

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 2012

N° 070

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par : Stéphane DEJOIE

Présentée et soutenue publiquement le 16 Novembre 2012

« Actualité de la radioimmunothérapie ciblant le CD20 dans le
traitement du lymphome non hodgkinien : intérêt d'un
modèle pré-clinique canin »

**Président du jury : M. Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur de Biophysique et
Praticien Hospitalier**

**Membres du jury : Dr. Stéphane BIRKLÉ, Maître de conférence en Immunologie
Dr. François DAVODEAU, Chargé de recherche Inserm
Dr. Jérôme ABADIE, Maître de Conférence**

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	8
II. LE CD20	9
A. STRUCTURE	9
1. <i>La structure protéique</i>	10
2. <i>Le gène du CD20</i>	10
3. <i>Le CD20 se retrouve sous trois isoformes</i>	11
B. FONCTION BIOLOGIQUE	12
C. DISTRIBUTION TISSULAIRE DANS LES TISSUS NORMAUX ET CANCEREUX	13
D. ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES ANTI-CD20	14
1. <i>Classification initiale selon la capacité à reconnaître AxP</i>	15
2. <i>Classification fonctionnelle des anticorps</i>	16
3. <i>Activité des deux types d'anticorps in vivo</i>	18
4. <i>Les anticorps thérapeutiques de seconde génération</i>	20
5. <i>Les anticorps thérapeutiques de troisième génération</i>	23
III. LE LYMPHOME NON HODGKINIEN	25
A. DEFINITION	25
B. ÉPIDEMIOLOGIE	25
C. PATHOGENIE	25
D. DIAGNOSTIC	26
1. <i>Circonstances de diagnostic</i>	26
2. <i>Principes de la biopsie ganglionnaire selon l'HAS</i>	27
3. <i>Examens Biologiques</i>	28

4. Les différentes formes de LNH	28
5. Le pronostic	30
E. TRAITEMENT	31
1. Prise en charge générale	31
2. Prise en charge des LNH agressifs	33
3. Prise en charge des LNH indolents	33
4. Autres protocoles	35
5. Le suivi du traitement	36
6. Les soins de support	38
F. LIMITES DES TRAITEMENTS ACTUELS	39
1. Les résistances au traitement par le Rituximab	39
2. Résistance par saturation du mécanisme de CDC	40
3. Résistance par saturation du mécanisme d'ADCC	41
4. Résistance par le phénomène de Shaving	42
5. Résistance par perte de l'expression du CD20	42
IV. APPORT DE LA RADIOIMMUNOTHÉRAPIE DANS LA PRISE EN CHARGE DES LNH	45
A. DEFINITION	45
B. PRINCIPE	45
1. L'activité du radiomarquage	46
2. L'activité de l'anticorps propre	46
3. La cinétique	48
4. Augmentation de l'activité vis à vis de l'anticorps nu	49
C. LA RIT EN UNE ETAPE	50
D. LA RIT EN PLUSIEURS ETAPES SELON LA TECHNIQUE DU PRECIBLAGE	52
1. La méthode en trois étapes	53

2. Le système d'amélioration de l'affinité	53
3. Le système « dock an lock ».....	54
E. ASSOCIATION DE LA RIT A D' AUTRES THERAPEUTIQUES POUR AMELIORER SON EFFICACITE.....	56
1. Association de la RIT à la chimiothérapie.....	56
2. Utilisation de la RIT à dose myeloablative	57
3. Stratégie d'augmentation de la distribution de l'anticorps	57
4. Stratégie de ciblage de différents antigènes dans un même protocole	58
5. Utilisation d'autres émetteurs de particules	59
6. Amélioration de la RIT par humanisation de l' anticorps	60
V. APPORT DU MODÈLE DE LNH CANIN DANS L'ÉVALUATION PRÉ-	
CLINIQUE DE LA RIT :	62
A. LES CANCERS DU CHIEN	62
B. LES LYMPHOMES CANINS	62
1. Etiologies	63
2. Clinique	63
3. Diagnostic.....	63
4. Classification.....	64
C. TRAITEMENTS DES LYMPHOMES CANINS	67
D. INTERET DU MODELE PRECLINIQUE CANIN.....	69
1. Les modèles classiques : les modèles murins	69
2. Alternative d'un grand intérêt : Le modèle canin.....	70
VI. CONCLUSION	73

Liste des Abréviations

ADCC : *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* : Cytotoxicité Dépendante de l'Anticorps

AKAPs : *The A-kinase anchor proteins* : zone d'Ancrage de la Protéine Kinase A

Asp : Acide Aspartique

Asn : Asparagine

BCR : *B Cell receptor* : Récepteur Cellulaire de type B

CD : *Cluster of differentiation* : Groupe de différenciation

CDC : *Complement-dependent Cell Death* : Cytotoxicité Dépendante du Complément

CDR : *Complementarity determining region* : Région Déterminant la Complémentarité

CHUV : Centre Hospitalo-Universitaire Vétérinaire

CHO : Cellules de Hamster Chinois

CHOP : Protocole (cyclophosphamide, vincristine, prednisone, adriamycine)

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CRP : *C-Reactive Protein* : Protéine C Réactive

CR1 : *Complement Receptor 1* : Récepteur du Complément de type 1

CSP : Cellules Souches Périphériques

CVP : Protocole de Chimiothérapie : Cyclophosphamide, Vincristine, Prednisone

DAF : *Decay-Accelerating Factor* : Facteur d'accélération de la dégradation

DR : *Durée de la première Rémission*

DS : *Durée de Survie Globale*

EBV : Virus Epstein-Barr

EM : Extra Membranaire

FRET : *Förster Resonance Energy Transfer* : Transfert D'énergie des molécules Fluorescentes

HAMA : *Human Anti Mouse Antibody* : Anticorps Humains anti Anticorps de Souris

HAS : Haute Autorité de Santé

HDAC : Histones Désacétylase

HHV8 : Herpèsvirus Humain de type 8

HTLV-1 : Virus T-Lymphotrope Humain

I : Iode

IC : Intra cellulaire

Ig : Immunoglobuline

IPI : *International Prognostic Index* : Indice de Pronostic International

LDH : Lactate Deshydrogénase

LET : *Linear Energy Transfer* : Transfert d'Energie Linéaire

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

MAC : *Membrane Attack Complex* : Complexe d'Attaque Membranaire du Complément

MCP : *Membrane Cofactor Protein* : Cofacteur Membrane Protéique

MS4A : *Membrane Spanning 4A* : famille de proteines avec 4 domaines transmembranaires

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS : Survie Globale

PAL : Phosphatase Alcaline

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell* : Cellules Mononuclées du Sang Périphérique

PCD : *Programmed Cell Death* : Mort Cellulaire Programmée

PRIT : RIT Préciblée

PKA : Protéine Kinase A

RIT : Radioimmunothérapie

RT-PCR : *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction* : Transcription Reverse – Réaction d'Amplification Génique

SDS : Sodium duodecyl sulphate

SOC : *Store-Operated Cation* : Canal Cationique

SPECT: *Single Photon Emission Computed Tomography* : Tomographie par Émission de Photons

TEP scan : Tomographie par Emission de Positons

TEP-FDG : TEP après injection de 18 Fluoro D-Glucose

TM : Trans Membrananaire

TSH : Thyroestimuline

VH : Région Variable de la Chaîne lourde des Immunoglobulines

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Y : Yttrium

I. Introduction

Le lymphome non-Hodgkinien est un cancer des plus répandus, il s'observe à tout âge

et peut se retrouver sous différentes formes comme le lymphome diffus à grandes cellules B ou le lymphome folliculaire. Il se situe au sixième rang des cancers les plus fréquents en France (près de 10 400 nouveaux cas en 2008) et au neuvième rang en terme de mortalité (environ 4000 décès annuels). Très répandu, il a donc été rapidement la source de nombreuses recherches pour trouver des solutions thérapeutiques à cette maladie. Les traitements actuels reposent sur de la chimiothérapie couplée à de l'immunothérapie voire à de la radioimmunothérapie (RIT).

Dans une première partie, nous nous attacherons à présenter le CD20. Nous verrons sa structure à quatre domaines transmembranaires et sa fonction de canal calcique, mais aussi son expression importante et homogène dans toutes les tumeurs malignes des cellules B et ainsi tout son intérêt comme cible pour les anticorps monoclonaux existant aujourd'hui. Puis nous nous intéresserons au lymphome non hodgkinien, à son diagnostic reposant sur une biopsie ganglionnaire, à son traitement par immunochemiothérapie, ainsi que les limites et résistances de ce dernier. Nous étudierons ensuite plus précisément la radioimmunothérapie et les bénéfices de cette thérapeutique d'avenir qui permet d'irradier des petites tumeurs disséminées dans l'organisme après injection d'un anticorps porteur d'une forte radioactivité et qui se fixe sélectivement sur les cellules tumorales. Pour terminer, nous aborderons les lymphomes canins et les avantages d'utilisation qu'ils présentent par leurs similitudes avec les lymphomes humains pour la compréhension et la recherche dans les cancers humains.

Ce travail s'inscrit dans la recherche actuelle sur la place de la RIT bêta dans les traitements des lymphomes de type B. Peut-elle être utilisée en traitement d'induction ou peut-on l'utiliser en traitement séquentiel ? À haute dose ou en consolidation ? Comment fractionner les doses et quelle quantité d'anticorps froids doit-on utiliser avant le traitement ? Voici quelques-unes des questions que les chercheurs se posent pour la thérapeutique humaine et qui sont actuellement en cours d'évaluation clinique. La participation des équipes de clinique vétérinaire à cette évaluation trouve sa place dans une approche intégrée de recherche contre le cancer. Cette expérimentation sur modèle canin devrait pouvoir accélérer la recherche en RIT pour la thérapeutique humaine mais aussi canine.

II. Le CD20

A. Structure

Le CD20 a été identifié et décrit pour la première fois comme un marqueur des lymphocytes B en 1980 par Stashenko et al (1). Nous savons actuellement qu'il est exprimé dans les cellules pré-B, que cette expression est maintenue durant le développement de ces lymphocytes B mais qu'il disparaît de ceux circulant dans le plasma (Figure 1) (2). Il faut noter qu'il est surtout, et c'est d'un grand intérêt pour la recherche de thérapeutiques, sur-exprimé à la surface de la majorité des lymphomes de type B (1);(2);(3).

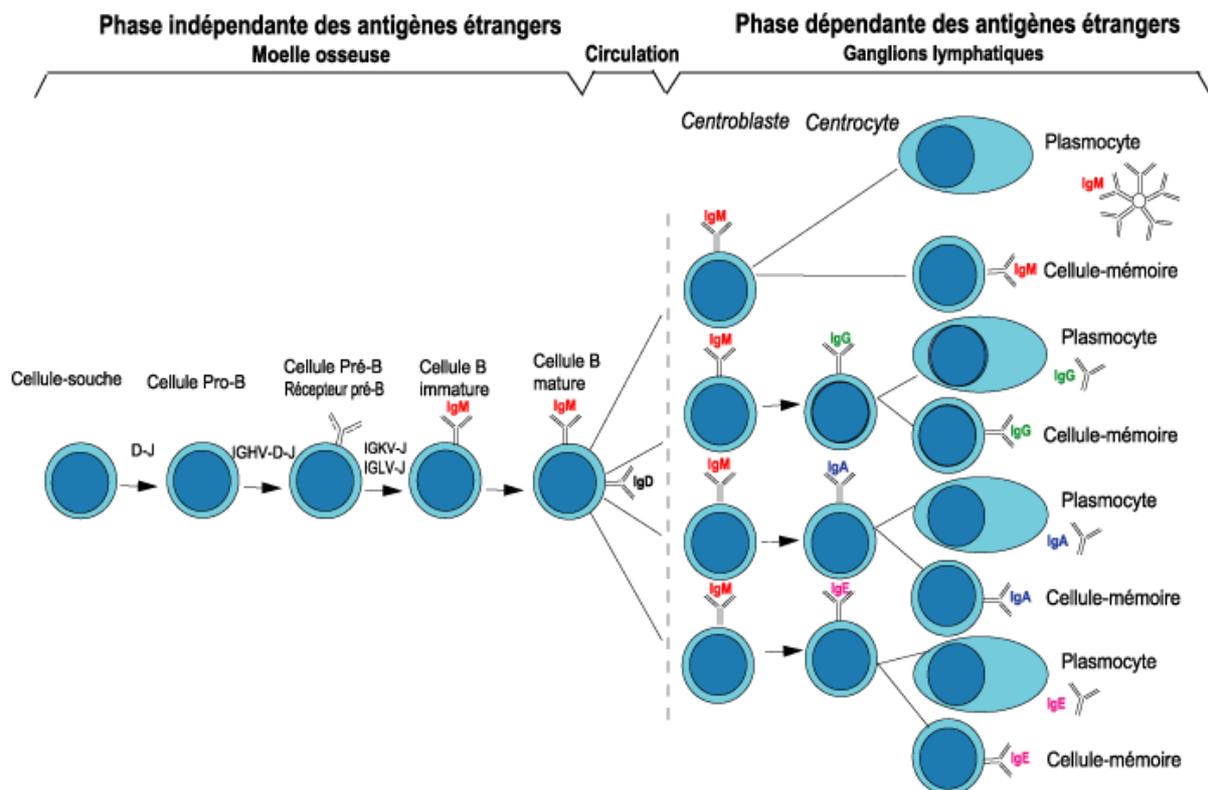


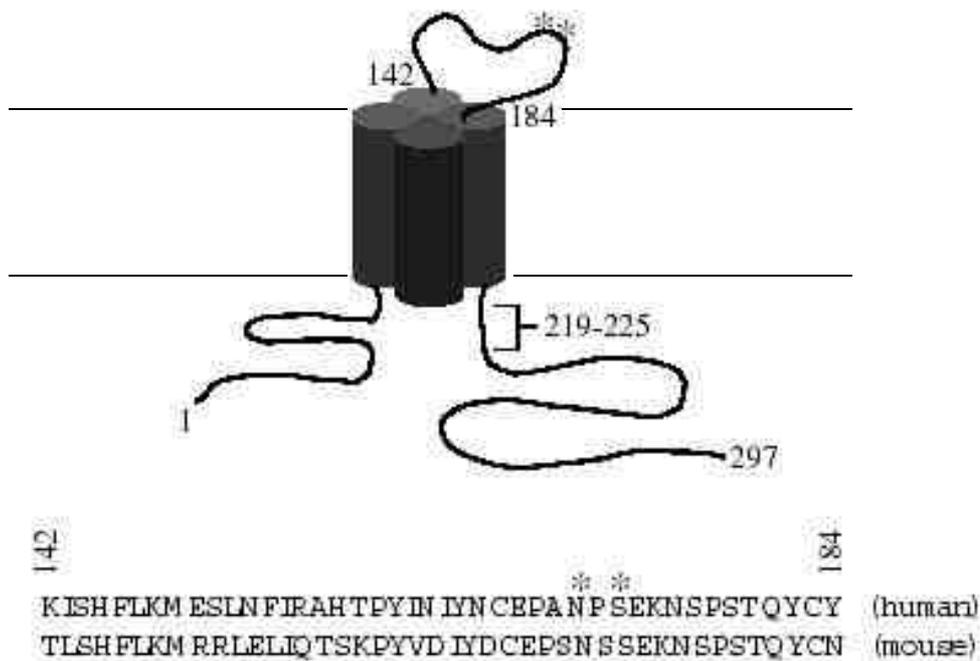
Figure 1 : La différenciation du lymphocyte B

D'après Elodie Foulquier et Marie-Paule Lefranc. <http://www.imgt.org>

1. La structure protéique

Le CD20 est une phosphoprotéine qui comporte quatre domaines transmembranaires

(Figure 2). Après analyse hydrophatique de sa séquence, on a pu distinguer trois régions hydrophobes formant une molécule avec quatre domaines transmembranaires, une boucle unique extracellulaire et les C- et N- terminales intracellulaires (4). La structure secondaire de la molécule est majoritairement constituée d'hélice α , elle est par ailleurs très stable donc peu sensible à la dénaturation par la chaleur ou par le détergent SDS (5).



CD20 (9), des modifications de l'expression de la protéine à la surface des cellules (10), ou une hyper expression des voies du NF- κ B et ERK 1/2 qui conduit à une surexpression de facteurs de résistance Bcl-2, Bcl-x1, Mcl-1 (11), (12), (13).

3. Le CD20 se retrouve sous trois isoformes

Les lymphocytes B expriment trois isoformes de cette molécule avec une forme prédominante de poids moléculaire égal à 33 KDa et deux formes moins répandues de poids moléculaire égal à 34,5 KDa et 36 Kda qui pourraient résulter de la phosphorylation différentielle de l'espèce la moins « lourde » (4). Au niveau intracellulaire, le CD20 possède un certain nombre de sites sérine et thréonine propices à la phosphorylation. Cette phosphorylation est importante dans différents cas de figure. On la retrouve en effet durant le cycle cellulaire et lors de la prolifération cellulaire en réponse au stimulus envoyé par le récepteur à l'antigène des cellules B (BCR). Cette phosphorylation est aussi retrouvée lors de la stimulation due à l'ester de phorbol, enfin elle est fortement augmentée lors de la fixation d'un anticorps anti-CD20(14). À la surface de la cellule, le CD20 présente une boucle contenant approximativement une quarantaine d'acides aminés entre la troisième et la quatrième hélice transmembranaire et une probable plus petite boucle localisée entre les domaines transmembranaires un et deux. La grande boucle semble contenir les épitopes reconnus par une grande partie des anticorps anti-CD20 produits jusqu'à aujourd'hui et plus particulièrement au niveau de l'alanine 170 et de la proline 172 qui sont cruciales pour la fixation de l'anticorps (15). De récentes études cristallographiques ont aussi montré, grâce à des protéines recombinantes, la présence d'un pont disulfure. Ce pont se situe entre les résidus cystéine 167 et 183 (5), (16). Il est retrouvé chez de nombreux membres de la famille MS4A, ceci nous montre son importance pour le maintien de la structure extracellulaire du CD20 (8). D'autres études ont démontré l'importance de ce pont disulfure pour la fixation du Rituximab, ce qui serait en accord avec son rôle dans le maintien de la structure de la boucle et donc de la conformation des épitopes (5). Concernant la petite boucle, des études non consensuelles supposent une reconnaissance de certaines séquences peptidiques de cette dernière par des anticorps humains anti-CD20 (15). À la surface des cellules, le CD20 a été décrit comme étant sous forme d'un homo-multimère, probablement un tetramère, complexe (Figure 3) (17), (18). La microscopie électronique et confocale a aussi montré que presque 90% de ce complexe moléculaire était constitutivement associé à des radeaux lipidiques membranaires et des microvillis (plis minuscules ressemblant à des cheveux dans la membrane plasmique de la

cellule) (19).

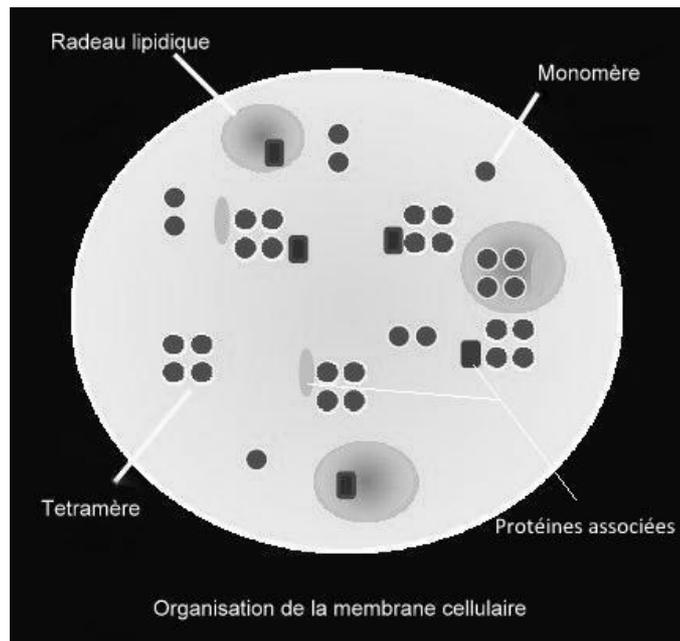


Figure 3 : Le CD20 dans la membrane cellulaire. Protéines associées avec le CD20 : CMH I, CMH II, CD53, CD81, CD82, CD40, BCR,... Modifié d'après Guillaume Cartron.

Enfin, des techniques d'immunoprécipitation et de transfert d'énergie des molécules fluorescentes (FRET) ont montré une association du CD20 avec de nombreuses autres molécules, elles-mêmes enrichies en radeaux lipidiques ou dépendantes de ces radeaux pour la transmission de leurs signaux tels que le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe un et deux, le CD53, le CD81, le CD82 (20), le CD40 (21) et le BCR (22).

B. Fonction biologique

La fonction du CD20 a longtemps été débattue, nous savons désormais que son rôle principal semble être d'amplifier le signal calcique transmis par le BCR pendant la phase de reconnaissance de l'antigène par les cellules de type B, qu'elles soient matures ou non (22). En effet, Bubien JK et al avaient tout d'abord rapporté qu'après transfection de cellules par le CD20, la conductance transmembranaire en calcium était très augmentée. Le CD20 agit vraisemblablement comme un canal calcique (23). Des expériences ultérieures d'immunoprécipitation du CD20 ont également suggéré que ce dernier pourrait être présent

sous forme d'oligomères multimériques pour constituer ces canaux dans la membrane des lymphocytes B (23). Enfin, il a été montré très récemment que par le biais de son association dans les radeaux lipidiques avec le BCR, les molécules de CD20 participeraient à la constitution des canaux de type SOC (store-operated cation) directement liés au flux de calcium engendré par l'activation du BCR (24). Les canaux SOC sont des canaux calciques dépendant de la libération des réserves de calcium intracellulaires (Figure 4). Notons enfin qu'à ce jour, aucun ligand spécifique du CD20 n'a pu être identifié.

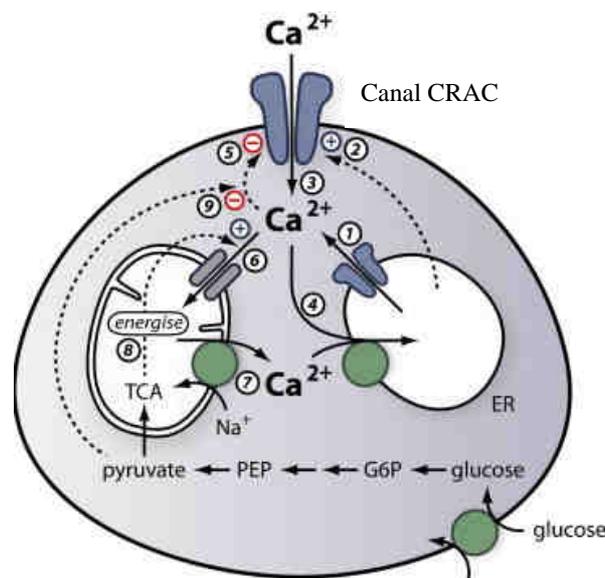


Figure 4 : le CD20 a une fonction de canal calcique.

Le canal CRAC est l'Archétype des canaux de type SOC d'après Parekh AB et al (25)

C. Distribution tissulaire dans les tissus normaux et cancéreux

Les intérêts majeurs d'utiliser le CD20 pour cibler les lymphomes non hodgkiniens sont premièrement son expression sélective. Son niveau d'expression est particulièrement important et homogène dans toutes les tumeurs malignes des cellules B excepté dans les leucémies lymphoïdes chroniques où son taux d'expression est plus variable (26). Grâce à des études d'immunofluorescence indirecte, de cytotoxicité et d'absorption quantitative, le CD20/B1 a été retrouvé sur environ 9% de la fraction de cellules mononucléaires du sang périphérique et sur plus de 95% des cellules B du sang et les organes lymphoïdes chez tous les individus testés. Les monocytes, les lymphocytes T au repos et activés, les cellules nulles et

les tumeurs de cellules T et d'origine myéloïde étaient CD20/B1 négatives (1). Le CD20 présente un fort taux d'expression à la surface des cellules. En effet, grâce à des tests de dilution ou de cytométrie de flux, Press et al ont pu évaluer environ 300 000 sites par cellules Daudi (lignée de cellules B malignes issues d'un lymphome de Burkitt) (27). Huh et al, quant à eux, ont évalué par cytométrie de flux un nombre moyen de sites CD20 dans les cellules normales de la moelle épinière à 19 000 sites et dans le sang périphérique à 10 000 sites. Par la même méthode, ils ont étudié les pathologies cancéreuses des cellules B et ont retrouvé des données très différentes suivant les pathologies. Par exemple, dans les LLC-B, on retrouve un taux moyen d'expression plus faible de l'ordre de 4000 sites ; dans les lymphomes folliculaires ou du manteau, des taux d'expression moyens plus importants, plutôt de l'ordre de 22 000 et 29 000 sites respectivement (28). En contrepartie, son expression est très faible et très hétérogène dans les lymphocytes T. Ceci permet d'obtenir une efficacité thérapeutique ciblée sur les cellules B. Notons néanmoins qu'il a été décrit de rares cas d'expression du CD20 dans des lymphomes à cellules T périphériques et dans les cellules épithéliales tumorales de thymomas (29), (30). Deuxièmement, son ciblage est possible aussi bien dans des tissus frais que dans des tissus conservés, ce qui peut être intéressant pour son étude au niveau microscopique et pour observer son ciblage. Cela est possible grâce à sa grande stabilité dans la membrane cellulaire. Troisièmement, son expression est relativement forte à la surface des cellules et les épitopes extracellulaires reconnus par les anticorps sont situés relativement proche de la surface cellulaire. Ceci facilite d'une part la concentration d'anticorps à cet endroit et permet d'autre part une activation efficace des mécanismes effecteurs Fc-dépendants (22). Enfin, l'expression de CD20 et sa fonction sont présentes chez l'homme et chez certains animaux. Ainsi, on retrouve une expression limitée aux cellules B et une fonction de canal calcique chez la souris comme chez l'homme (31), (32). De même, on retrouve une expression du CD20 chez le chien, là aussi l'ARNm est retrouvée dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), les ganglions lymphatiques de chiens sains et dans des cellules B de lymphomes canins, mais pas dans les cellules de lymphome à cellules T et les cellules de lymphome non-T et non à cellules B par analyse RT-PCR(33). Cela est très intéressant pour la conception de modèles animaux dans l'étude du CD20 comme cible thérapeutique.

D. Anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-CD20

1. Classification initiale selon la capacité à reconnaître AxP

L'intérêt pour la cible CD20 allant grandissant, un grand nombre d'anticorps ont été développés, dès lors, une classification s'est aussi imposée. Elle est fondée sur la fixation de l'anticorps à la protéine et sur les capacités de l'anticorps. Dans un premier temps, la classification comportait quatre groupes qui différaient par la capacité des anticorps à se lier à une molécule CD20 chimérique comprenant la large boucle extracellulaire murine et le motif critique de liaison AxP humain (Figure 5) (17). Le groupe I ne contient qu'un seul anticorps qui est incapable de reconnaître la molécule CD20 chimérique. Les groupes II et III comprennent les anticorps qui reconnaissent la molécule avec respectivement une intensité faible et modérée. Le groupe IV contient la majorité des anticorps et le Rituximab qui eux se lient fortement à la molécule (Tableau 1). Un groupe V a aussi été identifié qui lui ne nécessite pas de reconnaissance du motif AxP pour se fixer sur la molécule ; il se fixerait par contre sur la petite boucle décrite précédemment(15).

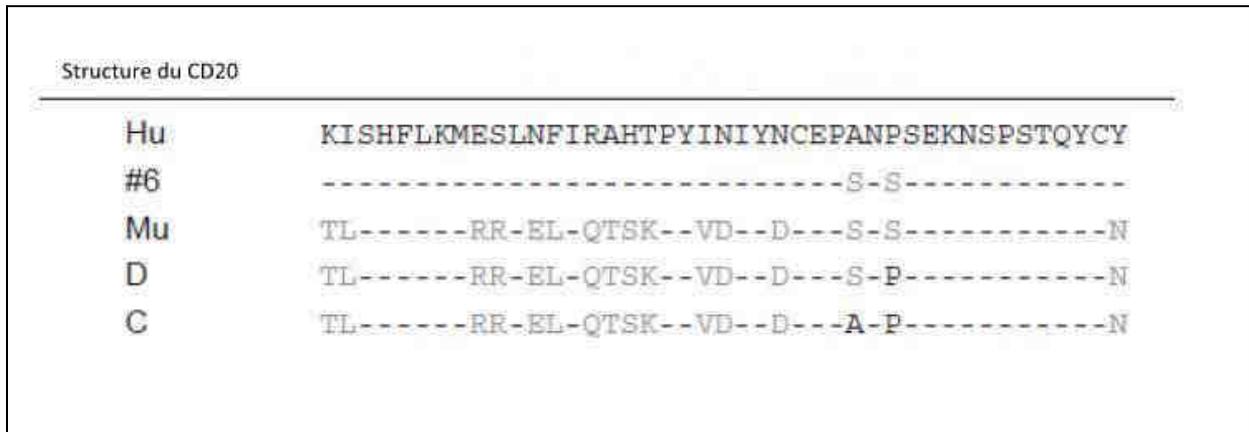


Figure 5 : Séquence en amino-acides de la boucle extracellulaire de la molécule CD20 humaine, murine ainsi que de différentes constructions avec des mutations. (Code en Annexe IV) D'après Polyak et al (17)

Groupe	Réactivité AxP	Anticorps	Agrégation homotypique	Translocation du CD20
--------	----------------	-----------	------------------------	-----------------------

I	aucune	CAT 13.6E12	-	++++
II	faible	2H7,1CO-165, AT80	- ++++	++++, ++ ++++
III	modérée	1F5, BH20, MEM-97	-	+++
IV	haute	B1, Bly1, RTX, NK1, PDR78, F4B1366, LT20, L27, CAT13.7H8	++++ ++ -	- ++++ +++ ++++

Tableau 1 : Les différents groupes d'anticorps anti-CD20. D'après Polyak et al (17)

2. Classification fonctionnelle des anticorps

De manière fonctionnelle, ces anticorps ne peuvent être classés qu'en deux groupes type I et type II. Ceux du type I comme le Rituximab entraînent une relocalisation du CD20 dans les radeaux lipidiques alors que les anticorps de type II, comme le tositumomab, ne le font pas (34). Cette relocalisation conditionne la fixation et les fonctions effectrices qui engendrent le succès thérapeutique des anticorps monoclonaux anti-CD20.

Les anticorps anti-CD20 générés jusqu'à aujourd'hui sont majoritairement de type I et ils sont caractérisés par leur habilité à activer le complément et à engendrer ainsi une cytotoxicité dépendante du complément (CDC) par le biais d'un recrutement accru du C1q (35). Cette propriété est directement corrélée à cette capacité qu'ont les anticorps de type I à relocaliser le CD20 dans les radeaux lipidiques, elle permet de regrouper les régions Fc des anticorps permettant ainsi d'augmenter la liaison du C1q (36). Les anticorps de type II, eux, ne modifient pas la localisation du CD20 et ils sont donc, sans ce regroupement des Fc, plutôt inefficaces pour induire la CDC (Figure 6). Cependant, ils induisent une adhésion homotypique et une lyse cellulaire directe beaucoup plus importante (37), (38), (39).

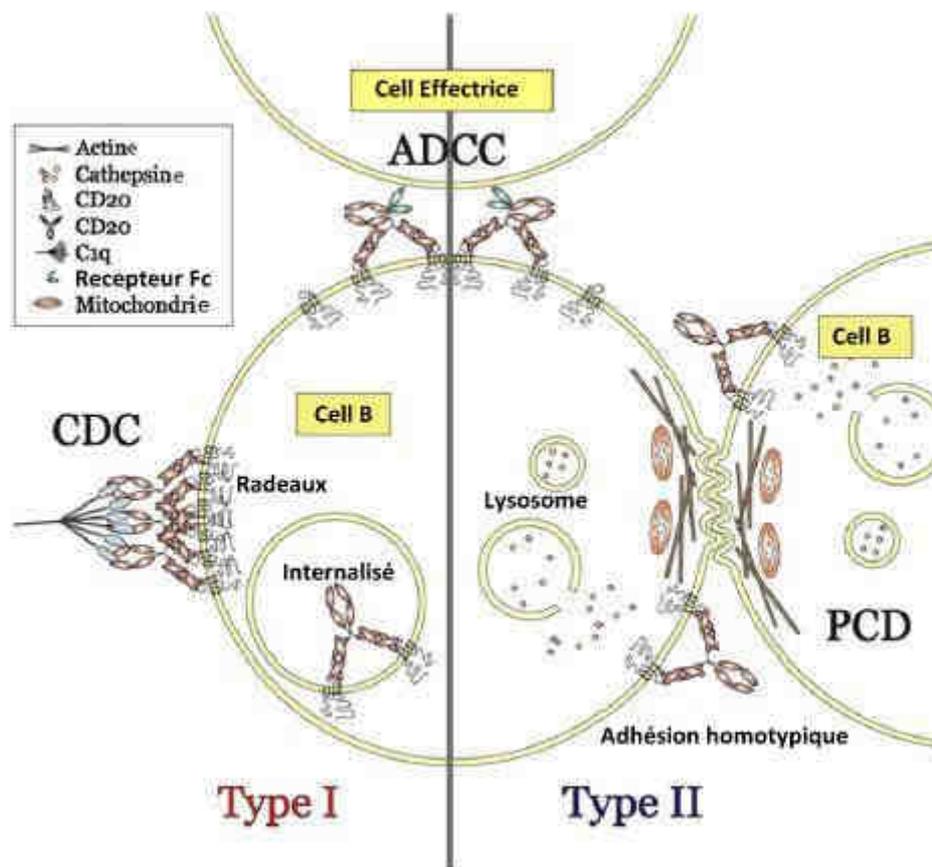


Figure 6 : Les différentes fonctions des anticorps anti-CD20 de type I et II. D'après Beers et al (22).

Cette lyse directe (qui est une forme de *mort cellulaire programmée* PCD), sans agrégation et selon une voie non apoptotique indépendante des caspases, est corrélée à l'adhésion homotypique des cellules B, requiert le cholestérol et implique la relocalisation des mitochondries (donc nécessite de l'énergie) au voisinage du contact cellule-cellule (Figure 6) (38). Ce type de mort cellulaire programmée implique des lysosomes, elle n'est pas régulée par les protéines anti-apoptotiques et peut donc outrepasser les voies classiques de survie cellulaire tumorale (22). Ce type de lyse a beaucoup été discuté pour les anticorps de type I comme le RTX. La fixation de ces anticorps pourrait entraîner une apoptose caspase-dépendante *in vitro* lorsqu'il y a « agrégation » par des anti-anticorps ou des conjugués multimériques d'anticorps mais ceci reste hypothétique *in vivo* (40). Enfin, les deux types d'anticorps sont capables d'engendrer une phagocytose efficace ainsi qu'une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Figure 6). Les différences entre les

modes d'action des anticorps de type I et II sont encore difficilement explicables et le challenge est de définir la relation structure / fonction pouvant expliquer la réponse divergente pour la CDC et la lyse directe alors que les taux d'ADCC sont identiques pour les anticorps de type I et II. Une des hypothèses repose sur une différence stœchiométrique de liaisons. En effet, la surface cellulaire présenterait moitié moins d'épitopes pour les types II que pour les types I. Ce ratio de 2 pour 1 pourrait être le résultat de la fixation d'un anticorps de type II à deux CD20 au sein d'un même tétramère, alors que l'anticorps de type I a tendance à se lier aussi aux tétramères adjacents (36). Des résultats très récents de co-cristallisation utilisant la tomographie des protéines de la société de biotechnologie GlycArt (Suisse) nous aide à comprendre ces différences. Brièvement, la fixation des anticorps de type I induit une configuration dite « ouverte » du CD20 (comme lorsqu'elle intervient dans le flux calcique) alors que la fixation de ceux de type II (qui n'induisent pas rapidement de flux calcique) entraînent une configuration fermée du CD20. En accord avec les observations que certains CD20 au moins sont constitutivement associés aux BCR et aux radeaux lipidiques avant la fixation de l'anticorps, le CD20 se trouve être présent à la fois à l'état ouvert et fermé (41). Pour l'avenir, il est à espérer que la manipulation des radeaux lipidiques et / ou des molécules de signalisation, en l'absence ou la présence d'anticorps avec des liaisons de type I / II avec la tomographie protéique, peut aider à élucider la clé de la relation structure / fonction des anticorps monoclonaux anti-CD20 (22).

3. Activité des deux types d'anticorps in vivo

Les différences mises en évidence *in vitro* entre les deux types d'anticorps anti-CD20 ont été retrouvées dans de nombreuses études, mais leur importance est moins bien définie *in vivo*. Pour les anticorps de type I et II, des expériences de xéno greffe démontrent une bonne protection contre la croissance tumorale, malgré des mécanismes d'action différents. Les anticorps de type I semblent être dépendants du complément *in vivo* alors que ceux de type II génèrent une protection anti-tumorale via un mécanisme Fc-indépendant (probablement la mort cellulaire programmée décrite préalablement) (42), (43). Depuis, des modèles murins ont été développés, notamment des modèles de déplétion des LB, soit par des anti-CD20 murins (31), soit par des anti-CD20 humains dans des souris transgéniques. Ces modèles ont démontré que les deux types d'anticorps sont dépendants des interactions Fc-FcR des macrophages et que ni le complément ni la lyse directe ne jouent un rôle prééminent dans cette déplétion B (22). En fait, contrairement à nos suggestions initiales concernant le

complément, des données récentes provenant de plusieurs sources semblent indiquer que l'activation du complément peut servir à inhiber l'activité des anticorps monoclonaux de type I tel que le rituximab. Ainsi, le rôle du complément comme un effecteur de l'activité des anticorps monoclonaux anti-CD20 reste controversé, et il est plus sûr de croire que, s'il n'est peut-être pas un acteur majeur pour éliminer les cellules B normales et même un inhibiteur de certains effecteurs, il est probable que contre les types particuliers de cellules B ou dans certains tissus, il jouera un rôle dans l'élimination des cellules ou l'activation des cellules effectrices (22).

Pour finir, quelques études chez l'homme ont reporté une internalisation du CD20 suite à la fixation d'un anticorps anti-CD20 (44), mais les résultats restent contradictoires. Après analyse de cellules issues de souris transgéniques pour le CD20, on observe que les anticorps de type I, et seulement eux, induisent une modulation antigénique du CD20 à la surface des lymphocytes B, *in vitro* et *in vivo*. Par conséquent, il s'ensuit une diminution de la lyse de ces derniers due aux interactions Fc-FcR et une diminution de la demi-vie de l'anticorps puisqu'il n'est pas fixé à sa cible (22). Au regard de ces résultats discordant avec les connaissances actuelles, l'équipe de Stephen Beers a utilisé un essai de quantification simultanée du niveau d'anticorps à la membrane et dans le cytoplasme. Ils ont ainsi mis en évidence une hétérogénéité des cellules issues de tumeurs humaines dans leur capacité à internaliser le CD20 lors de la fixation d'un anticorps de type I. Les auteurs concluent que, comme les lymphocytes B sains humains et murins, certains types de cellules B malignes (LLC et lymphomes du manteau) sont capables de moduler leur expression du CD20, alors que certaines cellules sont plus résistantes à la perte de CD20 à la surface (lymphomes folliculaires et lymphomes diffus à grandes cellules) (45).

Le Rituximab est considéré comme le représentant des anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-CD20 de première génération. Il a induit un élan considérable dans le développement de cette thérapeutique. Il y a actuellement au moins sept anticorps en développement et bien d'autres au stade du pré-développement. Les différents anticorps qui sont développés aujourd'hui sont dits de seconde ou de troisième génération (Tableau 2 ; Figure 7).

AcM	Type	Indication	Fabricant	Activité	Phase de développement
Rituximab	IgG1 chimérique	LNH /PR	Genentech/Biogen		Approuvé 1997
Y ^o -Ibritumomab tiuxetan	Murin (90Y)	LNH	Biogen/IDEC	Faible ADCC	Approuvé 2002
I ¹²⁵ -tositumomab	Murin (131I)	LNH	GSK	Faible CDC	Approuvé 2003
Ofatumumab	Humain IgG1	LNH/PR	Genmab AC/GSK	CDC et ADCC Forte	Phase III
Ocrelizumab ^a	Humain IgG1	LNH/PR	Genentech/Roche/Biogen		Phase III
TRU-015	SMIP ^a	PR	Trubion Pharma/Wyeth	ADCC Forte Faible CDC	Phase I/II
Veltuzumab	Humanisé	LNH/PTI	Immunomedics		Phase I/II IgG1
AME-133v	Humanisé IgG1	LNH rechute	Applied Molecular Evolution/Eli Lilly	ADCC Forte	Phase I/II
PRO131921 humain (Version 114)	IgG1	LNH/LLC	Genentech	CDC et ADCC Forte	Phase I/II
GAI01	Humanisé IgG1	LNH/LLC	Glycart/Roche	PCD et ADCC Forte Faible CDC	Phase I/II

Tableau 2 : Les différents anticorps anti-CD20 approuvés ou actuellement à l'étude. D'après Lim et al (35)

4. Les anticorps thérapeutiques de seconde génération

Les anticorps de seconde génération sont de type IgG1, humanisés ou totalement humains. Ces anticorps ont été modifiés pour limiter l'immunogénicité chez les patients (Figure 7).

- Ofatumumab (Arzerra, Genmab)

Cet anticorps anti-CD20 est entièrement humain. De type I, il est généré à partir de souris transgéniques pour les Ig humaines. Il reconnaît un épitope différent de celui du Rituximab, il reconnaît en effet la petite boucle de CD20 localisée à proximité de la membrane lui donnant ainsi une meilleure affinité de liaison. Cet anticorps est plus efficace en terme d'activation de la CDC grâce à une meilleure fixation du C1q à la surface des cellules et aussi en terme d'ADCC(46). Les premières études suggèrent l'utilisation de cet anticorps dans le traitement de la LNH et de la polyarthrite rhumatoïde (35).

- Ocrelizumab (PRO70769, rhuH27, Genentech /Roche /Biogen Idec)

L'Ocrélizumab est une IgG1 humanisée anti-CD20 de type I qui diffère du Rituximab en plusieurs endroits à l'intérieur des régions déterminant la complémentarité (CDR), des

régions variables des chaînes légères et lourdes. Il est également dérivé d'un allotype de Fc humain différent du Rituximab (de l'anti-CD20 murin 2H7). Il reconnaît un épitope différent mais englobant l'épitope du Rituximab sur la large boucle extracellulaire de CD20. L'Ocrélizumab utilise la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et l'apoptose. En comparaison avec le Rituximab in vitro, l'Ocrélizumab montre une ADCC plus forte (deux à cinq fois) contre des cellules exprimant le CD20, une CDC plus faible (de trois à cinq fois) et une liaison plus forte aux variants de faible affinité du récepteur Fc γ IIIa (Fc γ RIIIa, CD16) exprimant le phénotype FF / FV à la position 158. Le traitement par ce nouvel anticorps montre également moins de réaction à l'injection, probablement dû à la diminution de la CDC. Dans une étude de phase I / II, avec des patients ayant des lymphomes folliculaires en rechute ou réfractaires et prétraités par RTX, le traitement par l'Ocrelizumab est bien toléré et le taux de réponse est de 36% (47).

- Veltuzumab (hA20, IMMU-106, Immunomedics)

Cet anticorps de type I est un anticorps monoclonal anti-CD20 de type IgG1 humanisé. Le Veltuzumab est un anticorps humanisé anti-CD20 avec des régions déterminant la complémentarité (CDR) identiques à celle du Rituximab, sauf pour un résidu en position 101ème (numérotation de Kabat) du CDR3 de la chaîne lourde variable (VH). L'acide aspartique (Asp) remplace ainsi l'asparagine (Asn). En comparaison avec le Rituximab, le Veltuzumab a considérablement réduit la constante de dissociation dans trois lignées cellulaires humaines de lymphome testé. Il a aussi augmenté la CDC dans au moins une des trois lignées, mais on n'a observé aucune autre différence in vitro(48). Des études de phase I / II ont ensuite montré des résultats intéressants chez des patients atteints de LNH avec un taux de réponse globale à 44% (49). Par contre, dans la LLC, il semble que les doses soient à optimiser pour atteindre les objectifs (50).

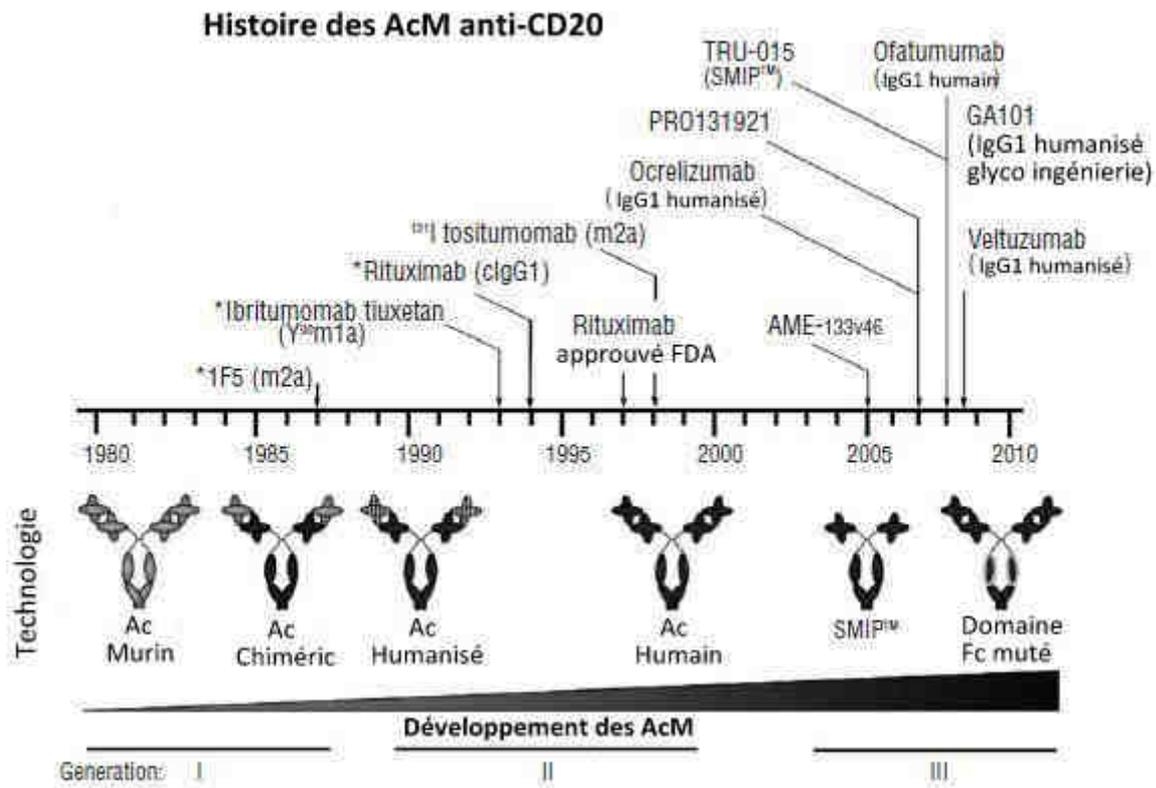


Figure 7 : Histoire et technologies des anticorps.

Anticorps chimérique : les régions constantes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines murines sont remplacées par des régions constantes humaines. *Anticorps humanisé* : les régions hypervariables (complementary determining region, CDR) d'un anticorps humain sont remplacées par des régions CDR d'origine murine, qui constituent le site de liaison de l'antigène. Cependant, certains acides aminés situés dans les régions adjacentes aux régions CDR (régions charpentes, ou FR pour framework) jouent un rôle majeur dans la structure du site de liaison de l'antigène. Pour conserver cette structure au cours de l'humanisation, l'anticorps accepteur reçoit non seulement les régions CDR de l'anticorps murin donneur, mais aussi les acides aminés de la région charpente de l'anticorps donneur. D'après Lim et al (35)

5. Les anticorps thérapeutiques de troisième génération

Les anticorps de troisième génération sont des IgG humanisées et ont leur région Fc modifiée pour une meilleure performance de ces anticorps dans l'activation des différentes fonctions effectrices (Figure 7).

- TRU-015 (Trubion Pharma /Wyeth)

Le Rituximab est un anticorps chimérique contenant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Ici, le TRU-015 est un petit immunopharmaceutique modulaire spécifique du CD20, codé par un construct d'une seule chaîne contenant une seule chaîne Fv spécifique du CD20 liée à une charnière d'IgG1 humaine, au domaine CH2 et CH3, mais dépourvu de domaine CH1 et CL. TRU-015 engendre de puissants signaux de cytotoxicité directe et de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), mais a réduit sa capacité à produire une cytotoxicité dépendante du complément (CDC) par rapport au Rituximab (51).

- AME-133 (LY2469298, Applied Molecular Evolution)

L'AME-123 est une IgG1 humanisée de type I. La sélection des CDR de cet anticorps est fondée sur l'augmentation de l'affinité pour le CD20 par une procédure de mutagenèse. La région Fc a, quant à elle, été modifiée pour augmenter l'affinité pour le Fc γ RIIIa et obtenir ainsi une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps plus forte comparée à celle du Rituximab (52). L'efficacité clinique de cet anticorps est en cours dans une étude de phase I / II dans le traitement des LNH en rechute.

- PRO131921 (Genentech)

Le PRO131921 est un anticorps monoclonal humanisé conçu pour obtenir une meilleure affinité pour le Fc γ RIIIa et ainsi une meilleure ADCC. Cet anticorps a été testé dans une étude de phase I / II chez des patients atteints de LNH indolents en rechute ou réfractaires. Les premiers résultats montrent une assez bonne tolérance et une efficacité clinique chez ces patients prétraités par Rituximab(53), (54).

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

L'Obinutuzumab a été spécifiquement conçu comme un anticorps de type II et il a été modifié par glycosylation. La région Fc de cet anticorps est en effet non fucosylée, ce qui lui donne une meilleure ADCC grâce à une meilleure affinité pour le FC γ RIIIa et une meilleure activité de lyse directe (55). Les modifications dans la structure de GA101 ont été conçues avec l'intention de fabriquer un anticorps qui a une capacité à tuer les cellules B ciblées plus importante que le Rituximab ou que les autres anticorps monoclonaux anti-CD20 de type I. Les observations des études *in vitro* suggèrent que le GA101 est supérieur dans l'induction de la mort cellulaire directe de cellules de lymphome (55), dans l'induction de l'ADCC, et en épuration du sang des lymphocytes B (56). Le GA101 a également démontré une activité antitumorale accrue par rapport aux anticorps de type I dans des modèles de xénogreffes humaines tumorales, à la fois comme agent seul (55), (57), et en combinaison avec de la chimiothérapie (57), il a également montré une forte capacité à éliminer les cellules B des tissus lymphoïdes chez des primates (55), (57). Les résultats de la première étude de faisabilité du GA101 chez des patients atteints de LNH difficiles à traiter montrent des résultats prometteurs et un traitement assez bien toléré (58).

III. LE LYMPHOME NON HODGKINIEN

A. Définition

Le terme de lymphome non hodgkinien (LNH) est d'origine anglo-saxonne, il remplace les anciens termes utilisés en France pour qualifier les proliférations lymphoïdes telles que le lymphosarcome ou le réticulosarcome. Les lymphomes non hodgkiniens sont généralement extramédullaires et dépourvus de cellules de Sternberg contrairement au lymphomes hodkiniens où elles sont très caractéristiques.

B. Épidémiologie

Les LNH se situent au sixième rang des cancers les plus fréquents en France (près de 10 400 nouveaux cas en 2008) et au neuvième rang en terme de mortalité (environ 4000 décès annuels). Le LNH s'observe à tout âge et les formes de l'enfant sont toujours des formes agressives, à grandes cellules ou lymphoblastiques ; néanmoins l'incidence augmente notablement après l'âge de 60-65 ans. Une légère prédominance masculine (54% des cas) se retrouve chez l'adulte. L'âge médian lors du diagnostic est de 64 ans chez l'homme et de 70 ans chez la femme, mais il peut varier selon les types histologiques, certains pouvant présenter des pics d'incidence chez l'adulte jeune ou l'enfant (dans le lymphome de Burkitt par exemple) (59).

C. Pathogénie

L'incidence des LNH augmente régulièrement et est passée en vingt ans d'environ 8,5 à 16/100 000 dans les pays développés. Ils représentent environ 4,5 % des affections malignes. Son étiologie est le plus souvent inconnue, mais de nombreux facteurs peuvent jouer un rôle. Un certain nombre d'infections peuvent être en cause telles que des infections bactériennes (*Helicobacter pylori*) et surtout des infections virales (EBV, HTLV-1, HHV8). Les LNH peuvent survenir chez des sujets atteints de déficit immunitaire génétique ou acquis.

De plus, des LNH peuvent s'associer à certaines manifestations auto-immunes, anémie hémolytique auto-immune notamment. Des facteurs génétiques inconnus sont probablement en cause dans certains cas, comme en témoigne la survenue répétée d'un même type de LNH dans d'exceptionnelles familles (60). L'augmentation régulière de l'incidence des LNH fait soupçonner, sans preuve décisive pour l'instant, le rôle des facteurs environnementaux (pesticides agricoles, dérivés de l'industrie chimique et pétrolière) (61).

D. Diagnostic

1. Circonstances de diagnostic

Les circonstances de diagnostic sont le plus souvent l'apparition d'adénopathies isolées ou associées à de la fièvre. L'interrogatoire doit rechercher en particulier des troubles tels que la fièvre, un amaigrissement ou des sueurs nocturnes. On recherchera aussi des antécédents familiaux ou personnels d'hémopathies, des risques de contamination virale (VIH, VHB et VHC) ainsi que la possibilité d'une exposition à des substances particulières telles que la dioxine, des dérivés de l'industrie chimique et pétrolière de même que les pesticides agricoles. Il peut s'agir par ailleurs de la découverte d'une splénomégalie ou d'une localisation viscérale telle que la sphère oto-rhino-laryngologique : on y retrouve notamment des tumeurs de l'amygdale ou des atteintes du cavum avec otalgie et obstruction nasale ; généralement ces atteintes sont le fait de lymphomes à grandes cellules. On trouve aussi des localisations digestives avec par ordre de fréquence décroissante des atteintes gastriques, des atteintes du grêle, le plus souvent iléal, et enfin des atteintes coliques ou rectales. On observe aussi des localisations osseuses parfois associées à une atteinte ganglionnaire, le diagnostic peut être difficile, notamment au niveau du rachis. Des localisations cutanées sont aussi retrouvées. Elles sont plus fréquentes, primitives, isolées ou associées à d'autres localisations. Enfin, il est possible d'avoir des atteintes du système nerveux central : isolées ou associées à d'autres localisations surtout dans les lymphomes à grandes cellules ou de Burkitt.

Le diagnostic des lymphomes non hodgkiniens repose sur la biopsie d'un organe atteint. Cette biopsie doit porter préférentiellement sur un ganglion en cas d'atteinte ganglionnaire et extra-ganglionnaire. La description anatomopathologique repose sur :

- La structure nodulaire (ou folliculaire) ou diffuse ;

- La morphologie des cellules proliférantes ;
- L'étude immunohistochimique. En occident, la grande majorité des LNH est B ;
- L'existence d'un réarrangement monoclonal T ou B et d'une translocation chromosomique.

À noter que du fait de la corticosensibilité des LNH, toute corticothérapie peut modifier l'aspect anatomopathologique. Devant une adénopathie d'origine inconnue, sauf urgence compressive, il est recommandé de ne pas prescrire de corticoïdes avant toute biopsie.

2. Principes de la biopsie ganglionnaire selon l'HAS

- Le premier temps de l'examen anatomopathologique est le prélèvement. Sa qualité est essentielle, le ganglion doit être entier, il doit être adressé frais et non fixé au pathologiste pour permettre les analyses complémentaires: immunohistochimique, et si besoin cytogénétique, immunophénotypique et de génétique moléculaire. C'est la qualité du prélèvement qui permettra d'obtenir de bons résultats de l'analyse histologique et donc une bonne appréciation pronostique ainsi que les décisions thérapeutiques qui en découlent ;
- La biopsie chirurgicale porte sur un ganglion superficiel dont l'exérèse doit être totale afin de permettre l'analyse architecturale du ganglion. En cas d'adénopathie profonde, l'exérèse par voie chirurgicale doit être privilégiée à des macrobiopsies radioguidées avec trocarts adaptés. La cytoponction à l'aiguille fine constitue une alternative possible dans un contexte d'urgence. En milieu spécialisé, elle peut fournir une orientation utile, rapide et précise (maladie de Hodgkin ou LNH, métastase, orientation pour caryotype, pour marqueur génétique...);
- La biopsie est à visée diagnostique : il n'y a pas d'indication à une exérèse ganglionnaire élargie (curage) ;
- La congélation rapide de tissu tumoral est hautement souhaitable, elle permet des études complémentaires différées si nécessaire.

Une deuxième lecture doit être envisagée, chaque fois que possible, par un pathologiste

spécialisé dans les lymphomes. La conclusion du compte rendu anatomopathologique doit se référer à l'actuelle classification internationale 2008 de l'OMS des hémopathies malignes.

3. Examens Biologiques

Associés à l'interrogatoire et à la biopsie, on retrouve un certain nombre d'examens biologiques et radiologiques. Les examens suivants seront systématiquement effectués : un hémogramme ; un ionogramme sanguin, une uricémie, une calcémie ; une CRP ; une électrophorèse des protéines, suivie en cas d'anomalie d'une immunoélectrophorèse ou d'une immunofixation ; une clairance de la créatinine ; un taux sérique de LDH ; une évaluation de la fonction hépatique (transaminases, PAL, bilirubine directe et indirecte, gamma GT); une sérologie hépatites B et C, VIH (à la recherche d'un terrain favorisant et nécessitant une prise en charge spécifique) ; un test de grossesse chez une femme en âge de procréer ; une biopsie médullaire unilatérale et éventuellement un myélogramme et une aspiration médullaire ; une ponction lombaire avec analyse cytologique et biochimique (afin de mettre en évidence une éventuelle atteinte méningée) ; ceci est systématique pour les LNH agressifs (59).

Du point de vue de l'imagerie, il sera réalisé là aussi de manière systématique, une tomodensitométrie cervicale, thoracique, abdominale et pelvienne. On mesurera les lésions tumorales cibles qui nous serviront de référence initiale afin d'évaluer la réponse au traitement.

4. Les différentes formes de LNH

On distingue, au sein des LNH, différentes formes. Elles se différencient anatomopathologiquement, phénotypiquement et ont en plus certaines particularités (cf. annexes). On distingue aussi des groupes comprenant les formes « agressives » et les formes « indolentes », caractérisées par des comportements cliniques et des modes évolutifs différents qui guideront ensuite l'approche thérapeutique (Annexe II) :

- Les lymphomes de haut grade de malignité ou agressifs (50-60 % des LNH) ont une évolution rapide (quelques semaines à quelques mois) et requièrent une prise en charge thérapeutique elle aussi rapide, soit dès que leur diagnostic est posé. Le traitement amène dans de nombreux cas à la guérison ;

- Les lymphomes de faible grade de malignité ou indolents (40-50 % des LNH) sont habituellement d'évolution lente (plusieurs années). Une stratégie de surveillance est généralement la prise en charge initiale car le pronostic à long terme des formes d'évolution indolente ne semble pas dépendre de la précocité du traitement. Si un traitement est initié, il peut conduire à une rémission apparente de la maladie. Les rechutes sont fréquentes mais l'amélioration récente du pronostic confère à de nombreux patients une survie importante notamment si le diagnostic est porté après 60-65 ans. Un lymphome indolent peut évoluer en un lymphome agressif.

Les formes histologiques les plus fréquentes sont :

- Pour les LNH agressifs : le lymphome diffus à grandes cellules B (environ 60 % des formes agressives) ;
- Pour les LNH indolents : le lymphome folliculaire, toujours de type B, (environ 80 % des formes indolentes).

Certaines formes histologiques justifient une approche particulière :

- Le lymphome de Burkitt, il existe sous deux formes différentes. L'une des formes est surtout retrouvée en Afrique Noire et de manière endémique. Elle est liée au virus Epstein Barr (EBV). L'autre forme est plus sporadique et n'est pas en lien avec l'EBV (type prédominant en France). La croissance tumorale de ce lymphome est extrêmement rapide et constitue une urgence thérapeutique. La chimiothérapie (courte et intensive) a heureusement transformé son pronostic et permet de le guérir sans séquelle dans la majorité des cas chez l'enfant alors qu'il reste de pronostic très réservé chez l'adulte. Le début du traitement doit cependant être effectué de manière prudente et progressive afin d'éviter un syndrome de lyse tumorale majeure ;
- Le lymphome du manteau (5 à 10 % des LNH), a un traitement difficile car il associe une évolution rapide typique des LNH agressifs, une résistance aux traitements, et des rechutes itératives caractéristiques des LNH indolents ;

- Les lymphomes lymphocytiques et la maladie de Waldenström ; leurs prise en charge est semblable à celle utilisée dans les leucémies lymphoïdes chroniques tout en tenant compte des spécificités de chaque pathologie (notamment un traitement par échanges plasmatiques pour la maladie de Waldenström).

5. Le pronostic

Le pronostic est évalué essentiellement grâce aux éléments anatomopathologiques et à cinq facteurs dont l'étude permet de définir un index de pronostic international de gravité (IPI) : l'âge (inférieur ou supérieur à 60 ans), le stade « Ann-Arbor » (I ou II versus III ou IV) (Figure 8), l'indice d'activité suivant l'échelle de l'OMS (0 ou 1 versus 2 à 4) (Tableau 3), le taux de LDH sérique (supérieur ou égal à une fois la normale), le nombre de localisations extra-ganglionnaires (0 ou 1 versus >1) (Annexe I). Il existe un score pronostique spécifique pour les lymphomes folliculaires (FLPI). Les trois lymphomes les plus fréquents sont : le lymphome à grandes cellules B, le lymphome folliculaires et le lymphome de Burkitt.

- I - Un seul territoire ganglionnaire d'un coté du diaphragme ou un seul organe extralymphatique
- II - Deux territoires ganglionnaires ou plus, d'un coté du diaphragme
- III - Atteinte ganglionnaire sus- et sous diaphragmatique:
 - III-1 - Abdominale supérieure: lombo-aortique ou splénique
 - III-2 - disséminée abdomino-pelvienne
- IV - Localisation viscérale ou médullaire
 - A ou B - selon l'absence ou la présence d'au moins un signe clinique d'évolutivité
 - a ou b - selon la VS > ou < 50 mm à 1h
- on peut aussi compléter ces stades par la lettre:
 - E - si atteinte extra-ganglionnaire contiguë à une atteinte ganglionnaire
 - s - en cas d'atteinte splénique

Figure 8 : Classification selon l'extension et l'évolutivité (Ann Arbor).

Cotation	État général du patient
0	Activité normale.
1	Capable de réaliser des petits travaux, ambulatoires.
2	Incapable de travailler, capable de s'occuper de lui-même, debout plus de 50 % du temps de veille.
3	Confiné au lit ou au fauteuil plus de 50 % du temps de veille.
4	Confiné au lit et incapable de s'occuper de lui-même.

Tableau 3 : Classification de l'index d'activité (performance status) selon l'échelle de l'OMS et de l'ECOG.

E. Traitement

1. Prise en charge générale

La prise en charge des Lymphomes non hodgkiniens diffère suivant la forme du lymphome. Elle dépend en effet de l'agressivité clinique de ce dernier, elle-même corrélée à l'histologie. Les lymphomes agressifs sont généralement d'évolution rapide mais accessibles à un traitement curatif. Par contre, les lymphomes indolents, d'évolution plus lente, sont eux difficilement curables et peuvent par ailleurs évoluer histologiquement vers une forme agressive.

Une simple dose de chimiothérapie ne peut détruire qu'un certain pourcentage de cellules cancéreuses. Il est donc nécessaire d'administrer des doses répétées de façon successive afin d'en détruire le maximum. Les séances de chimiothérapie sont planifiées aussi souvent que possible pour limiter au maximum la croissance de la tumeur, prévenir le développement de cellules cancéreuses résistantes et obtenir le meilleur résultat. La chimiothérapie est administrée le plus souvent dans le cadre de cycles ; chaque période de

traitement est suivie par une phase de repos et de récupération pendant laquelle aucun médicament n'est administré. Les périodes de traitement suivies des intervalles de repos constituent ce que l'on appelle une cure de chimiothérapie. Les médicaments sont généralement administrés selon un calendrier qui définit précisément l'intervalle qui sépare les périodes de traitement. Les cycles de chimiothérapie varient selon des facteurs tels que le stade de la maladie, le type de lymphome, les médicaments utilisés, la réponse obtenue au traitement, ainsi que la nature et la sévérité des effets indésirables. Le rythme entre deux cycles est précisé au moment du diagnostic. Il est de 14 à 21 jours pour les lymphomes à grandes cellules, et de 21 à 28 jours ou plus pour les autres. Les premiers cycles de chimiothérapie (entre 2 et 4) constituent le traitement d'induction. Au terme de celui-ci, un bilan est réalisé pour déterminer la chimiosensibilité, c'est-à-dire pour s'assurer que les médicaments administrés sont bien actifs sur les cellules cancéreuses ; cela se mesure notamment par des critères d'efficacité du traitement. Le patient est alors en rémission partielle. Commence ensuite un traitement de consolidation (parfois intensif avec autogreffe) qui a pour objectif d'atteindre la rémission complète. Il peut être suivi, pour certains lymphomes de faible malignité à risque élevé de récurrence, d'un traitement dit de « maintenance » ou « d'entretien » souvent à base d'anticorps monoclonaux (Rituximab), sur une durée de deux ans.

Selon la chimiothérapie retenue, il peut être prescrit des médicaments par voie orale ou injectés par voie intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée. Dans le cas d'un traitement par voie intraveineuse sur plusieurs cycles, le médecin peut recommander l'implantation d'un accès veineux central. Il s'agit d'un cathéter que l'on insère, au cours d'une brève intervention chirurgicale, dans une grosse veine à la base du cou pour faciliter les injections répétées. Il existe deux principaux types de dispositif : le cathéter à émergence cutanée et la chambre implantable, appelée aussi site implantable ou CIP ou Port-à-cath® ou encore PAC. Le choix de l'un ou l'autre dépend essentiellement du type de traitement prescrit et de sa durée. L'extrémité apparente du cathéter est munie d'un embout auquel sont reliés les flacons de perfusion. Entre chaque perfusion, cet embout est fermé par un bouchon et est recouvert d'un pansement stérile. La chambre implantable est un dispositif placé entièrement sous la peau. Le cathéter est introduit dans une veine à l'une de ses extrémités, l'autre étant reliée à un boîtier de petit volume, la chambre d'injection, placé juste sous la peau. La chambre d'injection est munie sur le dessus d'une membrane qui permet de réaliser les injections, les perfusions et les

prélèvements. Pour cela, on pique à travers la peau et la membrane avec une aiguille. L'équipe soignante peut appliquer, pendant l'heure qui précède, un pansement anesthésique à l'endroit de la chambre implantable afin de diminuer la douleur lors de la piqûre (62).

2. Prise en charge des LNH agressifs

Le modèle-type pour la prise en charge des LNH agressifs est celui du lymphome diffus à grandes cellules B (60 % des formes agressives ; 30 à 40 % de l'ensemble des LNH). Comme nous l'avons vu, les LNH agressifs sont accessibles à un traitement. Quel que soit leur stade au moment du diagnostic, plusieurs options thérapeutiques existent ; elles reposent sur : la chimiothérapie, l'immunothérapie, la radiothérapie ou la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Le traitement de référence et de première intention est une immunochemiothérapie. Elle associe en effet une immunothérapie : un anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab) et une polychimiothérapie (habituellement de type CHOP : *Cyclophosphamide, Adriamycine, Vincristine et Prednisone*). Cette immunochemiothérapie est administrée sur 6 à 8 cycles de 2 ou 3 semaines. Selon le score IPI du patient et son état général, le schéma d'administration peut être adapté. La réponse au traitement est évaluée dès les premiers cycles, elle permet ainsi d'ajuster précocement la thérapeutique. Elle est comparative avec les examens du bilan initial (examen clinique, tomodensitométrie et éventuellement TEP-scanner). En l'absence de réponse, un protocole de deuxième ligne sera proposé sans attendre la fin du schéma initial (59).

3. Prise en charge des LNH indolents

De même que pour les lymphomes agressifs, le traitement des LNH indolents repose sur un modèle, il s'agit ici du lymphome folliculaire (80 % des formes indolentes ; 25 à 30 % de l'ensemble des LNH). Comme nous l'avons vu, les lymphomes indolents évoluent le plus souvent sur plusieurs années, mais sont difficilement curables et ils peuvent se transformer en une forme histologique de lymphome agressif. Dans le cas du lymphome indolent, les options thérapeutiques sont décidées en fonction de l'importance de la masse tumorale et de l'état général du patient. Celles-ci reposent sur : la chimiothérapie, l'immunothérapie, la radiothérapie voire l'abstention thérapeutique. En effet, en dehors de protocoles de recherche, les patients qui sont asymptomatiques et qui ne possèdent pas de forte masse tumorale, soit 20

à 30 % des patients, ne nécessitent pas de traitement. On surveillera régulièrement, néanmoins, l'évolution de la maladie. En cas de masse tumorale importante, un traitement s'avère nécessaire. Le traitement de référence repose sur une immunoconjointothérapie qui consiste à administrer un anticorps thérapeutique anti-CD20, le Rituximab, associé à une polychimiothérapie (habituellement de type CVP10 : *Cyclophosphamide, Vincristine (à dose réduite), Prednisone* ou de type CHOP). Le traitement est administré sur 6 à 8 cycles de 3 semaines et adaptable à l'état général du patient. Une association de type polychimiothérapie (CHOP) et d'interféron alpha peut être proposée si le traitement de référence est impossible (en cas de contre-indication à une immunothérapie par exemple). Ces contre-indications sont essentiellement limitées au cas d'hypersensibilité de type I ou de réaction anaphylactique aux protéines murines, aux protéines de cellules ovariennes de hamster chinois ou à tout autre constituant du produit. Pour les lymphomes folliculaires, après l'immunoconjointothérapie, un traitement de consolidation par radio-immunothérapie peut être réalisé avec le Zevalin® (ibritumomab tiutexan), après avoir exclu une localisation médullaire (59). Comme précédemment, on réalise une évaluation de la réponse au traitement dès les premiers cycles et en fin de traitement. En l'absence de réponse, un protocole de deuxième ligne sera proposé.

Ce protocole consiste, après discussion au cas par cas, pour des patients de plus de 65 ans à un schéma R-CHOP avec entretien par le Rituximab (pour les rechutes après chimiothérapie sans anticorps thérapeutique). Le protocole R-Bendamustine +/- Rituximab d'entretien peut aussi être utilisé pour les rechutes après R-CHOP. Le Zevalin® peut être aussi une option (selon les critères de l'AMM : masses <5 cm, moelle osseuse envahie à moins de 25%).

Pour des patients de moins de 65 ans, le protocole de seconde ligne pourra être un traitement standard par chimiothérapie de rattrapage en fonction du primo-traitement, la stratégie privilégiée sera R-DHAOX (Rituximab, Dexaméthasone, Oxiplatine, Cytarabine) pour permettre la collecte de CSP, puis autogreffe de consolidation conditionnée par BEAM (Carmustine, Etoposide, Cytarabine, Melphalan) (sans Rituximab de maintenance). Un TEP scan est indispensablement fait avant l'autogreffe. En cas de rechute, un traitement de consolidation par une greffe de cellules souches hématopoïétiques doit être discuté par l'équipe spécialisée. Pour les formes localisées, un traitement local par irradiation doit être discuté.

4. Autres protocoles

Suivant la situation de chaque patient et après évaluation des solutions de traitement les mieux adaptées au cours de la réunion de concertation pluridisciplinaire, les médecins peuvent proposer d'autres protocoles. À titre d'exemple, on peut citer (liste non exhaustive d'exemples de protocoles recensés par les membres du conseil scientifique de France Lymphome Espoir):

- Mini CHVP : Cyclophosphamide – Doxorubicine – Etoposine – Prednisone
- R-Mini CHVP + IFN : Mini CHVP + Rituximab + Interféron
- R-ACVPB : Doxorubicine– Cyclophosphamide – Vindesine – Prednisone – Bleomycine
- EPOCH : Etoposine – Prednisone – Vincristine – Cyclophosphamide – Doxorubicine ou Daunorubicine
- CHOP : Cyclophosphamide – Doxorubicine – Vincristine – Prednisone
- R-CHOP : CHOP + Rituximab
- R-CVP : Cyclophosphamide – Vincristine – Prednisone + Rituximab
- FND : Fludarabine – Mitoxandrone – Dexamethasone
- Hyper CVAD : Cyclophosphamide – Vincristine – Doxorubicine – Dexamethasone – Methotrexate – Cytarabine
- ICE : Ifosfamide – Etoposide – Carboplatine
- BEAM : Carmustine – Etoposide – Cytarabine – Melphalan
- DHAP : Cisplatine – Cytosine – Dexamethasone
- R-DHAP : DHAP + Rituximab
- ESHAP : Etoposide – Methylprednisolone – Cytarabine - Cisplatine
- RFC : Fludarabine – Cyclophosphamide – Rituximab

Dans certains cas de lymphomes agressifs, du méthotrexate (en injection intrathécale) peut être ajouté au traitement. Beaucoup d'autres associations de médicaments sont actuellement en cours d'évaluation dans le cadre d'essais cliniques.

Les médicaments utilisés en chimiothérapie ne sont pas sélectifs, par conséquent ils peuvent détruire ou endommager les cellules saines qui se renouvellent rapidement, comme

les cellules du système pileux, de la bouche, du tube digestif ou de la moelle osseuse. Les effets indésirables de la chimiothérapie sont variables en fonction des médicaments et des personnes, et ils peuvent être plus ou moins importants. Les effets indésirables les plus fréquents liés à la chimiothérapie sont : la diminution de la production des cellules sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes), il y a donc des risques d'anémie, de neutropénie et thrombopénie ; la chute des ongles et des cheveux ; des nausées et des vomissements ; une mucite et des aphtes ; des diarrhées et une possible constipation ; la modification voir une perte de l'appétit.

5. Le suivi du traitement

Enfin le suivi du traitement est, lui aussi, d'une grande importance. Ce suivi est opéré avec différents objectifs. Tout d'abord, il faut pouvoir déceler de possibles récurrences locales ou à distance ; ensuite, rechercher et prendre en charge les complications tardives ou les séquelles liées aux traitements reçus. Il n'y a actuellement pas de données disponibles sur le schéma de surveillance optimal d'un LNH, le groupe de travail de l'HAS propose, à titre d'exemple, le protocole de surveillance ci-dessous. Le patient doit être informé des signes cliniques faisant suspecter une évolution de la maladie et devant l'amener à consulter (augmentation de la masse ganglionnaire, signes généraux et signes compressifs). La récurrence peut être ganglionnaire ou extra-ganglionnaire, quel que soit le site initialement atteint. Une attention particulière est portée sur les éléments suivants : l'évolution de la maladie et les éventuelles récurrences. Le risque d'hémopathie secondaire à la chimiothérapie telle que la myélodysplasie ou la leucémie aiguë. Le risque d'hypothyroïdie iatrogène suite à une irradiation de la loge thyroïdienne. Le risque de toxicité cardiaque lié à un traitement par les anthracyclines ou à une irradiation médiastinale. Enfin, le risque de leuco-encéphalopathie retardée après administration du Rituximab.

Tout élément clinique inhabituel et persistant doit faire évoquer et rechercher une rechute. Il est conseillé au patient de consulter dans tous les cas suivants :

- Fièvre (plus de 38 °C) ;
- Infection (comme un rhume, une grippe ou un abcès dentaire) ;

- Constipation ou diarrhée ;
- Lésions dans la bouche ou la gorge ;
- Toux excessive ;
- Souffle court ;
- Vertiges ;
- Fatigue inhabituelle ;
- Perte ou gain de poids inhabituels ;
- Jambes gonflées ;
- Picotement des doigts ou des orteils ;
- Bourdonnements d'oreille ;
- Saignements ou œdèmes inhabituels ;
- Nausées, vomissements, malgré la prise de médicaments antiémétiques ;
- Gonflement des ganglions lymphatiques ;
- Douleurs.

Des examens complémentaires sont nécessaires pour la surveillance de la maladie. On retrouve dans ces examens une tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne avec injection de produit de contraste. Cet examen est recommandé pour la détection de récurrences et il est habituellement réalisé à 6 mois puis à 1 an. Sa fréquence est à adapter en fonction du stade et des facteurs de risque en tenant compte du risque d'irradiation cumulée, notamment chez les patients les plus jeunes. Comme alternatives à cette tomodensitométrie peuvent être proposées, selon les circonstances, une radiographie thoracique et une échographie abdominopelvienne. On réalisera aussi, généralement au même rythme que la surveillance clinique, un hémogramme pour surveiller les fonctions rénale et hépatique, soit les transaminases, la PAL, la bilirubine directe et indirecte et la gamma GT. On recherchera aussi une hypothyroïdie iatrogène en cas d'irradiation cervicale par un dosage de la TSH. Enfin, on effectuera une évaluation de la fonction cardiaque par une échographie ou une scintigraphie chez les patients traités par anthracyclines ou ayant reçu une irradiation médiastinale. Selon les signes d'appels ou les différents traitements reçus et leurs effets secondaires particuliers, d'autres examens peuvent être prescrits (59). La surveillance s'effectue à un rythme de tous les 3 mois pendant 2 ans, puis tous les 6 mois pendant les 3 années suivantes, puis une fois par an.

6. Les soins de support

Le traitement du lymphome doit enfin prendre en compte les soins de support, c'est-à-dire l'ensemble des soins et soutiens nécessaires aux personnes malades tout au long de la maladie conjointement au traitement onco-hématologique spécifique. Un temps est réservé à un échange sur la qualité de vie du patient. La plupart des effets indésirables physiques et biologiques sont contrôlables de manière efficace avec des médicaments. Cependant, l'impact émotionnel et psychologique que représente la confrontation avec un lymphome doit également être pris en compte. Par exemple, la chute des cheveux et autres changements de l'apparence physique peuvent donner au patient l'impression de ne plus être attirants. On peut lutter contre ce sentiment par des traitements contre la calvitie, le port d'une perruque et des soins particuliers aux changements temporaires du corps tels que la peau sèche et le teint brouillé. Apprendre que l'on a un lymphome et suivre un traitement peut aussi être éprouvant à la fois physiquement et psychologiquement, les personnes vivant avec un lymphome peuvent donc se sentir déprimées. Néanmoins il est toujours possible de trouver de l'aide, à commencer auprès de sa famille, des soignants ou de professionnels (psychiatre, psychologue) et / ou envisager de prendre des médicaments pour aider à garder le contrôle de ses émotions. Des groupes de soutien peuvent aussi aider et apporter au patient le réconfort de parler avec d'autres personnes qui comprennent sa situation. La période de rémission est aussi une période difficile car elle est souvent vécue comme un mélange de soulagement et d'anxiété. Beaucoup de gens considèrent que c'est le moment de penser à ce qui est réellement important dans la vie. Des changements de mode de vie et de carrière professionnelle sont fréquents à ce stade. Ajuster les changements physiques et émotionnels est un processus constant. Beaucoup de personnes veulent donner en retour et deviennent actives au sein d'associations ou partagent leur expérience avec d'autres personnes qui souffrent d'un lymphome. Il est important de rester vigilant, à l'écoute de son corps et de suivre les recommandations de son médecin pour tous les examens de suivi post-traitement. Ce dernier permet la surveillance d'une éventuelle rechute et le dépistage de séquelles éventuelles. Autre étape très difficile, la récurrence, la peur de voir le lymphome revenir peut effectivement être envahissante. Apprendre que le lymphome a récidivé peut être démoralisant et sembler injuste. Certains se demandent s'ils auront la force psychologique et physique de recommencer un traitement. Pourtant, il est possible que la prise d'un nouveau traitement soit plus facile à supporter parce que le patient sait à quoi s'attendre et qu'il sait déjà où trouver du

soutien et prendre en charge sa maladie.

Les thérapies complémentaires, comme l'homéopathie, l'acupuncture, la phytothérapie, la naturopathie ou la relaxation sont des traitements qui ne sont pas conventionnels, mais qui peuvent potentiellement améliorer le confort physique et émotionnel. En aucun cas elles ne doivent se substituer au traitement du lymphome. Il est primordial d'informer le médecin de tous les traitements ou produits complémentaires pris, afin d'éviter tout risque d'interaction avec le traitement du lymphome. Une bonne alimentation est toujours primordiale pour la santé et encore plus pendant le traitement d'un lymphome. La meilleure approche est de manger régulièrement une nourriture variée et saine. Une activité physique régulière est très souvent conseillée par le médecin. Le dosage des exercices doit être adapté aux capacités physiques du moment, lesquelles peuvent être diminuées de manière significative par les traitements.

F. Limites des traitements actuels

Chez les patients atteints d'un lymphome diffus à grandes cellules par exemple, avec un traitement standard comprenant le Rituximab et un protocole à base d'anthracyclines, environ 67% des patients sont en vie sans lymphome avec un suivi médian de 4 ans (63). Par conséquent, malgré les améliorations de la survie globale (OS) par l'ajout systématique dans le traitement du Rituximab, un tiers des patients ont une maladie qui est soit réfractaire à la thérapie initiale ou en rechute après un traitement standard (64). Bien que la majorité des rechutes surviennent au début, une étude récente a souligné que des rechutes tardives (après 5 ans) sont possibles, et peuvent être associées à un stade localisé initial, un score d'index pronostique international (IPI) favorable et une complication extraganglionnaire au moment du diagnostic. Ces rechutes tardives constitueraient 7% de l'ensemble des progressions après un protocole (R-CHOP) ou une chimiothérapie CHOP selon un large essai randomisé (65).

1. Les résistances au traitement par le Rituximab

Le Rituximab est utilisé dans le traitement du cancer en raison de sa capacité à reconnaître les cellules cancéreuses exprimant à leur surface le CD20, à activer le complément (CDC) et la cytotoxicité à médiation cellulaire (ADCC) et / ou à induire un arrêt

de croissance ou à induire une apoptose et enfin à sensibiliser les cellules à la chimiothérapie (66), (40), (67), (68). Certaines études ont montré une résistance des cancers aux thérapies avec cet anticorps anti-CD20. Cette résistance impliquerait un certain nombre de mécanismes tels que des mutations du CD20 (9), des réductions de l'expression du gène et de la protéine à la surface des cellules (10). Il est aussi rapporté une hyper-expression des voies du NF- κ B et ERK 1/2 qui conduit à une surexpression de facteurs de résistance protéique, tels que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1(11),(12),(13), mais aussi la réduction de l'efficacité de l'ADCC ou de la CDC et l'implication de facteurs protecteurs du microenvironnement tumoral. De plus, certaines cellules résistantes n'expriment plus le CD20, soit de manière définitive, soit de manière temporaire (phénomène de « shaving », mutations, modifications épigénétiques...).

La cytotoxicité induite par le Rituximab (RTX) est dépendante des mécanismes immunitaires. Suite à la reconnaissance par le C1q, la voie classique du complément est activée et se traduit par le dépôt de fragments C3 sur la cellule B, lié à la pénétration dans la membrane cellulaire des complexes MAC (69). Elle est aussi initiée par la reconnaissance du complexe RTX/CD20/LB par les récepteurs Fc γ des cellules effectrices (les cellules NK et les macrophages) à l'origine de l'ADCC. Il a été montré dans la LLC, où les niveaux d'expression de CD20 sont faibles, que les cellules circulantes ne sont pas tuées par le RTX mais sont recouvertes de fragments C3 (70) et que des cellules effectrices ont des récepteurs permettant de reconnaître les cellules recouvertes et ainsi induire leur mort (71). D'autre part, il a été montré que le dépôt de fragments C3 pouvait interférer avec la reconnaissance de la partie Fc du complexe RTX/CD20/LB par le CD16 du NK (blocage de l'accès) et ainsi inhiber la réaction d'ADCC (72). Il est donc très important de bien connaître les effets cytotoxiques du RTX dans les différents compartiments (sang versus tumeur) afin d'améliorer le traitement de ces différentes pathologies, notamment avec les nouveaux anticorps anti-CD20. Il ne faut pas non plus négliger le rôle fondamental des cellules effectrices du système immunitaire dans l'efficacité du traitement par RTX et qui vont pouvoir être « dépassées » à un certain moment par le nombre de complexes LB/RTX.

2. Résistance par saturation du mécanisme de CDC

Le système de cytotoxicité dépendant du complément peut être saturé suite au traitement par le RTX. Ceci est bien illustré dans la LLC, où la densité de lymphocytes B tumoraux peut être très élevée dans le sang, on observe que l'activité du complément est déplétée dans le sérum suite à l'injection de RTX (70) et malgré le fait que les cellules soient saturées par le RTX (en injectant des doses importantes), la CDC est inefficace. Chez un patient atteint de LLC ayant une densité de cellules tumorales circulantes moyenne, le titre du complément n'a été restauré qu'une semaine plus tard suivant l'injection et après la deuxième cure de RTX (dans un traitement de 4 cures à une semaine d'intervalle), le titre est resté bas jusqu'à plus d'un mois après. Ceci a été observé chez d'autres patients et le temps de restauration du titre de complément reste variable selon les patients. Une alternative à ce problème serait l'injection de plasma fraîchement décongelé comme source de complément pour augmenter la CDC induite par le RTX (73). Une autre stratégie de résistance exploitée par les cellules cancéreuses consistant en l'expression à la surface de la membrane de protéines régulatrices du complément (mCRPs), tels que le CD46 (MCP), le CD55 (DAF), le CD35 (CR1) et le CD59, a été particulièrement étudiée. Le CD46, le CD55 et le CD35 bloquent la cascade du complément à l'étape d'activation du C3 ; le CD59, quant à lui, empêche l'assemblage du complexe d'attaque membranaire du complément (MAC). Ces protéines ont pour objectif de protéger les tissus normaux d'une attaque accidentelle par le complément activé, mais aussi malheureusement, de conférer une résistance aux cellules cancéreuses en limitant ainsi l'effet de l'activité CDC des anticorps thérapeutiques. Le niveau d'expression des protéines régulatrices sur les cellules malignes est très variable, mais il est maintenant démontré que certaines tumeurs expriment des niveaux plus élevés que le tissu normal à partir de laquelle elles ont évolué (74). Le blocage de ces protéines, notamment par des anticorps neutralisants, a montré une meilleure activité anti-tumorale du RTX (75).

3. Résistance par saturation du mécanisme d'ADCC

Il a été rapporté dans la littérature que le mécanisme d'ADCC pouvait lui aussi être saturé. En effet, les cellules NK, principales médiatrices de l'ADCC, ne peuvent pas tuer toutes les cellules B recouvertes de RTX. Une cellule NK est capable de détruire, au mieux, quatre lymphocytes sur lesquels le RTX s'est fixé (76). De plus, la fixation du CD16 (FcγRIIIa) sur les LB opsonisés par le RTX va entraîner une internalisation, le CD16 ne sera ainsi plus disponible à la surface de la cellule NK pour tuer d'autres LB (77). Une étude *in*

vivo a même montré qu'après ADCC par la cellule NK, la réexpression du CD16 à sa surface et la restauration de la cytotoxicité requièrent au minimum 24 heures (78). De plus, la présence d'un polymorphisme pour le FcγRIIIa expliquerait l'origine d'une diminution de l'ADCC. En effet, les patients hétérozygotes (ayant une valine en position 158) ont un récepteur CD16 de moins bonne affinité et ont donc une ADCC moins efficace que les patients homozygotes (79).

4. Résistance par le phénomène de Shaving

Nous venons de voir que l'ADCC et la CDC sont des processus qui peuvent être saturés. Les complexes RTX/CD20 peuvent aussi être soumis à un processus qui influe beaucoup sur l'activité de l'anticorps. Ce phénomène a d'abord été décrit dans d'autres systèmes en tant que modulation antigénique (80), il se nomme processus de « Shaving ». Cette réaction est médiée par des FcγR présents sur des cellules effectrices (Monocyte, Macrophages) (81). Comme son nom le suggère, ce processus enlève de la cellule les complexes CD20/RTX sans que celle-ci ne soit tuée. Ce n'est pas une internalisation comme habituellement retrouvée dans le processus de modulation, mais bien un système qui enlève les complexes de la cellule (70). Les macrophages pourraient réaliser à la fois de la phagocytose des LB tumoraux et à la fois, grâce à leur FcγRI, du shaving de complexes RTX/CD20. Ainsi, les LB non-tués n'expriment plus le CD20 et ne seront donc plus la cible du RTX (82). Après opsonisation de la cellule donneuse avec le RTX, elle est amenée à proximité de la cellule acceptrice, grâce à la reconnaissance de la fixation du RTX par le FcγRI de la cellule acceptrice, en formant ainsi une synapse immunologique (83), (84). Les petites régions de fragments de membrane contenant les complexes RTX/CD20 sont alors pincées hors de la cellule donneuse et intériorisées par le monocyte / macrophage accepteur. Ce processus, un type d'endocytose, est appelé trogocytose, et a été décrit pour les lymphocytes T et B et pour les cellules NK (84), (85), (86).

5. Résistance par perte de l'expression du CD20

Il a également été observé, chez certains patients, une perte permanente de l'expression de CD20 après traitement par le RTX, notamment dans les tumeurs de patients atteints de

lymphomes B. Cette perte pourrait être due à la prolifération d'un clone CD20 négatif obtenu suite à une mutation (87). Cette mutation du gène CD20 peut avoir lieu en différentes localisations : délétions au niveau du C-terminal ou au niveau transmembranaire... Il serait ainsi possible que les mutations au niveau de la partie codant pour la région C-terminal de la protéine CD20 soient associées à la rechute et / ou à la résistance des patients au RTX (88). Malheureusement, une autre étude portant sur une cohorte de patients atteints de lymphomes diffus à grandes cellules (264 biopsies au diagnostic et 15 à la rechute), n'a pas montré de corrélation entre la présence de mutations au niveau de l'épitope de reconnaissance du RTX et la rechute (89).

Un autre mécanisme à l'origine de la perte de l'expression du CD20 à la surface de la cellule pourrait être dû à des phénomènes épigénétiques. En effet, une équipe a rapporté que le traitement de cellules CD20 négatives d'un patient par un agent modulant l'acétylation des histones (Trichostatin A) restaurait à la fois l'ARNm et l'expression à la surface de CD20 (90). Une autre étude a confirmé ces résultats en utilisant cette fois-ci un agent déméthylant (le 5-aza-2'-deoxycytidine) pour le traitement de cellules de patients toujours CD20 négatives *in vitro* (91); laissant suggérer une implication partielle de mécanismes épigénétiques dans les résistances au RTX. Pour lutter contre ce mécanisme, des études préliminaires se proposent d'utiliser l'association entre le RTX et des drogues modulant l'épigénétique, telles que les inhibiteurs d'histones désacétylases (HDAC), afin d'améliorer le traitement des patients résistants. Une première étude a ainsi montré *in vitro* et *in vivo* le bénéfice d'une telle association qui se traduit par une augmentation de l'apoptose induite par le RTX (92). Une seconde étude plus récente montre que l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC, en augmentant l'expression de CD20, augmente l'activité CDC du RTX *in vitro* (93).

Les travaux de l'équipe de Czuczman laissaient suggérer un autre mécanisme à la fois pré-transcriptionnel et post-transcriptionnel à l'origine d'une modulation de l'expression de CD20 suite au traitement par RTX. Ils ont ainsi montré que le système ubiquitine-protéasome pouvait être en partie impliqué dans les mécanismes de résistance au RTX, avec une dégradation partielle de la protéine CD20 en C-terminal. Grâce à des inhibiteurs du protéasome, l'expression de CD20 a pu être augmentée et par conséquent la CDC a pu être partiellement restaurée (10). Malheureusement, des études plus récentes montrent que l'expression de CD20 est en fait régulée par le système ubiquitine-protéasome et par le système lysosome / autophagosome et qu'ainsi l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome, tels

que le Bortezomib, n'est pas aussi efficace dans la lutte contre les résistances au RTX (94), (95).

Enfin, des études démontrent que le microenvironnement tumoral (ou stroma) peut également interférer dans l'activité anti-tumorale du RTX au sein des tissus. C'est un mécanisme dominant de résistance au RTX (96) et cibler cet élément peut s'envisager comme une stratégie thérapeutique d'intérêt dans le traitement des hémopathies B matures (97).

Pour limiter ces résistances au traitement, la recherche actuelle se penche sur différents projets tels que : la modification du déroulement des protocoles de traitement par le Rituximab, la possibilité de le coupler avec des isotopes radioactifs et on recherche aussi des thérapeutiques basées sur d'autres anticorps ciblant le CD20 ainsi que d'autres cibles tels que le CD19 ou le CD22 (98), (99).

IV. Apport de la radioimmunothérapie dans la prise en

charge des LNH

A. Définition

Il s'agit d'une méthode de radiothérapie qui consiste à irradier des petites tumeurs disséminées dans l'organisme après injection intraveineuse d'un anticorps porteur d'une forte radioactivité et qui a la propriété de se fixer sélectivement sur les cellules tumorales (Figure 9).

B. Principe

C'est au début des années cinquante qu'était explorée pour la première fois, sur des modèles précliniques, la possibilité de cibler des tumeurs avec des anticorps couplés à des radionucléides. Ce ne sera que vingt-cinq ans plus tard que des tumeurs purent être tout d'abord localisées cliniquement grâce à des anticorps (100). Cela a conduit aux premiers produits d'immunodétection au milieu des années quatre-vingt-dix. Enfin, au début du XXIème siècle, à partir de ces découvertes sur la détection, deux anticorps radiomarqués sont autorisés pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens (101), (102), (103). Ces deux anticorps sont : le Zevalin® ([⁹⁰Y]ibritumomab tiuxetan) et le Bexxar® ([¹³¹I]tositumomab), ils sont indiqués dans le traitement des LNH folliculaires réfractaires à la chimiothérapie avec ou sans transformation. Ces anticorps radiomarqués sont des anticorps murins, ils ciblent tous les deux le CD20 et sont couplés un à l'Yttrium 90 et l'autre à l'Iode 131, tous deux émetteurs de particules β . La fixation des isotopes radioactifs est obtenue grâce à un agent chélateur, un isothiocyanatobenzyl dérivé de l'acide polyaminocarboxylique DTPA qui stabilise l'ensemble anticorps-isotope radioactif.

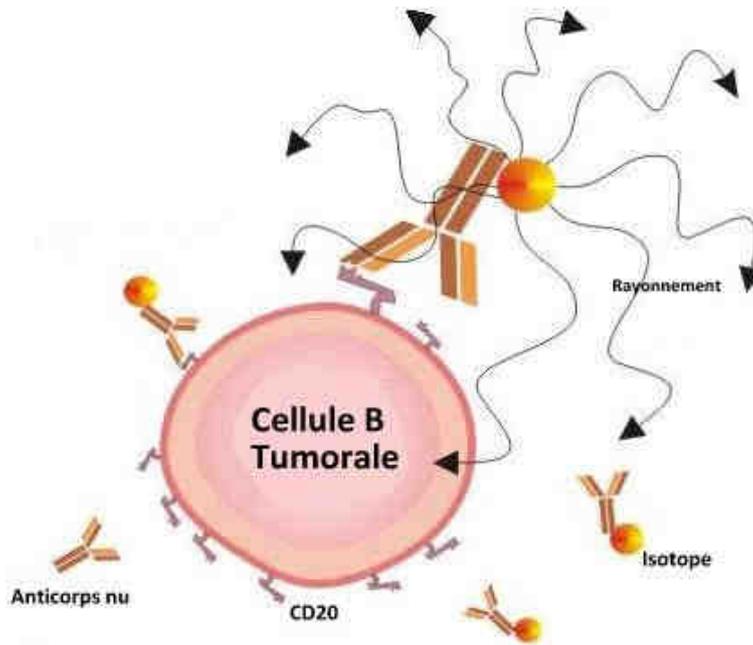


Figure 9 : Principe de la RIT. Modifié d'après : lymphomation.org

1. L'activité du radiomarquage

En RIT, c'est la toxicité médullaire qui permet de déterminer les doses toxiques, elles sont évaluées à 150-200 cGy. Notons que la réponse totale au traitement des patients réfractaires à la chimiothérapie par ces deux anticorps ne diffère pas. Ceci suggère que le choix du radionucléide n'influe pas sur l'efficacité du traitement (104). Le radiomarquage de ces anticorps a pour objectif de vectoriser l'isotope radioactif vers les cellules cancéreuses afin de les irradier (105). L'⁹⁰Y, par exemple, permet, dans les tissus mous, une absorption de 90% de l'énergie émise par le radionucléide à 5 mm de la source de rayonnement (correspondant à un diamètre de 100 à 200 cellules), permettant ainsi de fournir un rayonnement aux cellules cibles et à celles entourant les cellules tumorales. L'activité anti-tumorale est donc due principalement à la radioactivité, transportée par l'anticorps, qui est émise de manière continue mais qui décroît de manière exponentielle avec une dose de dépôt hétérogène.

2. L'activité de l'anticorps propre

Nous savons que l'anticorps seul à une activité propre, il peut donc vraisemblablement

lui aussi contribuer à la destruction tumorale, grâce à sa capacité à reconnaître les cellules cancéreuses exprimant à leur surface le CD20, à activer le complément (CDC) et la cytotoxicité à médiation cellulaire (ADCC) et / ou à induire un arrêt de croissance ou à induire une apoptose. Une réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis des antigènes tumoraux libérés peut être engendrée après la destruction des cellules médiées par l'anticorps ou par l'isotope (103), (106). Comme nous l'avons vu, les anticorps monoclonaux sont des immunoglobulines G (IgG) soit d'origine murine soit d'origine murine et humaine (anticorps chimériques, humanisés). Ce sont des macromolécules protéiques caractérisées par un poids moléculaire important (environ 150 000 dalton ou D) comparé à celui des autres médicaments (en général inférieur à 1 000 D). Les données cinétiques concernant les anticorps monoclonaux sont bien particulières et sont déterminantes pour la compréhension de la RIT.

Les anticorps monoclonaux sont administrés par voie intraveineuse ou par voie intramusculaire. La cible est constituée d'une protéine circulante dans le sang ou la lymphe ou bien d'une protéine cellulaire, elle-même circulante et / ou localisée à certains organes. La phase de distribution apparaît déterminante pour les anticorps à visée tissulaire et globalement on observe qu'ils diffusent assez mal et de manière hétérogène dans les tumeurs. Cette hétérogénéité de la distribution tumorale d'un anticorps monoclonal a pu être démontrée récemment, *in vivo*, chez 20 patients, en utilisant la tomographie d'émission de positons (107). On constate que la distribution dépend de la physiologie tumorale et des caractéristiques de l'anticorps. Plus précisément, certains paramètres liés à la vascularisation de la tumeur (perméabilité, débit sanguin), la différence de pression observée entre le capillaire tumoral et le liquide interstitiel semblent déterminer la distribution tumorale (108), (109). Mais le principal facteur limitant la diffusion tumorale des anticorps apparaît être l'affinité pour l'antigène membranaire cible et l'intensité de l'expression antigénique, c'est le concept de la barrière antigénique développé par Weinstein à la fin des années 1980 (110), (111). Ainsi, la captation spécifique de l'anticorps en périphérie tumorale limite la diffusion au sein de la tumeur. Le poids moléculaire peut également constituer un facteur limitant. Dès lors, les fragments Fab (poids moléculaire 50 000 D) ou scFv (poids moléculaire 27 000 D) présentent une diffusion plus rapide et plus homogène que l'anticorps entier dans un modèle murin porteur de xénogreffes (112). Les IgG restent concentrées à proximité des vaisseaux sanguins sur une distance de 40 μ m (soit environ deux couches cellulaires) (112). Néanmoins, l'utilisation des fragments Fab est limitée par leur demi-vie d'élimination courte (< 12 heures)

et par l'absence du fragment Fc impliqué dans l'activité cytotoxique. Compte tenu de leur rapide élimination, la fraction captée par la tumeur se révèle être inférieure à celle d'une IgG.

3. La cinétique

Très peu de données sont disponibles sur les voies d'élimination des anticorps monoclonaux. En utilisant les connaissances que nous avons sur les IgG endogènes, les anticorps monoclonaux semblent catabolisés dans les cellules du lit vasculaire (cellules endothéliales). Les IgG endogènes sont les protéines plasmatiques qui présentent la demi-vie d'élimination la plus longue, environ trois semaines. Cette longue demi-vie est liée à un récepteur saturable appelé FcRn situé dans les cellules endothéliales, les cellules intestinales et rénales (113), (114). Le récepteur FcRn possède deux propriétés : le passage transcellulaire et le recyclage cellulaire (113). D'après le modèle proposé par Junghans et Anderson, les IgG sont captées à l'intérieur des cellules par pinocytose (115). Elles se lient aux récepteurs FcRn en milieu acide par l'intermédiaire de leur fragment Fc puis sont transférées à la surface cellulaire pour être à nouveau disponibles. Les IgG non liées aux récepteurs FcRn dans les vésicules de pinocytose (IgG en excès) sont transférées vers des lysosomes pour être dégradées (115). L'absence de fragment Fc ou l'origine murine (moindre affinité) expliquent en partie la demi-vie courte de l'abciximab (fragment Fab) et du muromonab (IgG murine) comparée à celle des autres anticorps monoclonaux chimériques ou humanisés (7 à 18 heures versus 8 à 28 jours). La présence du récepteur FcRn au niveau intestinal et rénal chez l'homme laisse envisager un passage transcellulaire des IgG au niveau de ces organes. L'excrétion rénale des anticorps monoclonaux actuellement commercialisés n'est pas documentée, sinon de manière indirecte. Par exemple, l'insuffisance rénale ne semble pas avoir d'impact sur l'élimination du trastuzumab chez l'homme (116).

Par rapport aux médicaments « classiques », un rapport molaire élevé existe entre la cible (antigène) et l'anticorps (117). En d'autres termes, les concentrations plasmatiques de l'anticorps sont susceptibles d'être déterminées par l'intensité de l'expression antigénique. La normalisation des posologies au poids est contestable pour un anticorps monoclonal. Compte tenu de leur poids moléculaire élevé, ces molécules diffusent peu et ont un volume de

distribution faible correspondant au volume sanguin ; celui-ci est directement corrélé à la surface corporelle et non au poids (118). L'adaptation à la surface corporelle serait théoriquement plus licite. Néanmoins, la variabilité cinétique des anticorps monoclonaux apparaît supérieure à la variabilité de la surface corporelle observée chez l'adulte (10 à 15 %). En l'absence de données montrant un impact du poids ou de la surface corporelle sur la clairance systémique, la posologie devrait être fixe. Cette démarche éviterait les erreurs de calcul de doses et favoriserait l'utilisation de conditionnements entiers. Une alternative à la dose fixe ou normalisée pourrait être l'adaptation posologique au volume de la masse tumorale comme cela a été suggéré pour le Rituximab (119).

4. Augmentation de l'activité vis à vis de l'anticorps nu

Dans la RIT, le marquage et donc cette vectorisation vers les cellules cancéreuses permet d'augmenter significativement l'efficacité des anticorps radiomarqués par rapport à des anticorps nus (non radiomarqués comme le Rituximab). En effet, un essai randomisé comparant l'efficacité du Rituximab et du Zevalin®, a démontré que l'anticorps radiomarqué (Zevalin®) était plus efficace statistiquement que l'anticorps nu (Rituximab) pour améliorer les taux de réponse globaux et complets du lymphome au traitement (120). Les rémissions induites par le Zevalin® sont également plus durables que celles induites par des anticorps nus (121). Il est important pour cette thérapeutique de prendre en compte un certain nombre de données afin d'avoir une efficacité maximale. Il faut effectivement étudier la physiologie de la tumeur et la pharmacologie du couple anticorps-radionucléide et prendre en compte la vascularisation et les différentes barrières qui empêchent ou limitent l'activité de l'anticorps. Enfin, il ne faut pas négliger la toxicité sur la moelle épinière de cette thérapeutique causée par la clairance plus ou moins rapide de l'anticorps (103). D'autres effets secondaires sont à mentionner : la chute des cheveux et la mucite ainsi que les nausées, ils sont néanmoins peu fréquents pour ces deux médicaments (103). Enfin, ces deux anticorps étant des anticorps murins, des effets secondaires de type anaphylactique peuvent survenir lors de la reconnaissance des anticorps murins par le système immunitaire. Le patient produit alors des anticorps humains dirigés contre ces anticorps de souris (HAMA). Cette réponse immunitaire est généralement limitée chez les patients traités auparavant par chimiothérapie.

C. La RIT en une étape

La RIT est utilisée actuellement dans le cadre du traitement des LNH folliculaires résistants à la chimiothérapie. Le Zevalin® et le Bexxar® sont donc utilisés après une chimiothérapie et en une seule étape (Figure 10). Le Bexxar® est un double émetteur, il émet en effet des rayonnements gamma et bêta. L'émission bêta est de l'ordre de 0,81 MeV. Son rayon d'action est de 0,8 mm et sa demi-vie de 8 jours. Le Zevalin®, quant à lui, n'émet que du rayonnement bêta mais avec cinq fois plus de puissance 2,3 MeV. Son rayon d'action est plus fort (5 mm) et sa demi-vie est plus courte donc plus intéressante (2,7 jours) (122). Par ailleurs, la clairance biologique du Bexxar® est rapide alors que celle du Zevalin® est plutôt lente. La distribution non tumorale diffère aussi, elle se situe au niveau thyroïdien pour le Bexxar® et au niveau osseux pour le Zevalin®. Le Bexxar® est administré après une étude préthérapeutique de la dose administrable chez le patient ; le Zevalin®, quant à lui, est administré sur la base de la masse corporelle. Chacun de ces deux médicaments nécessite, avant l'administration de l'anticorps radiomarqué, l'administration préalable de l'anticorps froid (non couplé au radionucléide). Pour le Zevalin®, on administrera tout d'abord du Rituximab et pour le Bexxar®, son anticorps froid (103). Le schéma du ⁹⁰Y-ibritumomab peut-être commodément administré sur une semaine en ambulatoire. Au jour 1, le Rituximab à 250 mg/m² est perfusé et dans les 4 heures suivant la fin, une dose traceuse de ¹¹¹In-ibritumomab, 5 mCi, est administrée en 10 minutes. Un balayage gamma est effectué une fois passées 24 - 72 heures pour confirmer la biodistribution attendue. Au jour 8, l'injection de Rituximab est répétée à 250 mg/m², et la dose thérapeutique de ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxétan est administrée (123). Après le traitement par l'⁹⁰Y-ibritumomab tiuxétan, les patients n'ont pas besoin d'un isolement particulier et les seules précautions contre les rayonnements sont seulement minimales, comme éviter le contact avec des fluides corporels dans la première semaine suivant le traitement (124), (123). En raison de la variabilité individuelle de la clairance du ¹³¹I-tositumomab chez les patients, une dose dosimétrique constituée de 10 mg de l'anticorps marqué avec environ 5 mCi d'Iode¹³¹ est administrée pendant 30 minutes. En utilisant un scintillateur NaI et une caméra gamma, le dénombrement de la radioactivité totale du corps est obtenu et la cinétique de la clairance totale est mesurée sur trois points dans le temps afin de calculer les millicuries nécessaires pour produire une dose corporelle totale thérapeutique de 75 cGy pour les patients avec un nombre de plaquettes supérieur à 150000 ×

10^9 /mL et 65 cGy pour les patients ayant une numération plaquettaire de 100.000 à $149\ 000 \times 10^9$ /mL. Comme l'anticorps ^{131}I -conjugué est métabolisé, les métabolites libres d'Iode 131 sont libérés dans la circulation sanguine et rapidement excrétés dans l'urine. Les patients reçoivent 120 mg d'iodure de potassium par jour, comme blocage thyroïdien, administré 24 heures avant la dose dosimétrique et à continuer pendant 14 jours après l'administration thérapeutique. Les politiques institutionnelles varient en ce qui concerne l'administration en milieu hospitalier ou en clinique externe de ^{131}I -tositumomab (125), (126), (127).

Toujours dans le cadre de la RIT, on cherche actuellement à définir la place de cette dernière dans les premières lignes de traitement. Des études ont été mises au point pour évaluer cette possibilité de traitement chez des patients n'ayant pas subi de chimiothérapie préalablement. Ainsi, des patients ont été traités avec une simple dose de Bexxar®, soit l'administration après l'étude préthérapeutique du Tositumomab seul, puis, une semaine après, de l'anticorps radiomarqué. Ce dernier délivre alors une dose équivalente à 75 cGy dans le corps total. Dans cette étude, il a été constaté qu'un seul traitement par le ^{131}I -Tositumomab a entraîné un taux de 95 % de réponse globale et de 75 % de réponse complète. Il est estimé que 77 % des patients avec une rémission complète est resté indemne de la maladie à cinq ans. En outre, une rémission moléculaire (translocation BCL2 indétectable) a été obtenue chez 80 % des patients évaluable qui avaient une réponse complète à six mois. Le traitement a été associé à une toxicité hématologique modérée et réversible, et aucun cas de syndrome myélodysplasique ou de leucémie myéloïde aiguë n'a été observé pendant une durée médiane de suivi d'un peu plus de cinq ans. Kaminski et al concluent qu'un seul traitement d'une semaine de ^{131}I -tositumomab comme traitement initial peut induire des rémissions prolongées cliniques et moléculaires chez des patients atteints de lymphome folliculaire avancé.(128).

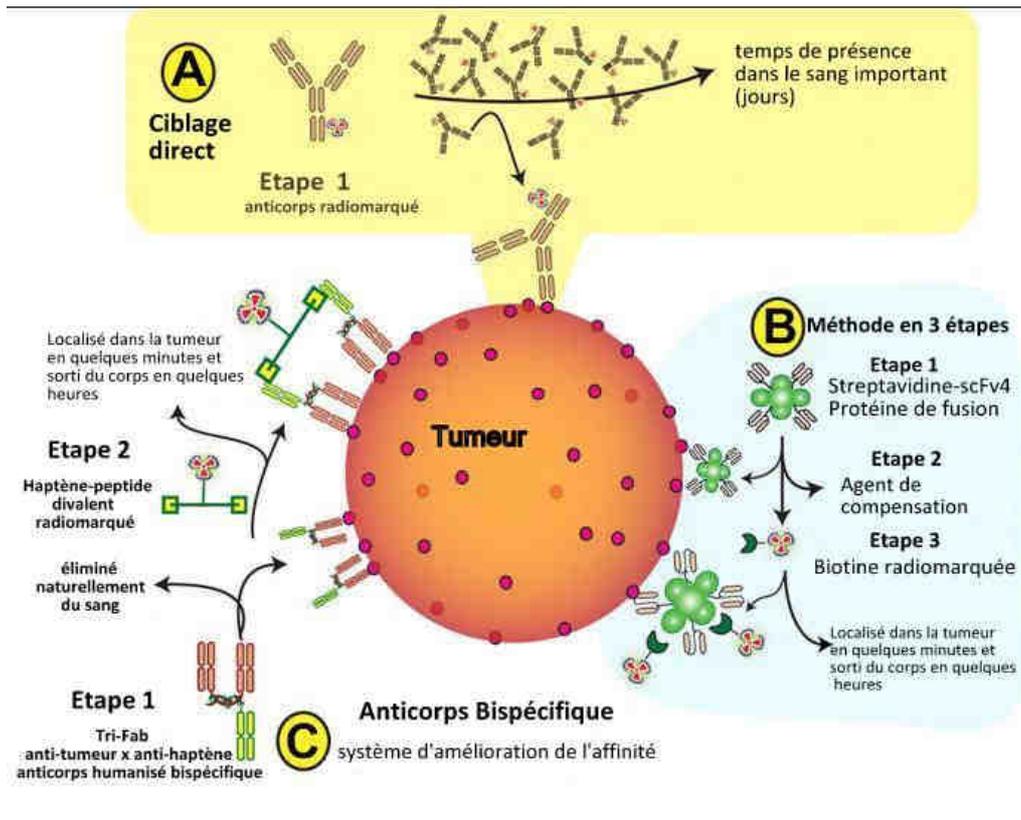


Figure 10 : Principales méthodes pour la radio-immunothérapie : (A) conventionnel directement anticorps radiomarqué. (B) la radio-immunothérapie en trois étapes (RIT préciblée) utilisée par Pagel et al, 4 injections comprenant de la streptavidine conjuguée à un anticorps, puis un agent de compensation, et ensuite application de la biotine radiomarquée. (C) En deux étapes, anticorps bispécifique trivalent, RIT préciblée "système d'amélioration de l'affinité". Le système est injecté et se lie à la tumeur avec deux des trois bras. il est suivi par l'injection d'un haptène-peptide radiomarqué qui se lie au troisième bras de ce système une fois le surplus de celui-ci éliminé du sang naturellement. Modifié D'après Goldenberg (129)

D. La RIT en plusieurs étapes selon la technique du préciblage

Une autre approche dans le traitement par RIT est celle du préciblage, ce système est à l'étude pour augmenter l'efficacité de la RIT en effectuant des RIT séquentielles. La plupart des patients ayant reçu de la RIT sont susceptibles d'avoir des rechutes, ceci à cause des rayonnements absorbés qui sont relativement faibles, résultant de doses insuffisantes de rayonnement sur les sites tumoraux à éradiquer. Les doses de RIT sont limitées par la toxicité associée à l'exposition aux rayonnements par les organes sains. La RIT préciblée (PRIT) est une stratégie qui a le potentiel de réduire de manière significative ces toxicités tout en

augmentant son efficacité, ceci en dissociant l'anticorps de la livraison du rayonnement.

1. La méthode en trois étapes

Bien qu'il existe plusieurs approches pour « présignaler », la méthode dans cette étude utilise un anticorps non radioactif conjugué à la streptavidine qui est injectée et va se fixer sur les cellules tumorales. Après le temps nécessaire pour que l'accumulation de l'anticorps soit maximale sur les sites de fixations tumoraux, un agent synthétique de compensation biotinylé est administré, ce qui élimine les anticorps non liés de la circulation sanguine. Il s'ensuit l'injection d'une dose thérapeutique de DOTA-biotine radiomarquée. La DOTA-biotine est petite et pénètre rapidement dans les tumeurs où elle se lie à la streptavidine conjuguée à l'anticorps, délivrant ainsi une dose de rayonnement ciblé aux tumeurs. Les molécules non fixées de DOTA-biotine radiomarquées sont rapidement éliminées de la circulation sanguine et sont excrétées dans l'urine (Figure 10). Cette méthode diminue notablement le temps durant lequel les organes sains sont exposés au rayonnement, permettant de limiter la toxicité (130), (131), (132), (133), (134).

2. Le système d'amélioration de l'affinité

Barbet et al ont, pour leur part, travaillé sur un haptène bivalent qui permet une liaison de coopération, ainsi ils lient deux anticorps bispécifiques à la surface des cellules tumorales en utilisant l'haptène bivalent comme un pont (Figure 10). La construction de ce « système d'amélioration d'affinité » emploie des fragments Fab d'anticorps anti-tumoraux et des fragments Fab d'anticorps anti-haptènes (Figure 11). La cyclisation spontanée de l'haptène bivalent avec les deux molécules bispécifique $F(ab')_2$ liées aux deux antigènes stabilise le radioligand à la surface de la cellule tumorale. Cette approche a donné des résultats impressionnants à la fois dans l'imagerie et dans les applications thérapeutiques (135).

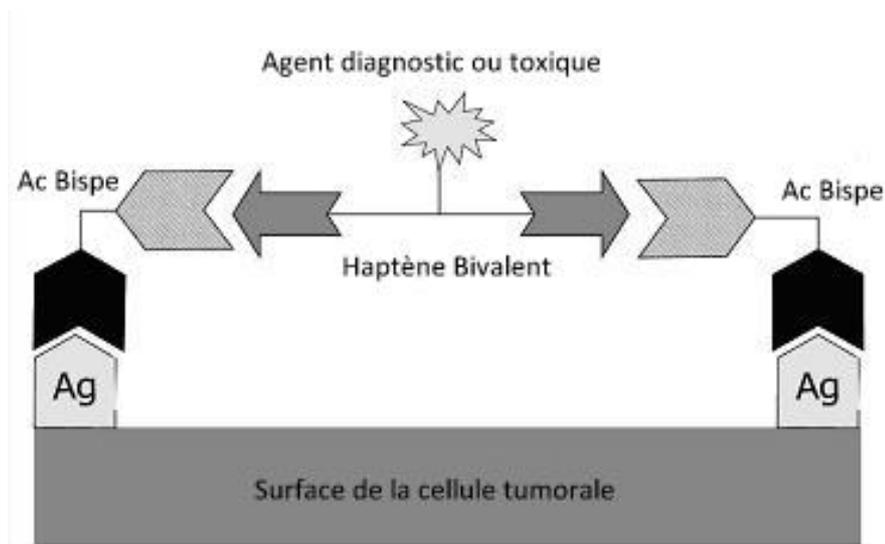


Figure 11 : système d'amélioration de l'affinité d'après Chang et al. (135)

3. Le système « dock an lock »

Cette même équipe a conçu plus récemment, dans la même veine que leur « système d'amélioration de l'affinité », une nouvelle technologie appelée la méthode « dock and lock » (accoster et attacher) (Figure 12). Elle utilise la liaison naturelle entre les sous-unités de régulation de l'adénosine monophosphate cyclique, protéine kinase dépendante et les domaines d'ancrage des protéines kinases d'ancrage pour coupler quantitativement et spécifiquement les sites des différentes sous-unités modulaires biologiques dans diverses applications médicales, y compris la radio-immunothérapie préciblée (136).

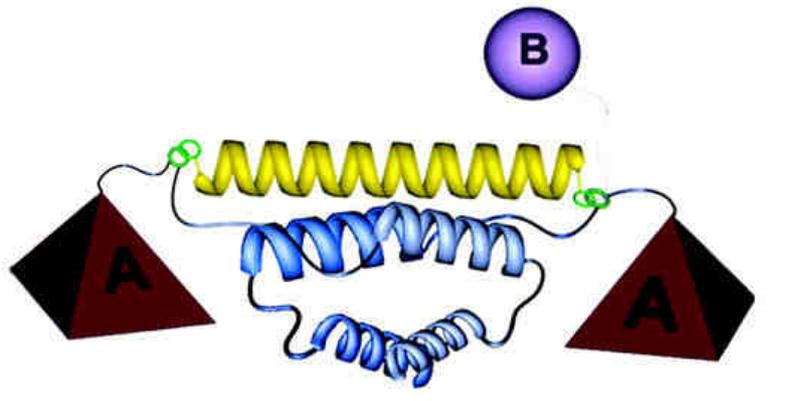


Figure 12 : Système Dock and Lock d'après Rossi et al (136). Les hélices α impliquées dans l'interaction de liaison entre la sous-unité de la protéine kinase A (PKA : en bleu) et la zone d'ancrage de la protéine kinase A d'ancrage (AKAPs : en jaune) permettent de fournir un module de liaison préférentiel pour l'amarrage de deux types d'entités, A et B, qui sont ensuite verrouillées par des liaisons disulfures (montré par les anneaux entrelacés). Ces complexes multivalents contiennent toujours deux copies de l'entité A.

Ils ont généré des complexes de liaison bispécifiques trivalents composés de trois fragments Fab liés de façon stable, capables d'une distribution sélective de radiotraceurs aux xénogreffes de cancers humains. Cela permet une amélioration rapide et significative du ciblage et de l'imagerie dans les cancers (137), (104).

L'impulsion pour le développement de la méthode « Dock and Lock » était sans doute liée aux limites des technologies existantes pour la production d'agents basés sur des anticorps ayant des fonctions multiples ou des spécificités de liaison. Pour les agents générés par génie recombinant, ces limites comprennent le coût de fabrication élevé, les rendements d'expression faible, l'instabilité dans le sérum, la formation d'agrégats ou de sous-unités dissociées, une composition de lot indéfini en raison de la présence de formes de produits multiples, la présence de produits de contamination secondaire, la réduction des activités fonctionnelles ou de l'affinité / avidité de liaison attribuée à des facteurs stériques ou des conformations altérées, etc. Pour les agents générés par diverses méthodes de réticulation chimique, le coût de fabrication élevé et l'hétérogénéité du produit purifié sont deux préoccupations majeures. Bien sûr, les protéines de fusion innovantes créées par les technologies recombinantes peuvent être intégrées dans des structures plus complexes pour

obtenir des attributs supplémentaires, ce qui est hautement souhaitable, mais pas techniquement possible, dans la construction individuelle d'ingénierie. À ce jour, ces objectifs sont généralement atteints avec des succès divers par l'application judicieuse des chimies de conjugaison. Des stratégies nouvelles qui sont basées sur la liaison de l'enzyme au substrat (138) ou d'un inhibiteur (139), ou l'interaction à haute affinité entre deux fragments de RNase I humaine (140), (141), pour attacher deux ou plusieurs fractions de fonctions distinctes dans un assemblage covalent ou quasi-covalent ont été rapportées, mais ces méthodes sont lourdes et peuvent donc limiter leur utilisation à grande échelle (136).

E. Association de la RIT à d'autres thérapeutiques pour améliorer son efficacité

Les possibilités d'associations thérapeutiques avec la chimiothérapie et avec d'autres anticorps monoclonaux à potentiel thérapeutique sont aussi un des grands axes de recherche pour augmenter l'efficacité de la RIT (142).

1. Association de la RIT à la chimiothérapie

C'est ce qui a été mis en place par exemple dans l'équipe de Press et al. Ils ont étudié la possibilité de combiner un protocole de chimiothérapie de type CHOP (cyclophosphamide, vincristine, adriamycine, prednisone) au I-131 tositumomab sur des patients atteints d'un LNH de type folliculaire et non encore traité. Plus précisément, ils ont traité les patients avec six cycles de protocole CHOP suivi 4 à 8 semaines plus tard du protocole d'administration du Bexxar® vu précédemment. D'autres équipes ont étudié l'utilisation de la RIT en association avec d'autres protocoles de chimiothérapie comme le protocole CVP (cyclophosphamide, vincristine, prednisone) (143) ou simplement trois cycles de fludarabine (144). Un autre type d'approche combinait, lui, un anticorps puis une chimiothérapie et enfin de la RIT : quatre semaines de Rituximab seul, suivi de trois cycles de Rituximab plus CHOP et enfin cinq semaines plus tard du Zevalin® (145). Pour finir, une dernière équipe a exploré un protocole composé de trois cycles de traitement Rituximab plus CHOP suivi après rémission de la moelle osseuse d'un traitement par le Zevalin® et terminé par des injections 4 fois par

semaine de Rituximab, une à deux semaines après la RIT(146). Chacune de ces études montre que la RIT est bien tolérée après la chimiothérapie. En effet, les différentes toxicités induites par la RIT (hématologique ou non) sont modérées. Elles démontrent aussi que la RIT convertit beaucoup de rémission partielle en rémission complète (121), jouant ainsi un rôle non négligeable dans la consolidation de thérapeutique (147).

2. Utilisation de la RIT à dose myéloablativ

Une autre approche possible consiste à utiliser la RIT à dose myélo-ablative en conditionnement d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques. En partant du constat que de nombreux patients atteints de LNH et en rechute ont plus de 60 ans et qu'ils refusent alors souvent une thérapeutique agressive à haute dose et une transplantation cellulaire, des études ont été menées pour déterminer si la RIT ne pouvait pas être utilisée dans ce cas là. En effet, avec une activité plus ciblée sur les tumeurs, les effets secondaires pourraient être moindre et faciliter ainsi la transplantation chez ces patients. Les patients ont donc reçu des perfusions de Tositumomab marqué avec 185 à 370 MBq à des fins de dosimétrie suivie, dix jours plus tard, par des injections thérapeutiques de [131I] tositumomab (de 12,1 à 42,7 Gbq) pour délivrer 25 à 27 Gy aux organes critiques normaux (foie, poumon, rein) qui reçoivent la plus forte dose de rayonnement. La greffe est quant à elle réalisée environ deux semaines après le traitement. Il est observé une réelle efficacité et sécurité de ce protocole (148). D'autres équipes ont ajouté à ce protocole de transplantation une chimiothérapie (étoposide et cyclophosphamide) (149). D'autres groupes ont publié des protocoles similaires (seules les chimiothérapies varient) avec des résultats tout aussi prometteur (150), (151), (152). Dès lors, il est possible de conclure que différentes études ont démontré que des patients en rechute de LNH traités avec de hautes doses de RIT et une transplantation cellulaire semblent être définitivement guéris (121).

3. Stratégie d'augmentation de la distribution de l'anticorps

Une autre stratégie à l'étude pour améliorer l'activité de la RIT passe par l'augmentation de la distribution des anticorps à la tumeur. Différentes modalités ont en effet été étudiées pour modifier la distribution de l'anticorps, par exemple l'administration conjointe d'interféron pour augmenter l'expression de l'antigène et augmenter ainsi le ciblage des cellules. Les résultats de cette étude montre une augmentation importante de la dose

absorbée par la tumeur de l'ordre de vingt fois plus que lors d'une irradiation externe. Néanmoins, la toxicité médullaire est augmentée (153), (154). De nombreuses études ont aussi recherché à modifier la vascularisation des tumeurs grâce à l'hyperthermie, les radiations, ou des principes actifs pour augmenter la quantité d'anticorps fixés sur la cible (155). On trouve aussi des études portant sur l'administration conjointe du peptide C5a humain, il permettrait d'augmenter sa fixation et son efficacité chez la souris nude, ceci en augmentant la perméabilité des vaisseaux entourant la tumeur aux macromolécules que sont les anticorps. Cette étude montre que l'administration conjointe des deux traitements permet de multiplier par deux le temps de quadruplement de la tumeur Tq. La réponse tumorale aux traitements est donc augmentée et sans effets secondaires supplémentaires (156). Enfin, d'autres méthodes utilisent l'activité anti-angiogénique de certains principes actifs avec la RIT. Les agents anti-angiogéniques, qui ciblent normalement la prolifération des cellules endothéliales, ont le potentiel de fournir une inhibition relativement non toxique et continue de la croissance des tumeurs en bloquant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins. Ils peuvent ainsi agir en synergie avec la RIT et en augmenter l'efficacité de 15 à 50 % ainsi que l'apoptose sans augmenter par ailleurs la toxicité de la thérapeutique (157), (158).

4. Stratégie de ciblage de différents antigènes dans un même protocole

Des études portent aussi sur la possibilité de cibler dans un même protocole différents antigènes à la surface des cellules de lymphomes (131). Les autres antigènes qui peuvent être ciblés en plus du CD20 sont par exemple le CD19 et le CD22 qui sont exprimés exclusivement dans les lymphocytes B et pas dans les cellules progénitrices. En effet, la plupart des autres antigènes possibles sont exprimés sur d'autres cellules hématopoïétiques et dans diverses lignées : CD37, HLA-DR, CD74, CD138 ou CD45, ils ne peuvent donc pas être utilisés. Des études combinant par exemple un anti-CD20 nu et un anti-CD22 radiomarqué ont montré la réelle efficacité de cette association malgré une forte toxicité hématologique. L'efficacité était notable, d'ailleurs, que l'anti-CD20 soit injecté un jour avant ou six jours après l'anti-CD22 (159). Ces résultats sont explicables par l'action synergique de l'anticorps nu avec sa capacité cytotoxique propre et la RIT. Cliniquement, le début du traitement avec l'anticorps anti-CD20 nu permettrait de réduire l'effet d'« évier » des cellules B qui peuvent potentiellement affecter l'absorption des anti-CD22-radioisotopes par la tumeur, parce que les

anticorps radiomarqués se fixent aussi des cellules B normales. Parce que tous les anticorps se lient aux cellules normales et malignes, la grande concentration de cellules B dans la rate (B normales et malignes) agit comme un évier, en prenant la petite quantité de radioisotopes à partir du sang avant qu'il ait eu l'occasion de circuler et de se localiser dans tous les sites tumoraux (159).

5. Utilisation d'autres émetteurs de particules

En dehors de l'association à différentes stratégies pour améliorer les performances de la RIT, certaines équipes se sont penchées sur l'utilisation d'autres émetteurs (Tableau 4). D'autres émetteurs de particules ont en effet été étudiés, c'est le cas des émetteurs Alpha comme le bismuth 212 et le bismuth 213 qui sont élués respectivement de générateurs à Radium 234 et à Actinium 225 (160), (161). L'Astatine 211 produite par un cyclotron à aussi été développée pour la RIT (162); (98). Ces radionucléides sont des émetteurs avec un TEL (quantité d'énergie transférée par une particule ionisante traversant la matière) élevé par rapport aux transmissions β . Un si haut taux de TEL engendre d'important effets sur l'ADN, comme des ruptures de brins qui peuvent être ciblés sur les cellules tumorales puisque les rayonnements α sont de courte portée. D'où un intérêt certain de cette RIT α dans le traitement de micrométastases ou de cellules tumorales circulantes et non pas dans les cancers trop volumineux (104). Les autres émetteurs possibles sont les émetteurs Auger qui ont été démontrés comme très actifs sur des modèles animaux avec des LNH humains disséminé (163). Cependant, du fait de leur faible énergie, un grand nombre de particules Auger doivent être administrées afin de tuer une cellule.

Isotope	$t_{1/2}$ (h)	Emission	Energie max (keV)	Rayon max des particules (mm)
Iode -131 (^{131}I)	193	β	610	2.0
Yttrium-90 (^{90}Y)	64	β	2,280	12.0
Lutetium-177 (^{177}Lu)	161	β	496	1.5
Cuivre -67 (^{67}Cu)	62	β	577	1.8
Rhenium-186 (^{186}Re)	91	β	1,080	5.0
Rhenium-188 (^{188}Re)	17	β	2,120	11.0
Bismuth-212 (^{212}Bi)	1	α	8,780	0.09
Bismuth-213 (^{213}Bi)	0.77	α	>6,000	<0.1
Astate -211 (^{211}At)	7.2	α	7,450	0.08

Tableau 4 : Les isotopes radioactifs utilisables en RIT avec leur demi-vie, leur type

d'émission, l'énergie produite et le rayonnement des particules. d'après Goldenberg et Sharkey (104)

6. Amélioration de la RIT par humanisation de l' anticorps

Les anticorps en eux-mêmes étant sans doute à l'origine d'une partie de l'activité de la RIT, l'humanisation des anticorps fait partie des innovations en mesure d'améliorer cette thérapeutique (Figure 13). Le but ultime de l'humanisation d'un anticorps est de produire des régions variables proches des régions humaines sans que l'anticorps humanisé perde l'affinité et la spécificité de l'anticorps murin. Pour atteindre ce but, il faut transférer dans un cadre humain « accepteur » des acides aminés des régions CDR provenant de l'anticorps monoclonal « donneur » d'origine murine. Ce concept repose sur le fait que les six régions CDR des régions variables des chaînes lourdes et légères contiennent la majorité des acides aminés constituant le site de liaison de l'antigène. En greffant les CDR provenant d'un anticorps monoclonal murin (l'anticorps « donneur ») dans des régions variables humaines (l'anticorps « accepteur »), on attend que les CDR murins puissent remplacer les CDR humains sans affecter la structure du site de liaison de l'antigène formé par les CDR murins. Cette humanisation limite ainsi la possibilité de reconnaissance des anticorps par le système immunitaire du patient. Pour le CD20, il a été produit un certain nombre d'anticorps tel l'Ofatumumab dont nous avons déjà parlé, qui a été testé précliniquement et a montré une activité importante avec une cytotoxicité due au complément forte (CDC) grâce sa grande capacité de fixation du C1q à la surface de la cellule (15).

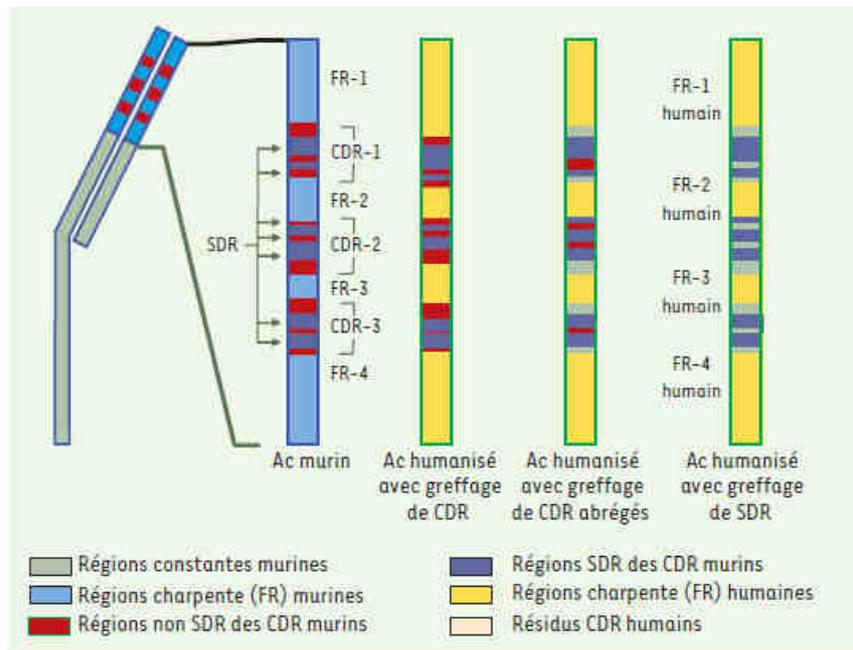


Figure 13 : Les différentes régions de l'anticorps utilisées lors du processus d'humanisation. CDR : région déterminante complémentaire ; SDR : résidu déterminant spécifique (acide aminé des régions CDR critique dans l'interaction antigène-anticorps) ; CDR abrégés : portions des CDR contenant les résidus SDR . D'après Tamura et al (164)

Il est envisageable qu'il y ait à l'avenir des modes d'expression de protéines de signalisation cellulaire qui seront prédictifs de la réponse ou de la résistance à la thérapie par RIT, peut-être aussi pourront-ils nous donner un aperçu de la combinaison d'agents qui amélioreront la réponse ou nous permettront de surmonter la résistance. Pour les lymphomes, l'apoptose semble être un chemin décisif pour la mort cellulaire et il est probable que la radio-immunothérapie joue un rôle dans la mort cellulaire par apoptose grâce à des mécanismes de signalisation cellulaire(165).

V. Apport du modèle de LNH canin dans l'évaluation pré-clinique de la RIT :

A. Les cancers du chien

Les cancers chez les chiens sont depuis quelque temps devenus un enjeu majeur pour la médecine vétérinaire. En effet, on estime qu'un chien de plus de deux ans sur quatre mourra du cancer et certaines races très populaires sont surreprésentées en termes d'incidence du cancer et de la mortalité (166), (167). La prévalence du cancer chez les chiens a augmenté au cours des dernières années. Cela peut être dû à une augmentation de la population de chiens à risque pour le développement du cancer, au résultat d'une augmentation réelle de l'incidence du cancer et / ou à la prise de conscience et l'intérêt dans la communauté des propriétaires d'animaux de compagnie de poursuivre jusqu'au bout les diagnostics et les traitements. Une autre explication possible est que les progrès dans le soin des animaux a permis aux chiens de vivre plus longtemps grâce à une meilleure nutrition, à la vaccination pour les maladies infectieuses courantes, à la tenue en laisse qui limitent les décès par accident automobiles et à la disponibilité de méthodes de diagnostic plus sophistiquées et des traitements pour de nombreuses affections auparavant considérées comme dangereuses. Ainsi, la meilleure santé générale des animaux de compagnie a entraîné une augmentation de maladies liées au vieillissement, y compris le cancer (168).

B. Les lymphomes Canins

Le lymphome du chien est très commun chez le chien et il a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années parce qu'il est un des plus facilement curables (169). Des hémopathies malignes du chien, les lymphomes sont les plus fréquents, ils représentent 83 % des hémopathies et 7 à 24 % des tumeurs canines (170). Aux USA, l'incidence des lymphomes canins est de l'ordre de 13 à 24 cas pour 100 000 chiens (171). En France, l'incidence annuelle s'élève à 6,95 cas pour 100 000 chiens (172). Chez les jeunes chiens, le risque de développer un lymphome est faible (1,5/106 pour les chiens de moins d'un an) et plus élevé pour les chiens plus âgés (84/106 pour les chiens de 10 à 11 ans) (173). Cependant,

les chiens étant encore peu diagnostiqués et traités, ces données sont sans doute à revoir à la hausse. On observe par ailleurs une certaine prédisposition de certaines races. Ainsi le Scottish Terrier, le Boxer, le Saint Bernard, le Bouvier des Flandres et le Rottweiler semblent plus sujets aux lymphomes que d'autres races (171). Le sexe, quant à lui, ne semble pas intervenir dans la prédisposition ; contrairement au lymphome humain où les hommes sont les plus atteints, chez le chien on retrouve autant de cas chez le mâle que chez la femelle(171).

1. Etiologies

Contrairement à l'homme où les étiologies sont bien connues comme les facteurs génétiques, environnementaux ou infectieux, pour les chiens on ne peut définir que des facteurs de risques potentiels car aucune étude n'a pu définir de véritables étiologies. Néanmoins, les similitudes de répartition entre les lymphomes humains et canins sur le territoire français présagent une possible utilisation du chien comme indicateur de facteurs de risque de LNH humains (173).

2. Clinique

Les lymphomes peuvent être classés selon leurs localisations anatomiques : Le lymphome multicentrique est la forme clinique la plus fréquente chez le chien, suivi par la forme digestive, la forme cutanée, la forme médiastinale et les formes des sites extra-ganglionnaires (Tableau 5). Tout comme chez l'homme, les localisations peuvent être très variées et les signes observés sont dus au lymphome et à ses conséquences. La classification clinique est la seule actuellement définie et simple des lymphomes canins. Or, les signes cliniques ne sont pas forcément très spécifiques et surtout les évolutions cliniques peuvent être très différentes, ce qui suggère l'adoption de critères supplémentaires pour différencier les lymphomes (169).

3. Diagnostic

Le diagnostic des lymphomes canins repose sur un certain nombre de critères relativement bien codifiés actuellement. On tiendra compte des données de l'examen clinique, de l'évaluation de l'état de l'animal, puis des paramètres biologiques et de l'imagerie pour

obtenir un bilan d'extension. Le diagnostic de certitude repose sur l'examen cytologique et histologique de la tumeur, on pourra recourir aux données immunologiques et de biologie moléculaire pour approfondir le diagnostic.

LYMPHOMES		FREQUENCES RELATIVES
MULTICENTRIQUE		80 à 85 %
DIGESTIF		7 %
CUTANE	Epithélioïtrophe T	3 à 8 %
	Non Epithélioïtrophe	
MEDIASINAL		5 %
SITES EXTRA GANGLIONNAIRES	Oculaire	< 3 %
	Nerveux	
	Intravasculaire	
	Rénal	
	Cardiaque	
	Hépatosplénique	
	Vésical	
	Osseux	

Tableau 5 : Les localisations des lymphomes canins et leurs fréquences d'après Magnol et al (174)

4. Classification

Dès 1973, la recherche a démontré que les lymphomes canins pouvaient être traités par des protocoles de chimiothérapie de type CVP (cyclophosphamide, vincristine, prednisone) (175). D'autres études ont par la suite montré l'efficacité d'autres protocoles mais il a aussi été montré des variations très importantes de réponse à ces thérapeutiques (176), (177), (178), (179), (180), (181). La raison principale est sans doute le fait que le lymphome était alors traité comme une seule maladie. Hors, comme les lymphomes humains, les lymphomes canins se retrouvent sous diverses formes et répondent donc différemment à un même traitement. Dès lors, les objectifs de la recherche furent de trouver les marqueurs susceptibles d'identifier les différents lymphomes, de poser un diagnostic et d'établir un pronostic (178), (176). Les premiers critères utilisés ont été le sexe, l'âge, la masse corporelle et la race des animaux ; malheureusement il y avait peu de lien avec les réponses

thérapeutiques. Il a ensuite été question d'étudier les stades tumoraux et l'immunophénotype pour voir son influence sur le pronostic ; malheureusement aucun véritable lien n'a pu être établi. Chez l'homme, différentes classifications des LNH ont été établies avec différents critères morphologiques, immunophénotypiques et génotypiques et ce depuis un certain nombre d'années (Tableau 6). Une des classifications les plus récentes est appelée système de classification REAL (Revised European American Lymphoma) et est issue des connaissances cumulées des classifications du NCI et de Kiel. Il serait bien sûr d'un intérêt majeur d'obtenir ce même type de classification pour les lymphomes canins. Or, les différentes tentatives ont montré une limite. Il est vraisemblable que les tumeurs canines présentent beaucoup moins de diversité histologique que chez l'homme. Néanmoins, la classification de Kiel semble être le système le plus approprié pour les lymphomes malins canins, car elle ne met que faiblement l'accent sur l'architecture, qui est presque toujours diffuse chez le chien, et elle a aussi permis une plus grande subdivision des lymphomes de haut grade (182), (171). L'OMS a aussi mis à jour une classification des tumeurs hématopoïétiques des animaux domestiques (183). Toutefois, la valeur pronostique de cette classification n'a pas été validée dans des études cliniques. Par contre, les résultats rapportés par le Dr Ponce et al dans un numéro de la Revue vétérinaire (184) représente un développement très important dans la classification des lymphomes canins. Ils ont utilisé une mise à jour du classement de Kiel (185) pour fournir une classification cliniquement pertinente du lymphome canin. En utilisant cette classification morphologique dans 57 cas cliniques, ils étaient en mesure d'identifier des sous-ensembles de lymphomes canins, qui étaient corrélées non seulement avec la présentation clinique, mais aussi avec la réponse au traitement et le pronostic. C'est précisément l'information dont les vétérinaires ont besoin pour aider les propriétaires à prendre des décisions sur le traitement (169).

Classification Lymphomes	Date	Commentaire
Humain		
Gall et Mallory	1942	Première ébauche, critères de distinctions des entités peu précis (ex distingue pas LNH et Maladie de Hodgkin).
Rappaport	1966	Basée uniquement sur la morphologie cellulaire et histologique. Reconnaît une corrélation entre l'aspect clinique et histologique.
Luke et Collins (US)	1974	Basée sur les lignées cellulaires et les altérations morphologiques liées aux transformations lymphocytaires. Classée en fonction du type T ou B.
Kiel (EU)	1974	Inclut certaines leucémies tel que la LLC. Construite selon l'idée que l'aspect cytologique peut grader la malignité et donc l'évolution du lymphome.
Formulation international de travail à usage clinique (NCI)	1982	Consensus de travail. Division en trois grades de malignités différentes (faible, intermédiaire, élevée). Fondée sur l'architecture et la morphologie.
Kiel Actualisée	1988	Intègre les progrès génétiques immunocyto / histochimiques. Se base sur la morphologie et l'immunophénotypage. Différencie haut et bas grade.
REAL	1994	Classe plus de 95% des Lymphomes. Toutes les données : immunophénotypiques, cytogénétiques, moléculaires et cliniques. Abandon du « grade ».
OMS	2001 et 2008	Même principe que la REAL. Nouveaux marqueurs apportent des compléments diagnostiques et pronostiques. Tient compte de l'âge du patient.
Canin		
Rappaport	Essai :1994	Inadaptée : manque de valeur pronostique et de précision . Lymphomes histiocytaires par exemple regroupe des entités très variées (171).
Formulation de travail à usage Clinique	Essai :1997	Imprécisions et difficulté d'uniformisation des études (185), (182), (186).
Kiel	Essai : 1994	Plus adaptée : car met peu l'accent sur l'architecture. Subdivision plus importante des lymphomes de hauts grades (les plus fréquents chez les chiens) (171) (169) On retrouve des équivalents homme-chien (185).
Kiel Actualisée	Essai : 1997	Bonne corrélation entre les critères morphologiques et l'immunophénotype. La plus appropriée des classifications humaines grâce à la subdivision selon les sous types et les immunophénotypes.
OMS des animaux domestiques	2002	Non validée par des études cliniques.

Tableau 6 : Historique des classification des lymphomes humains et canins

C. Traitements des lymphomes canins

Le lymphome est un des cancers hématologiques le plus fréquent chez le chien. Au cours des 30 dernières années, la pratique de soin pour les chiens souffrant d'un lymphome de haut grade est passé d'un protocole avec un seul produit, à un protocole de chimiothérapie combinée qui se poursuit indéfiniment, pour arriver enfin à une version abrégée de ce dernier (6 mois ou moins) (Annexe III). Malheureusement, même avec de multiples stratégies, la survie médiane globale avec un traitement agressif ne s'est pas améliorée au-delà de 12 mois. Actuellement, la plupart des protocoles thérapeutiques utilisés en oncologie chez le chien n'ont pas été développés initialement pour cette espèce, ils dérivent plutôt des thérapeutiques humaines (187).

- La Prednisone utilisée seule est un bon compromis pour avoir une efficacité relative et un moindre coût. La myélosuppression est absente mais certains effets secondaires propres à la prednisone demeurent et une résistance à la chimiothérapie peut être observée si le propriétaire veut poursuivre avec un traitement plus puissant (187).
- L'adriamycine utilisée seule est une autre option efficace pour la gestion des lymphomes. C'est un produit relativement peu coûteux et globalement bien toléré par la plupart des chiens. Le protocole est court et relativement simple et une étude ne signale aucune différence dans la durée médiane de rémission ou de survie globale chez les chiens traités avec la doxorubicine en monothérapie par rapport aux chiens traités avec une chimiothérapie à base de doxorubicine en association (188). Néanmoins, comme toute chimiothérapie, cette stratégie présente des effets secondaires tel que la myélosuppression et de possibles troubles gastro-intestinaux.
- Une des associations possibles se compose de la Lomustine et de la Prednisone. Elle peut de par sa toxicité engendrer de profondes neutropénies et une potentielle hépatotoxicité. À ce jour, peu de solutions ont été trouvées pour limiter cette hépatotoxicité. Pourtant très efficace, cette thérapeutique nécessite une grande prudence dans son utilisation. Elle n'est cependant pas conseillée en première ligne de

traitement. On conseillera plutôt d'utiliser la Lomustine en association à la Prednisone et à la L-asparaginase comme une option de secours lors d'une rechute (189).

- Une autre association possible qui a été très utilisée dans le passé est le protocole CVP (cyclophosphamide, vincristine, prednisone). Il a l'avantage d'inclure relativement peu de médicaments et est peu onéreux. Par contre, de par l'association, il cumule les possibilités d'effets secondaires des trois drogues telles que la cystite hémorragique due au cyclophosphamide ou l'irritation périvasculaire après extravasation due à la vincristine. Enfin, on trouve d'autres inconvénients tels que la longueur du protocole (cf. annexes) et le fait que certains articles font état de plus courtes périodes de contrôle de la maladie et de survie globale (176).
- Enfin, le protocole le plus utilisé en médecine vétérinaire est le protocole CHOP (cyclophosphamide, vincristine, adriamycine et prednisone). Il est le plus fréquent car le plus efficace, on obtient en effet un contrôle moyen de la maladie de 9 mois et une survie médiane de 13 mois. Dans ce protocole-ci aussi on cumule les effets secondaires des différents principes actifs : la cystite hémorragique limitable par le furosémide, la myellosuppression et la toxicité gastro-intestinale et des toxicités périvasculaires dues à l'extravasation. Ce qui reste le plus discuté dans cette stratégie thérapeutique est la durée de traitement. On retrouve des protocoles allant de 12 à 25 semaines et d'autres qui se prolongent sur des durées supérieures à 78 semaines et avec les mêmes résultats (190), (191), (192). Généralement, ce sont les protocoles brefs qui sont recommandés principalement pour des raisons de logistique et financières pour le propriétaire et de qualité de vie pour l'animal. En effet, pour suivre des protocoles de chimiothérapie, il faut faire de nombreuses et régulières visites chez le vétérinaire. Le faible nombre de centres de radiothérapie existant en France engendre en plus une possible hospitalisation de l'animal et donc une nécessaire mobilité du propriétaire. Enfin, le coût important du traitement et des examens complémentaires (numération formule sanguine, échocardiographie...) n'est pas négligeable. Par exemple, il faut compter pour un protocole COPLA, 370 euros pour l'induction et 360 de plus pour deux mois de maintenance.
- Notons également qu'un certain nombre d'adjuvants thérapeutiques sont évalués pour le traitement des lymphomes chez le chien. En effet, les radiothérapies adjuvantes sont

à l'étude ainsi que les greffes de moelle osseuses. Les radiothérapies n'ont pas montré de résultats probants (193) ; par contre les greffes ont montrées une durée de survie médiane de 139 semaines (194).

Afin de pouvoir effectuer un pronostic, les vétérinaires et chercheurs ont recherché une concordance entre des facteurs pronostics et les résultats de la thérapeutique. Malheureusement, parmi les différents facteurs pronostics étudiés pour les lymphomes canins, beaucoup sont controversés et donc peu fiables. A titre d'exemple, les principaux facteurs étudiés sont : l'âge et le sexe, la durée de la première rémission (DR) et la durée de survie globale (DS), qui serait meilleure pour les chiens de 4 à 8 ans (173) et les femelles auraient un meilleur pronostic que les mâles (195). Les grades histologiques seraient aussi intéressants, la DR et DS seraient plus courtes pour les grades élevés mais le taux de réponse serait plus grand (selon la classification de Kiel) (171). Un stade clinique faible serait aussi de meilleur pronostic (171). Les marqueurs d'activité cellulaire Ki-67 et AgNORs pourraient eux aussi présager de la DR (196), (197). Enfin, une hypercalcémie et une corticothérapie avant le traitement induirait une DR plus courte (182), (198).

D. Intérêt du modèle préclinique canin

1. Les modèles classiques : les modèles murins

Les modèles animaux sont utilisés pour le développement de nouvelles technologies et les modèles les plus couramment utilisés sont les modèles murins. Ils permettent en effet de démontrer l'efficacité de ces nouvelles approches, d'en évaluer la toxicité associée et de les comparer aux traitements de référence. Cependant, les souris qui sont fréquemment utilisées à cet effet en raison de leur taille permettant de travailler sur des cohortes, ne peuvent pas nous apporter de conclusions satisfaisantes. Les modèles murins de cancer ont en effet été extrêmement utiles pour l'analyse de la biologie des voies impliquées dans l'initiation du cancer, la promotion et la progression de ce dernier (Tableau 7). Cependant, ils n'ont souvent pas pu répondre correctement aux attentes des chercheurs dans certaines des caractéristiques qui définissent le cancer chez les humains. Ainsi, l'instabilité génomique, les longues périodes de latence et l'hétérogénéité des cellules tumorales et de leur microenvironnement n'ont pas

pu être convenablement recréées avec ces modèles. Plus importante encore, la biologie complexe de récurrence du cancer et des métastases, partie intégrante des résultats chez des patients humains, n'est pas correctement reproduite dans les modèles de souris immunodéprimées greffées par des lymphomes humains utilisés classiquement. Les modèles de tumeurs syngéniques ou induites chez la souris permettent en partie de contourner ces limites, mais ne sont pas disponibles pour les lymphomes.

Modèle de tumeur	
Tumeur humaine greffée	Chez les souris nude
Tumeur spontanée	Chez des souris mutées ou transgéniques
Tumeur induite chimiquement ou physiquement	Pas disponible pour les lymphomes
Tumeur syngénique (issue de la même espèce)	Pas disponible pour les lymphomes

Tableau 7 : Les différents modèles de tumeurs utilisables dans la recherche contre le cancer.

2. Alternative d'un grand intérêt : Le modèle canin

Il existe en revanche une alternative possible dans les lymphomes du chien et du chat qui eux présentent un grand intérêt. De nouveaux protocoles cliniques peuvent assurément être mis en place, grâce aux tumeurs spontanées du chien qui présentent une diversité histopathologique et génétique comparable aux tumeurs humaines (168), (199). En effet, les critères histologiques de classification utilisés en clinique humaine sont aussi pertinents pour le lymphome canin et permettent de définir dans cette espèce des sous-types tumoraux correspondants (200). Par exemple, les lymphomes B diffus à grandes cellules chez l'homme ont un pendant chez le chien nommé lymphome immunoblastique et centroblastique B canin. Les marqueurs immunohistochimiques utilisés chez les hommes sont eux aussi pertinents pour la classification des tumeurs canines. La réponse au traitement et les situations de récurrence sont également comparables (187). L'opposé est aussi vrai, des médicaments qui ne sont pas efficaces chez le chien ne le sont pas non plus chez l'homme (201).

Cette forme d'étude du cancer et la thérapie chez le chien atteint de cancer n'est pas un concept nouveau. En effet, cela fait 30 à 40 années que des chercheurs l'utilisent. Cette

approche a apporté des contributions importantes à la compréhension et la pratique de l'oncologie humaine dans des domaines aussi variés que la radiobiologie (202), l'hyperthermie (203), la biologie des tumeurs et de l'immunologie fondamentale (204), (205), (206) et les thérapies systémiques pour les cancers, y compris le lymphome, l'ostéosarcome, le mélanome, et d'autres (205), (207), (199), (208). Ces études chez le porteur sont très intéressantes puisqu'elles permettent de travailler sur des cancers d'origine naturelle contrairement à ceux qu'on implante chez la souris. Ces tumeurs naturelles se développent dans un contexte immunitaire normal et intact et la tumeur est de la même origine que l'hôte et le microenvironnement, alors que dans les modèles murins, ce sont des lymphomes humains qu'on implante. Par conséquent, les facteurs qui influencent la croissance de la tumeur chez l'animal sont les mêmes que chez l'homme (environnement, âge, sexe, poids, nutrition, statut de reproduction) (209), (210). De même, grâce à cette origine naturelle et par le fait de sa diversité des cancers très comparable à l'homme, on peut observer et donc étudier dans ce modèle canin des résistances au traitement, des récurrences et des métastases tout comme chez les patients humains (166), (199).

La similitude entre l'homme et le chien se retrouve aussi au niveau des gènes impliqués dans la cancérisation. Des études ont en effet montré une homologie significative entre le chien et l'homme pour les gènes reconnus comme associés au cancer comme MET, IGF1R, mTOR, et KIT (211). De même, les anomalies cytogénétiques qui définissent les cancers humains, c'est à dire les translocations Bcr-Abl dans la leucémie myéloïde chronique et la délétion RB1 dans la leucémie lymphoïde chronique ont été trouvés dans des cancers canins comparables (212).

Dans le cas du lymphome, l'expression du CD20 est quasiment semblable entre le chien et l'homme. Les séquences d'acides aminés du CD20 canin ont 73% de similitude avec la séquence du CD20 humain contre 68% avec celle de la souris (Tableau 8). Le CD20 canin contient des domaines de séquences d'acides aminés comprenant deux domaines extracellulaires (EM), quatre domaines transmembranaires (TM), et trois domaines intracellulaires (IC) comme dans le CD20 humain. Enfin, l'ARNm du CD20 canin a été détecté dans les PBMC et les ganglions lymphatiques de chiens sains, et dans des cellules B de lymphomes canins, mais pas dans les cellules de lymphome à cellules T et les cellules de lymphome non-T et non à cellules B par analyse RT-PCR. Grâce à ces résultats, il est possible

de dire que le CD20 canin pourrait être ciblé pour la thérapie d'anticorps monoclonaux contre le lymphome à cellules B de chiens (33), (213).

CD20	Humain	Canin	Murin
	Séquences acides aminés	73 % de similitude	73 % de similitude
	Deux domaines extracellulaires (EM), quatre domaines transmembranaires (TM), et trois domaines intracellulaires (IC)	Structures identiques	Structures identiques
	Expression limitée aux cellules B	oui	oui
	Fonction de canal calcique		oui

Tableau 8 : Comparaison des CD20 murin et canin avec le CD20 humain

La forte incidence du lymphome chez le chien permet d'avoir accès à un nombre important de modèles dans les CHUV (centre hospitalier universitaire vétérinaire) et dans la clientèle privée. La clientèle privée est en effet souvent motivée pour participer à l'avancée de la lutte contre le cancer humain et canin et permet ainsi un fort recrutement nécessaire aux études.

VI. CONCLUSION

Le traitement des lymphomes B non Hodgkiniens (LNH) est actuellement fondé, comme nous l'avons vu, sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Mab) tels que le Rituximab ciblant le CD20 à la surface des cellules cancéreuses. Le CD20 est exprimé dans les cellules pré-B, cette expression est maintenue durant le développement de ces lymphocytes B mais elle disparaît de ceux circulant dans le plasma. Cette cible est d'un grand intérêt pour la recherche de thérapeutiques, car elle est surexprimée à la surface de la majorité des lymphomes de type B. La grande boucle semble contenir les épitopes reconnus par une grande partie des anticorps anti-CD20 produits jusqu'à aujourd'hui et à la surface des cellules, le CD20 a été décrit comme étant sous forme d'un homo-multimère, probablement un tétramère complexe. La fonction du CD20 a été longtemps débattue, nous savons désormais que son rôle principal est d'amplifier le signal calcique transmis par le BCR pendant la phase de reconnaissance de l'antigène par les cellules de type B. Son niveau d'expression est particulièrement important et homogène dans toutes les tumeurs malignes des cellules B excepté dans les leucémies lymphoïdes chroniques où son taux d'expression est plus variable. L'intérêt pour la cible CD20 allant grandissant, un grand nombre d'anticorps ont été développés.

Les lymphomes non Hodgkinien (LNH) se situent au sixième rang des cancers les plus fréquents en France et au neuvième rang en terme de mortalité environ. On distingue, au sein des LNH, différentes formes. Elles se différencient anatomopathologiquement, phénotypiquement et ont en plus certaines particularités. On distingue aussi des groupes comprenant les formes « agressives » et les formes « indolentes », caractérisées par des comportements cliniques et des modes évolutifs différents qui guident ensuite l'approche thérapeutique. Quel que soit leur stade au moment du diagnostic, plusieurs options thérapeutiques existent ; elles reposent sur la chimiothérapie, l'immunothérapie, la

radiothérapie ou la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Le traitement de référence et de première intention est une immunochimiothérapie. Malgré les améliorations de la survie globale (OS) par l'ajout systématique dans le traitement du Rituximab, un tiers des patients a une maladie qui est soit réfractaire à la thérapie initiale soit en rechute après un traitement standard.

La RIT semble dès lors une possible alternative dans le traitement du LNH. Cette méthode de radiothérapie qui consiste à irradier des petites tumeurs disséminées dans l'organisme après injection intraveineuse d'un anticorps porteur d'une forte radioactivité et qui a la propriété de se fixer sélectivement sur les cellules tumorales semble en effet très prometteuse. L'activité anti-tumorale est due principalement à la radioactivité, transportée par l'anticorps, qui est émise de manière continue mais qui décroît de manière exponentielle avec une dose de dépôt hétérogène. Par ailleurs, l'anticorps étant lui même actif seul, il peut vraisemblablement contribuer à la destruction tumorale, grâce à sa capacité à reconnaître les cellules cancéreuses exprimant à leur surface le CD20, à activer le complément (CDC) et la cytotoxicité à médiation cellulaire (ADCC) et / ou à induire un arrêt de croissance ou à induire une apoptose. Cette thérapeutique est actuellement utilisée en une étape avec de nets résultats même sur des lymphomes en rechute. De nombreuses études recherchent à améliorer son efficacité en l'utilisant différemment. La RIT préciblée (PRIT) a le potentiel de réduire de manière significative la toxicité tout en augmentant son efficacité, ceci en dissociant l'anticorps de la livraison du rayonnement. La RIT peut être aussi associée à la chimiothérapie et utilisée à dose myélo-ablative en conditionnement d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques. D'autres stratégies à l'étude pour améliorer l'activité de la RIT passent par l'augmentation de la distribution des anticorps à la tumeur, l'utilisation d'autres émetteurs de particules et l'humanisation des anticorps. Afin d'optimiser l'efficacité de cette thérapeutique, un certain nombre d'axes de recherche restent à étudier. Pour réaliser ces projets, les modèles pré-cliniques sont indispensables. Ils permettent en effet de démontrer l'efficacité de ces nouvelles approches, d'en évaluer la toxicité associée et de les comparer aux traitements de référence. Cependant, les rongeurs qui sont fréquemment utilisés à cet effet en raison de leur taille permettant de travailler sur des cohortes, ne peuvent pas nous apporter de conclusions satisfaisantes.

Les nombreux succès dans ce domaine démontrent l'intérêt du modèle canin et de la

thérapeutique humaine utilisée chez le chien. De nouveaux protocoles cliniques peuvent assurément être mis en place, grâce aux tumeurs spontanées du chien qui présentent une diversité histopathologique et génétique comparable aux tumeurs humaines. En effet, les critères histologiques de classification utilisés en clinique humaine sont aussi pertinents pour le lymphome canin et permettent de définir dans cette espèce des sous-types tumoraux correspondants. Les marqueurs immunohistochimiques utilisés chez les hommes sont eux aussi pertinents pour la classification des tumeurs canines. La réponse au traitement et les situations de récurrences sont également comparables. Ce modèle est très intéressant pour la recherche dans la thérapeutique humaine mais aussi dans la thérapeutique canine. Les cancers chez les chiens sont en effet devenus un enjeu majeur pour la médecine vétérinaire et le lymphome du chien a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années parce qu'il est un des plus facilement curables. Au cours des 30 dernières années, la pratique de soin pour les chiens souffrant d'un lymphome de haut grade est passée d'un protocole avec un seul produit, à un protocole de chimiothérapie combinée qui se poursuit indéfiniment, pour arriver enfin à une version abrégée de ce dernier (6 mois ou moins). Malheureusement, même avec de multiples stratégies, la survie médiane globale avec un traitement agressif ne s'est pas améliorée au-delà de 12 mois. Les lymphomes humains, les lymphomes canins se retrouvent sous diverses formes et répondent donc différemment à un même traitement. La classification de Kiel semble être le système de classification le plus approprié pour les lymphomes malins canins et elle permet d'établir des corrélations homme-chien.

L'intérêt du modèle canin et de la thérapeutique humaine utilisée chez le chien est donc indéniable. C'est dans cette optique que le projet dans lequel j'ai été impliqué a été mis en place. Il s'agissait d'établir des protocoles de RIT des lymphomes B chez le chien ciblant le CD20 afin de trouver des réponses pour la thérapeutique humaine. Tout d'abord, il faudra valider la correspondance entre les sous-types de lymphomes B canins et humains. Elle sera mise en évidence en comparant les critères histologiques, immunohistologiques et transcriptomiques et potentiellement génétiques (collaboration avec équipe « génétique du chien », UMR 6061, Rennes, Dr Catherine ANDRE). Il faudra ensuite produire les immunogènes sous forme de peptides (CD20) et isoler des anticorps (partie sous traitée). Ces anticorps seront ensuite caractérisés, c'est-à-dire qu'il faudra mesurer leur affinité sur des lignées de cellules canines exprimant l'antigène et valider ces anticorps en immunohistochimie et en imagerie SPECT. Il s'agira par la suite de constituer les essais

thérapeutiques. Le diagnostic sera tout d'abord posé, il faudra pour cela procéder à l'analyse transcriptomique et histologique des lymphomes canins et définir un sous-type tumoral représentatif des LNH humains. Puis les essais en tant que tels pourront débuter ; ils consistent en une radio-immunothérapie ciblant CD20 ou CD22 après une chimiothérapie d'induction courte (Prednisone + une simple dose de L-Asparaginase). Ces données devront être comparées avec un autre groupe ayant subi, lui, un protocole de chimiothérapie COPLA complet. La valeur de RIT effectuée à la suite d'une induction de chimiothérapie courte est en effet un enjeu crucial chez les humains.

L'évaluation de la réponse tumorale au traitement sera réalisée à l'aide de techniques comme l'échographie, l'hématologie et la biochimie. On pourra aussi suivre la réponse tumorale par TEP-FDG (tomographie par émission de position alliée au 18-Fluorodesoxyglucose) comparée à l'immuno-TEP à l'aide du Mab anti CD20 couplé à des émetteurs de positons produits au cyclotron ARRONAX : 64Cu, 68Ga.

Dès lors, l'intérêt de la RIT sera évalué dans la consolidation de la chimiothérapie grâce à des essais cliniques de phase I et II chez le chien. Tous ces essais permettront de valider le modèle de chien comme un modèle pré-clinique pertinent pour l'homme que ce soit le diagnostic, la thérapie, ou le suivi du traitement. Les essais pré-cliniques pourront enfin être étendus à l'évaluation d'autres approches thérapeutiques et / ou concerner d'autres types tumoraux. Les protocoles les plus prometteurs permettront une avancée chez l'homme tout en progressant dans la prise en charge des cancers en médecine vétérinaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J. Immunol.* 1980 oct;125(4):1678-1685.[cité 2012 mars 17]
2. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol. Today* 1994 sept;15(9):450-454.[cité 2012 mars 17]
3. Nadler LM, Ritz J, Hardy R, Pesando JM, Schlossman SF, Stashenko P. A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *J. Clin. Invest.* 1981 janv;67(1):134-140.[cité 2012 mars 17]
4. Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988 janv;85(1):208-212.[cité 2012 mars 17]
5. Ernst JA, Li H, Kim HS, Nakamura GR, Yansura DG, Vandlen RL. Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. *Biochemistry* 2005 nov;44(46):15150-15158.[cité 2012 mars 17]
6. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology* 2002 oct;107(2):176-182.
7. Liang Y, Buckley TR, Tu L, Langdon SD, Tedder TF. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. *Immunogenetics* 2001 juill;53(5):357-368.[cité 2012 juill 9]
8. Ishibashi K, Suzuki M, Sasaki S, Imai M. Identification of a new multigene four-transmembrane family (MS4A) related to CD20, HTm4 and beta subunit of the high-affinity IgE receptor. *Gene* 2001 févr;264(1):87-93.[cité 2012 juin 28]
9. Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M. The epitope recognized by rituximab. *Blood* 2006 sept;108(6):1975-1978.[cité 2012 avr 3]
10. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H, Knight J, Starostik P, Deans J, Hernandez-Ilizaliturri FJ. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin. Cancer Res.* 2008 mars;14(5):1561-1570.[cité 2012 avr 3]

11. Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2005 janv;65(1):264-276.[cité 2012 avr 3]
12. Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, Goodglick L, Bonavida B. Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res.* 2004 oct;64(19):7117-7126.[cité 2012 avr 3]
13. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res.* 2007 févr;67(3):1270-1281.[cité 2012 avr 3]
14. Tedder TF, Schlossman SF. Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1988 juill;263(20):10009-10015.[cité 2012 mars 17]
15. Teeling JL, Mackus WJM, Wiegman LJJM, van den Brakel JHN, Beers SA, French RR, van Meerten T, Ebeling S, Vink T, Slootstra JW, Parren PWI, Glennie MJ, van de Winkel JGJ. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol.* 2006 juill;177(1):362-371.[cité 2012 mars 19]
16. Du J, Wang H, Zhong C, Peng B, Zhang M, Li B, Huo S, Guo Y, Ding J. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *J. Biol. Chem.* 2007 mai;282(20):15073-15080.[cité 2012 juin 28]
17. Polyak MJ, Deans JP. Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood* 2002 mai;99(9):3256-3262.[cité 2012 mars 19]
18. Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 2008 juill;283(27):18545-18552.[cité 2012 mars 19]
19. Li H, Ayer LM, Polyak MJ, Mutch CM, Petrie RJ, Gauthier L, Shariat N, Hendzel MJ, Shaw AR, Patel KD, Deans JP. The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts: antibody binding increases the affinity of the association through an epitope-dependent cross-linking-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2004 mai;279(19):19893-19901.[cité 2012 mars 19]
20. Szöllösi J, Horejsí V, Bene L, Angelisová P, Damjanovich S. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J. Immunol.* 1996 oct;157(7):2939-2946.[cité 2012 mars 19]
21. Léveillé C, AL-Daccak R, Mourad W. CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur. J. Immunol.* 1999 janv;29(1):65-

- 74.[cité 2012 mars 19]
22. Beers SA, Chan CHT, French RR, Cragg MS, Glennie MJ. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin. Hematol.* 2010 avr;47(2):107-114.[cité 2012 mars 19]
 23. Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J. Cell Biol.* 1993 juin;121(5):1121-1132.[cité 2012 mars 19]
 24. Li H, Ayer LM, Lytton J, Deans JP. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 2003 oct;278(43):42427-42434.[cité 2012 mars 19]
 25. Parekh AB. Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels. *Cell Calcium* 2008 juill;44(1):6-13.[cité 2012 juin 25]
 26. von Schilling C. Immunotherapy with anti-CD20 compounds. *Semin. Cancer Biol.* 2003 juin;13(3):211-222.[cité 2012 mars 19]
 27. Press OW, Farr AG, Borroz KI, Anderson SK, Martin PJ. Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. *Cancer Res.* 1989 sept;49(17):4906-4912.[cité 2012 juill 1]
 28. Huh YO, Keating MJ, Saffer HL, Jilani I, Lerner S, Albitar M. Higher levels of surface CD20 expression on circulating lymphocytes compared with bone marrow and lymph nodes in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001 sept;116(3):437-443.[cité 2012 juill 21]
 29. Chilosi M, Castelli P, Martignoni G, Pizzolo G, Montresor E, Facchetti F, Truini M, Mombello A, Lestani M, Scarpa A. Neoplastic epithelial cells in a subset of human thymomas express the B cell-associated CD20 antigen. *Am. J. Surg. Pathol.* 1992 oct;16(10):988-997.[cité 2012 mars 19]
 30. Mohrmann RL, Arber DA. CD20-Positive peripheral T-cell lymphoma: report of a case after nodular sclerosis Hodgkin's disease and review of the literature. *Mod. Pathol.* 2000 nov;13(11):1244-1252.[cité 2012 mars 19]
 31. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, Liang Y, Bradney A, Oliver JA, Bowen K, Steeber DA, Haas KM, Poe JC, Tedder TF. Mouse CD20 expression and function. *Int. Immunol.* 2004 janv;16(1):119-129.[cité 2012 mars 20]
 32. Tedder TF, Klejman G, Disteché CM, Adler DA, Schlossman SF, Saito H. Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen, homologous to the human B1 (CD20) antigen, and localization of the gene to chromosome 19. *J. Immunol.* 1988 déc;141(12):4388-4394.[cité 2012 mars 20]
 33. Kano R, Inoie C, Okano H, Yamazaki J, Takahashi T, Watari T, Tokuriki M, Hasegawa A. Canine CD20 gene. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005 déc;108(3-4):265-268.[cité 2012 janv 9]

34. Deans JP, Robbins SM, Polyak MJ, Savage JA. Rapid redistribution of CD20 to a low density detergent-insoluble membrane compartment. *J. Biol. Chem.* 1998 janv;273(1):344-348.[cité 2012 juin 28]
35. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PWM, Glennie MJ, Cragg MS. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica* 2010 janv;95(1):135-143.[cité 2012 juin 30]
36. Cragg MS, Morgan SM, Chan HTC, Morgan BP, Filatov AV, Johnson PWM, French RR, Glennie MJ. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 2003 févr;101(3):1045-1052.[cité 2012 juin 30]
37. Chan HTC, Hughes D, French RR, Tutt AL, Walshe CA, Teeling JL, Glennie MJ, Cragg MS. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res.* 2003 sept;63(17):5480-5489.[cité 2012 juin 30]
38. Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, Honeychurch J, Alduaij W, Cox KL, Potter KN, Murray S, Chan CHT, Klymenko T, Erenpreisa J, Glennie MJ, Illidge TM, Cragg MS. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 2009 août;119(8):2143-2159.[cité 2012 juin 30]
39. Ivanov A, Krysov S, Cragg MS, Illidge T. Radiation therapy with tositumomab (B1) anti-CD20 monoclonal antibody initiates extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-dependent cell death that overcomes resistance to apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 2008 août;14(15):4925-4934.[cité 2012 juin 30]
40. Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood* 2001 mars;97(5):1392-1398.[cité 2012 juin 21]
41. Wurch T, Larbouret C, Robert B. Keystone Symposium on Antibodies as Drugs: March 27-April 1, 2009, Whistler, BC CA. *MAbs* 2009 août;1(4):318-325.[cité 2012 juin 30]
42. Cragg MS, Glennie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 2004 avr;103(7):2738-2743.[cité 2012 juin 30]
43. Golay J, Cittera E, Di Gaetano N, Manganini M, Mosca M, Nebuloni M, van Rooijen N, Vago L, Introna M. The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica* 2006 févr;91(2):176-183.[cité 2012 juin 30]
44. Jilani I, O'Brien S, Manshuri T, Thomas DA, Thomazy VA, Imam M, Naeem S, Verstovsek S, Kantarjian H, Giles F, Keating M, Albitar M. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003 nov;102(10):3514-3520.[cité 2012 juin 30]
45. Beers SA, French RR, Chan HTC, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, Wijayaweera SS, Dixon SV, Kim H, Cox KL, Kerr JP, Johnston DA, Johnson PWM, Verbeek JS, Glennie

- MJ, Cragg MS. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 2010 juin;115(25):5191-5201.[cité 2012 juin 30]
46. Teeling JL, French RR, Cragg MS, van den Brakel J, Pluyter M, Huang H, Chan C, Parren PWHI, Hack CE, Dechant M, Valerius T, van de Winkel JGJ, Glennie MJ. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2004 sept;104(6):1793-1800.[cité 2012 juill 5]
 47. Morschhauser F, Marlton P, Vitolo U, Lindén O, Seymour JF, Crump M, Coiffier B, Foà R, Wassner E, Burger H-U, Brennan B, Mendila M. Results of a phase I/II study of ocrelizumab, a fully humanized anti-CD20 mAb, in patients with relapsed/refractory follicular lymphoma. *Ann. Oncol.* 2010 sept;21(9):1870-1876.[cité 2012 juill 5]
 48. Goldenberg DM, Rossi EA, Stein R, Cardillo TM, Czuczman MS, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Hansen HJ, Chang C-H. Properties and structure-function relationships of veltuzumab (hA20), a humanized anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood* 2009 janv;113(5):1062-1070.[cité 2012 juill 5]
 49. Morschhauser F, Leonard JP, Fayad L, Coiffier B, Petillon M-O, Coleman M, Schuster SJ, Dyer MJS, Horne H, Teoh N, Wegener WA, Goldenberg DM. Humanized anti-CD20 antibody, veltuzumab, in refractory/recurrent non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II results. *J. Clin. Oncol.* 2009 juill;27(20):3346-3353.[cité 2012 juill 5]
 50. van Meerten T, Hagenbeek A. CD20-targeted therapy: the next generation of antibodies. *Semin. Hematol.* 2010 avr;47(2):199-210.[cité 2012 juill 5]
 51. Hayden-Ledbetter MS, Cerveny CG, Espling E, Brady WA, Grosmaire LS, Tan P, Bader R, Slater S, Nilsson CA, Barone DS, Simon A, Bradley C, Thompson PA, Wahl AF, Ledbetter JA. CD20-directed small modular immunopharmaceutical, TRU-015, depletes normal and malignant B cells. *Clin. Cancer Res.* 2009 avr;15(8):2739-2746.[cité 2012 juill 5]
 52. Bowles JA, Wang S-Y, Link BK, Allan B, Beuerlein G, Campbell M-A, Marquis D, Ondek B, Wooldridge JE, Smith BJ, Breitmeyer JB, Weiner GJ. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood* 2006 oct;108(8):2648-2654.[cité 2012 juill 5]
 53. Robak T, Robak E. New Anti-CD20 Monoclonal Antibodies for the Treatment of B-Cell Lymphoid Malignancies. *BioDrugs* 2011 févr;25(1):13-25.[cité 2012 juill 5]
 54. Paper: A Phase I Study of PRO131921, a Novel Anti-CD20 Monoclonal Antibody in Patients with Relapsed/Refractory CD20⁺ Indolent NHL: Correlation Between Clinical Responses and AUC Pharmacokinetics [Internet]. [date unknown];[cité 2012 juill 5] Available from: <https://ash.confex.com/ash/2009/webprogram/Paper17900.html>
 55. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, Grau R, Gerdes C, Nopora A, van Puijenbroek E, Ferrara C, Sondermann P, Jäger C, Strein P, Fertig G, Friess T, Schüll C, Bauer S, Dal Porto J, Del Nagro C, Dabbagh K, Dyer MJS, Poppema

- S, Klein C, Umaña P. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 2010 juin;115(22):4393-4402.[cité 2012 juill 7]
56. Patz M, Isaeva P, Forcob N, Müller B, Frenzel LP, Wendtner C-M, Klein C, Umana P, Hallek M, Krause G. Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 2011 févr;152(3):295-306.[cité 2012 juill 7]
 57. Dalle S, Reslan L, Besseyre de Horts T, Herveau S, Herting F, Plesa A, Friess T, Umana P, Klein C, Dumontet C. Preclinical studies on the mechanism of action and the anti-lymphoma activity of the novel anti-CD20 antibody GA101. *Mol. Cancer Ther.* 2011 janv;10(1):178-185.[cité 2012 juill 7]
 58. Salles G, Morschhauser F, Lamy T, Milpied N, Thieblemont C, Tilly H, Bieska G, Asikanius E, Carlile D, Birkett J, Pisa P, Cartron G. Phase 1 study results of the type II glycoengineered humanized anti-CD20 monoclonal antibody obinutuzumab (GA101) in B-cell lymphoma patients. *Blood* 2012 mai;119(22):5126-5132.[cité 2012 juill 7]
 59. ald_30_gm_inh_web.pdf (Objet application/pdf) [Internet]. [date unknown];[cité 2012 mars 16] Available from: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-11/ald_30_gm_inh_web.pdf
 60. Lévy J-P, Varet B, Clauvel J-P, Lefrère F, Bezeaud A, Guillin M-C. Les lymphomes non hodgkiniens. In: *Hématologie et Transfusion*. Masson; [date unknown]
 61. Thyss PA. Diagnostiquer un lymphome malin (164) - Corpus Médical [Internet]. 2006;[cité 2012 juin 11] Available from: <http://cancero.unice.fr/sitelocal/disciplines/niveaudiscipline/cancerologie/numlecon164/lecon164.htm#>
 62. Brice P, Solal-Seligny P, Delarue R, Deconinck E. *Comprendre les lymphomes non hodgkiniens*. 2011;
 63. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, MacPherson N, O'Reilly S, Spinelli JJ, Sutherland J, Wilson KS, Gascoyne RD, Connors JM. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J. Clin. Oncol.* 2005 août;23(22):5027-5033.[cité 2012 avr 13]
 64. Friedberg JW. Rituximab for early-stage diffuse large-B-cell lymphoma. *Lancet Oncol.* 2006 mai;7(5):357-359.[cité 2012 avr 13]
 65. Friedberg JW. Relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:498-505.[cité 2012 avr 13]
 66. Hofmeister JK, Cooney D, Coggeshall KM. Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells Mol. Dis.* 2000 avr;26(2):133-143.[cité 2012 mars 17]

67. Maloney DG. Mechanism of action of rituximab. *Anticancer Drugs* 2001 juin;12 Suppl 2:S1-4.[cité 2012 juin 21]
68. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 2001 nov;1(2):118-129.[cité 2012 juin 21]
69. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 2001 avr;344(14):1058-1066.[cité 2012 juill 19]
70. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, DiLillo DJ, Lindorfer MA, Hess CE, Densmore JJ, Williams ME, Taylor RP. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J. Immunol.* 2004 mars;172(5):3280-3288.[cité 2012 juill 19]
71. Helmy KY, Katschke KJ Jr, Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, Diehl L, Scales SJ, Ghilardi N, van Lookeren Campagne M. CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 2006 mars;124(5):915-927.[cité 2012 juill 19]
72. Wang S-Y, Racila E, Taylor RP, Weiner GJ. NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood* 2008 févr;111(3):1456-1463.[cité 2012 juill 19]
73. Taylor R. Fresh frozen plasma as a complement source. *Lancet Oncol.* 2007 mai;8(5):370-371.[cité 2012 juill 19]
74. Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol. Immunol.* 2003 sept;40(2-4):109-123.[cité 2012 avr 13]
75. Macor P, Tripodo C, Zorzet S, Piovan E, Bossi F, Marzari R, Amadori A, Tedesco F. In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab. *Cancer Res.* 2007 nov;67(21):10556-10563.[cité 2012 juill 19]
76. Bhat R, Watzl C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS ONE* 2007;2(3):e326.[cité 2012 juill 19]
77. Bowles JA, Weiner GJ. CD16 polymorphisms and NK activation induced by monoclonal antibody-coated target cells. *J. Immunol. Methods* 2005 sept;304(1-2):88-99.[cité 2012 juill 19]
78. Berdeja JG, Hess A, Lucas DM, O'Donnell P, Ambinder RF, Diehl LF, Carter-Brookins D, Newton S, Flinn IW. Systemic interleukin-2 and adoptive transfer of lymphokine-activated killer cells improves antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with relapsed B-cell lymphoma treated with rituximab. *Clin. Cancer Res.* 2007 avr;13(8):2392-2399.[cité 2012 juill 19]
79. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 2002 févr;99(3):754-758.[cité 2012 juill

80. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J. Immunol.* 2006 févr;176(4):2600-2609.[cité 2012 juill 19]
81. Beum PV, Lindorfer MA, Taylor RP. Within peripheral blood mononuclear cells, antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-opsonized Daudi cells is promoted by NK cells and inhibited by monocytes due to shaving. *J. Immunol.* 2008 août;181(4):2916-2924.[cité 2012 juill 19]
82. Daubeuf S, Lindorfer MA, Taylor RP, Joly E, Hudrisier D. The direction of plasma membrane exchange between lymphocytes and accessory cells by trogocytosis is influenced by the nature of the accessory cell. *J. Immunol.* 2010 févr;184(4):1897-1908.[cité 2012 juill 19]
83. Espinosa E, Tabiasco J, Hudrisier D, Fournié J-J. Synaptic Transfer by Human $\gamma\delta$ T Cells Stimulated with Soluble or Cellular Antigens. *J Immunol* 2002 juin;168(12):6336-6343.[cité 2012 juill 19]
84. Tabiasco J, Vercellone A, Meggetto F, Hudrisier D, Brousset P, Fournié J-J. Acquisition of Viral Receptor by NK Cells Through Immunological Synapse. *J Immunol* 2003 juin;170(12):5993-5998.[cité 2012 juill 19]
85. Poupot M, Pont F, Fournié J-J. Profiling Blood Lymphocyte Interactions with Cancer Cells Uncovers the Innate Reactivity of Human $\gamma\delta$ T Cells to Anaplastic Large Cell Lymphoma. *J Immunol* 2005 janv;174(3):1717-1722.[cité 2012 juill 19]
86. Tabiasco J, Espinosa E, Hudrisier D, Joly E, Fournié J-J, Vercellone A. Active trans-synaptic capture of membrane fragments by natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 2002 mai;32(5):1502-1508.[cité 2012 juill 19]
87. Kennedy GA, Tey S-K, Cobcroft R, Marlton P, Cull G, Grimmett K, Thomson D, Gill D. Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *Br. J. Haematol.* 2002 nov;119(2):412-416.[cité 2012 juill 19]
88. Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sakurai T, Mishima Y, Kuniyoshi R, Taniyama A, Yokoyama M, Sakajiri S, Takeuchi K, Watanabe C, Takahashi S, Ito Y, Hatake K. Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2009 avr;15(7):2523-2530.[cité 2012 juill 19]
89. Johnson NA, Leach S, Woolcock B, deLeeuw RJ, Bashashati A, Sehn LH, Connors JM, Chhanabhai M, Brooks-Wilson A, Gascoyne RD. CD20 mutations involving the rituximab epitope are rare in diffuse large B-cell lymphomas and are not a significant cause of R-CHOP failure. *Haematologica* 2009 mars;94(3):423-427.[cité 2012 juill 19]
90. Tomita A, Hiraga J, Kiyoi H, Ninomiya M, Sugimoto T, Ito M, Kinoshita T, Naoe T. Epigenetic regulation of CD20 protein expression in a novel B-cell lymphoma cell line,

- RRBL1, established from a patient treated repeatedly with rituximab-containing chemotherapy. *Int. J. Hematol.* 2007 juill;86(1):49-57.[cité 2012 juill 19]
91. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, Nakamura S, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* 2009 mai;113(20):4885-4893.[cité 2012 juill 19]
 92. Zhao W-L, Wang L, Liu Y-H, Yan J-S, Leboeuf C, Liu Y-Y, Wu W-L, Janin A, Chen Z, Chen S-J. Combined effects of histone deacetylase inhibitor and rituximab on non-Hodgkin's B-lymphoma cells apoptosis. *Exp. Hematol.* 2007 déc;35(12):1801-1811.[cité 2012 juill 19]
 93. Shimizu R, Kikuchi J, Wada T, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells. *Leukemia* 2010 oct;24(10):1760-1768.[cité 2012 juill 19]
 94. Bil J, Winiarska M, Nowis D, Bojarczuk K, Dabrowska-Iwanicka A, Basak GW, Sułek K, Jakobisiak M, Golab J. Bortezomib modulates surface CD20 in B-cell malignancies and affects rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity. *Blood* 2010 mai;115(18):3745-3755.[cité 2012 juill 19]
 95. Winiarska M, Bil J, Nowis D, Golab J. Proteolytic pathways involved in modulation of CD20 levels. *Autophagy* 2010 août;6(6):810-812.[cité 2012 juill 19]
 96. Gong Q, Ou Q, Ye S, Lee WP, Cornelius J, Diehl L, Lin WY, Hu Z, Lu Y, Chen Y, Wu Y, Meng YG, Gribbling P, Lin Z, Nguyen K, Tran T, Zhang Y, Rosen H, Martin F, Chan AC. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J. Immunol.* 2005 janv;174(2):817-826.[cité 2012 juill 19]
 97. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009 oct;114(16):3367-3375.[cité 2012 juill 19]
 98. Aurlien E, Larsen RH, Kvalheim G, Bruland OS. Demonstration of highly specific toxicity of the alpha-emitting radioimmunoconjugate(211)At-rituximab against non-Hodgkin's lymphoma cells. *Br. J. Cancer* 2000 nov;83(10):1375-1379.[cité 2012 avr 2]
 99. Ma D, McDevitt MR, Barendswaard E, Lai L, Curcio MJ, Pellegrini V, Brechbiel MW, Scheinberg DA. Radioimmunotherapy for model B cell malignancies using 90Y-labeled anti-CD19 and anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia* 2002 janv;16(1):60-66.[cité 2012 avr 16]
 100. PRESSMAN D, KORNGOLD L. The in vivo localization of anti-Wagner-osteogenic-sarcoma antibodies. *Cancer* 1953 mai;6(3):619-623.[cité 2012 mars 23]
 101. Goldenberg DM, Juweid M, Dunn RM, Sharkey RM. Cancer imaging with radiolabeled antibodies: new advances with technetium-99m-labeled monoclonal antibody Fab' fragments, especially CEA-Scan and prospects for therapy. *J Nucl Med Technol* 1997 mars;25(1):18-23; quiz 34.[cité 2012 mars 23]

102. Goldenberg DM. The role of radiolabeled antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: the coming of age of radioimmunotherapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2001 août;39(1-2):195-201.[cité 2012 mars 23]
103. Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J. Nucl. Med.* 2002 mai;43(5):693-713.[cité 2012 mars 23]
104. Goldenberg DM, Sharkey RM. Advances in cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2006 déc;50(4):248-264.[cité 2012 mars 23]
105. Davies AJ. Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma: Y90 ibritumomab tiuxetan and I(131) tositumomab. *Oncogene* 2007 mai;26(25):3614-3628.[cité 2012 janv 9]
106. DeNardo SJ, Kroger LA, MacKenzie MR, Mirick GR, Shen S, DeNardo GL. Prolonged survival associated with immune response in a patient treated with Lym-1 mouse monoclonal antibody. *Cancer Biother. Radiopharm.* 1998 févr;13(1):1-12.[cité 2012 mars 26]
107. Jayson GC, Zweit J, Jackson A, Mulatero C, Julyan P, Ranson M, Broughton L, Wagstaff J, Hakansson L, Groenewegen G, Bailey J, Smith N, Hastings D, Lawrance J, Haroon H, Ward T, McGown AT, Tang M, Levitt D, Marreaud S, Lehmann FF, Herold M, Zwierzina H. Molecular imaging and biological evaluation of HuMV833 anti-VEGF antibody: implications for trial design of antiangiogenic antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002 oct;94(19):1484-1493.[cité 2012 juill 28]
108. Sands H, Jones PL, Shah SA, Palme D, Vessella RL, Gallagher BM. Correlation of vascular permeability and blood flow with monoclonal antibody uptake by human Clouser and renal cell xenografts. *Cancer Res.* 1988 janv;48(1):188-193.[cité 2012 juill 28]
109. Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res.* 1987 juin;47(12):3039-3051.[cité 2012 juill 28]
110. Fujimori K, Covell DG, Fletcher JE, Weinstein JN. Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')₂, and Fab in tumors. *Cancer Res.* 1989 oct;49(20):5656-5663.[cité 2012 juill 28]
111. van Osdol W, Fujimori K, Weinstein JN. An analysis of monoclonal antibody distribution in microscopic tumor nodules: consequences of a « binding site barrier ». *Cancer Res.* 1991 sept;51(18):4776-4784.[cité 2012 juill 28]
112. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* 1992 juin;52(12):3402-3408.[cité 2012 juill 28]
113. Ghetie V, Ward ES. FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter. *Immunol. Today* 1997 déc;18(12):592-598.[cité 2012 juill 28]
114. Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am.*

- J. Physiol. Renal Physiol. 2002 févr;282(2):F358-365.[cité 2012 juill 28]
115. Junghans RP, Anderson CL. The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996 mai;93(11):5512-5516.[cité 2012 juill 28]
116. McKeage K, Perry CM. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. Drugs 2002;62(1):209-243.[cité 2012 juill 28]
117. Meijer RT, Koopmans RP, ten Berge IJM, Schellekens PTA. Pharmacokinetics of murine anti-human CD3 antibodies in man are determined by the disappearance of target antigen. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002 janv;300(1):346-353.[cité 2012 juill 28]
118. BAKER RJ, KOZOLL DD, MEYER KA. The use of surface area as a basis for establishing normal blood volume. Surg Gynecol Obstet 1957 févr;104(2):183-189.[cité 2012 juill 28]
119. Davis TA, White CA, Grillo-López AJ, Velásquez WS, Link B, Maloney DG, Dillman RO, Williams ME, Mohrbacher A, Weaver R, Dowden S, Levy R. Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. J. Clin. Oncol. 1999 juin;17(6):1851-1857.[cité 2012 juill 28]
120. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R, Pohlman BL, Bartlett NL, Wiseman GA, Padre N, Grillo-López AJ, Multani P, White CA. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. J. Clin. Oncol. 2002 mai;20(10):2453-2463.[cité 2012 mars 23]
121. Palanca-Wessels MCA, Press OW. Improving the efficacy of radioimmunotherapy for non-Hodgkin lymphomas. Cancer 2010 févr;116(4 Suppl):1126-1133.[cité 2012 janv 9]
122. Cheson BD. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. Blood 2003 janv;101(2):391-398.[cité 2012 juill 2]
123. Dillman RO. Radiolabeled anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-cell lymphoma. J. Clin. Oncol. 2002 août;20(16):3545-3557.[cité 2012 juill 8]
124. Wiseman GA, Gordon LI, Multani PS, Witzig TE, Spies S, Bartlett NL, Schilder RJ, Murray JL, Saleh M, Allen RS, Grillo-López AJ, White CA. Ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma and mild thrombocytopenia: a phase II multicenter trial. Blood 2002 juin;99(12):4336-4342.[cité 2012 juill 8]
125. Vose JM, Wahl RL, Saleh M, Rohatiner AZ, Knox SJ, Radford JA, Zelenetz AD, Tidmarsh GF, Stagg RJ, Kaminski MS. Multicenter phase II study of iodine-131 tositumomab for chemotherapy-relapsed/refractory low-grade and transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. J. Clin. Oncol. 2000 mars;18(6):1316-1323.[cité 2012 juill 8]
126. Kaminski MS, Estes J, Zasadny KR, Francis IR, Ross CW, Tuck M, Regan D, Fisher S,

- Gutierrez J, Kroll S, Stagg R, Tidmarsh G, Wahl RL. Radioimmunotherapy with iodine (131)I tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience. *Blood* 2000 août;96(4):1259-1266.[cité 2012 juill 8]
127. Kaminski MS, Zelenetz AD, Press OW, Saleh M, Leonard J, Fehrenbacher L, Lister TA, Stagg RJ, Tidmarsh GF, Kroll S, Wahl RL, Knox SJ, Vose JM. Pivotal study of iodine I 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J. Clin. Oncol.* 2001 oct;19(19):3918-3928.[cité 2012 juill 8]
128. Kaminski MS, Tuck M, Estes J, Kolstad A, Ross CW, Zasadny K, Regan D, Kison P, Fisher S, Kroll S, Wahl RL. 131I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2005 févr;352(5):441-449.[cité 2012 janv 9]
129. Goldenberg DM. Some Like It Hot: Lymphoma Radioimmunotherapy. *Blood* 2009 mai;113(20):4823-4824.[cité 2012 juin 25]
130. Pantelias A, Pagel JM, Hedin N, Saganic L, Wilbur S, Hamlin DK, Wilbur DS, Lin Y, Stone D, Axworthy D, Gopal AK, Press OW. Comparative biodistributions of pretargeted radioimmunoconjugates targeting CD20, CD22, and DR molecules on human B-cell lymphomas. *Blood* 2007 juin;109(11):4980-4987.[cité 2012 janv 9]
131. Pagel JM, Orgun N, Hamlin DK, Wilbur DS, Gooley TA, Gopal AK, Park SI, Green DJ, Lin Y, Press OW. A comparative analysis of conventional and pretargeted radioimmunotherapy of B-cell lymphomas by targeting CD20, CD22, and HLA-DR singly and in combinations. *Blood* 2009 mai;113(20):4903-4913.[cité 2012 janv 9]
132. Axworthy DB, Reno JM, Hylarides MD, Mallett RW, Theodore LJ, Gustavson LM, Su F, Hobson LJ, Beaumier PL, Fritzberg AR. Cure of human carcinoma xenografts by a single dose of pretargeted yttrium-90 with negligible toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 févr;97(4):1802-1807.[cité 2012 mars 31]
133. Pagel JM, Lin Y, Hedin N, Pantelias A, Axworthy D, Stone D, Hamlin DK, Wilbur DS, Press OW. Comparison of a tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein and an antibody-streptavidin chemical conjugate for pretargeted anti-CD20 radioimmunotherapy of B-cell lymphomas. *Blood* 2006 juill;108(1):328-336.[cité 2012 mars 31]
134. Subbiah K, Hamlin DK, Pagel JM, Wilbur DS, Meyer DL, Axworthy DB, Mallett RW, Theodore LJ, Stayton PS, Press OW. Comparison of immunoscintigraphy, efficacy, and toxicity of conventional and pretargeted radioimmunotherapy in CD20-expressing human lymphoma xenografts. *J. Nucl. Med.* 2003 mars;44(3):437-445.[cité 2012 mars 31]
135. Chang C-H, Sharkey RM, Rossi EA, Karacay H, McBride W, Hansen HJ, Chatal J-F, Barbet J, Goldenberg DM. Molecular advances in pretargeting radioimmunotherapy with bispecific antibodies. *Mol. Cancer Ther.* 2002 mai;1(7):553-563.[cité 2012 mars 31]
136. Rossi EA, Goldenberg DM, Chang C-H. The Dock-and-Lock Method Combines Recombinant Engineering with Site-Specific Covalent Conjugation To Generate

- Multifunctional Structures. *Bioconjug. Chem.* 2012 mars;23(3):309-323.[cité 2012 avr 2]
137. Rossi EA, Goldenberg DM, Cardillo TM, McBride WJ, Sharkey RM, Chang C-H. Stably Tethered Multifunctional Structures of Defined Composition Made by the Dock and Lock Method for Use in Cancer Targeting. *PNAS* 2006 févr;103(18):6841-6846.[cité 2012 avr 2]
 138. Hodneland CD, Lee Y-S, Min D-H, Mrksich M. Selective immobilization of proteins to self-assembled monolayers presenting active site-directed capture ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 avr;99(8):5048-5052.[cité 2012 juill 21]
 139. Deyev SM, Waibel R, Lebedenko EN, Schubiger AP, Plückthun A. Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module. *Nat. Biotechnol.* 2003 déc;21(12):1486-1492.[cité 2012 juill 21]
 140. Backer MV, Gaynutdinov TI, Patel V, Jehning BT, Myshkin E, Backer JM. Adapter protein for site-specific conjugation of payloads for targeted drug delivery. *Bioconjug. Chem.* 2004 oct;15(5):1021-1029.[cité 2012 juill 21]
 141. Backer MV, Patel V, Jehning BT, Backer JM. Self-assembled « dock and lock » system for linking payloads to targeting proteins. *Bioconjug. Chem.* 2006 août;17(4):912-919.[cité 2012 juill 21]
 142. Press OW, Unger JM, Brazier RM, Maloney DG, Miller TP, Leblanc M, Fisher RI. Phase II trial of CHOP chemotherapy followed by tositumomab/iodine I-131 tositumomab for previously untreated follicular non-Hodgkin's lymphoma: five-year follow-up of Southwest Oncology Group Protocol S9911. *J. Clin. Oncol.* 2006 sept;24(25):4143-4149.[cité 2012 janv 9]
 143. Link BK, Martin P, Kaminski MS, Goldsmith SJ, Coleman M, Leonard JP. Cyclophosphamide, vincristine, and prednisone followed by tositumomab and iodine-131-tositumomab in patients with untreated low-grade follicular lymphoma: eight-year follow-up of a multicenter phase II study. *J. Clin. Oncol.* 2010 juin;28(18):3035-3041.[cité 2012 mars 30]
 144. Leonard JP, Coleman M, Kostakoglu L, Chadburn A, Cesarman E, Furman RR, Schuster MW, Niesvizky R, Muss D, Fiore J, Kroll S, Tidmarsh G, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ. Abbreviated chemotherapy with fludarabine followed by tositumomab and iodine I 131 tositumomab for untreated follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2005 août;23(24):5696-5704.[cité 2012 mars 30]
 145. Hainsworth JD, Spigel DR, Markus TM, Shipley D, Thompson D, Rotman R, Dannaher C, Greco FA. Rituximab plus short-duration chemotherapy followed by Yttrium-90 Ibritumomab tiuxetan as first-line treatment for patients with follicular non-Hodgkin lymphoma: a phase II trial of the Sarah Cannon Oncology Research Consortium. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009 juin;9(3):223-228.[cité 2012 mars 30]
 146. Jacobs SA, Swerdlow SH, Kant J, Foon KA, Jankowitz R, Land SR, DeMonaco N, Joyce J, Osborn JL, Evans TL, Schaefer PM, Luong TM. Phase II trial of short-course CHOP-R followed by 90Y-ibritumomab tiuxetan and extended rituximab in previously

- untreated follicular lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2008 nov;14(21):7088-7094.[cité 2012 mars 30]
147. Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, Vitolo U, Soubeyran P, Tilly H, Huijgens PC, Kolstad A, d' Amore F, Gonzalez Diaz M, Petrini M, Sebban C, Zinzani PL, van Oers MHJ, van Putten W, Bischof-Delaloye A, Rohatiner A, Salles G, Kuhlmann J, Hagenbeek A. Phase III trial of consolidation therapy with yttrium-90-ibritumomab tiuxetan compared with no additional therapy after first remission in advanced follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2008 nov;26(32):5156-5164.[cité 2012 mars 30]
 148. Gopal AK, Rajendran JG, Gooley TA, Pagel JM, Fisher DR, Petersdorf SH, Maloney DG, Eary JF, Appelbaum FR, Press OW. High-dose [131I]tositumomab (anti-CD20) radioimmunotherapy and autologous hematopoietic stem-cell transplantation for adults > or = 60 years old with relapsed or refractory B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2007 avr;25(11):1396-1402.[cité 2012 janv 9]
 149. Press OW, Eary JF, Gooley T, Gopal AK, Liu S, Rajendran JG, Maloney DG, Petersdorf S, Bush SA, Durack LD, Martin PJ, Fisher DR, Wood B, Borrow JW, Porter B, Smith JP, Matthews DC, Appelbaum FR, Bernstein ID. A phase I/II trial of iodine-131-tositumomab (anti-CD20), etoposide, cyclophosphamide, and autologous stem cell transplantation for relapsed B-cell lymphomas. *Blood* 2000 nov;96(9):2934-2942.[cité 2012 mars 31]
 150. Nademanee A, Forman S, Molina A, Fung H, Smith D, Dagens A, Kwok C, Yamauchi D, Anderson A-L, Falk P, Krishnan A, Kirschbaum M, Kogut N, Nakamura R, O'donnell M, Parker P, Popplewell L, Pullarkat V, Rodriguez R, Sahebi F, Smith E, Snyder D, Stein A, Spielberger R, Zain J, White C, Raubitschek A. A phase 1/2 trial of high-dose yttrium-90-ibritumomab tiuxetan in combination with high-dose etoposide and cyclophosphamide followed by autologous stem cell transplantation in patients with poor-risk or relapsed non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2005 oct;106(8):2896-2902.[cité 2012 mars 31]
 151. Winter JN, Inwards DJ, Spies S, Wiseman G, Patton D, Erwin W, Rademaker AW, Weitner BB, Williams SF, Tallman MS, Micallef I, Mehta J, Singhal S, Evens AM, Zimmer M, Molina A, White CA, Gordon LI. Yttrium-90 ibritumomab tiuxetan doses calculated to deliver up to 15 Gy to critical organs may be safely combined with high-dose BEAM and autologous transplantation in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2009 avr;27(10):1653-1659.[cité 2012 mars 31]
 152. Devizzi L, Guidetti A, Tarella C, Magni M, Matteucci P, Seregini E, Chiesa C, Bombardieri E, Di Nicola M, Carlo-Stella C, Gianni AM. High-dose yttrium-90-ibritumomab tiuxetan with tandem stem-cell reinfusion: an outpatient preparative regimen for autologous hematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* 2008 nov;26(32):5175-5182.[cité 2012 mars 31]
 153. Meredith RF, Khazaeli MB, Macey DJ, Grizzle WE, Mayo M, Schlom J, Russell CD, LoBuglio AF. Phase II study of interferon-enhanced 131I-labeled high affinity CC49 monoclonal antibody therapy in patients with metastatic prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 1999 oct;5(10 Suppl):3254s-3258s.[cité 2012 avr 2]
 154. Macey DJ, Grant EJ, Kasi L, Rosenblum MG, Zhang HZ, Katz RL, Rieger PT, LeBherz

- D, South M, Greiner JW, Schlom J, Podoloff DA, Murray JL. Effect of recombinant alpha-interferon on pharmacokinetics, biodistribution, toxicity, and efficacy of ¹³¹I-labeled monoclonal antibody CC49 in breast cancer: a phase II trial. *Clin. Cancer Res.* 1997 sept;3(9):1547-1555.[cité 2012 avr 2]
155. Hauck ML, Zalutsky MR. Enhanced tumour uptake of radiolabelled antibodies by hyperthermia: Part I: Timing of injection relative to hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2005 févr;21(1):1-11.[cité 2012 avr 2]
156. Kurizaki T, Okazaki S, Sanderson SD, Colcher D, Enke CA, Tempero MA, Baranowska-Kortylewicz J. Potentiation of radioimmunotherapy with response-selective peptide agonist of human C5a. *J. Nucl. Med.* 2002 juill;43(7):957-967.[cité 2012 avr 2]
157. Li X-F, Kinuya S, Yokoyama K, Koshida K, Mori H, Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Michigishi T, Tonami N. Benefits of combined radioimmunotherapy and anti-angiogenic therapy in a liver metastasis model of human colon cancer cells. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2002 déc;29(12):1669-1674.[cité 2012 avr 2]
158. Burke PA, DeNardo SJ, Miers LA, Lamborn KR, Matzku S, DeNardo GL. Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 2002 août;62(15):4263-4272.[cité 2012 avr 2]
159. Sharkey RM, Karacay H, Goldenberg DM. Improving the treatment of non-Hodgkin lymphoma with antibody-targeted radionuclides. *Cancer* 2010 févr;116(4 Suppl):1134-1145.[cité 2012 janv 9]
160. McDevitt MR, Sgouros G, Finn RD, Humm JL, Jurcic JG, Larson SM, Scheinberg DA. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med* 1998 sept;25(9):1341-1351.[cité 2012 avr 2]
161. Sgouros G, Ballangrud AM, Jurcic JG, McDevitt MR, Humm JL, Erdi YE, Mehta BM, Finn RD, Larson SM, Scheinberg DA. Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: ²¹³Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia. *J. Nucl. Med.* 1999 nov;40(11):1935-1946.[cité 2012 avr 2]
162. Zalutsky MR, Vaidyanathan G. Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy. *Curr. Pharm. Des.* 2000 sept;6(14):1433-1455.[cité 2012 avr 2]
163. Ochakovskaya R, Osorio L, Goldenberg DM, Mattes MJ. Therapy of disseminated B-cell lymphoma xenografts in severe combined immunodeficient mice with an anti-CD74 antibody conjugated with (¹¹¹)indium, (⁶⁷)gallium, or (⁹⁰)yttrium. *Clin. Cancer Res.* 2001 juin;7(6):1505-1510.[cité 2012 avr 2]
164. Tamura M, Milenic DE, Iwahashi M, Padlan E, Schlom J, Kashmiri SV. Structural correlates of an anticarcinoma antibody: identification of specificity-determining residues (SDRs) and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only. *J. Immunol.* 2000 févr;164(3):1432-1441.[cité 2012 juill 7]
165. Jacobs SA. Yttrium ibritumomab tiuxetan in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma:

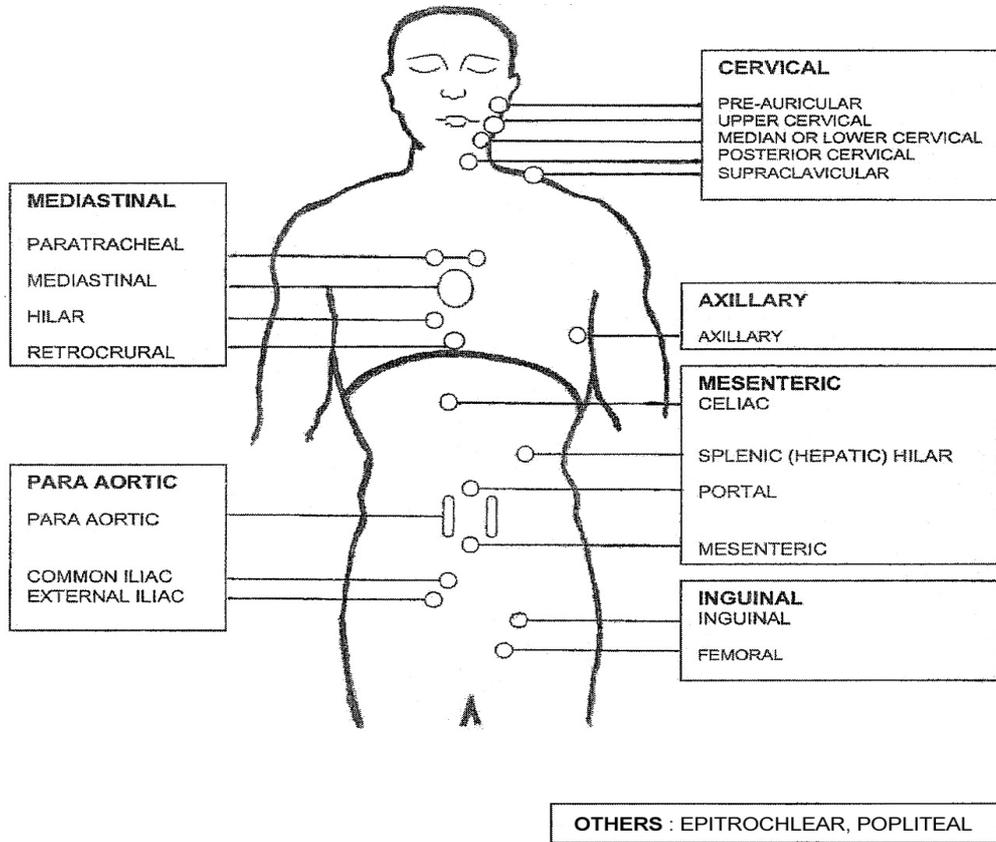
- current status and future prospects. *Biologics* 2007 sept;1(3):215-227.[cité 2012 janv 9]
166. Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, London C, Bergman P, Barber L, Breen M, Kitchell B, McNeil E, Modiano JF, Niemi S, Comstock KE, Ostrander E, Westmoreland S, Withrow S. The dog as a cancer model. *Nat. Biotechnol.* 2006 sept;24(9):1065-1066.[cité 2012 avr 4]
 167. Olson PN. Using the canine genome to cure cancer and other diseases. *Theriogenology* 2007 août;68(3):378-381.[cité 2012 avr 4]
 168. Paoloni MC, Khanna C. Comparative oncology today. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2007 nov;37(6):1023-1032; v.[cité 2012 janv 9]
 169. Dobson J. Classification of canine lymphoma: a step forward. *Vet. J.* 2004 mars;167(2):125-126.[cité 2012 avr 6]
 170. Gavazza A, Presciuttini S, Barale R, Lubas G, Gugliucci B. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J. Vet. Intern. Med.* 2001 juin;15(3):190-195.[cité 2012 juill 14]
 171. Teske E, van Heerde P, Rutteman GR, Kurzman ID, Moore PF, MacEwen EG. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994 déc;205(12):1722-1728.[cité 2012 avr 6]
 172. Pastor M, Chalvet-Monfray K, Marchal T, Keck G, Magnol JP, Fournel-Fleury C, Ponce F. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J. Vet. Intern. Med.* 2009 avr;23(2):301-310.[cité 2012 juill 14]
 173. Jagielski D, Lechowski R, Hoffmann-Jagielska M, Winiarczyk S. A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2002 oct;49(8):419-424.[cité 2012 juill 14]
 174. Magnol JP, Marchal T, Delisle F, Devaudelle P, Fournel C. *Cancérologie clinique du chien*. Edition à compte d'auteur. LYON, FRANCE: 1998.
 175. Squire RA, Bush M, Melby EC, Neeley LM, Yarbrough B. Clinical and pathologic study of canine lymphoma: clinical staging, cell classification, and therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973 août;51(2):565-574.[cité 2012 avr 4]
 176. Carter, R.F., Harris, C.K., Withrow, S.J., Valli, V.E.O., Susaneck,. [date unknown];
 177. Cotter SM. Treatment of lymphoma and leukemia with cyclophosphamide, vincristine and prednisolone: I. treatment of dogs. 1983;
 178. Dobson, J.M., Gorman, N.T., 1994. Canine multicentric lymphoma II:. [date unknown];
 179. Hahn KA, Richardson RC, Teclaw RF, Cline JM, Carlton WW, DeNicola DB, Bonney PL. Is maintenance chemotherapy appropriate for the management of canine malignant lymphoma? *J. Vet. Intern. Med.* 1992 févr;6(1):3-10.[cité 2012 juill 10]
 180. MacEwen EG, Brown NO, Patnaik AK, Hayes AA, Passe S. Cyclic combination

- chemotherapy of canine lymphosarcoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1981
juin;178(11):1178-1181.[cité 2012 juill 10]
181. Madewell BR. Chemotherapy for canine lymphosarcoma. *Am. J. Vet. Res.* 1975
oct;36(10):1525-1528.[cité 2012 juill 10]
182. Greenlee PG, Filippa DA, Quimby FW, Patnaik AK, Calvano SE, Matus RE, Kimmel
M, Hurvitz AI, Lieberman PH. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and
clinical study. *Cancer* 1990 août;66(3):480-490.[cité 2012 avr 6]
183. Valli, V.E., Jacobs, R.M., Parodi, A.L., Vernau, W., Moore, P.F.. [date unknown];
184. Ponce F, Magnol J-P, Ledieu D, Marchal T, Turinelli V, Chalvet-Monfray K, Fournel-
Fleury C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant
lymphomas during chemotherapy. *Vet. J.* 2004 mars;167(2):158-166.[cité 2012 avr 6]
185. Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, Marchal T, Chabanne L, Delverdier A, Bryon
PA, Felman P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant
lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J. Comp. Pathol.* 1997
juill;117(1):35-59.[cité 2012 avr 6]
186. Guija de Arespachaga A, Schwendenwein I, Weissenböck H. Retrospective study of
82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and
immunophenotyping. *J. Comp. Pathol.* 2007 avr;136(2-3):186-192.[cité 2012 juill 12]
187. Chun R. Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? *Top Companion Anim
Med* 2009 août;24(3):157-162.[cité 2012 janv 9]
188. Simon D, Moreno SN, Hirschberger J, Moritz A, Kohn B, Neumann S, Jurina K,
Scharvogel S, Schwedes C, Reinacher M, Beyerbach M, Nolte I. Efficacy of a
continuous, multiagent chemotherapeutic protocol versus a short-term single-agent
protocol in dogs with lymphoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2008 mars;232(6):879-
885.[cité 2012 avr 6]
189. Saba CF, Thamm DH, Vail DM. Combination chemotherapy with L-asparaginase,
lomustine, and prednisone for relapsed or refractory canine lymphoma. *J. Vet. Intern.
Med.* 2007 févr;21(1):127-132.[cité 2012 avr 6]
190. Garrett LD, Thamm DH, Chun R, Dudley R, Vail DM. Evaluation of a 6-month
chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J. Vet.
Intern. Med.* 2002 déc;16(6):704-709.[cité 2012 avr 6]
191. Zemann BI, Moore AS, Rand WM, Mason G, Ruslander DM, Frimberger AE, Wood
CA, L'Heureux DA, Gliatto J, Cotter SM. A combination chemotherapy protocol
(VELCAP-L) for dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 1998 déc;12(6):465-
470.[cité 2012 avr 6]
192. Moore AS, Cotter SM, Rand WM, Wood CA, Williams LE, London CA, Frimberger
AE, L'Heureux DA. Evaluation of a discontinuous treatment protocol (VELCAP-S) for
canine lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 2001 août;15(4):348-354.[cité 2012 avr 6]

193. Meleo KA. The role of radiotherapy in the treatment of lymphoma and thymoma. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1997 janv;27(1):115-129.[cité 2012 avr 6]
194. Frimberger AE, Moore AS, Rassnick KM, Cotter SM, O'Sullivan JL, Quesenberry PJ. A combination chemotherapy protocol with dose intensification and autologous bone marrow transplant (VELCAP-HDC) for canine lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 2006 avr;20(2):355-364.[cité 2012 avr 6]
195. Keller ET, MacEwen EG, Rosenthal RC, Helfand SC, Fox LE. Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 1993 oct;7(5):289-295.[cité 2012 juill 10]
196. Phillips BS, Kass PH, Naydan DK, Winthrop MD, Griffey SM, Madewell BR. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000 mars;12(2):111-117.[cité 2012 juill 15]
197. Vail DM, Kisseberth WC, Obradovich JE, Moore FM, London CA, MacEwen EG, Ritter MA. Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp. Hematol.* 1996 juin;24(7):807-815.[cité 2012 juill 15]
198. Price GS, Page RL, Fischer BM, Levine JF, Gerig TM. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 1991 oct;5(5):259-262.[cité 2012 juill 15]
199. Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest.* 2000;18(8):781-792.[cité 2012 janv 9]
200. Ponce F, Marchal T, Magnol JP, Turinelli V, Ledieu D, Bonnefont C, Pastor M, Delignette ML, Fournel-Fleury C. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet. Pathol.* 2010 mai;47(3):414-433.[cité 2012 janv 9]
201. Withrow, SJ.; Vail, DM. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology.* 4. S. [date unknown];
202. Powers BE, McChesney SL, Gillette EL. Late radiation response of the canine trachea with change in dose per fraction. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1987 nov;13(11):1673-1680.[cité 2012 avr 10]
203. Page RL, Thrall DE. Therapeutic hyperthermia: contribution from clinical studies in dogs with spontaneous neoplasia. *In Vivo* 1994 déc;8(5):851-858.[cité 2012 avr 10]
204. Pang LY, Argyle DJ. Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. *Biochim. Biophys. Acta* 2009 avr;1792(4):380-391.[cité 2012 avr 10]
205. Withrow SJ, Powers BE, Straw RC, Wilkins RM. Comparative aspects of osteosarcoma. Dog versus man. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1991 sept;(270):159-168.[cité 2012 avr 10]

206. Madewell BR. Neoplasms in domestic animals: a review of experimental and spontaneous carcinogenesis. *Yale J Biol Med* 1981 avr;54(2):111-125.[cité 2012 avr 10]
207. Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hotz B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res.* 2007 févr;27(1A):155-164.[cité 2012 avr 10]
208. Selting K, Waldrep JC, Reiner C, Branson K, Gustafson D, Kim DY, Henry C, Owen N, Madsen R, Dhand R. Feasibility and safety of targeted cisplatin delivery to a select lung lobe in dogs via the AeroProbe intracorporeal nebulization catheter. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2008 sept;21(3):255-268.[cité 2012 avr 10]
209. Bukowski JA, Wartenberg D, Goldschmidt M. Environmental causes for sinonasal cancers in pet dogs, and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 1998 août;54(7):579-591.[cité 2012 avr 10]
210. Hayes HM Jr, Fraumeni JF Jr. Epidemiological features of canine renal neoplasms. *Cancer Res.* 1977 août;37(8 Pt 1):2553-2556.[cité 2012 avr 10]
211. Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat. Rev. Cancer* 2008 févr;8(2):147-156.[cité 2012 avr 10]
212. Breen M, Modiano JF. Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans--man and his best friend share more than companionship. *Chromosome Res.* 2008;16(1):145-154.[cité 2012 avr 10]
213. Jubala CM, Wojcieszyn JW, Valli VEO, Getzy DM, Fosmire SP, Coffey D, Bellgrau D, Modiano JF. CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Vet. Pathol.* 2005 juill;42(4):468-476.[cité 2012 janv 9]
214. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, Dakhil SR, Woda B, Fisher RI, Peterson BA, Horning SJ. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2006 juill;24(19):3121-3127.[cité 2012 janv 9]
215. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, Engert A, Tilly H, Ma D, Johnson P, Lister A, Feuring-Buske M, Radford JA, Capdeville R, Diehl V, Reyes F. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood* 1998 sept;92(6):1927-1932.[cité 2012 janv 9]

ANNEXE I : Les localisations ganglionnaires



ANNEXE II : Les principales formes de lymphomes B

Lymphomes	Anatomopathologie	Phénotypes	Particularités
lymphocytaire	Petits lymphocytes	CD19+, CD20+, CD5+, CD23+, SigM+	Analogues à la LLC B
lymphoplasmocytaire zone marginale	Infiltrat diffus de petits lymphocytes, cellules lymphoplasmocytaires, plasmocytes	CD19+, CD20+, CD5-, CD38+, clgM+	Maladie de Waldenström IgM monoclonale
du manteau	Atteinte diffuse + nodulaire : cellules à noyau +/- clivé	CD19+, CD20+, CD5+, CD23-, CD10-, CD43+, S IgM + SigD+	t (11 ;14) Hyperexpression Cycline D1 Polypose digestive lymphomateuse
folliculaire	Petites cellules clivés en follicules	CD19+, CD20+, CD5-, CD23+/-, CD10+, Bc12+	t (14 ;18), Ig/Bc12
diffus à grande cellules	Prolifération diffuse de grandes cellules parfois clivées ou anaplasiques	CD19+, CD20+, CD5+/-, Sig+/-	
de Burkitt	Prolifération diffuse de cellules basophiles au noyau plurinucléolé	CD19+, CD20+, CD10+, CD5-, CD23- ,SigM+	t (8 ; 14) t (2 ; 8) t (8 ; 22) avec implication de C-myc EBV + ou -
du MALT	Chorion infiltré par les C. lymphoïdes, lésion lymphoépithéliale, hyperplasie folliculaire	CD19+, CD20+, CD5-, CD23-, SigM+	<i>Helicobacter pylori</i> : estomac t (11 ; 18)

D'après « Hématologie et Transfusion » J.-P. Lévy et B. Varet

ANNEXE III :Protocoles de chimiothérapie chez le chien (187)

Protocol	Drug Dosage	Follow-up
Single-agent prednisone	2 mg/kg/d × 14 d, then 1.5 mg/kg/d × 14 d, then 1 mg/kg/d × 14 d, then 1 mg/kg every other day indefinitely	1- to 2-month median disease control
Single agent doxorubicin ²	30 mg/m ² IV every 21 days × 5 treatments. Dogs weighing >15 kg should be dosed at 1 mg/kg.	~7-month median disease control. Median survival of 9 months.
CCNU ⁹	70 mg/m ² PO every 21 d × 5 treatments	~3-month median survival, including dogs treated with rescue therapies.
Prednisone	2 mg/kg/d × 7 d, dose tapered over the next 3 wk	Median duration of response: ~1 month
COP (induction) ¹⁶	6 weekly cycles of the following:	Median survival not provided. Median duration of response: ~3 months
Vincristine	day 1: 0.7 mg/m ² IV	
Cyclophosphamide	days 4-7: 50 mg/m ² PO	
Prednisone	days 1-7: 20 mg/m ² PO every 12 h	
COP (maintenance) ¹⁶	Repeated weekly until relapse:	
Methotrexate	days 1 and 5: 5 mg/m ² PO	
Cyclophosphamide	day 3: 100 mg/m ² PO	
Prednisone	days 1, 3, 5, 7: 20 mg/m ² PO	

Abbreviations: CCNU, cyclohexylchloroethylnitrosourea; COP, cyclophosphamide, Oncovin, and prednisone; IV, intravenously; PO, orally.

Week and Drug	Dose	Follow-up
1: Vincristine Prednisone	0.7 mg/m ² IV 2 mg/kg/d	Median survival: ~13 months Median disease control: ~9 months
2: Cyclophosphamide Prednisone	250 mg/m ² IV or PO 1.5 mg/kg/d	
3: Vincristine Prednisone	0.7 mg/m ² IV 1 mg/kg/d	
4: Doxorubicin Prednisone	30 mg/m ² IV (if ≤ 15 kg: 1 mg/kg) 0.5 mg/kg/d	
5: No drugs		
6: Vincristine	0.7 mg/m ² IV	
7: Cyclophosphamide	250 mg/m ² IV or PO	
8: Vincristine	0.7 mg/m ² IV	
9: Doxorubicin	30 mg/m ² IV (if ≤ 15 kg: 1 mg/kg)	
11: Vincristine	0.7 mg/m ² IV	
13: Cyclophosphamide	250 mg/m ² IV or PO	
15: Vincristine	0.7 mg/m ² IV	
17: Doxorubicin	30 mg/m ² IV (if ≤ 15 kg: 1 mg/kg)	
19: Vincristine	0.7 mg/m ² IV	
21: Cyclophosphamide	250 mg/m ² IV or PO	
23: Vincristine	0.7 mg/m ² IV	
25: Doxorubicin	30 mg/m ² IV (if ≤ 15 kg: 1 mg/kg)	

Abbreviations: CHOP, cyclophosphamide, hydroxyl-daunorubicin (doxorubicin; Adriamycin), Oncovin (vincristine), and prednisone; IV, intravenously; PO, orally.

ANNEXE IV : Le code des acides aminés à une et trois lettres

Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre	Code à trois lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate ou acide aspartique	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate ou acide glutamique	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

Les codes des 20 acides aminés d'après www.ponroy.com

Noms – Prénoms : DEJOIE Stéphane

Titre de la thèse : Actualité de la radioimmunothérapie ciblant le CD20 dans le traitement du lymphome non hodgkinien : intérêt d'un modèle pré-clinique canin

Résumé de la thèse

Les lymphomes non Hodgkinien (LNH) se situent au sixième rang des cancers les plus fréquents en France et au neuvième rang en terme de mortalité environ. On distingue, au sein des LNH, différentes formes. Elles se différencient anatomopathologiquement, phénotypiquement et ont en plus certaines particularités. Quel que soit leur stade au moment du diagnostic, plusieurs options thérapeutiques existent ; elles reposent sur la chimiothérapie, l'immunothérapie, la radiothérapie ou la greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Les nouvelles thérapeutiques pour lutter contre cette pathologie sont basées sur la radioimmunothérapie. Cette méthode de radiothérapie qui consiste à irradier des petites tumeurs disséminées dans l'organisme après injection intraveineuse d'un anticorps porteur d'une forte radioactivité et qui a la propriété de se fixer sélectivement sur les cellules tumorales semble en effet très prometteuse. Une des cibles utilisée dans cette thérapie est le CD20. Cette cible est d'un grand intérêt pour la recherche de thérapeutiques, car elle est sur-exprimée à la surface de la majorité des lymphomes de type B. Elle se trouve être aussi bien exprimée chez l'homme que chez l'animal.

Les nombreux succès dans ce domaine démontrent l'intérêt du modèle canin et de la thérapeutique humaine utilisée chez le chien. Les marqueurs immunohistochimiques utilisés chez les hommes sont eux aussi pertinents pour la classification des tumeurs canines. La réponse au traitement et les situations de récurrences sont également comparables. Cette étude abordera l'intérêt de constituer des protocoles de RIT ciblant le CD20 chez le chien dans la recherche préclinique humaine mais aussi de la médecine vétérinaire.

MOTS CLES

Lymphome non hodgkinien , Radioimmunothérapie, Canin, CD20

JURY

Président : Pr. Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur de Biophysique et Praticien Hospitalier au CHU de Nantes

**Assesseurs : Dr. Stéphane BIRKLÉ, Maître de conférence en Immunologie
Faculté de Pharmacie de Nantes**

**Dr. François DAVODEAU, Chargé de recherche Inserm
Unité 892, IRT de Nantes**

**Dr. Jérôme ABADIE, Maître de Conférence, Unité d'histologie-
anatomie pathologique de l'école vétérinaire de Nantes**
