granzyme B) est corrélée avec l'évolution de la maladie traitée. Cette observation suggère une coopération entre immunité spécifique et chimiothérapie. Il est possible que la chimiothérapie induise une libération massive d'antigènes tumoraux, responsable d'une forte stimulation de la réponse immunitaire. Le fait que le score Granzyme B ne corrèle pas avec l'histoire naturelle de la maladie (score FLIPI ou GELF) suggère que les CTL ne sont pas très efficaces dans le contrôle naturel de la maladie. Cette discordance (corrélation avec la maladie traitée et absence de corrélation avec

la maladie non traitée) suggère que, dans le LF, la quantité d'antigène tumoral présentée à la CPA est un facteur limitant pour l'initiation d'une réponse spécifique. Il est en effet documenté que la quantité d'antigène tumoral conditionne la nature de la SI, de fortes doses facilitant la formation de SI mature induisant à une réponse immunologique prolongée. Ces considérations peuvent avoir des implications thérapeutiques. En effet, dans cette hypothèse on peut imaginer que l'action optimale d'une stratégie vaccinale se situe à distance du traitement lorsque la réponse immunologique liée à la libération d'antigène commence à s'épuiser. Cette approche pourrait être rendue d'autant plus efficace qu'elle correspond à la période d'entretien par le rituximab. Parallèlement, cette hypothèse suggèrerait alors que les essais vaccinaux ont été réalisés dans des périodes non propices (avant ou pendant la chimiothérapie).

2.6 Rôle du granzyme B dans la fonction des CTL

La corrélation entre le score granzyme B et l'évolution suggère que le système granzyme B/perforine est le principal mécanisme par lequel les CTL opèrent dans le contrôle du LF. Implicitement, cette interprétation revient à s'interroger sur le rôle du système FAS/FAS-L dans l'immuno-contrôle de cette maladie. La notion que le système FAS/FAS-L joue un rôle accessoire est étayée par les données in vitro mettant en évidence que la plupart des cellules hématopoïétiques en général et des lymphomes en particulier sont résistantes à l'engagement de FAS.[213] La fonction de FAS est volontiers défaillante dans les lymphomes via plusieurs mécanismes dont la répression du gène *FAS* (méthylation du promoteur), des délétions ou mutations du domaine de mort de FAS ou la surexpression de FLICE interférant avec la formation du DISC.[214] Dans les lymphomes, le système granzyme B/perforine est efficace comme le suggère la sensibilité à la lyse induite par les cellules NK. Bien que les cellules de

lymphome expriment à des niveaux souvent élevés de PI-9 (inhibiteur sérine protéase 9) inhibitor 9), un puissant inhibiteur de granzyme B et de l'apoptose induite par granzyme B, ces cellules lymphomateuses restent sensibles aux granules cytotoxiques in vitro.[10]

PERSPECTIVES

Dans ce travail consacré à la biologie des LF et portant sur l'immuno-infiltration par les lymphocytes T $CD8^+$ dans les tissus lymphomateux, il ressort que dans plus de moitié des cas, cette maladie se caractérise par une mobilisation de cellules CTL immunocompétentes, et que l'intensité de l'infiltration CTL corrèle avec l'évolution post-thérapeutique.

Sur la base de cette observation, nous proposons un modèle en plusieurs étapes :

1) Lors de l'évolution de la maladie, il se génère des CTL intrinsèquement actifs dirigés contre un ou plusieurs antigènes tumoraux qui restent à déterminer.

2) Avant le traitement, les CTL voient leur efficacité limitée du fait d'une distribution topographique restreinte à la périphérie du nodule. Les raisons de ce phénomène sont pour l'instant obscures et possiblement plurifactorielles mais nous privilégions la piste d'un déficit en facteur chémo-attractant ou la sécrétion d'un facteur chémo-répulsif limitant la mobilité des CTL. De plus, avant le traitement, la quantité relativement faible d'antigène tumoral (faible index d'apoptose) représente un facteur limitant à une réponse immuno-spécifique puissante.

3) Lors de la phase thérapeutique, l'immunochimiothérapie, par sa très grande efficacité, induit une libération massive d'antigènes tumoraux responsable d'une puissante immuno-réactivité T dont l'intensité est possiblement amoindrie par des populations régulatrices (ex : les lymphocytes T_{regs} intra-folliculaires).

4) Au-delà du traitement, ces CTL restent longtemps actifs durant la phase post-thérapeutique, laquelle apparait donc propice aux stratégies vaccinales. Le rituximab administré dans le

cadre du traitement d'entretien (1 injection tous les 2 mois pendant 2 ans) joue possiblement un rôle. En effet, ce médicament est connu pour moduler l'expression de chémokines attractives dont CCL2.[215]

Notre projet pourrait se développer dans trois directions : nouvelles études immunohistochimiques, création de modèles 3D, nouvelles techniques d'imagerie cellulaire permettant d'étudier les interactions cellulaires « in situ ».

1. APPROCHES IMMUNOHISTOCHIMIQUES COMPLEMENTAIRES

En utilisant la même technique (simple ou double marquage CD8/granzyme B), nous souhaitons poser deux questions.

En premier lieu, quel est le statut de l'immuno-infiltration par les CTL dans d'autres lymphomes ? Tous les types histologiques sont concernés. En ce qui concerne le plus fréquent des LMNH, le LBDGC, la question mérite d'être posée. Nos résultats préliminaires suggèrent de grandes variations quant à l'immuno-infiltration avec, dans certains cas, une densité très élevée en CTL (voir Figure 12 ci-dessous). Dans le cas présenté, il s'agissait d'une malade immuno-compétente étant sur le plan clinique relativement stable. Le ganglion cervical prélevé montrait de très nombreuses cellules lymphocytaires T $CD8^+$ réactionnelles infiltrant un LBDGC, parfois entourant les cellules tumorales de grande taille, et chargées fortement en granules cytotoxiques granzyme B et perforine. Il est possible que cette situation soit encore plus fréquemment retrouvée dans le LBDGC de l'immuno-déprimé pour lequel on sait que la baisse d'intensité du traitement immunosuppresseur facilite la disparition du lymphome, cette observation signifiant implicitement la réalité d'une réponse CTL.

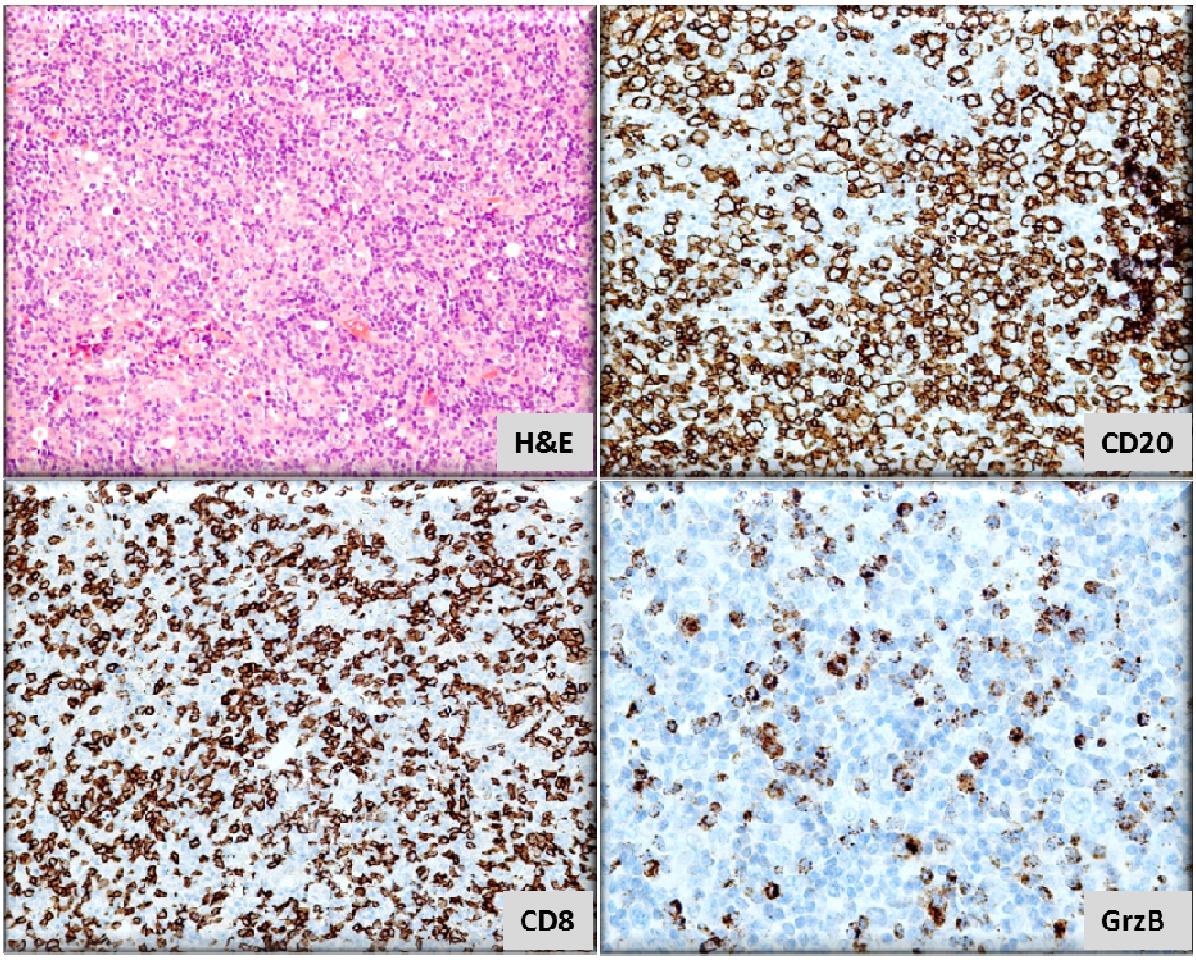


Figure 12 : Exemple d'immuno-infiltration par des CTL fortement chargés en granules cytotoxiques dans un LBDGC ganglionnaire.

En H&E, on observe une prolifération lymphomateuse de type lymphome B diffus à grandes cellules (H&E, x400). Les cellules tumorales sont positives avec l'anticorps anti-CD20 (CD20, x400). L'anticorps anti-CD8 met en évidence une population environnante riche en cellules T $CD8^+$(CD8, x400). L'anticorps anti-Granzyme B (GrzB, x400) montre de très nombreuses cellules exprimant les granules sécrétoires cytotoxiques.

En deuxième lieu, nous souhaitons répondre à cette question fascinante : la réponse CTL in situ s'inscrit-elle dans la durée ? L'hypothèse (provocante) est de considérer que l'infiltration

CTL persiste in situ bien au-delà de la disparition clinique de la maladie et conditionne ainsi le contrôle de la maladie dans un contexte de maladie résiduelle minime. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi le statut CTL impacte plus sur la durée de réponse que sur le taux de réponse. Cette question est difficile à résoudre et impossible à partir des échantillons ganglionnaires (par définition, un malade en réponse complète ne présente pas d'adénopathie prélevable). Toutefois, le LF se caractérise par une infiltration fréquente de la moelle osseuse détectée par la biopsie ostéo-médullaire (BOM). Cet examen est répété lors du bilan d'arrêt thérapeutique. Nous avions par ailleurs montré que, dans cette situation, alors que les cellules de LF ne sont plus détectables, il persistait durablement (un an !) un infiltrat T lymphocytaire constitué de cellules T $CD8^+$ mais surtout de cellules $CD4^+$ $FOXP3^+$ (Figure 13).[216] Ce travail déjà ancien (voir chapitre Annexes), corrélé au travail présenté ci-dessous, nous a encouragés à postuler qu'une fraction des cellules T $CD8^+$ était bien des CTL. En reprenant le matériel (10 cas), nous avons observé que lorsque l'immunomarquage était interprétable (n=5), près de 10% des T $CD8^+$ expriment effectivement le granzyme B, suggérant le maintien d'une activité cytotoxique bien au-delà de la disparition de la tumeur (Figure 13). Il est bien sûr tentant de faire l'hypothèse que cette population est bien LA population concernée dans l'allongement de la durée de réponse. Il conviendrait de la caractériser au plan phénotypique et cytokininique.

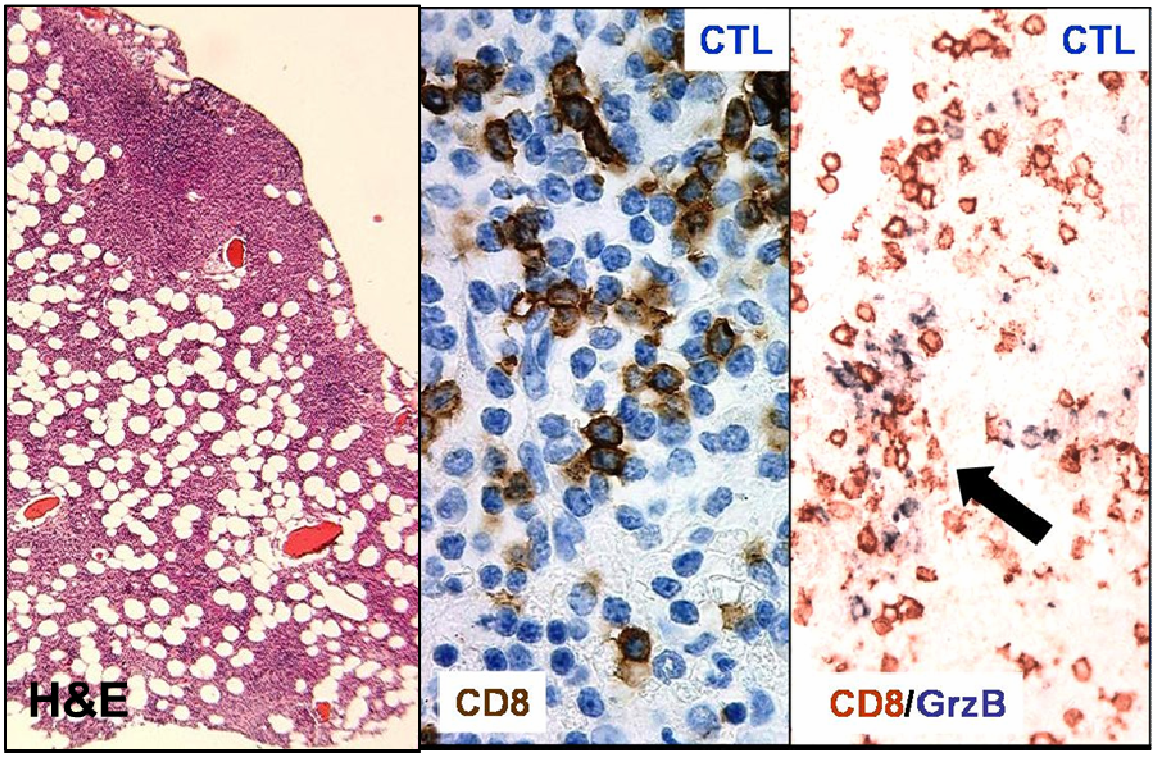


Figure 13 : Présence de CTL dans les BOM de patients LF en réponse complète 6 mois après Rituximab+chimiothérapie. D'après Laurent *et al*.[216]

En H&E, on observe un infiltrat lymphoïde nodulaire et paratrabéculaire post-traitement par rituximab associé à la chimiothérapie (H&E, x200). L'anticorps anti-CD8 met en évidence une population riche en cellules T $CD8^+$ au sein d'un infiltrat lymphocytaire réactionnel sans cellule LF identifiable (CD8, x1000). Le double immuno-marquage à l'aide des anticorps anti-CD8 et Granzyme B (GrzB) montre un contingent cellulaire de type CTL $CD8^+$ et exprimant les granules sécrétoires cytotoxiques granzyme B (CD8 et GrzB, x1000).

2. CREATION DE MODELES 3D

Notre travail montre l'importance d'examiner la dynamique de l'infiltration par les CTL et les mécanismes d'interactions CTL/cellules cibles dans un contexte spatial le plus proche possible de la vraie vie.

2.1 Les sphéroïdes

Les sphéroïdes peuvent représenter une réponse. Un modèle de ce type a été développé et breveté par Jean C. *et collaborateurs* dans l'Institut en 2010. Ce modèle a permis de démontrer que l'organisation spatiale affecte profondément l'expression des gènes de prolifération, de survie, et de protection cellulaire. Il est probable que la sensibilité aux effecteurs de l'immunité innée ou adaptative en soit également modifiée. Déjà, il a été montré dans ce système une régulation positive de la molécule tolérigène HLA-G (human leucocyte antigène G). Toutefois, le sphéroïde ne reproduit pas la complexité de l'architecture ganglionnaire au plan du réseau vasculaire et de la diversité fonctionnelle des sous-populations qui composent le micro-environnement. Il ne contient pas les nombreuses cellules accessoires qui jouent un rôle essentiel dans la fonction des CTL (CPA, cellules régulatrices, TAM, etc..). Enfin, le sphéroïde utilise des lignées immortalisées (dans l'expérience toulousaine il s'agit de la lignée RL) dont la biologie est sensiblement différente des cellules lymphomateuses fraiches.

2.2 Le projet FLIC/Follicular Lymphoma Immune Cells

Pour cette raison nous développons un modèle de culture organotypique dérivée de biopsie de LF. Ce projet (projet FLIC/Follicular Lymphoma Immune Cells) vient de débuter grâce à un financement INCA. Nous le détaillons ci-dessous.

2.2.1 Méthodologie

Un échantillon de tissu lymphomateux à l'état frais est coupé au Vibratome pour constituer un cube de 300 µm puis déposé sur une membrane insérée à la surface d'une cupule. L'ensemble du système est placé sous perfusion enrichie en O_2 continue dans l'incubateur à 37°C. La forme et la taille de l'échantillon autorise l'injection à sa phase supérieure de cellules qui pénètrent mécaniquement à l'intérieur du « Cube » ou coupe de tissu (Figure 14). Ainsi après avoir déposé nos cellules B et T marquées dans le tissu lymphomateux, ces dernières vont pouvoir pénétrer dans la coupe sous l'action conjointe de l'O2 et de la température et établir de possibles contacts entre elles. Par la suite, le tissu sera analysé soit en imagerie dynamique (microscope biphoton ou confocal) soit fixé et perméabilisé pour des études d'immunomarquage multi-couleurs au microscope confocal.

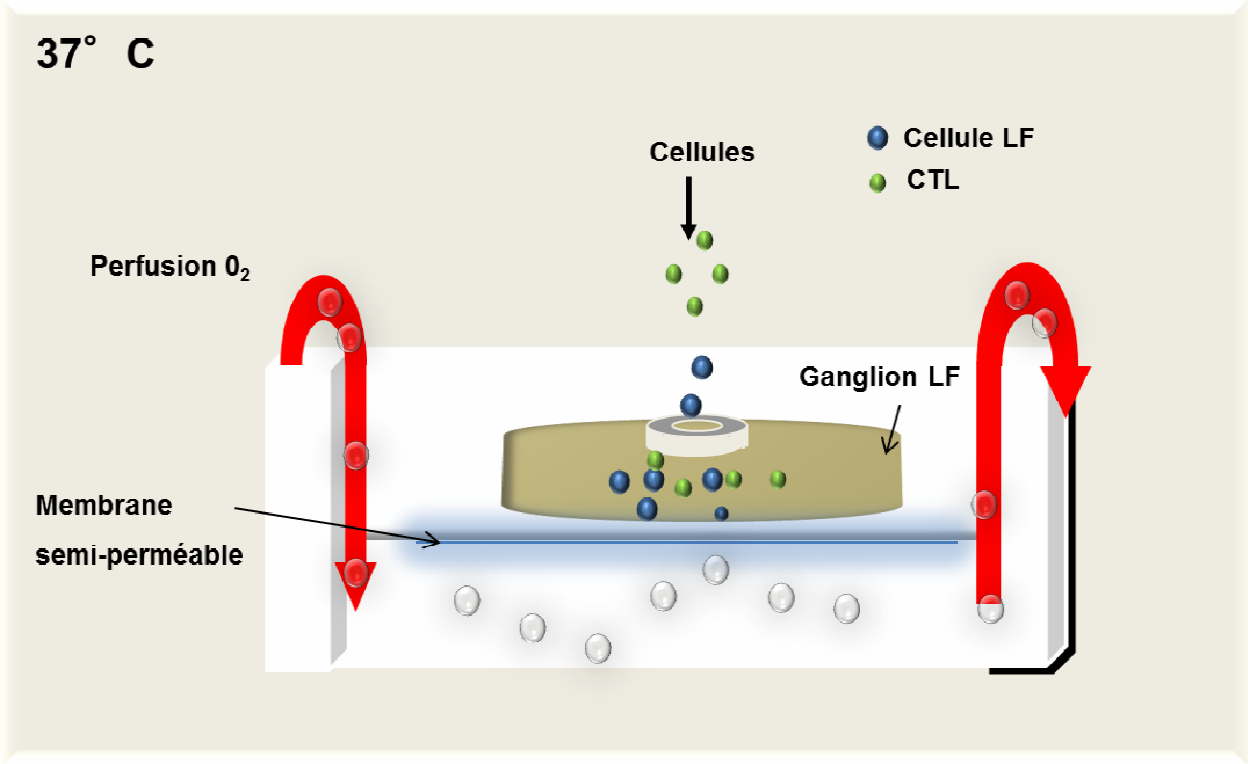


Figure 14 : Schématisation du modèle « Coupe de Tissu » du projet FLIC. D'après Rodrigues M. *2012*

Dans ce modèle, une coupe de 1 mm de ganglion lymphatique de LF, préalablement inclus en agarose et coupé au vibratome, sera déposée sur une membrane semi-perméable dans un milieu perfusé et enrichi en O2 et placée dans un incubateur (37°C). Après avoir préalablement marqué les cellules LF (ici en bleu) et les cellules T (ici en vert), les cellules seront déposées sur notre tissu qui sous l'action stimulante de l'oxygène, vont pénétrer le tissu et possiblement rentrer en contact. Par la suite les tissus seront soit analysés in live par imagerie dynamique soit fixés et perméabilisés pour des études d'immunomarquages multi-couleurs.

Nous envisageons d'analyser l'infiltration du système par des cellules T $CD8^+$: soit $CD8^+$ autologues (issus du ganglion ou du sang après tri), soit $CD8^+$ allogéniques (issus de donneurs ou de clones T anti-CMV). L'infiltration cellulaire peut être observée et quantifiée en utilisant le bi-photon microscope 7 MP (Zeiss) ou le microscope confocal 710 (Zeiss) (Figure 15).

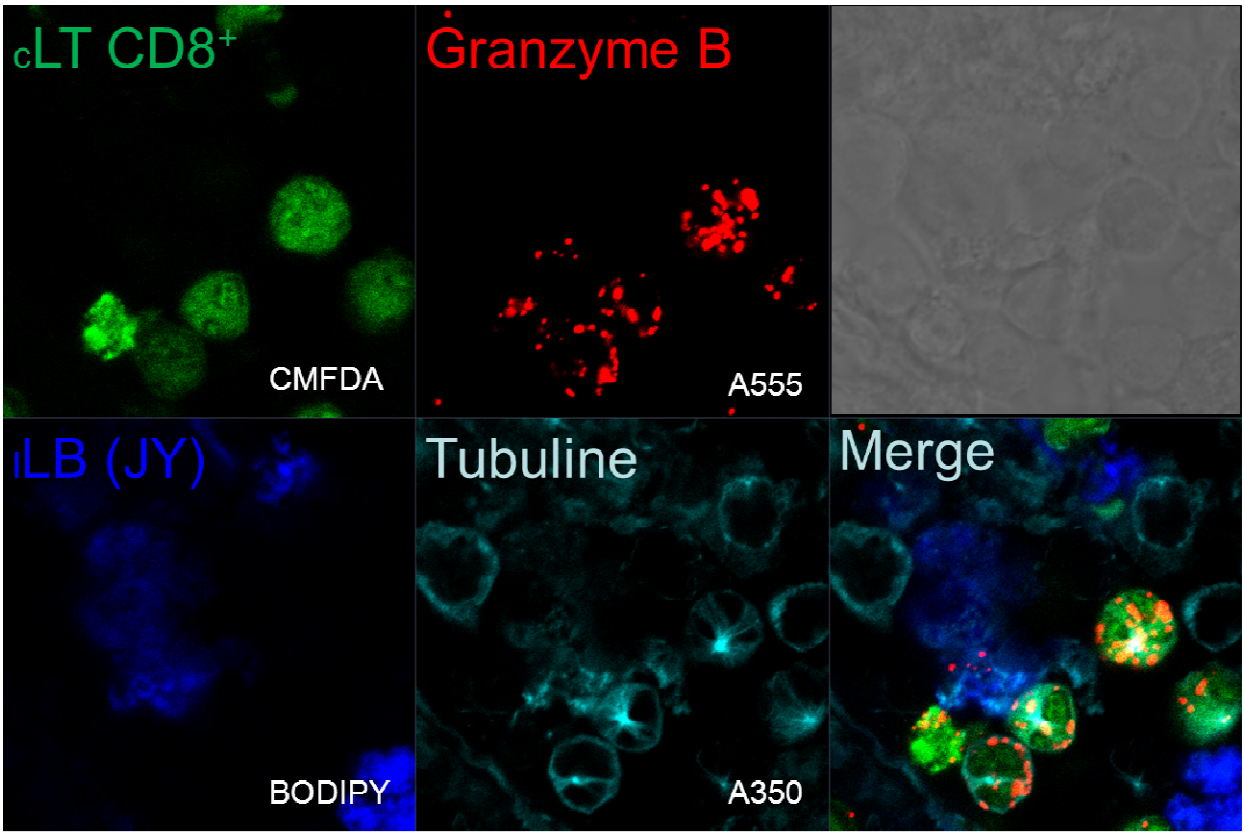


Figure 15 : Etude dynamique de l'infiltration des CTL et de leur fonction SIdans les tissus lymphoïdes humains (Microscope Confocal 710). Rodrigues et Laurent *2012*

Les cLT CD8 (CTL) peptide-CMV spécifiques (marqués en vert par le CMFDA) chargés en granules cytotoxiques granzyme B (en rouge A555) viennent au contact des CPA LB (lignées B JY) (marquées en bleu par le BodiPy) (préalablement chargées du peptide spécifique CMV) et polarisent une partie de leur granules lytiques (en rouge) vers la zone de contact synaptique entre le CTL et le LB (merge). Le cytosquelette de tubuline des cLT CD8 et le LB est marqué avec un anticorps antiα-tubulin (en cyan A350)

2.2.2 Objectifs du FLIC

Le projet FLIC a pour but de définir la cartographie spatiale des interactions dynamiques entre CTL et cellules de LF pour évaluer l'impact de manipulations pharmacologiques visant à favoriser l'immuno-infiltration et la formation de synapses lytiques. Le modèle décrit ci-dessus représente un outil unique pour tester des molécules susceptibles d'influencer l'immuno-infiltration ou de restaurer la synapse immunologique.

3. IMMUNOPHARMACOLOGIE

De tels modèles se prêtent bien à la mesure des effets immuno- pharmacologiques de certains médicaments. Sur la seule base de nos résultats actuels, plusieurs axes pourraient être développés.

3.1 Synapse immunologique et agents immunomodulateurs

Les agents immunomodulateurs (Imids®) sont susceptibles de restaurer une synapse immunologique (SI) effective.[191,192,217] En effet, L'équipe de J Gribben [191,217] a montré un déficit de la SI entre le lymphocyte T $CD4^+$ et T $CD8^+$ et la cellule tumorale dans les LLC et dans le LF, dû à un défaut de polymérisation de l'actine au niveau du lymphocyte effecteur, processus actif induit par exemple dans la cellule LLC via LFA1. Récemment, la même équipe[192] a montré que le défaut de réorganisation du cytosquelette dépendait des petites

molécules GTPases (RhoA, Rac1 et cdc 42) activées en aval des récepteurs « immune checkpoints » tels que CD200R et PD-1. Ce défaut synaptique serait restauré par un traitement avec 1µM de lenalidomide (chef de file des Imids). Enfin, le lenalidomide pourrait également moduler le recrutement des LF en diminuant la sécrétion de CXCL12 par les cellules stromales mésenchymateuses.[218]

Dans mon modèle (projet FLIC), nous aurons l'opportunité de tester l'efficacité du lenalidomide *in vivo* chez des patients LF traités par lenalidomide, et *in vitro* par live imaging (études dynamiques de la migration et des interactions lymphocytaires).

3.2 Immuno-infiltration et chimiokines/cytokines

Plusieurs classes de médicaments sont susceptibles de modifier l'immuno-infiltration via un recrutement des cellules cytotoxiques (CTL ou NK) par des cytokines ou des chimiokines. Les agonistes de TLR-9 (qui induisent la sécrétion de cytokines de type T_H1, notamment IFNα) ont démontré en clinique des synergies intéressantes avec le R (rituximab).[219] En effet l'IFNα a été longtemps utilisé dans le traitement des LF, seul ou avec R-chimiothérapie, et augmenterait la réponse anti-tumorale.[220,221] Enfin d'autres approches immuno-modulatrices pourraient être également envisagées notamment en stimulant la lyse tumorale induite par les NK en utilisant des cytokines telles que l'IL-15.[222] Dans les atteintes médullaires, une approche thérapeutique couplant le rituximab aux inhibiteurs de CXCR4 (plerixafor), actuellement testée dans les LLC, pourrait être bénéfique pour limiter le recrutement des lymphocytes tumoraux.[223]

3.3 Les nouveaux anticorps : bloquer les immune checkpoints

Dans notre modèle, on pourrait également envisager d'utiliser des anticorps qui stimuleraient la réponse anti-tumorale en levant l'inhibition de contact induite par la cellule B tumorale sur le lymphocyte effecteur. Par exemple, l'anticorps anti-CTLA-4 (CD152) ou ipilimumab, commercialisé dans les mélanomes.[224,225] et testé en phase I dans les lymphomes[226] pourrait restaurer l'action lytique des CTL.[227] Le blocage de l'interaction entre PD-1 et son ligand PD-L1[,228,229]par exemple par l'anticorps anti-PD-1 traitement ayant montré son efficacité dans les mélanomes, les cancers du rein ou les cancers du poumons non à petites cellules,[230] pourrait favoriser la migration et l'activation des lymphocytes T effecteurs et leur réponse anti-tumorale dans les LF. Enfin parmi les nouveaux anticorps, notre projet s'adapterait bien à la problématique des anticorps bi-spécifiques couplant une activité anti-B et une activité anti-CTL afin de favoriser l'interaction cellules cibles/effecteurs. Le modèle anti-CD19/anti-CD3 BiTE® (testé actuellement dans les LAL en rechute) ou d'autres systèmes de couplage pourraient être envisagés.[206,207]

Dans mon modèle (projet FLIC), nous pourrons tester l'efficacité de l'ensemble de ces traitements, associés ou non avec le rituximab, sur la réponse cytotoxique anti-tumorale induite par les CTL in situ en me focalisant dans un premier temps sur la dynamique d'infiltration des CTL et leurs interactions avec les cellules LF par live imaging et sur l'analyse fonctionnelle des SI entre CTL et LF.

REFERENCES

REFERENCES

1. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, et al: The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. Int J Cancer 120 Suppl 12:1-39, 2007
2. Michallet AS, Coiffier B: Recent developments in the treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma. Blood Rev 23:11-23, 2009
3. Solal-Celigny P: Prognosis of follicular lymphomas. Clin Lymphoma 6:21-5, 2005
4. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, et al: Follicular lymphoma international prognostic index. Blood 104:1258-65, 2004
5. Bakhshi A, Wright JJ, Graninger W, et al: Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. Proc Natl Acad Sci U S A 84:2396-400, 1987
6. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, et al: Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. Blood 93:3081-7, 1999
7. Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, et al: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue: Follicular Lymphoma. 4th Edition. IARC Press. Lyon, France, 220-226, 2008
8. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, et al: In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. Blood 99:3376-82, 2002
9. Finn LS, Viswanatha DS, Belasco JB, et al: Primary follicular lymphoma of the testis in childhood. Cancer 85:1626-35, 1999
10. Godal R, Keilholz U, Uharek L, et al: Lymphomas are sensitive to perforin-dependent cytotoxic pathways despite expression of PI-9 and overexpression of bcl-2. Blood 107:3205-11, 2006
11. Leich E, Ott G, Rosenwald A: Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL. Best Pract Res Clin Haematol 24:95-109, 2011
12. Leich E, Salaverria I, Bea S, et al: Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. Blood 114:826-34, 2009
13. Leich E, Zamo A, Horn H, et al: MicroRNA profiles of t(14;18)-negative follicular lymphoma support a late germinal center B-cell phenotype. Blood 118:5550-8, 2011
14. Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, et al: Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. Oncogene 6:2271-6, 1991
15. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, et al: Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. Leukemia 20:158-62, 2006
16. Giannelli F, Moscarella S, Giannini C, et al: Effect of antiviral treatment in patients with chronic HCV infection and t(14;18) translocation. Blood 102:1196-201, 2003
17. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, et al: The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. Blood 117:563-74, 2011
18. Irish JM, Czerwinski DK, Nolan GP, et al: Altered B-cell receptor signaling kinetics distinguish human follicular lymphoma B cells from tumor-infiltrating nonmalignant B cells. Blood 108:3135-42, 2006

19. Kheirallah S, Caron P, Gross E, et al: Rituximab inhibits B-cell receptor signaling. Blood 115:985-94, 2010
20. Zhu D, McCarthy H, Ottensmeier CH, et al: Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. Blood 99:2562-8, 2002
21. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al: Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. Nature 459:717-21, 2009
22. Coelho V, Krysov S, Ghaemmaghami AM, et al: Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. Proc Natl Acad Sci U S A 107:18587-92, 2010
23. Leseux L, Hamdi SM, Al Saati T, et al: Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. Blood 108:4156-62, 2006
24. Chim CS, Wong KY, Loong F, et al: SOCS1 and SHP1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. Leukemia 18:356-8, 2004
25. Noonan K, Borrello I: The immune microenvironment of myeloma. Cancer Microenviron 4:313-23, 2011
26. Braga WM, Atanackovic D, Colleoni GW: The role of regulatory T cells and TH17 cells in multiple myeloma. Clin Dev Immunol 2012:293479, 2012
27. Burger JA: Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011:96-103, 2011
28. Audrito V, Vaisitti T, Serra S, et al: Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia offers novel therapeutic options. Cancer Lett, 2012
29. Fruchon S, Kheirallah S, Al Saati T, et al: Involvement of the Syk-mTOR pathway in follicular lymphoma cell invasion and angiogenesis. Leukemia 26:795-805, 2012
30. Jorgensen JM, Sorensen FB, Bendix K, et al: Expression level, tissue distribution pattern, and prognostic impact of vascular endothelial growth factors VEGF and VEGF-C and their receptors Flt-1, KDR, and Flt-4 in different subtypes of non-Hodgkin lymphomas. Leuk Lymphoma 50:1647-60, 2009
31. Labidi SI, Menetrier-Caux C, Chabaud S, et al: Serum cytokines in follicular lymphoma. Correlation of TGF-beta and VEGF with survival. Ann Hematol 89:25-33, 2010
32. Farinha P, Kyle AH, Minchinton AI, et al: Vascularization predicts overall survival and risk of transformation in follicular lymphoma. Haematologica 95:2157-60, 2010
33. Evens AM, Sehn LH, Farinha P, et al: Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} expression predicts superior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. J Clin Oncol 28:1017-24, 2010
34. Martinet L, Garrido I, Girard JP: Tumor high endothelial venules (HEVs) predict lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. Oncoimmunology 1:789-790, 2012
35. Hindley JP, Jones E, Smart K, et al: T cell trafficking facilitated by high endothelial venules is required for tumor control after regulatory T cell depletion. Cancer Res, 2012
36. Taskinen M, Jantunen E, Kosma VM, et al: Prognostic impact of CD31-positive microvessel density in follicular lymphoma patients treated with immunochemotherapy. Eur J Cancer 46:2506-12, 2010
37. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, et al: A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. Gastroenterology 135:234-43, 2008
38. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, et al: Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. Immunol Rev 222:162-79, 2008

39. Bronte V, Zanovello P: Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. Nat Rev Immunol 5:641-54, 2005

40. Kusmartsev SA, Li Y, Chen SH: Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. J Immunol 165:779-85, 2000

41. Munder M, Schneider H, Luckner C, et al: Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. Blood 108:1627-34, 2006

42. Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, et al: L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. J Immunol 171:1232-9, 2003

43. Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG, et al: Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. J Immunol 160:5729-34, 1998

44. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, et al: Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. J Immunol 168:689-95, 2002

45. Gabrilovich DI, Nagaraj S: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol 9:162-74, 2009

46. Ostrand-Rosenberg S: Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. Cancer Immunol Immunother 59:1593-600, 2010

47. Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, et al: Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth. J Immunol, 2012

48. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al: Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. J Exp Med 202:919-29, 2005

49. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, et al: Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. Cancer Res 68:5439-49, 2008

50. Chen CH, Seguin-Devaux C, Burke NA, et al: Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca2+ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. J Exp Med 197:1689-99, 2003

51. Munn DH: Indoleamine 2,3-dioxygenase, Tregs and cancer. Curr Med Chem 18:2240-6, 2011

52. Terabe M, Matsui S, Park JM, et al: Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. J Exp Med 198:1741-52, 2003

53. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, et al: Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. J Immunol 179:977-83, 2007

54. Ame-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, et al: Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. Blood 109:693-702, 2007

55. Mourcin F, Pangault C, Amin-Ali R, et al: Stromal cell contribution to human follicular lymphoma pathogenesis. Front Immunol 3:280, 2012

56. Mraz M, Zent CS, Church AK, et al: Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin alpha-4-beta-1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. Br J Haematol 155:53-64, 2011

57. Mueller CG, Boix C, Kwan WH, et al: Critical role of monocytes to support normal B cell and diffuse large B cell lymphoma survival and proliferation. J Leukoc Biol 82:567-75, 2007

58. Goval JJ, Thielen C, Bourguignon C, et al: The prevention of spontaneous apoptosis of follicular lymphoma B cells by a follicular dendritic cell line: involvement of caspase-3, caspase-8 and c-FLIP. Haematologica 93:1169-77, 2008

59. Calvo KR, Dabir B, Kovach A, et al: IL-4 protein expression and basal activation of Erk in vivo in follicular lymphoma. Blood 112:3818-26, 2008

60. Pangault C, Ame-Thomas P, Ruminy P, et al: Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent T(FH)-B cell axis. Leukemia 24:2080-9, 2010

61. Guilloton F, Caron G, Menard C, et al: Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. Blood 119:2556-67, 2012

62. Solinas G, Germano G, Mantovani A, et al: Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J Leukoc Biol 86:1065-73, 2009

63. Sica A, Mantovani A: Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest 122:787-95, 2012

64. Roca H, Varsos ZS, Sud S, et al: CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. J Biol Chem 284:34342-54, 2009

65. Lewis CE, Pollard JW: Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. Cancer Res 66:605-12, 2006

66. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, et al: The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer 8:618-31, 2008

67. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM: Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. Trends Immunol 33:119-26, 2012

68. Dave SS, Wright G, Tan B, et al: Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. N Engl J Med 351:2159-69, 2004

69. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, et al: Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). Blood 106:2169-74, 2005

70. Canioni D, Salles G, Mounier N, et al: High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial. J Clin Oncol 26:440-6, 2008

71. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Nyman H, et al: A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. Clin Cancer Res 13:5784-9, 2007

72. Alvaro T, Lejeune M, Camacho FI, et al: The presence of STAT1-positive tumor-associated macrophages and their relation to outcome in patients with follicular lymphoma. Haematologica 91:1605-12, 2006

73. Wang HW, Joyce JA: Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. Cell Cycle 9:4824-35, 2010

74. Epron G, Ame-Thomas P, Le Priol J, et al: Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. Leukemia 26:139-48, 2012

75. Clear AJ, Lee AM, Calaminici M, et al: Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. Blood 115:5053-6, 2010

76. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, et al: Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. Oncogene 29:1093-102

77. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, et al: Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. J Clin Oncol 24:5350-7, 2006

78. Wahlin BE, Aggarwal M, Montes-Moreno S, et al: A unifying microenvironment model in follicular lymphoma: outcome is predicted by programmed death-1--positive, regulatory, cytotoxic, and helper T cells and macrophages. Clin Cancer Res 16:637-50

79. Wahlin BE, Sander B, Christensson B, et al: CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. Clin Cancer Res 13:388-97, 2007

80. Leger-Ravet MB, Devergne O, Peuchmaur M, et al: In situ detection of activated cytotoxic cells in follicular lymphomas. Am J Pathol 144:492-9, 1994

81. Glas AM, Knoops L, Delahaye L, et al: Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. J Clin Oncol 25:390-8, 2007

82. Relander T, Johnson NA, Farinha P, et al: Prognostic factors in follicular lymphoma. J Clin Oncol 28:2902-13

83. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, et al: High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. Blood 108:2957-64, 2006

84. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, et al: High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. J Clin Oncol 27:1470-6, 2009

85. Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, et al: Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. J Clin Oncol 24:5052-9, 2006

86. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, et al: Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica 93:193-200, 2008

87. Farinha P, Al-Tourah A, Gill K, et al: The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. Blood 115:289-95, 2010

88. Rimsza L: Regulating the suppressors: helpful or harmful? Leuk Lymphoma 49:179-80, 2008

89. Savage PA, Malchow S, Leventhal DS: Basic principles of tumor-associated regulatory T cell biology. Trends Immunol, 2012

90. Facciabene A, Motz GT, Coukos G: T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. Cancer Res 72:2162-71, 2012

91. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY: Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. Annu Rev Immunol 30:531-64, 2012

92. Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, et al: The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. Blood 113:2394-401, 2009

93. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, et al: Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Blood 107:3639-46, 2006

94. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, et al: Attenuation of CD8(+) T-cell function by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Cancer Res 66:10145-52, 2006

95. Ai WZ, Hou JZ, Zeiser R, et al: Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4+ T cells to T-regulatory cells. Int J Cancer 124:239-44, 2009

96. Ame-Thomas P, Le Priol J, Yssel H, et al: Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells. Leukemia 26:1053-63, 2012

97. Braza MS, Caraux A, Rousset T, et al: gammadelta T lymphocytes count is normal and expandable in peripheral blood of patients with follicular lymphoma, whereas it is decreased in tumor lymph nodes compared with inflammatory lymph nodes. J Immunol 184:134-40, 2010

98. Sicard H, Ingoure S, Luciani B, et al: In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. J Immunol 175:5471-80, 2005

99. Steel JC, Waldmann TA, Morris JC: Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. Trends Pharmacol Sci 33:35-41, 2012

100. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD: Pathogenesis of follicular lymphoma. J Clin Invest 122:3424-31, 2012

101. Bezombes C, Fournie JJ, Laurent G: Direct effect of rituximab in B-cell-derived lymphoid neoplasias: mechanism, regulation, and perspectives. Mol Cancer Res 9:1435-42, 2011

102. Ysebaert L, Gross E, Kuhlein E, et al: Immune recovery after fludarabine-cyclophosphamide-rituximab treatment in B-chronic lymphocytic leukemia: implication for maintenance immunotherapy. Leukemia 24:1310-6, 2010

103. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al: Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. Blood 99:1517-26, 2002

104. Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, et al: Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma. J Clin Oncol 29:2787-94, 2011

105. Prockop S, Petrie HT: Cell migration and the anatomic control of thymocyte precursor differentiation. Semin Immunol 12:435-44, 2000

106. Benoist C, Mathis D: T-cell development: a new marker of differentiation state. Curr Biol 9:R59-61, 1999

107. Baird AM, Gerstein RM, Berg LJ: The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development. Curr Opin Immunol 11:157-66, 1999

108. Berg LJ, Kang J: Molecular determinants of TCR expression and selection. Curr Opin Immunol 13:232-41, 2001

109. von Boehmer H: Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. Nat Rev Immunol 5:571-7, 2005

110. Worbs T, Forster R: T cell migration dynamics within lymph nodes during steady state: an overview of extracellular and intracellular factors influencing the basal intranodal T cell motility. Curr Top Microbiol Immunol 334:71-105, 2009

111. Germain RN: MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. Cell 76:287-99, 1994

112. Zhou L, Chong MM, Littman DR: Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. Immunity 30:646-55, 2009

113. Zhu J, Paul WE: Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. Immunol Rev 238:247-62, 2010

114. Zhu J, Yamane H, Paul WE: Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). Annu Rev Immunol 28:445-89, 2010

115. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, et al: Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. Annu Rev Immunol 16:523-44, 1998

116. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC: Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. Immunity 24:133-9, 2006

117. Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, et al: The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. Cell 111:967-79, 2002

118. Weiss A, Littman DR: Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. Cell 76:263-74, 1994

119. Reth M: Antigen receptor tail clue. Nature 338:383-4, 1989

120. Cambier JC: Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). J Immunol 155:3281-5, 1995

121. Sharpe AH, Abbas AK: T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. N Engl J Med 355:973-5, 2006

122. Ley SC, Marsh M, Bebbington CR, et al: Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes. J Cell Biol 125:639-49, 1994

123. Schoenborn JR, Tan YX, Zhang C, et al: Feedback circuits monitor and adjust basal Lck-dependent events in T cell receptor signaling. Sci Signal 4:ra59, 2011

124. van Oers NS, Killeen N, Weiss A: ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells. Immunity 1:675-85, 1994

125. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, et al: LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. Cell 92:83-92, 1998

126. Zhang W, Trible RP, Zhu M, et al: Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell angigen receptor-mediated signaling. J Biol Chem 275:23355-61, 2000

127. Su YW, Zhang Y, Schweikert J, et al: Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. Eur J Immunol 29:3702-11, 1999

128. Feske S, Giltnane J, Dolmetsch R, et al: Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. Nat Immunol 2:316-24, 2001

129. Valitutti S, Dessing M, Aktories K, et al: Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. J Exp Med 181:577-84, 1995

130. Lyubchenko TA, Wurth GA, Zweifach A: Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing. Immunity 15:847-59, 2001

131. Lewis RS: Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. Annu Rev Immunol 19:497-521, 2001

132. Karin M, Delhase M: The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. Semin Immunol 12:85-98, 2000

133. Marsland BJ, Soos TJ, Spath G, et al: Protein kinase C theta is critical for the development of in vivo T helper (Th)2 cell but not Th1 cell responses. J Exp Med 200:181-9, 2004

134. Mor A, Philips MR: Compartmentalized Ras/MAPK signaling. Annu Rev Immunol 24:771-800, 2006

135. Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS: Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. Nat Rev Immunol 7:131-43, 2007

136. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, et al: Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. Nature 395:82-6, 1998

137. Saito T, Yokosuka T: Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells. Curr Opin Immunol 18:305-13, 2006

138. Muller S, Demotz S, Bulliard C, et al: Kinetics and extent of protein tyrosine kinase activation in individual T cells upon antigenic stimulation. Immunology 97:287-93, 1999

139. Dustin ML, Cooper JA: The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. Nat Immunol 1:23-9, 2000

140. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, et al: The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. Immunity 15:751-61, 2001

141. Faroudi M, Utzny C, Salio M, et al: Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. Proc Natl Acad Sci U S A 100:14145-50, 2003

142. Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, et al: Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. Annu Rev Immunol 28:79-105, 2010

143. Kupfer A, Dennert G, Singer SJ: Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. Proc Natl Acad Sci U S A 80:7224-8, 1983

144. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, et al: The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science 285:221-7, 1999

145. Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, et al: T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. Science 295:1539-42, 2002

146. Dustin ML, Long EO: Cytotoxic immunological synapses. Immunol Rev 235:24-34, 2010

147. Thauland TJ, Parker DC: Diversity in immunological synapse structure. Immunology 131:466-72, 2010

148. O'Keefe JP, Blaine K, Alegre ML, et al: Formation of a central supramolecular activation cluster is not required for activation of naive CD8+ T cells. Proc Natl Acad Sci U S A 101:9351-6, 2004

149. Maldonado RA, Irvine DJ, Schreiber R, et al: A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. Nature 431:527-32, 2004

150. Richie LI, Ebert PJ, Wu LC, et al: Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3zeta to form a stable central accumulation during negative selection. Immunity 16:595-606, 2002

151. Valitutti S: Immunological synapse: center of attention again. Immunity 29:384-6, 2008

152. Valitutti S, Dupre L: Plasticity of immunological synapses. Curr Top Microbiol Immunol 340:209-28, 2010

153. Valitutti S, Coombs D, Dupre L: The space and time frames of T cell activation at the immunological synapse. FEBS Lett 584:4851-7, 2010

154. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 299:1057-61, 2003

155. Joffre O, Santolaria T, Calise D, et al: Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. Nat Med 14:88-92, 2008

156. Sakaguchi S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol 6:345-52, 2005

157. Micheau O, Tschopp J: Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell 114:181-90, 2003

158. Igney FH, Krammer PH: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer 2:277-88, 2002

159. Street SE, Hayakawa Y, Zhan Y, et al: Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. J Exp Med 199:879-84, 2004

160. van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, et al: Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. J Exp Med 184:1781-90, 1996

161. Cullen SP, Brunet M, Martin SJ: Granzymes in cancer and immunity. Cell Death Differ 17:616-23, 2010

162. Boatright KM, Salvesen GS: Mechanisms of caspase activation. Curr Opin Cell Biol 15:725-31, 2003

163. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al: Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science 277:818-21, 1997

164. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, et al: The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. Immunity 7:813-20, 1997

165. Merino D, Lalaoui N, Morizot A, et al: Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. Mol Cell Biol 26:7046-55, 2006

166. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al: Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. Immunol Today 18:89-95, 1997

167. Hicklin DJ WZ, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S.: beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. J Clin Invest 101:2720-9, 1998

168. Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, et al: Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. Blood 92:3018-24, 1998

169. Do B, Lossos IS, Thorstenson Y, et al: Analysis of FAS (CD95) gene mutations in higher-grade transformation of follicle center lymphoma. Leuk Lymphoma 44:1317-23, 2003

170. O'Connell J, Houston A, Bennett MW, et al: Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. Nat Med 7:271-4, 2001

171. Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ: The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. Nat Rev Cancer 8:782-98, 2008

172. Zaks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, et al: Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. J Immunol 162:3273-9, 1999

173. Lehmann C, Zeis M, Schmitz N, et al: Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. Blood 96:594-600, 2000

174. Irmler M, Thome M, Hahne M, et al: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature 388:190-5, 1997

175. Travert M, Ame-Thomas P, Pangault C, et al: CD40 ligand protects from TRAIL-induced apoptosis in follicular lymphomas through NF-kappaB activation and up-regulation of c-FLIP and Bcl-xL. J Immunol 181:1001-11, 2008

176. Hersey P, Zhang XD: How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. Nat Rev Cancer 1:142-50, 2001

177. Sharma S, Stolina M, Lin Y, et al: T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. J Immunol 163:5020-8, 1999

178. Yue FY, Dummer R, Geertsen R, et al: Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. Int J Cancer 71:630-7, 1997

179. Yang L, Pang Y, Moses HL: TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. Trends Immunol 31:220-7, 2010

180. Oyama T, Ran S, Ishida T, et al: Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. J Immunol 160:1224-32, 1998

181. Thompson CB, Allison JP: The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. Immunity 7:445-50, 1997

182. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, et al: Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. Immunity 27:635-46, 2007

183. Poggi A, Zocchi MR: Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 54:323-33, 2006

184. Nishikawa H, Sakaguchi S: Regulatory T cells in tumor immunity. Int J Cancer 127:759-67, 2010

185. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al: The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer 12:298-306, 2012

186. Pistoia V, Corcione A, Dallegri F, et al: Lymphoproliferative disorders and chemokines. Curr Drug Targets 7:81-90, 2006

187. Cittera E, Leidi M, Buracchi C, et al: The CCL3 family of chemokines and innate immunity cooperate in vivo in the eradication of an established lymphoma xenograft by rituximab. J Immunol 178:6616-23, 2007

188. Kroemer G, Zitvogel L: Abscopal but desirable: The contribution of immune responses to the efficacy of radiotherapy. Oncoimmunology 1:407-408, 2012

189. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al: Immunological aspects of cancer chemotherapy. Nat Rev Immunol 8:59-73, 2008

190. Lacour S, Hammann A, Grazide S, et al: Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. Cancer Res 64:3593-8, 2004

191. Ramsay AG, Clear AJ, Kelly G, et al: Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. Blood 114:4713-20, 2009

192. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, et al: Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. Blood 120:1412-21, 2012

193. Chouaib S, Messai Y, Couve S, et al: Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape. Front Immunol 3:21, 2012

194. Noman MZ, Buart S, Van Pelt J, et al: The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. J Immunol 182:3510-21, 2009

195. Joffre OP, Segura E, Savina A, et al: Cross-presentation by dendritic cells. Nat Rev Immunol 12:557-69, 2012

196. Boissonnas A, Fetler L, Zeelenberg IS, et al: In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. J Exp Med 204:345-56, 2007

197. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, et al: Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. J Clin Invest 122:899-910, 2012

198. Skibola CF, Akers NK, Conde L, et al: Multi-locus HLA class I and II allele and haplotype associations with follicular lymphoma. Tissue Antigens 79:279-86, 2012

199. Amiot L, Onno M, Lamy T, et al: Loss of HLA molecules in B lymphomas is associated with an aggressive clinical course. Br J Haematol 100:655-63, 1998

200. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, et al: Combined genetic inactivation of beta2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. Cancer Cell 20:728-40, 2011

201. Rohatiner AZ, Gregory WM, Peterson B, et al: Meta-analysis to evaluate the role of interferon in follicular lymphoma. J Clin Oncol 23:2215-23, 2005

202. Butsch R, Lukas Waelti S, Schaerer S, et al: Intratumoral plasmacytoid dendritic cells associate with increased survival in patients with follicular lymphoma. Leuk Lymphoma 52:1230-8, 2011

203. Weber JS, Kahler KC, Hauschild A: Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. J Clin Oncol 30:2691-7, 2012

204. Brody J, Kohrt H, Marabelle A, et al: Active and passive immunotherapy for lymphoma: proving principles and improving results. J Clin Oncol 29:1864-75, 2011

205. Mi JQ, Manches O, Wang J, et al: Development of autologous cytotoxic CD4+ T clones in a human model of B-cell non-Hodgkin follicular lymphoma. Br J Haematol 135:324-35, 2006

206. Bargou R, Leo E, Zugmaier G, et al: Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. Science 321:974-7, 2008

207. Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, et al: Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. Blood 119:6226-33, 2012

208. Seiler TM, Hiddemann W: Advances in the management of follicular lymphoma. Curr Opin Oncol, 2012

209. Zou Z, Denny E, Brown CE, et al: Cytotoxic T lymphocyte trafficking and survival in an augmented fibrin matrix carrier. PLoS One 7:e34652, 2012

210. Coppieters K, Amirian N, von Herrath M: Intravital imaging of CTLs killing islet cells in diabetic mice. J Clin Invest 122:119-31, 2012

211. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, et al: Brave little world: spheroids as an in vitro model to study tumor-immune-cell interactions. Cell Cycle 5:691-5, 2006

212. Weigelin B, Friedl P: A three-dimensional organotypic assay to measure target cell killing by cytotoxic T lymphocytes. Biochem Pharmacol 80:2087-91, 2010

213. Carey GB, Donjerkovic D, Mueller CM, et al: B-cell receptor and Fas-mediated signals for life and death. Immunol Rev 176:105-15, 2000

214. Takahashi H, Feuerhake F, Kutok JL, et al: FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. Clin Cancer Res 12:3265-71, 2006

215. Fabre S, Guisset C, Tatem L, et al: Protein biochip array technology to monitor rituximab in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 155:395-402, 2009

216. Laurent C, de Paiva GR, Ysebaert L, et al: Characterization of bone marrow lymphoid infiltrates after immunochemotherapy for follicular lymphoma. Am J Clin Pathol 128:974-80, 2007

217. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, et al: Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. J Clin Invest 118:2427-37, 2008

218. Wobus M, Benath G, Ferrer RA, et al: Impact of lenalidomide on the functional properties of human mesenchymal stromal cells. Exp Hematol 40:867-76, 2012

219. Douglas VK, Gordon LI, Goolsby CL, et al: Lymphoid aggregates in bone marrow mimic residual lymphoma after rituximab therapy for non-Hodgkin lymphoma. Am J Clin Pathol 112:844-53, 1999

220. Davis TA, Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, et al: Combination immunotherapy of relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interferon-alpha-2a. Clin Cancer Res 6:2644-52, 2000

221. Kimby E: Biological therapy doublets: pairing rituximab with interferon, lenalidomide, and other biological agents in patients with follicular lymphoma. Curr Hematol Malig Rep 7:221-7, 2012

222. Jakobisiak M, Golab J, Lasek W: Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. Cytokine Growth Factor Rev 22:99-108, 2011

223. Calandra G, Bridger G, Fricker S: CXCR4 in clinical hematology. Curr Top Microbiol Immunol 341:173-91, 2010

224. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD: The antitumor immunity of ipilimumab: (T-cell) memories to last a lifetime? Clin Cancer Res 18:1821-3, 2012

225. Postow MA, Harding J, Wolchok JD: Targeting immune checkpoints: releasing the restraints on anti-tumor immunity for patients with melanoma. Cancer J 18:153-9, 2012

226. Ansell SM, Hurvitz SA, Koenig PA, et al: Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res 15:6446-53, 2009

227. Shrikant P, Khoruts A, Mescher MF: CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+ T cell- and IL-2-dependent mechanism. Immunity 11:483-93, 1999

228. Andorsky DJ, Yamada RE, Said J, et al: Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. Clin Cancer Res 17:4232-44, 2011

229. Li Y, Wang J, Li C, et al: Contribution of PD-L1 to oncogenesis of lymphoma and its RNAi-based targeting therapy. Leuk Lymphoma 53:2015-23, 2012

230. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al: Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med 366:2443-54, 2012

ANNEXES

Characterization of Bone Marrow Lymphoid Infiltrates After Immunochemotherapy for Follicular Lymphoma

Camille Laurent, MD,[1] Geisilene Russano de Paiva, MD,[1] Loic Ysebaert, MD,[2] Guy Laurent, MD,[2] Michel March, MS,[1] Georges Delsol, MD,[1] and Pierre Brousset, MD, PhD[1]

Key Words: Follicular lymphoma; Rituximab; T regulator and mast cell infiltrates; Nonmalignant immature B cells

DOI: 10.1309/LREBX069UXDYMBXV

Abstract

We studied the distribution of lymphoid cells in the bone marrow of 10 follicular lymphoma (FL) cases in complete response after immunochemotherapy but with nodular lymphoid infiltrates mimicking persistent lymphoma nodules. Immunohistochemical analysis showed that most of these cells displayed a T-cell phenotype with important proportions of regulatory T cells (CD3+/CD4+/FOXP3+) and mast cells. These populations were also present before treatment. Whereas no CD20+ cells were observed, immature B cells (CD79a+/terminal deoxynucleotidyl transferase+/CD20–) were detected. These cells were scarce before immunochemotherapy, suggesting that immunochemotherapy enabled their expansion. Fluorescence in situ hybridization and quantitative polymerase chain reaction failed to detect residual lymphoma cells in 5 cases with the t(14;18) translocation. Our study describes 2 important features in bone marrow in FL following immunochemotherapy. It is probable that the accumulation of regulatory T cells has some role in the control of FL. The expansion of nonmalignant B cells reflects the regeneration of B-cell lineage following immunochemotherapy.

Follicular lymphoma (FL) is the second most common type of B-cell non-Hodgkin lymphoma and includes 35% to 40% of all lymphomas in adults. FL is derived from germinal center follicle lymphoid cells as attested by the CD20+/CD10+/CD5– phenotype.[1] In the vast majority of cases, FL cells display high expression of bcl-2 as a consequence of the t(14;18)(q21;q32) translocation.[1-3] FL is characterized by an indolent initial course, a favorable response to first-line therapy, and recurrence followed by a refractory phase eventually complicated by histologic transformation. Patients with FL have recently greatly benefited from immunochemotherapy consisting of the combination of rituximab with chemotherapy.[4] Indeed, R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) and R-CVP (rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone) regimens result in response rates significantly higher than those for CHOP or CVP alone in front-line therapy and in relapse.[5-7]

One of the particular features of FL is the frequent bone marrow infiltration. In most cases, an exclusively paratrabecular pattern or a mixed paratrabecular and random focal pattern is seen.[8] The marrow in FL also contains scarce normal B and T cells, as well as follicular dendritic cells. Immunochemotherapy eliminates not only FL cells, but also normal mature B cells in humans[8-10] and in animal models.[11] In a previous study, it was shown that treatment with rituximab used as a single agent resulted in the constitution or persistence of lymphoid infiltrates, which mimicked residual lymphoma.[10] These infiltrates were devoid of CD20+ mature B cells and considered as normal mature residual T cells as analyzed by immunohistochemical studies and/or flow cytometry.[10] The nature and the presumed function of these residual lymphoid cells have not been further documented.

© American Society for Clinical Pathology

Based on recent studies that emphasize the role of T-cell functional subsets in FL, such as CD4+/FOXP3+ T regulatory cells (Tregs), we hypothesized that these infiltrates could be related to Treg accumulation.[12-14] This hypothesis was supported by a recent study that showed that, at least in autoimmune diseases, rituximab-induced B-cell depletion accompanied Treg accumulation as evidenced by increased expression of FOXP3.[15] Moreover, because rituximab selectively depletes the mature CD20+ B cells and the CD20+ compartment of B cell precursors, we also assume that these infiltrates could derive from the least mature lymphoid B cells. Therefore, in the present study, we investigated the percentage of CD4+/FOXP3+ cells in these infiltrates and the representation of immature B or T cells.

Materials and Methods

Patient Database

We reviewed the database of 10 patients with FL treated by front-line therapy with R-CHOP (n = 8) or R-CVP (n = 2) between January 2000 and March 2006. All patients had bone marrow infiltration and a complete response after 6 to 8 cycles of immunochemotherapy, according to the criteria of the International Working Group.[16] Patients were selected because of the persistence of lymphoid infiltrates in posttreatment bone marrow biopsy specimens. In France, there is no need for institutional review board approval in studies using tissue material that has been used for diagnostic purposes.

Histopathologic and Immunohistochemical Studies

Bone marrow samples were fixed in 10% buffered formalin or in Duboscq-Brazil (alcohol-based Bouin), embedded in paraffin, and processed for routine histopathologic examination. We stained 3-μm-thick sections with H&E. For immunohistochemical examination, 3-μm-thick sections were tested using a Ventana Benchmark XT immunostainer (Ventana, Tucson, AZ). The panel included antibodies directed against CD20 (clone L26, dilution 1:50; DAKO, Glostrup, Denmark), CD3 (A452 Poly, dilution 1:25; DAKO), CD4 (clone 1F6, dilution 1:25; Novocastra, Newcastle upon Tyne, England), CD8 (clone C8/144b, dilution 1:10; DAKO), bcl-2 (clone 124, DAKO), terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) (clone SEN28, dilution 1:50; Novocastra), CD117 (A4502 Poly, dilution 1:100; DAKO), FOXP3 (clone 236A/E7, mouse monoclonal antibody, Abcam, Cambridge, MA), and CD79a (clone JCB117, a generous gift from D.Y. Mason, MD, Oxford, England). To characterize FOXP3+ cells, double staining procedures were performed with anti-FOXP3 and anti-CD79a or anti-CD3. In addition, to compare the amount of Treg and mast cells, double staining was performed with anti-FOXP3 and anti-c-Kit antibodies.

Fluorescence In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction

For detection of t(14;18)(q32;q21) by fluorescence in situ hybridization (FISH) performed on paraffin sections, we used a *BCL2/IGH* dual-color, dual-fusion DNA probe (LSI IgH Spectrum Green/LSI BCL2 Spectrum Orange, Vysis, Downers Grove, IL) as previously described.[17] Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) amplification of the major breakpoint region/J_H joining fragment was performed in 5 cases at diagnosis and after treatment as previously described.[18] Nonneoplastic regenerative bone marrow samples (n = 3) were used as control samples.

Results

Patient Characteristics

The characteristics of the 10 patients with FL are listed in Table 1. Patients were treated for intermediate- or high-risk FL with R-CHOP (n = 8) or R-CVP (n = 2). Duration of treatment

Table 1
Patient Characteristics in 10 Cases of Follicular Lymphoma

Case No./Sex/Age (y)	FLIPI	Treatment	Posttreatment Status	Therapy Completion–Biopsy Interval (mo)
1/F/64	2	R-CHOP	CR	1
2/F/48	2	R-CHOP	CR	1
3/M/65	4	R-CHOP	CR	1
4/F/49	2	R-CVP	CR	1
5/M/49	2	R-CHOP	CR	1
6/M/51	2	R-CVP	CR	1
7/F/39	3	R-CHOP	CR	1
8/F/55	2	R-CHOP	CR	1
9/F/42	2	R-CHOP	CR	1
10/M/44	3	R-CHOP	CR	8

CR, complete response; FLIPI, follicular lymphoma international prognostic index; R-CHOP, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; R-CVP, rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone.

© American Society for Clinical Pathology

DOI: 10.1309/LREBX069UXDYMBXV

was 6 to 8 months. Each patient had bone marrow involvement before treatment but had a complete response after immunochemotherapy. The interval between completion of therapy and biopsy was less than 1 month for 9 of 10 patients. In only 1 case, the evaluation was carried out about 8 months after immunochemotherapy because the patient had cardiac failure, which delayed posttherapy evaluation.

Histologic Characteristics

All cases were grade 1 FL according to the World Health Organization classification. Before treatment, bone marrow infiltration displayed a mixed paratrabecular and interstitial nodular pattern. In all cases, immunohistochemical analysis showed a typical phenotypic profile of FL cells with coexpression of CD20, CD10, and bcl-2. The percentage of FL infiltrates ranged between 20% and 70% with a median around 41% (data not shown). After treatment, in all cases, bone marrow histologic examination revealed interstitial and paratrabecular lymphoid nodules in a mixture of small lymphocytes. The number of nodules was much lower than lymphoma nodules but still important, varying from 2 to 6 per section **Table 2**. These infiltrates were surrounded by a well-defined border margin, thus mimicking persistent lymphoma nodules because of abundance, architecture, and paratrabecular location **Image 1**.

Table 2
Bone Marrow Histologic Characteristics in 10 Cases of Follicular Lymphoma*

Case No.	No. of Paratrabecular and Interstitial Nodular Lymphoid Infiltrates in Posttreatment Bone Marrow (per Bone Marrow Section)
1	2 (with 1 paratrabecular)
2	2 (with 1 paratrabecular)
3	4 (with 2 paratrabecular)
4	3 (with 1 paratrabecular)
5	6 (with 4 paratrabecular)
6	6 (with 3 paratrabecular)
7	5 (with 3 paratrabecular)
8	2 (with 1 paratrabecular)
9	2 (with 1 paratrabecular)
10	1 (paratrabecular)

* The bone marrow biopsy specimen surface was around 0.25-0.30 cm^2.

Characterization of T Cells in Bone Marrow After Immunochemotherapy

Lymphoid nodules were entirely composed of T cells (CD2+/CD3+) with a slight predominance of CD4+ over CD8+ cells (CD4+/CD8+ ratio, 1.5) **Image 2**. Except in 1 case in which the bone marrow biopsy was performed 8 months after the end of treatment (case 10), no CD20+ mature B cells were detected **Image 3**. Immunostaining with the anti-FOXP3 antibody revealed that about 20% to 33% of CD3+ T cells were CD4+/FOXP3+, considered Tregs **Image 4**. Double staining with anti-CD4 and anti-FOXP3 antibodies confirmed that a significant proportion of these cells coexpressed CD4 and FOXP3 **Image 5**. As a comparison, we found that reactive hyperplastic bone marrow contained much lower amounts of FOXP3+ cells (0.5%-1% of the CD3+ T cells; data not shown). The detection of FOXP3+ cells in lymphoid nodules prompted us to investigate whether these cells were also present in the bone marrow in FL before treatment. A significant number of FOXP3+ cells were detected in pretreatment bone marrow biopsy specimens, representing about 20% to

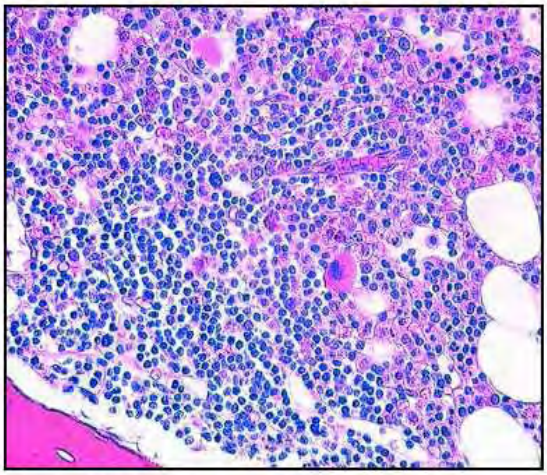


Image 1 Histologic features of bone marrow after treatment with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP). Nodular lymphoid infiltrates (H&E, ×200).

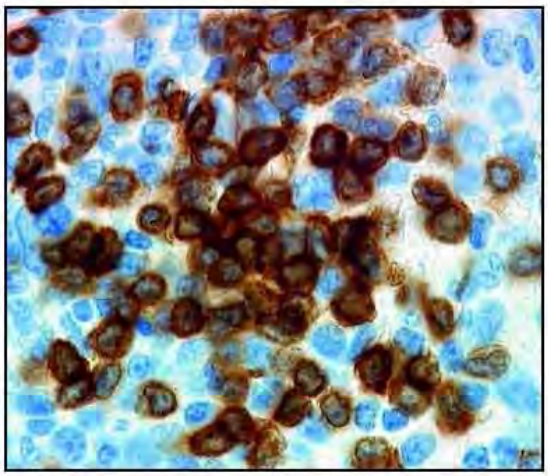


Image 2 Immunophenotype of lymphoid infiltrates. Nodular infiltrates are constituted predominantly of CD4+ T cells (anti-CD4, ×400).

DOI: 10.1309/LREBX069UXDYMBXV
© American Society for Clinical Pathology

33% of interstitial T cells. These cells were located at the periphery of the FL nodules as described in lymph nodes.[12,15]

Quantification of Mast Cells With Regard to Treg Infiltration

These experiments were performed in only 5 cases because the biopsy specimens were exhausted by several steps of immunostaining and DNA extraction. However, we observed that the amounts of mast cells were increased in bone marrow biopsy specimens before and after treatment and paralleled the increase of Tregs. Mast cells and Tregs colocalized at the periphery of lymphoma or lymphoid nodules Image 6.

Immunocharacterization of Immature Cells in Bone Marrow After Immunochemotherapy

Based on profound depletion of mature B cells, as evidenced by the lack of CD20+ elements (cells except in case 10), we also investigated whether immunochemotherapy could have resulted in a selection of immature B cells.

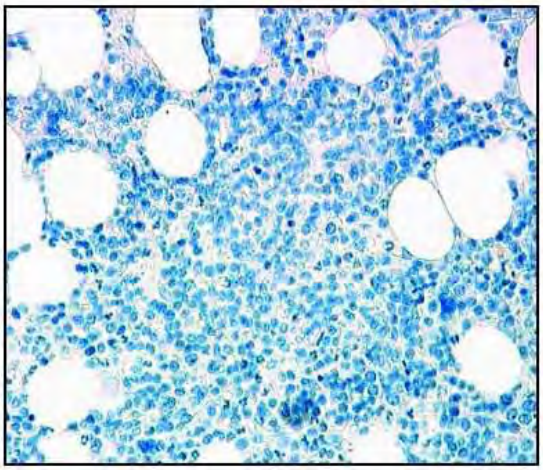


Image 3 Absence of CD20+ mature B-cell population (anti-CD20, peroxidase, ×200; staining controlled twice).

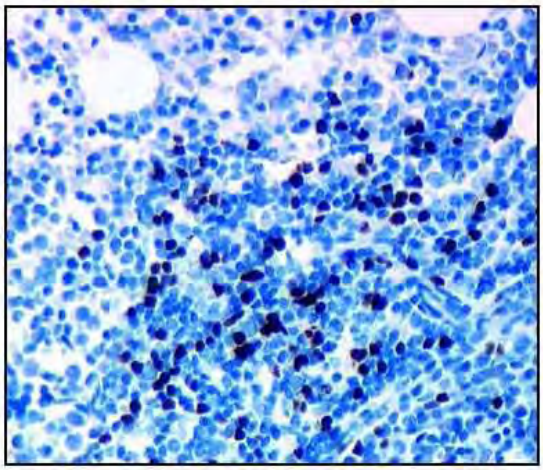


Image 4 Determination of T-cell subtype; presence of FOXP3+ cells within lymphoid nodules (anti-FOXP3, peroxidase, ×200).

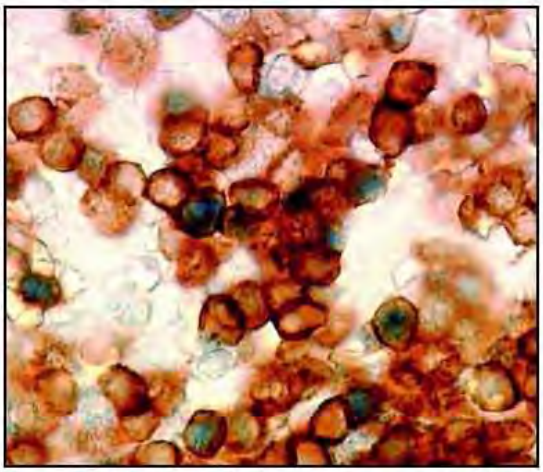


Image 5 T cells display a T-regulatory phenotype with CD4 and FOXP3 coexpression (double staining with anti-FOXP3, alkaline phosphatase–fast blue; anti-CD4, peroxidase-diaminobenzidine, ×1,000).

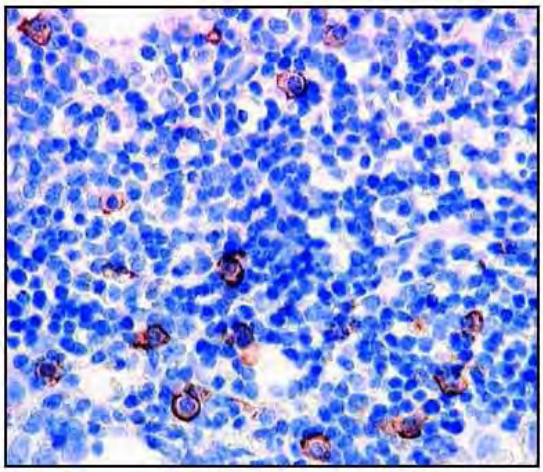


Image 6 Accumulation of c-Kit+ mast cells in lymphoid infiltrates (anti-CD117/Kit, peroxidase, ×400).

© American Society for Clinical Pathology

DOI: 10.1309/LREBX069UXDYMBXV

Compared with nonneoplastic bone marrow samples, we observed an increased number of CD79a+ B cells in all bone marrow biopsy samples from patients in complete remission. CD79a+ cells were scarce in lymphoid nodules and predominantly distributed outside the nodules in interstitial areas **Image 7A**. Some cells had a large, irregular nucleus and were TdT+ **Image 7B**. Double staining with anti-CD79a and anti-TdT antibodies confirmed that one third or one half of these cells were B blasts (TdT+/CD79a+/CD20–) **Image 7C**. The remaining B cells were TdT–/CD79a+/CD20–. Of note, we failed to detect any CD3+/TdT+ double-positive cells (not shown). It is worth mentioning that in 9 cases, the bone marrow biopsies were performed at the end of the treatment (about 1 month). In case 10, evaluation was carried out about 8 months after immunochemotherapy because the patient had cardiac failure, which delayed posttherapy evaluation. This delay probably explains the reconstitution of a population of mature CD20+ B cells, which represented around 1% of the bone marrow cells.

t(14;18) in the Immature B-Cell Population

Owing to the presence of immature B cells, we wondered whether some of these cells could carry the t(14;18) translocation present in the lymphoma cells. To address this question, we first designed a FISH technique with a double *BCL2/JH* probe. In the 3 cases tested in which FISH was positive before treatment, we failed to detect any positive residual cells after treatment. To further confirm the lack of residual disease, the same samples were tested by Q-PCR analysis, a technique considered more sensitive, even if it does not allow identifying the source of positive cells. Before treatment, all 3 cases were positive, whereas after treatment, minimal residual disease was at an undetectable level (10^{-4} by amplifying DNA dilutions), including case 10 in which CD20+ cells were detected. Altogether, these findings suggest that treatment-selected B-cell precursors are not derived from the malignant clone.

Discussion

Our study confirms that, in the context of patients with FL with a complete response following immunochemotherapy, bone marrow may contain dense lymphoid infiltrates mimicking lymphoma nodules, as previously described.[10] This situation is relatively uncommon since the use of rituximab and, in our experience, is observed in fewer than 5% of patients. Without careful examination, including immunohistochemical analysis, these histologic patterns may result in overestimation of residual lymphoma infiltration.[10]

As described in the latter study,[10] as well as in ours, these lymphoid nodules were constituted of mature T cells. However, we described herein, for the first time, that these T cells contained a significant fraction of CD4+/FOXP3+ Tregs. These unexpected results encouraged us to investigate whether these cells could also accumulate in bone marrow during the overt stage of the disease. We found that Tregs were indeed present before treatment and that their percentage was not significantly affected by treatment. The topology of Treg infiltration in pretreatment bone marrow biopsy specimens

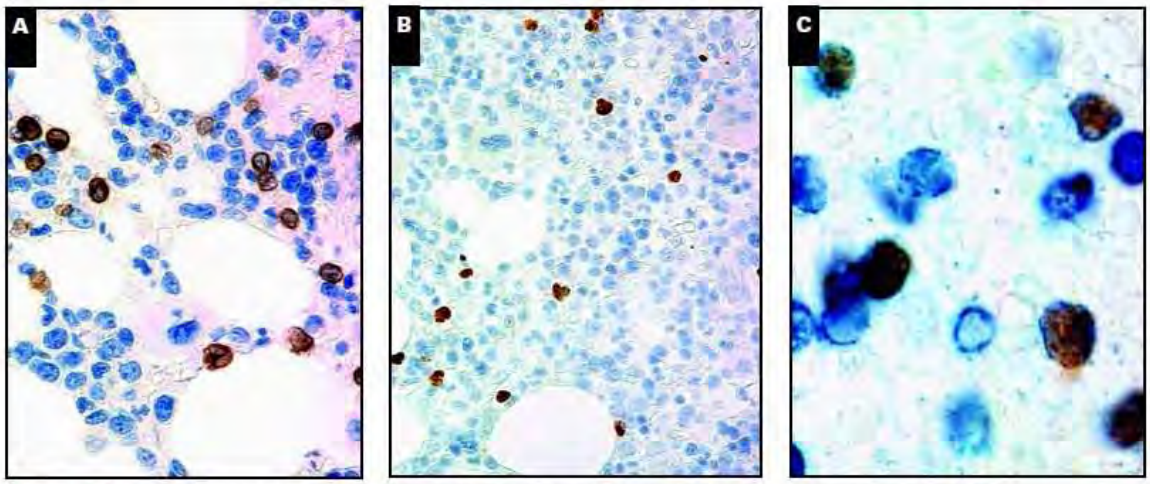


Image 7 **A**, Nonmalignant subpopulation composed of pre-B or immature B cells after treatment with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP). Presence of CD79a+/CD20– B cells with anti-CD79a (peroxidase ×400). **B**, Presence of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)+ cells with anti-TdT (peroxidase, ×400). **C**, Double staining with anti-CD79a alkaline phosphatase, fast blue, and anti-TdT peroxidase (diaminobenzidine, ×1,000).

DOI: 10.1309/LREBX069UXDYMBXV
© American Society for Clinical Pathology

was similar to that described in FL lymph nodes,[12] ie, with a predominant perifollicular distribution.

The mechanism by which Tregs are recruited in FL bone marrow is unclear. In a recent study, it was described that in patients with lupus nephritis, rituximab treatment resulted in increased transforming growth factor β concentration and Treg accumulation, suggesting that, besides B-cell depletion, rituximab could also influence T-cell subsets.[15] However, the fact that in FL Tregs are present to the same extent in pretreatment and posttreatment bone marrow biopsy specimens suggests that the treatment has no role in their accumulation. Another explanation to consider is that Tregs are critical components of the microenvironment of FL cells, besides other cellular subsets such as macrophages and dendritic follicular cells. If this is the case, the fact that Tregs persist for a long period after FL cell elimination (minimum of 8 months in case 10 in which the bone marrow biopsy was performed later) is intriguing.

The exact role of Tregs in the microenvironment of FL has not been elucidated. However, an increased mast cell population in Treg-rich lymphoid infiltrates suggests that Tregs recruit and activate mast cells in situ. The question remains as to whether this recruitment is to mediate regional immune tolerance[19] or to promote the proinflammatory role of mast cells. Recent studies demonstrating that high numbers of tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs are associated with improved overall survival in FL[12-14] suggest that sustained Treg accumulation reflects the persistence of potent immunoreactivity against FL cells and subsequent subtle regulatory mechanisms between effector T cells and Tregs.

In our study, we also describe for the first time that rituximab-combination chemotherapy results not only in profound and durable mature B-cell (CD20+) depletion but also in the accumulation of immature B cells that display a CD79a+/CD20–/TdT+ phenotype. Similar data were reported after autologous or allogeneic bone marrow transplantation.[20] However, in their study, Douglas et al[10] failed to detect any CD79a+ cells after immunochemotherapy (except in 1 patient with CD20+ cells). This discrepancy is difficult to explain and may be related to distinct technical conditions for immunohistochemical analysis.

We observed that immature B cells were diffusely distributed in the marrow without particular accumulation in lymphoid nodules. It is noteworthy that the amount of these immature cells was much lower in pretreatment biopsy specimens and in nonneoplastic bone marrow samples, suggesting a direct link between B-cell precursor selection and treatment-induced mature B-cell depletion. An important question is to consider whether these cells belong to the malignant clone. Indeed, it is generally accepted that the t(14;18) translocation occurs along the VDJ rearrangement in bone marrow B lymphoid precursors.[2,3] However, by using FISH analysis and Q-PCR techniques, we could not detect the *bcl*-2 rearrangement (present in lymphoma cells before treatment), suggesting that B-cell precursors expanded from normal B-cell lineage.

Besides the CD79a+/CD20–/TdT+, we also identified another B-cell population, CD79a+/CD20–/TdT–. We have no explanation for the status of the CD79a+/CD20–/TdT– B-cell population. Besides authentic plasma cells, which are easily recognizable and generally CD20–/CD79+/TdT–, there were indeed authentic lymphocytes without plasma cell differentiation. The lack of TdT expression implies that the cells could be mature, which is difficult to reconcile with the lack of CD20. We have strong molecular arguments that these cells are not malignant. Therefore, 2 interpretations can be put forward. First, these cells may belong to a particular subset of B cells that have accomplished their immunoglobulin chain gene rearrangements and do not yet express the CD20 molecule.[21] A second, less plausible explanation is that rituximab has masked the CD20 in vivo such that the reagent antibody is unable to bind during the immunostaining procedure. In this hypothesis, these B-cell subsets could simply correspond to mature B cells. Further studies based on combined cell-sorting and molecular techniques will probably address this question. As expected, a similar mechanism of cell restoration was not observed for T cells because by using double-staining techniques, we were unable to detect any double-positive CD3+/TdT+ T-cell precursors.

Finally, our study describes that, before treatment, FL bone marrow infiltrates are enriched with a large fraction of CD4+/FOXP3+ cells and mast cells suggesting that, as in lymph nodes involved by FL, Tregs are important components of the tumor microenvironment and that immunochemotherapy spares these cell subsets. Moreover, posttreatment bone marrow samples contain a nonmalignant subpopulation composed of pre-B or immature B cells, which could reflect the regeneration of the B-cell lineage following rituximab-mediated B-cell depletion. From a practical point of view, it should be stressed that the lack of careful immunophenotypic examination of these expanded lymphoid populations may result in overestimation of malignant lymphoid infiltration.

From [1]INSERM, U.563, Physiopathology Center of Toulouse-Purpan, Paul-Sabatier University, and Department of Pathology, CHU Purpan, Toulouse, France; and [2]Department of Hematology, CHU Purpan, Toulouse.

Address reprint requests to Dr Brousset: Laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU Purpan, place Baylac, Toulouse, F-31300 France.

References

1. Nathwani BN, Harris NL, Weisenburger D, et al. Follicular lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al, eds. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon, France: IARC Press; 2001:162-167.

© American Society for Clinical Pathology

DOI: 10.1309/LREBX069UXDYMBXV

2. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, et al. Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular lymphoma. *Science*. 1985;228:1440-1443.
3. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 1984;226:1097-1099.
4. Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*. 2005;105:1417-1423.
5. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2005;106:3725-3732.
6. van Oers MH, Klasa R, Marcus RE, et al. Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood*. 2006;108:3295-3301.
7. Coiffier B. Monoclonal antibody as therapy for malignant lymphomas. *C R Biol*. 2006;329:241-254.
8. Arber DA, George TI. Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma: frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:1549-1557.
9. Torlakovic E, Torlakovic G, Brunning RD. Follicular pattern of bone marrow involvement by follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2002;118:780-786.
10. Douglas VK, Gordon LI, Goolsby CL, et al. Lymphoid aggregates in bone marrow mimic residual lymphoma after rituximab therapy for non-Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1999;112:844-853.
11. Schroder C, Azimzadeh AM, Wu G, et al. Anti-CD20 treatment depletes B-cells in blood and lymphatic tissue of cynomolgus monkeys. *Transpl Immunol*. 2003;12:19-28.
12. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2006;108:2957-2964.
13. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, et al. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol*. 2006;24:5350-5357.
14. Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, et al. Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3–positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol*. 2006;24:5052-5059.
15. Sfikakis PP, Souliotis VL, Fragiadaki KG, et al. Increased expression of the FoxP3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis. *Clin Immunol*. 2007;123:66-73.
16. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al, for the NCI Sponsored International Working Group. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol*. 1999;17:1244-1253.
17. Matsumoto Y, Nomura K, Matsumoto S, et al. Detection of t(14;18) in follicular lymphoma by dual-color fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;150:22-26.
18. Rambaldi A, Lazzari M, Manzoni C, et al. Monitoring of minimal residual disease after CHOP and rituximab in previously untreated patients with follicular lymphoma. *Blood*. 2002;99:856-862.
19. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*. 2006;442:997-1002.
20. Wolf E, Harms H, Winkler J, et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase–positive cells in trephine biopsies following bone marrow or peripheral stem cell transplantation reflect vigorous B-cell generation. *Histopathology*. 2005;46:442-450.
21. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, et al. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood*. 2001;98:2498-2507.

DOI: 10.1309/LREBX069UXDYMBXV
© American Society for Clinical Pathology