

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE ED524

Equipe de recherche : UMR CNRS 7276

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie

présentée et soutenue par

M. David Rizzo

le 19 juin 2014

**Etude de paramètres biologiques influençant
l'histoire naturelle de la Leucémie Lymphoïde Chronique:
expression du CD45, sécrétion d'une IgM monoclonale et
dérégulation de ZAP70**

Thèse dirigée par Pr. Jean Feuillard

JURY

:

Président du jury

M. Michel Cogné, PU-PH, UMR CNRS7276, Faculté de médecine de Limoges

Rapporteurs

M. Christian Bastard, Docteur, INSERM U918, Centre Henri Becquerel, Rouen

M. Frédéric Davi, PU-PH, Laboratoire d'hématologie, CHU de la Pitié-Salpêtrière, Paris

Examineurs

Mme Nathalie Gachard, PH, UMR CNRS7276, Faculté de Médecine de Limoges

M. Jean Feuillard, PU-PH, UMR CNRS 7276, Faculté de Médecine de Limoges

Membres invités

M. Arnaud Jaccard, PU-PH, Service d'hématologie clinique, CHU de Limoges

Résumé

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est un syndrome lymphoprolifératif B de la personne âgée qui reste incurable à l'heure actuelle. Un nombre important de patients nécessitera un traitement par des drogues chimiotoxiques et anticorps monoclonaux. Notre objectif était d'étudier les mécanismes biologiques qui influencent l'histoire naturelle de la LLC. Nous montrons que la faible expression du CD45 était reliée à la fragilité cellulaire du clone et inversement corrélée avec la présence d'une trisomie 12, une anomalie plus fréquente dans les formes tumorales de LLC. Nous mettons également en évidence que la sécrétion d'une immunoglobuline monoclonale par la cellule tumorale est associée à une accumulation d'évènements oncogénétiques adverses et est probablement liée au répertoire du BCR exprimé par le clone. Enfin, nos résultats montrent que l'expression de la tyrosine kinase ZAP70, un marqueur de mauvais pronostic, pourrait permettre à la cellule tumorale de moduler son microenvironnement en sécrétant de l'interféron alpha. En conclusion, les facteurs biologiques étudiés suggèrent une convergence vers un rôle majeur du microenvironnement tumoral dans le développement de la LLC.

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a B cell lymphoproliferative disorder of the elderly that still remains incurable. A significant number of patients will require treatment with chemotoxic drugs and monoclonal antibodies. Our objective was to study the biological mechanisms that influence the natural history of CLL. We show that low levels of CD45 were related to cellular fragility and inversely correlated with the trisomy 12 that is more frequent in tumoral forms of CLL. We also demonstrated that the secretion of monoclonal immunoglobuline by the tumor cell is associated with an accumulation of adverse oncogenetic events and our data support a BCR-driven origin for this secreting state. Finally, we show that the expression of the tyrosine kinase, a marker of poor prognosis, could allow tumor cell to modulate the microenvironment by secreting interferon alpha. In conclusion, the studied biological factors may show a convergence towards a major role of the tumor microenvironment in the development of CLL.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Frédéric Davi et Monsieur le Docteur Christian Bastard, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Votre expertise et votre sens critique m'ont permis d'entrevoir les bons et moins bons aspects de mon travail.

Je remercie Madame le Docteur Nathalie Gachard, Monsieur le Professeur Michel Cogné et Monsieur le Professeur Arnaud Jaccard pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie particulièrement Monsieur le Professeur Jean Feuillard, qui a dirigé très activement mon travail de recherche.

Je tiens également à remercier Madame le Docteur Jasmine Chauzeix pour son aide précieuse lors des multiples séries de séquençage que nous avons du réaliser pour le second article présenté dans ce manuscrit.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire d'Hématologie du CHU de Limoges, en particulier mes collègues biologistes, pour m'avoir permis de trouver le temps nécessaire à ce travail de thèse.

Je remercie également l'ensemble du laboratoire de l'UMR CNRS 7276 pour les divers échanges scientifiques que nous avons pu avoir.

Enfin, je remercie ma famille, tout particulièrement Aurélie et Clémentine, d'avoir fait preuve d'une grande compréhension en acceptant mes absences répétées durant ces derniers mois. Merci pour votre soutien sans faille.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Liste des abréviations | 9 |
| Liste des figures | 11 |
| Liste des tableaux | 13 |
| I. AVANT-PROPOS | 14 |
| II. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 16 |
| LA DIFFERENCIATION LYMPHOCYTAIRE B NORMALE | 16 |
| 1. Structure générale des immunoglobulines et du BCR | 16 |
| 1.1. Structure générale d'une immunoglobuline..... | 16 |
| 1.2. Les gènes des immunoglobulines | 18 |
| 1.3. Structure du récepteur à l'antigène de la cellule B ou BCR :..... | 19 |
| 1.4. La signalisation du BCR et co-signaux | 20 |
| 2. Différenciation lymphocytaire B indépendante de l'antigène..... | 23 |
| 2.1. Le stade pré-pro B : | 23 |
| 2.2. Le stade pro-B : | 23 |
| 2.3. Mécanismes moléculaires de recombinaison VDJ..... | 25 |
| 2.4. Le stade pré-B : | 27 |
| 2.5. Le lymphocyte B immature | 29 |
| 2.6. Le lymphocyte B transitionnel | 29 |
| 3. Différenciation lymphocytaire B dépendante de l'antigène..... | 30 |
| 3.1. Réponse immune T-dépendante | 30 |
| 3.2. Réponse immune T-indépendante | 36 |
| LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE | 38 |
| 1. Définition OMS 2008 de la Leucémie Lymphoïde Chronique | 38 |
| 2. Repères historiques de la LLC..... | 38 |
| 3. Epidémiologie | 40 |
| 3.1. Epidémiologie descriptive | 40 |
| 3.2. Epidémiologie explicative : | 45 |
| 4. Microenvironnement de la LLC | 48 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 4.1. | Trafic cellulaire et « homing » des cellules tumorales au sein des zones de prolifération | 48 |
| 4.2. | Implication des TLRs :..... | 51 |
| 4.3. | Interactions cellulaires | 52 |
| 5. | Phase précoce de la maladie : la lymphocytose B monoclonale | 59 |
| 5.1. | Définition des lymphocytoses B monoclonales | 59 |
| 5.2. | Epidémiologie et histoire de la maladie : | 60 |
| 5.3. | Biologie comparative des MBL CLL-like et des LLC : | 61 |
| 6. | Aspects cliniques, diagnostic biologique, évaluation pronostique et principes de prise en charge des patients atteints de LLC : actualités et bilan pratique..... | 62 |
| 6.1. | Les aspects cliniques de la LLC | 62 |
| 6.2. | Cytologie : | 66 |
| 6.3. | Caractérisation immunophénotypique..... | 69 |
| 6.4. | Anomalies cytogénétiques..... | 76 |
| 6.5. | Les mutations et dérégulation d'expression de gènes | 85 |
| 6.6. | Cas particulier de l'évaluation fonctionnelle du statut p53 et ATM..... | 101 |
| 6.7. | Le récepteur à l'antigène des cellules de LLC | 102 |
| 6.8. | Les marqueurs pronostiques sériques..... | 103 |
| 6.9. | Evaluation pronostique et traitement en pratique courante..... | 108 |
| 7. | Le BCR : mutations somatiques, répertoire et rôle de ZAP70 | 117 |
| 7.1. | Le statut mutationnel du locus IgVH..... | 118 |
| 7.2. | Expression d'AID et recombinaison de classe des cellules de LLC..... | 120 |
| 7.3. | Le répertoire du BCR et BCR stéréotypés | 122 |
| 7.4. | La spécificité antigénique, BCR tonique et BCR autonome | 126 |
| 7.5. | Structure et fonction de ZAP70 dans les lymphopathies B | 127 |
| 8. | Synthèse brève | 141 |
| III. | PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS | 144 |
| IV. | MATERIELS ET METHODES..... | 146 |
| 1. | Cultures cellulaires et stimulation du BCR : | 146 |
| 1.1. | Lignées cellulaires : | 146 |
| 1.2. | Cellules primaires de LLC | 146 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 1.3. | Culture cellulaire et pontage du BCR | 147 |
| 1.4. | Révélation du BCR tonique par le pervanadate..... | 147 |
| 2. | Cytométrie en flux :..... | 148 |
| 2.1. | Quantification de l'apoptose : | 148 |
| 2.2. | Marquage intracytoplasmique de ZAP70: | 148 |
| 3. | Explorations protéiques : | 148 |
| 3.1. | Extraction des protéines : | 148 |
| 3.2. | Western-blot : | 149 |
| 3.3. | Mesure de la phosphorylation de ZAP70 (Y319) par ELISA | 150 |
| 4. | Biologie moléculaire : | 150 |
| 4.1. | Préparation des acides nucléiques : | 150 |
| 4.2. | PCR, RQ-PCR et séquençage | 150 |
| 4.3. | Clonage dans le vecteur pcDNA3 | 151 |
| V. | RESULTATS..... | 154 |
| | ARTICLE 1 :..... | 155 |
| 1. | Introduction :..... | 155 |
| 2. | Article 1 : | 156 |
| 3. | Discussion de l'article 1 | 157 |
| | ARTICLE 2 :..... | 159 |
| 1. | Introduction..... | 159 |
| 2. | Article 2 : | 160 |
| 3. | Discussion de l'article 2 | 161 |
| | ARTICLE 3 :..... | 163 |
| 1. | Introduction :..... | 163 |
| 2. | Article 3 : | 164 |
| 3. | Discussion l'article 3 | 165 |
| | ETUDE FONCTIONNELLE DE ZAP70 DANS LE LYMPHOCYTE B..... | 167 |
| 1. | Critères de choix des modèles de lignée cellulaire BL2 et BL41 | 167 |
| 2. | Validation du modèle de surexpression de ZAP70 dans la lignée BL2..... | 168 |
| 2.1. | Vérification du statut ZAP70 des cellules BL2 :..... | 168 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 2.2. | Contrôle de l'implication fonctionnelle de ZAP70 dans le signalosome du BCR des modèles cellulaires BL2 et BL41 non transfectés :..... | 168 |
| 3. | Comparaison des lignées cellulaires et des cellules primaires de LLC..... | 170 |
| 3.1. | Comparaison du signal BCR tonique et de la sensibilité à la stimulation du BCR par le fragment F(ab') ₂ anti-IgM : | 170 |
| 3.2. | Comparaison de la finalité fonctionnelle de la stimulation du BCR in vitro dans la lignée BL2 et les cellules primaires de LLC : | 170 |
| 4. | Etude de l'impact fonctionnel de ZAP70 dans la signalisation du BCR | 172 |
| 4.1. | Clonage de ZAP70 dans un vecteur d'expression constitutive | 172 |
| 4.2. | Impact fonctionnel de ZAP70 dans la signalisation précoce du BCR..... | 172 |
| 4.1. | ZAP70 et dégradation de Syk après stimulation du BCR | 175 |
| 4.2. | Impact fonctionnel de ZAP70 dans le signal tonique du BCR..... | 176 |
| 5. | Etude du rôle de ZAP70 dans l'équilibre apoptose / prolifération | 178 |
| 6. | Résultats préliminaires sur la relation entre statut ZAP70 et interféron α | 179 |
| 7. | Résultats préliminaires concernant la régulation de ZAP70 dans le lymphocyte B tumoral de LLC | 182 |
| 8. | Conclusion sur le rôle fonctionnel de ZAP70 | 184 |
| VI. | DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... | 186 |
| 1. | Signification de la multitude des facteurs pronostiques dans la LLC..... | 186 |
| 2. | Signification de la sécrétion de l'immunoglobuline par les cellules de LLC..... | 190 |
| 3. | Rôle fonctionnel de ZAP70 et microenvironnement des cellules tumorales .. | 193 |
| 3.1. | ZAP70 et signal du BCR | 193 |
| 3.2. | ZAP70 et apoptose spontanée des cellules B tumorales..... | 194 |
| 3.3. | ZAP70 et interféron alpha..... | 195 |
| 3.4. | Régulation de l'expression de ZAP70 dans les cellules de LLC | 197 |
| 3.5. | Hypothèses autour de la surexpression de ZAP70 dans les lymphocytes T autologues des patients atteints de LLC | 198 |
| 3.6. | Perspectives de recherche sur le rôle fonctionnel de ZAP70 dans la LLC | 199 |
| 4. | Conclusion générale sur le travail de thèse | 201 |
| VII. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 203 |

Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| Abl : Abelson | ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif |
| ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire | iWCLL : groupe de travail international sur la LLC |
| Akt : v-akt murine thymoma viral oncogene homolog | Lck : Leucocyte-specific protéin tyrosine kinase |
| APRIL : a proliferation inducing ligand | LH : lymphome hodgkinien |
| ARNm : Acide ribonuléique messenger | LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique |
| BAFF : B cell Activity Factor of the tumor necrosis factor Family | LNH : Lymphome non hodgkinien |
| Bcl -XL : longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein from avian | LOH : loss of heterozygotie |
| Bcl2 : B-cell lymphoma 2 | LPL : lymphoplasmacytic lymphoma ou lipoprotéine lipase |
| BCR : B celle receptor | Lyn : V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog |
| BLNK : B cell linker (autre nom :SLP-65) | mAb : anticorps monoclonal |
| BTK : Bruton's tyrosine kinase | MAP-kinase : mitogen activated protein kinase |
| Cbl : Casitas B-lineage lymphoma | MCL : mantle cell lymphoma |
| CG : centre germinatif | MFI : moyenne de fluorescence |
| CMF : cytométrie en flux | MM : myelome multiple |
| CMH : complexe majeur d'histocompatibilité | mTOR : mammalian target of rapamycin |
| CNV : copy number variation | MyD88 : myeloïd differentiation primary response gene (88) |
| CXCL : chemokine (C-X-C motif) ligand | MW : macroglobulinémie de Waldenström |
| DAG : diacylglycerol | MZL : marginal zone lymphoma |
| DLBCL : diffuse large B-cell lymphoma | NF-κB : nuclear factor kappa B |
| DO : densité optique | NGS : next generation sequencing |
| DMSO : dimethyl sulfoxyde | NK : natural killer |
| ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay | PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis |
| Erk : extracellular signal-regulated kinase | PBS : Phosphate buffered saline |
| FCL : Follicular cell lymphoma | PIP3 : phosphoinositol-3-phosphate |
| FcR : recepteur du fragment Fc des Ig | PI3K : phospho-inositide-3 kinase |
| FCR : fludarabine cyclophosphamide rituximab | PKC : phosphokinase C |
| FITC : Fluoresceïne Isothiocyanate | PLCγ2 : Phospholipase C gamma 2 |
| Fyn : FYN oncogene related to SRC, FGR, YES | PTK : protein tyrosine kinase |
| Hb : hémoglobine | PVDF : polyvynilidene fluoride |
| Hsp90 : heat shock protein of 90 kDa | RAF : v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog |
| Ig : immunoglobuline | RAS : RAS guanyl releasing protein |
| IgVH : locus de la chaine lourde des immunoglobulines | Rb : retinoblastoma |
| IP3 : 1,4,5-inositol triphosphate | RFC : rituximab fludarabine cyclophosphamide |
| ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activator motif | |

RT : reverse transcription
SDF1 : stromal cell derived factor-1 (=CXCL12)
SDS : sodium dodecylsulfate
SH2 : Src homology domain type 2
SLL : lymphoma lymphocytiq
Src : v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
Syk : Spleen tyrosine kinase
TCR : T cell receptor
TER : taux d'expression relative

TK : thymidine kinase
TLR : Toll-like receptor
TTBS : Tween-20 Tris buffered saline
TZK : truncated ZAP kinase
UPD : uniparental disomy
UTR : untranslated region
Vav : vav guanine nucleotid exchange factor
WB : western-blot
WGAS : wide genome association study
ZAP70 : zeta associated protéin of 70 kDa

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Schéma général de la structure d'une immunoglobuline..... | 17 |
| Figure 2 : Schéma de la configuration germinale des loci des gènes des immunoglobulines. | 18 |
| Figure 3 : Répartition des régions hypervariables CDR sur le réarrangement VDJ..... | 19 |
| Figure 4 : Immunoglobuline de surface associée au CD79A et CD79B constituant le BCR. | 20 |
| Figure 5 : Les voies de signalisation contrôlées par le BCR..... | 21 |
| Figure 6 : Schéma des principaux co-sigaux activateurs reçu par le lymphocyte B. | 22 |
| Figure 7 : Représentation schématique du principe de recombinaison VDJ. | 24 |
| Figure 8 : Réarrangements séquentiels du locus de la chaîne lourde et de la chaîne légère.. | 25 |
| Figure 9 : Représentation schématique des séquences RSS et des loci IgH, IgK et IgL..... | 26 |
| Figure 10 : Les étapes de la diversité jonctionnelle. | 28 |
| Figure 11 : Présentation du centre germinatif..... | 32 |
| Figure 12 : Principe des mutations somatiques introduites par AID. | 34 |
| Figure 13 : Principe de la commutation de classe induite par l'action d'AID. | 35 |
| Figure 14 : Age au diagnostic des cas incidents de LLC en France en 2012. | 41 |
| Figure 15 : Nombre de cas incidents par hémopathies en France en 2012. | 42 |
| Figure 16 : Ombre de Gümprecht observables sur les frottis sanguin. | 67 |
| Figure 17 : Immunophénotypage complet d'une série de LLC et de MBL..... | 70 |
| Figure 18 : Schéma représentant le déroulement du chromothripsis..... | 82 |
| Figure 19 : Orientation du choix de traitement de première ligne de la LLC. | 111 |
| Figure 20 : Comparaison des répertoires IGHV des lymphocytes B normaux et des lymphocytes B de LLC. | 123 |

| | |
|--|-----|
| Figure 21 : Structure schématique des différents isoformes de ZAP70 et Syk..... | 128 |
| Figure 22 : Corrélation du niveau d'expression de ZAP70 dans les lymphocytes T avec celui des lymphocytes B et la lymphocytose absolue totale..... | 166 |
| Figure 23 : Evaluation du niveau d'expression de ZAP70 dans les lignées BL2 et BL41. | 169 |
| Figure 24 : Phosphorylation de la tyrosine Y319 de ZAP70 après stimulation du BCR..... | 169 |
| Figure 25 : Comparaison du signal NCR entre la lignée BL2 et les cellules primaires de LLC. | 170 |
| Figure 26 : Induction de l'apoptose par le BCR sur les lignées BL..... | 171 |
| Figure 27 : Construction du vecteur d'expression constitutive pcDNA3-ZAP..... | 172 |
| Figure 28 : Impact de ZAP70 sur la signalisation proximale du BCR..... | 173 |
| Figure 29 : Impact fonctionnel de ZAP70 dans la signalisation précoce du BCR. | 174 |
| Figure 30 : Impact fonctionnel de ZAP70 dans la régulation tardive du BCR. | 176 |
| Figure 31 : Evaluation de l'impact fonctionnel de ZAP70 sur le signal tonique du BCR. | 177 |
| Figure 32 : Evaluation de l'impact du statut ZAP70 sur l'apoptose des cellules B. | 179 |
| Figure 33 : Niveau d'expression de l'ARNm des interférons dans LLC et la lignée BL2. | 181 |
| Figure 34 : Expression de ZAP70 en réponse à une stimulation par IL2 + DSP30..... | 183 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Principaux gènes impliqués dans la prédisposition génétique de la LLC. | 44 |
| Tableau 2 : Critères de classification clinico-biologique de Rai et de Binet..... | 63 |
| Tableau 3 : Principaux marqueurs sériques modifiés au cours de la LLC. | 104 |
| Tableau 4 : Signes d'évolutivité de la LLC selon les recommandations internationales. | 109 |
| Tableau 5 : Fréquence observées de l'expression de ZAP70 dans les lymphopathies B. | 134 |
| Tableau 6 : Classification des LAL-B selon l'EGIL..... | 135 |

I. AVANT-PROPOS

La Leucémie Lymphoïde Chronique ou LLC est un syndrome lymphoprolifératif très fréquent en occident qui touche particulièrement les personnes âgées et seulement 15% des diagnostics sont réalisés avant l'âge de 60 ans en France [1].

Cette hémopathie maligne est identifiée depuis le début du XX^{ème} siècle et malgré son caractère chronique souvent qualifié d'indolent, l'évolution « variable et imprévisible » de la maladie a longtemps été la règle au cours du suivi du patient [2].

Le diagnostic de la LLC est souvent fortuit lors d'un bilan sanguin systématique. Elle se caractérise au début par une hyperlymphocytose constituée de petits lymphocytes matures exprimant le marqueur CD5. Ces cellules clonales s'accumulent peu à peu dans l'organisme et les cas plus évolués présentent des adénopathies puis des cytopénies par envahissement de la moelle osseuse. Les patients atteints de LLC peuvent également présenter des cytopénies aiguës d'origine auto-immune et, pour certains, une « transformation » en lymphome agressif peut survenir. Cependant, cette hémopathie est aussi associée à une immunodépression latente, marquée par une hypogammaglobulinémie, presque constante après plusieurs années d'évolution, à l'origine d'infections graves constituant la 1^{ère} cause de décès chez les patients.

On sait aujourd'hui que la LLC, comme le myélome multiple ou le lymphome folliculaire par exemple, est précédée pendant plusieurs années d'une phase « précoce » où le clone lymphocytaire est détectable à faible niveau dans le sang sans pour autant réunir les critères complets du diagnostic de LLC. Comme pour le myélome, environ 1% à 2% des patients présentant cette phase dite de « lymphocytose B monoclonale de type LLC » évolue chaque année vers une LLC authentique.

Cette hémopathie chronique d'évolution très variable est étroitement intriquée avec le système immunitaire. La LLC passionne la communauté scientifique et médicale eut égard

aux plus de 20000 articles référencés à ce jour, depuis 1949, dans la base de donnée PubMed.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux facteurs biologiques susceptibles d'influencer ou de contrôler l'évolution du clone de LLC vers des formes évolutives et agressives de la maladie. Même s'il est difficile de faire une synthèse exhaustive de cette littérature, l'introduction bibliographique présentée dans ce document essaye de rendre compte de la complexité de la biologie de la LLC et des interactions des cellules clonales avec leur microenvironnement. Dans une seconde partie du document, nous exposons et discutons les résultats obtenus concernant la fragilité cellulaire, la sécrétion d'une immunoglobuline monoclonale et la surexpression de la kinase ZAP70.

II. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

LA DIFFERENCIATION LYMPHOCYTAIRE B NORMALE

Ce chapitre a pour objectif de rappeler les connaissances générales nécessaires à la compréhension de la LLC. La structure générale d'une immunoglobuline et du BCR est d'abord introduite. Ce chapitre rappelle ensuite brièvement les étapes importantes de l'ontogénèse B à partir de la cellule souche hématopoïétique médullaire et de la diversification du répertoire du BCR. Il se poursuit par la description des événements qui interviennent en périphérie, en particulier lors de la réponse immunitaire T-dépendante et T-indépendante.

1. Structure générale des immunoglobulines et du BCR

1.1. Structure générale d'une immunoglobuline

L'immunoglobuline (Ig) est une hétéroprotéine composée de 2 chaînes lourdes (H pour « heavy ») et de 2 chaînes légères (L pour « light ») identiques deux à deux (Figure 1). La fonction d'une immunoglobuline est de reconnaître un antigène spécifique. L'Ig peut être sécrétée dans le sérum ou être localisée à la surface du lymphocyte B pour constituer le « récepteur à l'antigène de la cellule B » ou BCR [3].

La chaîne légère peut être d'isotype Kappa (κ) ou Lambda (λ). Ces 2 chaînes sont codées par des gènes différents et comportent 1 domaine variable VL et 1 domaine constant CL qui définit l'isotype κ ou λ de la chaîne [3].

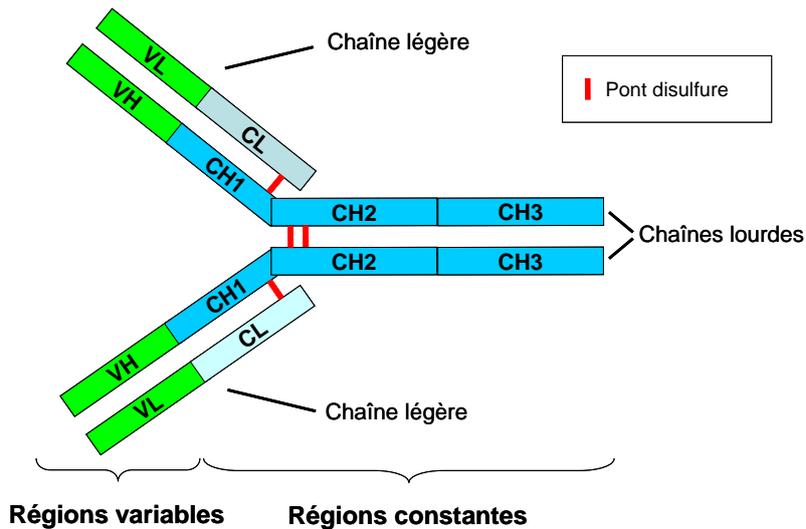


Figure 1 : Schéma général de la structure d'une immunoglobuline.

Adapté d'après MP. Lefranc *et al.*, www.imgt.org [4].

La chaîne lourde comporte 1 domaine variable VH porteur de la spécificité antigénique et 3 domaines constants CH1, CH2 et CH3 pour les isotypes δ , γ , α ou 4 domaines constants CH1 à CH4 pour les isotypes μ ou ϵ . L'assemblage d'un dimère de chaîne lourde μ , δ , γ , α ou ϵ avec un dimère de chaîne légère κ ou λ définit une immunoglobuline de classe IgM, IgD, IgG, IgA ou IgE respectivement. Toutes ces classes de la chaîne lourde sont produites par un locus unique IgH. Les immunoglobulines de nature IgM et IgD sont les premières à être produites par épissage alternatif d'un transcrite primaire commun. La commutation de classe, *i.e.* l'expression d'une IgG, IgA ou IgE est déterminée par le remaniement du locus et orientée par les stimuli que le lymphocyte B reçoit lors de la réponse immunitaire. Les IgG sont les plus abondantes dans le sérum et on distingue les sous-classes IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Ces IgG sont capables de reconnaître une grande diversité d'antigènes. Les IgA sont spécialisées dans l'immunité des muqueuses et les IgE sont particulièrement impliquées dans la reconnaissance des antigènes parasitaires et les phénomènes d'hypersensibilité [3].

1.2. Les gènes des immunoglobulines

Les gènes des immunoglobulines sont organisés en 3 loci localisés sur le chromosome 14 pour le locus IgH, le chromosome 2 pour le locus IgK et le chromosome 22 pour le locus IgL (Figure 2) [3].

Le domaine variable de la chaîne lourde, V_H , est codé par un assemblage de gènes V (« variability »), D (« diversity ») et J (« junction »). Une seule combinaison de gènes V, D et J est utilisée par chaque lymphocyte B lors de la phase de différenciation indépendante de l'antigène. Chaque domaine constant de la chaîne lourde est codé par 1 gène unique qui peut être réarrangé au cours de la phase de différenciation dépendante de l'antigène.

Les domaines variables des chaînes légères sont codés par une combinaison de gènes V et J seulement. Le domaine constant de la chaîne κ est codé par un gène unique. Le domaine constant de la chaîne λ est codé par plusieurs copies du gène $C\lambda$, chacune étant associée à 1 gène $J\lambda$ (tandems $C\lambda$ – $J\lambda$).

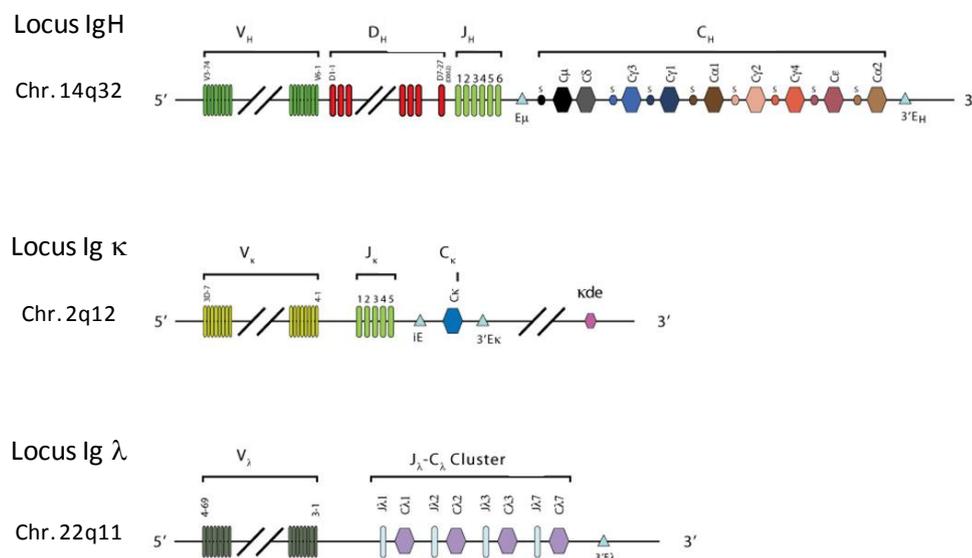


Figure 2 : Schéma de la configuration germinale des loci des gènes des immunoglobulines.

Adapté d'après Shroeder et Cavacini, 2010.

Chez l'homme, le domaine variable de la chaîne lourde IgVH comporte 123 à 129 gènes V (dont 38 à 46 fonctionnels), 27 gènes D (dont 23 fonctionnels) et 9 gènes J (dont 6 fonctionnels) [5]. Le locus de la chaîne légère κ comporte 76 gènes V (dont 31 à 35 fonctionnels) et 5 gènes J [6]. Le locus de la chaîne légère λ comporte 73 à 74 gènes V (dont 29 à 33 fonctionnels) et 7 à 11 tandems J λ -C λ (dont 4 à 5 fonctionnels) [7].

Les domaines variables de la chaîne lourde et des chaînes légères sont au final constitués de 4 régions peu variables (régions FR1 à FR4 pour « framework ») qui encadrent 3 régions hypervariables qui sont les régions qui entrent en contact avec l'antigène (CDR1 à CDR3, « complementary determining region »). Les CDR1 et 2 sont codés par le gène V alors que la région CDR3 correspond à la jonction VDJ pour la chaîne lourde et VJ pour les chaînes légères (Figure 3).

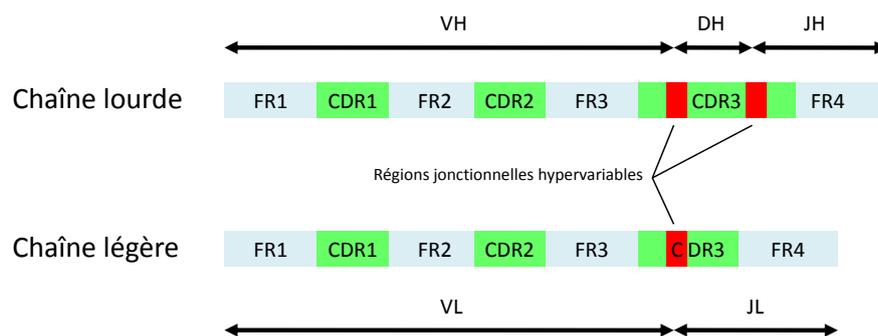


Figure 3 : Répartition des régions hypervariables CDR sur le réarrangement VDJ.

Les régions variables des chaînes lourdes et légères sont composées de 4 domaines peu variables (« framework » ou FR) encadrant des domaines hypervariables (« complementary determining region » ou CDR) qui sont en contact avec l'antigène. La région la plus variable est la région CDR3 située au niveau de la jonction VDJ. Adapté d'après Collins *et al.* [8].

1.3. Structure du récepteur à l'antigène de la cellule B ou BCR :

Le BCR est composé d'une Ig transmembranaire complète associée aux adaptateurs transmembranaires CD79A (Ig α) et CD79B (Ig β) possédant des régions ITAMs (« immunoreceptor tyrosine-based activation motif ») contenant chacun 1 résidu tyrosine indispensable à la transduction du signal (Figure 4). L'Ig de surface peut être de nature IgM,

IgD, IgG, IgA ou IgE en fonction de la chaîne lourde utilisée et selon le degré de maturation du lymphocyte B. La chaîne légère est d'isotype κ dans 2/3 des lymphocytes B et λ dans 1/3 des cas [9].

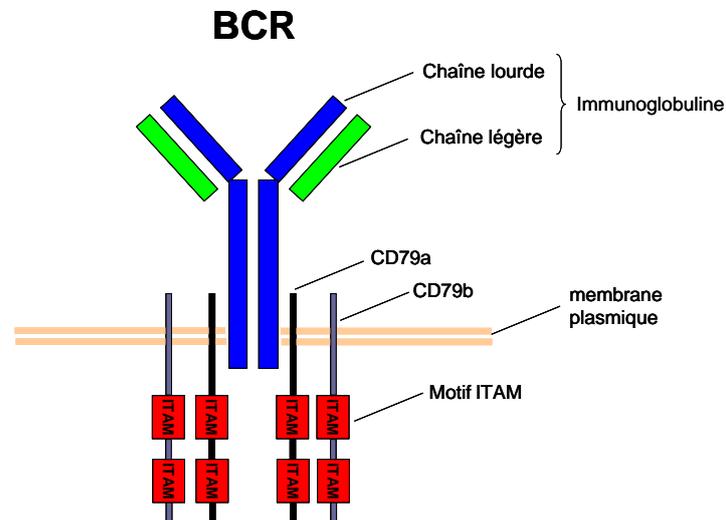


Figure 4 : Immunoglobuline de surface associée au CD79A et CD79B constituant le BCR.

1.4. La signalisation du BCR et co-signaux

Le BCR est un récepteur spécifique capable d'activer le lymphocyte B lorsqu'il se lie à l'antigène. La signalisation du BCR est complexe car de multiples voies sont activées de manière concomitante et a récemment été revue par Young et Staudt [10]. Lorsque l'antigène est reconnu, les résidus tyrosine des domaines ITAMs des co-récepteurs CD79A et CD79B sont phosphorylés par les Src-kinase Lyn, Fyn et Blk [10]. La tyrosine kinase Syk (« spleen tyrosine kinase ») est alors recrutée sur ces domaines ITAM phosphorylés grâce à ses domaines SH2 (« Src homology 2 ») et est activée *in situ* par autophosphorylation et phosphorylation par les Src-kinases. Le signal se diversifie ensuite par le biais de recrutement de protéines adaptatrices comme BLNK (« B-cell linker ») par exemple qui vont recruter un ensemble de régulateurs de différentes voies de signalisation sous le BCR activé. Ainsi, Syk peut activer la voie des MAPK (« mitogen activated protein kinase »). Btk (« Bruton tyrosine kinase ») et PLC γ 2 (« phospholipase C-gamma 2 ») active le signal calcique et la PKC β

(« protein kinase C β ») qui contrôlent respectivement les facteurs de transcription NFAT (« nuclear factor-activated of T-cell ») et NF- κ B (« nuclear factor-kappa B »). Les Src-kinases activent également le CD19 qui contrôle la PI3K (« phospho-inositol-3 kinase »). La PI3K permet l'activation de la voie Akt (ou PKB, « protein kinase B ») et mTOR (« mammalian target of rapamycin »). L'ensemble des voies d'aval MAPK, NFAT, NF- κ B et Akt/mTOR active le lymphocyte B ayant reconnu l'antigène Figure 5).

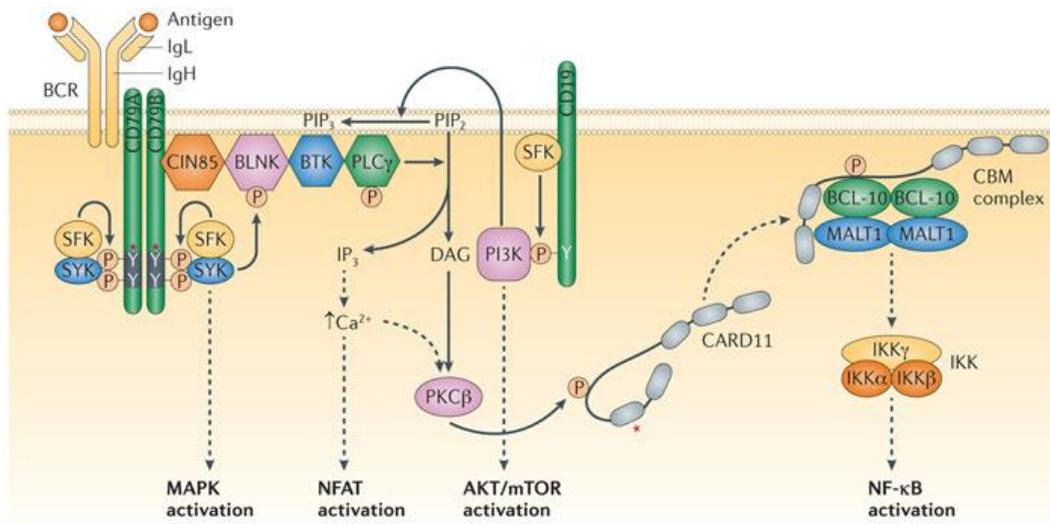


Figure 5 : Les voies de signalisation contrôlées par le BCR.

Le schéma représente les principales voies de signalisation du BCR. BLNK, B-cell linker protein; BTK, Bruton tyrosine kinase; CARD11, caspase recruitment domain-containing protein 11; CBM, CARD11–BCL-10–MALT1; CIN85, Cbl-interacting protein of 85 kDa; DAG, diacylglycerol; IKK, inhibitor of NF- κ B kinase; IgH, immunoglobulin heavy chain; IgL, immunoglobulin light chain; IP₃, inositol trisphosphate; MALT1, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NFAT, nuclear factor of activated T cells; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PIP₂, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PIP₃, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; PKC β , protein kinase C β ; PLC γ , phospholipase C γ ; SFK, SRC family kinase. Adapté d'après Young & Staudt, 2013 [10].

Lors de la reconnaissance de l'antigène par le BCR, le lymphocyte B peut recevoir des co-signaux activateurs supplémentaires provenant du microenvironnement comme l'activation du CD40 ou des TLRs (Toll like receptors) (Figure 6). Ces signaux additionnels agissent principalement sur la voie NF- κ B [11].

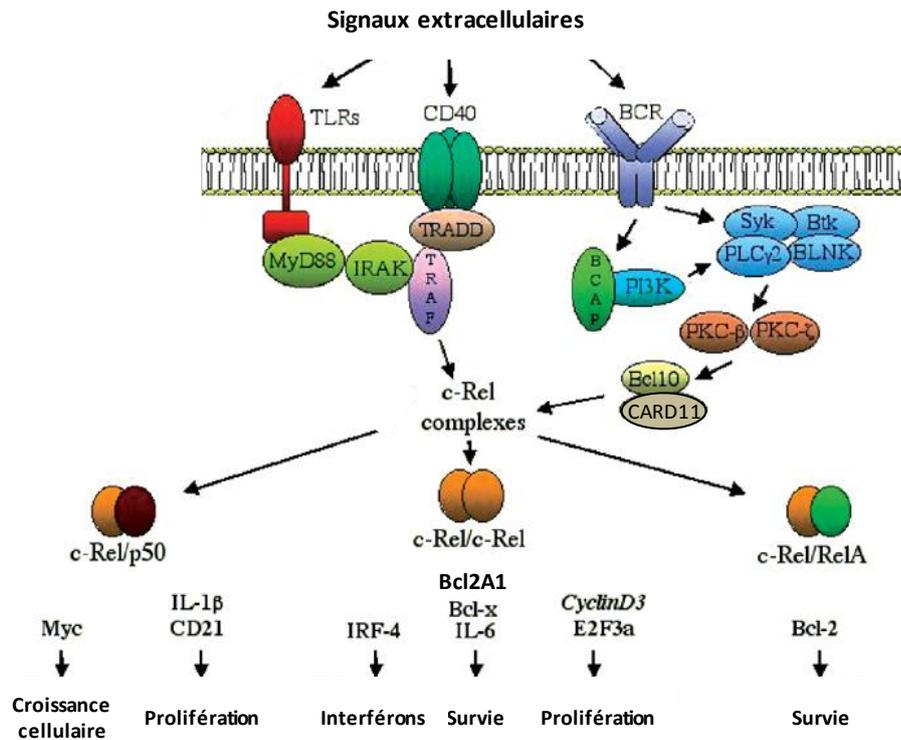


Figure 6 : Schéma des principaux co-signaux activateurs reçu par le lymphocyte B.

Le schéma représente les principales voies actives par les co-signaux des Toll-like receptors (TLR) et du CD40. TLRs : Toll-like receptors, MyD88 : Myeloid Differentiation Primary Response 88, IRAK : interleukin-1 receptor-associated kinase, TRAF : TNF receptor-associated factor, TRADD : Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein, BCAP : B cell antigen receptor (BCR)-associated protein, PI3K : phosphatidyl inositol-3 kinase, Syk : spleen tyrosine kinase, Btk : Bruton's tyrosine kinase, PLC γ 2 : phospholipase C gamma 2, BLNK : B-cell linker, PKC- β /PKC- ζ : protein kinase C beta/zeta, Bcl2/10/x : B cell lymphoma 2/10/x, CARD11 : Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 11, c-Rel/RelA : v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog C/A, Myc : v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog, IL-1 β /IL-6 : interleukine 1 β /6, IRF-4 : interferon regulatory factor 4, Bcl2A1: BCL2-Related Protein A1, E2F3a : E2F Transcription Factor 3a. Adapté d'après Gilmore *et al.*, 2004 [11].

2. Différenciation lymphocytaire B indépendante de l'antigène

La différenciation lymphocytaire B à partir de la cellule souche hématopoïétique (CSH) dans la moelle osseuse correspond à la phase de lymphopoïèse B indépendante de l'antigène. Une partie des CSH se différencie en un progéniteur lymphoïde commun (« common lymphoid precursor » ou CLP) à partir duquel l'ensemble des lymphocytes sont produits. Elle aboutit à la libération dans la circulation périphérique d'un lymphocyte B différencié porteur d'un BCR spécifique.

2.1. Le stade pré-pro B :

Il s'agit du premier stade de différenciation du lymphocyte B à partir du CLP. L'IL7 sécrétée par le microenvironnement intervient dans cette phase précoce de différenciation. Les facteurs de transcription IKAROS et PU1 (« purine box factor 1 ») sont impliqués très précocement dans cette différenciation lymphocytaire et relayés par E2A (« E box binding protein 2A ») et EBF (« early B cell factor ») qui induisent l'expression de Pax5. Pax5 est un facteur de transcription indispensable au maintien de la différenciation B dans les phases précoces de la lymphopoïèse [12]. Les cellules pré-pro B expriment encore un faible taux de Pax5 et ne portent pas de BCR à la surface.

2.2. Le stade pro-B :

Les cellules au stade pro-B expriment une ébauche de BCR, ou pro-BCR, constituée des 2 corécepteurs CD79A et CD79B associés à la calnexine. C'est à ce stade que débute le réarrangement des gènes des immunoglobulines [13]. Sous l'action de Pax5 dont le niveau d'expression a augmenté, les enzymes RAG1 et RAG2 (« recombination activating gene ») sont produites. Les enzymes RAG1 et RAG2 initient la recombinaison des gènes V, D et J du locus IgH. La première étape est une recombinaison DJ qui est générée sur les 2 allèles. La seconde étape consiste à recombiner, sur 1 premier allèle seulement, un gène V avec les gènes DJ nouvellement assemblés (Figure 7).

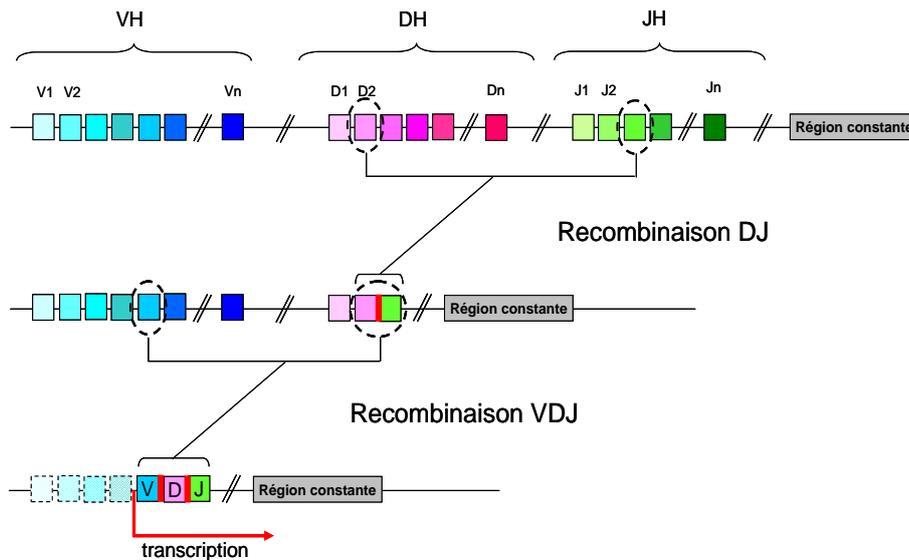


Figure 7 : Représentation schématique du principe de recombinaison VDJ.

Le locus IgH de la chaîne lourde est composé de plusieurs gènes V, plusieurs gènes D et plusieurs gènes J. Lors de la différenciation B, un premier réarrangement DJ est produit par recombinaison avant qu'un gène V ne soit enfin également réarrangé sur le tandem DJ nouvellement formé. Ce réarrangement VDJ est fonctionnel et permet la transcription d'un ARNm.

La recombinaison VDJ constitue le 1^{er} point de contrôle majeur de la différenciation B. Elle permet l'expression d'une chaîne lourde μ qui va s'associer à une pseudo-chaîne légère constituée des protéines V-pré-B et $\lambda 5$. Cette construction (chaîne μ + pseudo-chaîne légère) est exprimée à la surface et forme le pré-BCR en association avec les corécepteurs CD79A et CD79B et va permettre de tester la fonctionnalité du réarrangement VDJ, indispensable à la survie de la cellule [12]. Si le 1^{er} réarrangement VDJ n'est pas fonctionnel (2/3 des cas), le 2nd allèle est réarrangé avec le même taux d'échec (2/3) (Figure 8). Au final, l'expression du pré-BCR marque le passage au stade de différenciation pré-B [14].

Chaque gène V et J est associé à 1 RSS12 respectivement en 3' et en 5'. Les gènes D sont encadrés en 5' et en 3' par 2 RSS23 en orientation opposée (Figure 9). Cette configuration des séquences RSS12 et RSS23 de part et d'autre des gènes V, D et J permet de ne pas favoriser des réarrangements stochastiques illégitimes entre les différents gènes du locus.

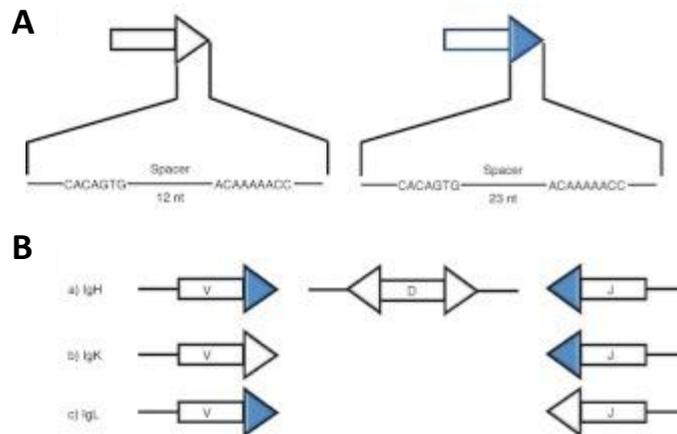


Figure 9 : Représentation schématique des séquences RSS et des loci IgH, IgK et IgL.

Panel A : représentation de l'organisation orientée des séquences RSS12 et RSS23. Panel B : disposition des séquences RSS12 et RSS23 dans les loci IgH, IgK et IgL. Adapté d'après Nishana *et al.*, 2012 [15].

Au-delà de la diversité combinatoire entre 1 gène V, 1 gène D et 1 gène J, le mécanisme de recombinaison introduit une diversité jonctionnelle. Lors de la cassure double brin engendrée par le complexe de recombinaison, il se forme une boucle covalente entre le résidu 3'-OH d'un brin et le brin d'ADN opposé (Figure 10A). Cette cassure est alors réparée par le principal système enzymatique engagé dans la réparation des cassures double brin. Il s'agit d'un système ubiquitaire de jonction d'extrémités non homologues ou NHEJ (« Non homologous End-Joining system »). Ce système commence son action par l'ouverture de la boucle covalente. Cette ouverture peut ne pas être centrale, engendrant alors l'addition d'une séquence palindromique ou « P-nucléotides » (Figure 10B). Ensuite, il y a action d'une exonucléase du système NHEJ qui agit de manière peu précise et peut exciser jusqu'à 15 nucléotides, surtout s'il s'agit de séquences riches en bases AT (Figure 10C). Ces modifications permettent au système de réparer une cassure double brin au prix de l'introduction de mutations dans les régions concernées. Dans la recombinaison VDJ, une autre enzyme, spécifique du tissu lymphoïde, intervient lors de la réparation de la cassure

double brin par le système NHEJ. Il s'agit de la TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) qui rajoute des nucléotides au hasard sur l'une des 2 extrémités 3'. Ces nucléotides sont intégrés sans complémentarité avec un brin antisens, on les appelle des « N-nucléotides » (Non-templated nucleotides) (Figure 10D). Les extrémités libres sont enfin jointes par le couple DNA Ligase IV et XRCC4 (X-Ray Cross-Complementing 4) et la complémentarité des 2 brins d'ADN rétablie par diverses DNA polymérases (Figure 10E et F) [8,16]. La variabilité jonctionnelle est donc la résultante des P-nucléotides et N-nucléotides résiduels après action de l'exonucléase.

2.4. Le stade pré-B :

La cellule B exprimant un pré-BCR est un pré-BI. Le pré-BCR émet un signal de survie à la cellule grâce à la chaîne $\lambda 5$ qui reconnaît la galectine-1 exprimée par les cellules stromales médullaires [18]. Le signal du pré-BCR réprime l'expression des gènes RAG1 et RAG2 et inhibe le réarrangement du second allèle IgH. Il donne également un signal de prolifération à la cellule qui devient une « large pré-BII » proliférant [19–21]. Enfin le pré-BCR réprime l'expression de la pseudo-chaîne légère et induit la perte de son expression membranaire. La cellule devient alors, après prolifération, un « small pré-BII » [19–21].

La perte d'expression du pré-BCR permet aux gènes RAG1 et RAG2 d'être à nouveau exprimés. Ils vont maintenant réarranger le locus de la chaîne légère, le locus IgH n'étant plus « disponible » pour ces remaniements grâce à des processus épigénétiques d'hétérochromatisation [22]. Le réarrangement VJ de la chaîne légère est également très ordonné. Il débute par un 1^{er} allèle κ . Si un réarrangement fonctionnel est produit, cette chaîne κ s'associera à la chaîne μ et la structure sera exprimée à la membrane avec CD79A et CD79B pour former un BCR marquant le passage au stade de lymphocyte B immature. L'expression d'un BCR fonctionnel est le second point de contrôle de la lymphopoïèse B intramédullaire [19–21]. Si le réarrangement du 1^{er} allèle κ est non fonctionnel, le système complexe de recombinaison réarrangera séquentiellement le 2nd allèle κ puis le 1^{er} et 2nd allèle λ (Figure 8). Si aucun BCR fonctionnel ne peut être produit, la cellule meurt par apoptose.

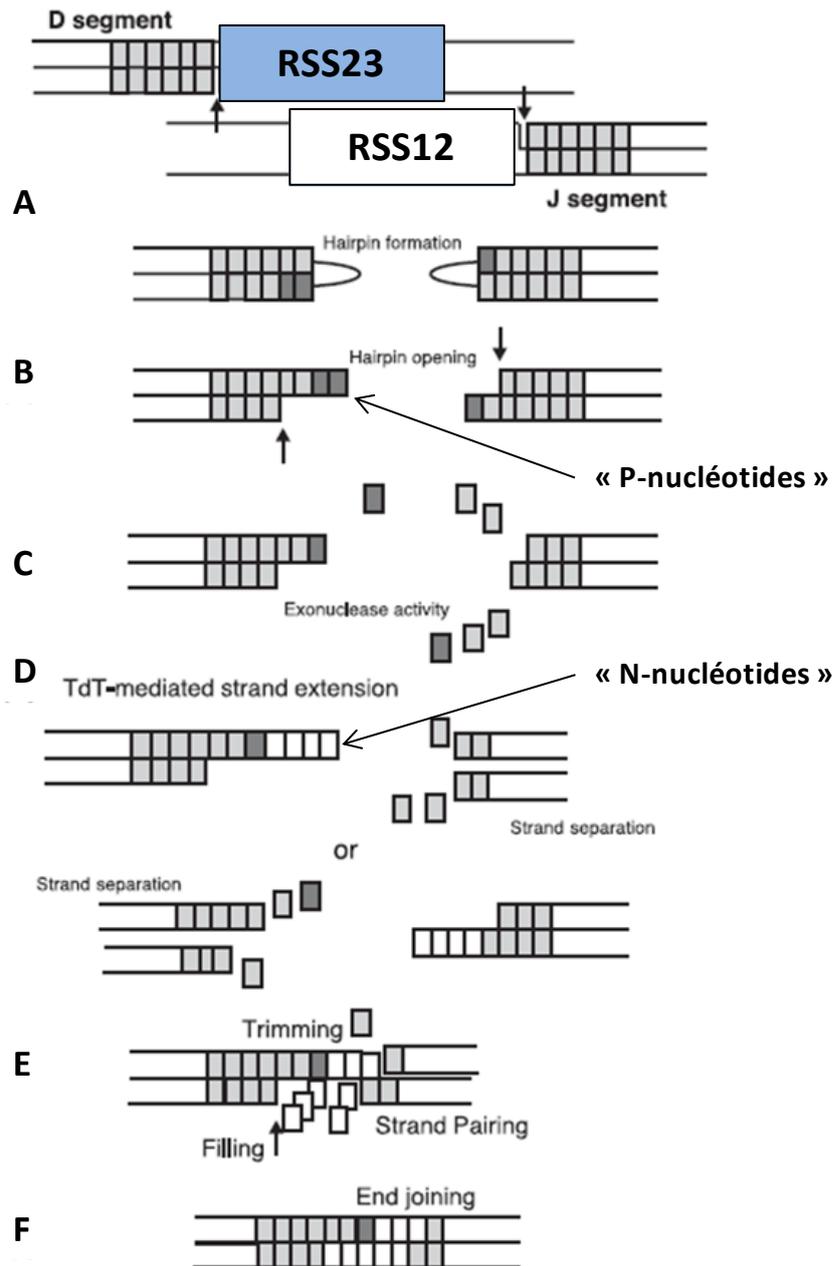


Figure 10 : Les étapes de la diversité jonctionnelle.

Panel A : RAG1 et RAG2 catalysent une cassure double-brin au niveau des régions RSS, autorisant la formation d'une boucle entre les 2 brins opposés. Panel B : cette boucle est ouverte mais parfois de manière non symétrique, introduisant une séquence palindromique en 3' (= P-nucléotides représentés par les cubes gris foncé). Panel C : une exonucléase excise certains de ces nucléotides. Panel D : la TdT catalyse l'élongation en 3' sur 1 seul des 2 brins de nucléotides au hasard (= N-nucléotides représentés par les cubes blancs). Panels E et F : les extrémités modifiées sont soudées et complétées par des DNA ligase et DNA polymerase. Adapté d'après Collins *et al.* [8].

2.5. Le lymphocyte B immature

Le lymphocyte B immature est caractérisé par l'expression d'un BCR de nature IgM. Son phénotype à ce stade est donc IgM⁺ IgD⁻ et seuls les lymphocytes B non autoréactifs seront libérés dans la circulation périphérique. Plusieurs mécanismes existent pour empêcher ces lymphocytes B d'engager un processus auto-immun. Les cellules B autoréactives peuvent être éliminées par apoptose (délétion clonale). D'autres cellules peuvent être orientées vers un état d'anergie ou subir une ignorance clonale si l'antigène est faiblement représenté dans la moelle [23]. Enfin un processus d'édition du BCR (« receptor editing ») est possible par un réarrangement secondaire sur l'allèle déjà réarrangé ou les autres allèles [24].

2.6. Le lymphocyte B transitionnel

Le lymphocyte B immature libéré dans la circulation périphérique est appelé lymphocyte B transitionnel précoce ou T1. Cette phase transitionnelle permet au lymphocyte B de devenir réceptif aux co-signaux des lymphocytes T helper lors de la réponse immunitaire et de stabiliser le signalosome du BCR. Durant cette phase, les lymphocytes B autoréactifs sont également éliminés par apoptose.

Le lymphocyte B T1 est exclu des ganglions lymphatiques par le déficit en CD62L et fibronectine et transite tout d'abord par la pulpe rouge de la rate dont les nombreux macrophages permettent d'épurer les cellules B autoréactives apoptotiques [25]. Après acquisition de l'expression de CXCR5, récepteur de la chemokine CXCL13, le lymphocyte B T1 pénètre dans les follicules lymphoïdes spléniques de la pulpe blanche, riche en antigène et lymphocytes T helper CD4⁺ (Th), en se différenciant en lymphocyte B transitionnel tardif ou T2. Un co-signal de la cytokine BAFF (B-Cell-Activating Factor) et un BCR fonctionnel sont également nécessaires pour cette étape de différenciation [25]. Le lymphocyte B T2 se caractérise par la coexpression d'une IgM et d'une IgD de surface [25]. Certains auteurs identifient une étape de lymphocyte B transitionnel T3 avant le stade de lymphocyte B mature naïf capable de participer à une réponse immunitaire [25].

3. Différenciation lymphocytaire B dépendante de l'antigène

Les lymphocytes B matures naïfs IgM⁺/IgD⁺ peuvent être libérés de la rate vers la circulation périphérique et peuvent coloniser l'ensemble des organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate, MALT ou « mucosa associated lymphoid tissue »). Brièvement, l'architecture des organes lymphoïdes s'organise autour de régions riches en lymphocytes B qui constituent des follicules eux-mêmes délimités par une zone marginale. Cette zone marginale est marquée dans la rate mais très réduite dans le ganglion normal. Il s'agit d'une zone complexe constituée essentiellement de lymphocytes B recrutés par l'activation de la voie NOTCH2, de phénotype IgM^{high}/IgD^{low}/CD27⁺ et exprimant souvent un BCR autoréactif ou polyréactif [26,27]. Ces zones riches en lymphocytes B sont au contact de zones riches en lymphocytes T (zone interfolliculaire ou paracorticale dans les ganglions et manchon péri-artériolaire dans la rate) [28].

3.1. Réponse immune T-dépendante

Le lymphocyte B ganglionnaire peut être activé par un antigène « T-dépendant » à l'extérieur du follicule. Cet antigène peut être présenté par une cellule dendritique (une cellule présentatrice d'antigène ou CPA, d'origine hématopoïétique) ou un macrophage qui activera en parallèle les lymphocytes Th CD4⁺. Le lymphocyte B activé via son BCR et les co-sigaux du lymphocyte Th CD4⁺ (CD40L par exemple) présente une phase rapide de prolifération. La réponse T-dépendante suivra alors 2 voies de différenciation parallèle.

Tout d'abord, la majorité des lymphocytes B activés vont directement se différencier en plasmocytes à courte durée de vie. Ce plasmocyte sécrète une IgM de faible affinité et sont responsables de la réponse immune primaire contre l'antigène qui intervient rapidement après l'infection.

Ensuite, d'autres lymphocytes B stimulés par l'antigène vont devenir des cellules fondatrices du centre germinatif (CG) ou cellules folliculaires (Figure 11). Le lymphocyte B activé migre vers le follicule primaire en réponse à la sécrétion de CXCL13 par les cellules

folliculaires dendritiques (CFD) qu'il capte grâce au récepteur CXCR5. Les CFD sont des cellules mésenchymateuses [29] spécialisées dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes B sous forme de complexes immuns piégés à leur surface.

Le CG est une structure interne au follicule dans laquelle le lymphocyte B va subir une intense phase de prolifération et dont la présence identifie un follicule secondaire (*i.e.* follicule réactionnel). Le CG est constitué d'une zone sombre et d'une zone claire.

Le lymphocyte B stimulé est d'abord dirigé vers la zone sombre où il recevra de multiples co-sinaux des lymphocytes Th CD4+ et des cellules folliculaires dendritiques. Le lymphocyte B stimulé prolifère rapidement et devient un centroblaste. Son phénotype se modifie : il exprime le CD38, le CD10 et le facteur de transcription Bcl6. La transcription du gène *AICDA* qui code pour l'enzyme AID (« activation induced cytidin deaminase ») est induite. Dans la zone sombre, AID va contrôler le processus d'hypermutations somatiques (SHM pour « somatic hypermutations ») qui correspond à l'introduction de mutations dans les séquences variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère pour augmenter l'affinité de l'Ig pour l'antigène.

Le centroblaste est ensuite dirigé vers la zone claire où il devient un centrocyte. Un processus de sélection positive du BCR permet de sélectionner les centrocytes pour lesquels le processus de SHM a permis d'obtenir un récepteur de haute affinité pour l'antigène. Les centrocytes porteurs d'un BCR de faible affinité sont déléétés par apoptose. Ces centrocytes sont phagocytés par les macrophages présents (macrophages à corps tingibles). Selon certaines conditions de co-stimulation, le centrocyte peut subir un processus facultatif de commutation de classe (CSR pour « class switch recombination »), également contrôlé par AID, avant de se différencier en plasmocyte ou en lymphocyte B mémoire. Le processus de CSR va permettre au lymphocyte d'exprimer une IgG, une IgA ou une IgE dont les propriétés physicochimiques sont différentes de l'IgM initiale.

Au final, le lymphocyte B ayant répondu à un antigène T-dépendant et ayant fait l'expérience du CG va pouvoir se différencier soit en lymphocyte B mémoire, capable de

rester quiescent plusieurs années, soit en plasmocyte à longue durée de vie, producteur d'Ig spécifique de haute affinité pour l'antigène initial [30,31].

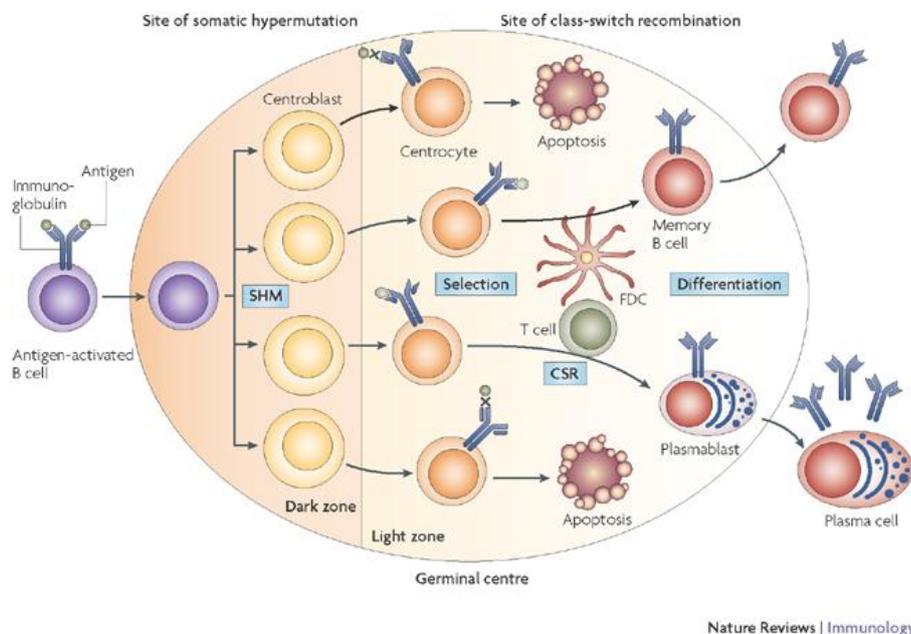


Figure 11 : Présentation du centre germinatif.

Le lymphocyte B naïf activé par l'antigène peut être dirigé vers le centre germinatif. Il traverse d'abord la zone sombre après une intense prolifération sous la forme de centroblaste où le processus d'hypermutations somatiques (SHM) est activé. Il devient alors un centrocyte en pénétrant dans la zone claire où un processus compétitif de sélection positive des centrocytes avec les BCRs les plus affins pour l'antigène. Les cellules B ayant les BCRs les moins efficaces sont éliminés par apoptose. Le processus de recombinaison de classe peut être activé dans cette zone et conduire à un lymphocyte capable d'exprimer une Ig de surface de nature IgG, IgA ou IgE. A la sortie du centre germinatif, le centrocyte peut se différencier en plasmocyte ou en lymphocyte B mémoire. Adapté d'après Klein et Dalla-Favera, 2008 [30].

3.1.1. Mécanisme moléculaire des mutations somatiques

AID initie le processus de SHM en catalysant la transformation d'une déoxycytosine (dC) en déoxyuridine (dU) créant ainsi un mésappariement (ou « mismatch »). AID se fixe à l'ADN en reconnaissant une séquence spécifique de type WGCW où W représente une base A ou T [32]. Il existe 4 modalités de réparation du mésappariement (Figure 12) :

- Ce mésappariement peut être répliqué sans correction et conduire à une transition dC→dT [33].
- Le système « base excision repair » (BER) peut être activé. Grâce aux enzymes UNG (uracil-N-glycosylase) et APE1 (apurinic apyrimidic endonucléase 1), la base dU est excisée créant ainsi un site abasique que le système BER comblera par une autre base dA, dC, dT ou dG selon que la polymérase Rev1 ou polθ est mise en jeu. L'implication du système BER conduit alors à une transition ou transversion [33].
- Le mésappariement peut activer le système de « mismatch repair » (MMR). Le système MMR va exciser, grâce à l'exonucléase ExoI, les bases proches de dU et de la séquence sera corrigée grâce au brin complémentaire par des polymérases de faible fidélité polη ou polζ qui vont introduire des mutations dans la région ciblée par AID. Il ne s'agit plus alors de mutations ponctuelles puisque le processus mutationnel se répand de part et d'autre de la base ciblée par AID (« mutation spreading » dans la Figure 12)
- Enfin, une réparation par un processus de haute fidélité par le recrutement de la polymérase de haute fidélité polβ ou, plus récemment démontré, de type recombinaison homologue (« HR ») mettant en jeu l'enzyme XRCC2 (« X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cell ») est possible conduisant à une absence de mutation sur la cible d'AID. Physiologiquement, cette voie est moins fréquemment sélectionnée lors du processus de SHM par rapport aux systèmes de réparation peu fidèles [32,33].

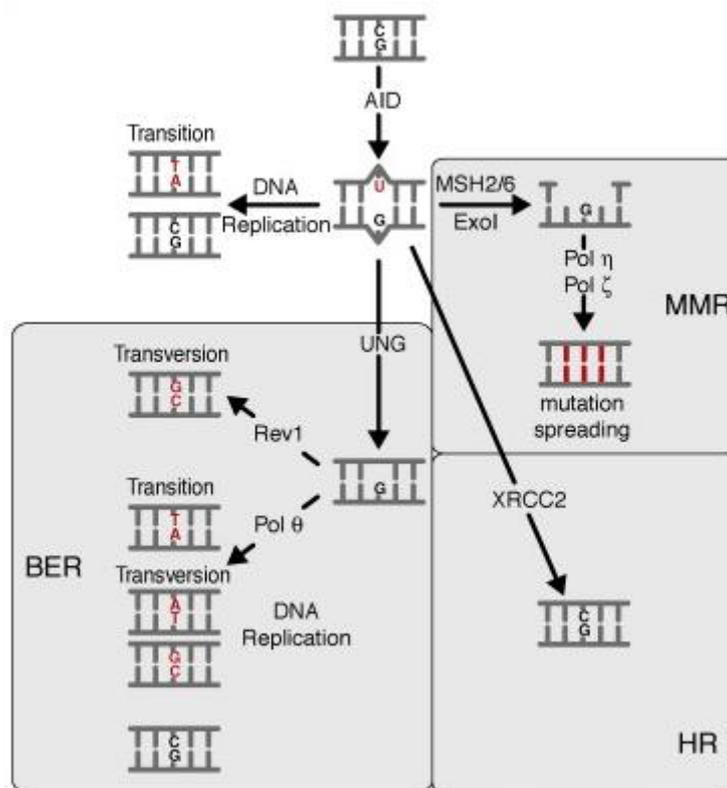


Figure 12 : Principe des mutations somatiques introduites par AID.

AID (Activation induced deaminase) catalyse la déamination d'un résidu dC en dU. Les différentes voies de réparation d'ADN utilisées dans la résolution des mésappariements introduits par AID au cours des SHM sont illustrées. Les mutations non silencieuses sont notées en rouge alors que les nucléotides issus d'une réparation fidèle sont notés en noir. La réplication avant réparation stabilise la mutation dans la cellule fille. Si le système de base excision repair (BER) est sollicité, l'enzyme UNG (uracil-N-glycosylase) excise la base U et le vide peut être comblé par une base au hasard et conduira à une transition ou transversion. Le système MMR (mismatch repair, composé entre autre des enzymes « MutS protein Homolog » MSH2 et MSH6 et de l'exonucléase ExoI) peut créer un site abasique et sa réparation par des ADN-polymérase peu fidèles pol η ou pol ζ va propager les mutations de part et d'autre du mésappariement initial. Enfin, le recrutement de la polymérase de haute fidélité pol β (non représentée) ou du système de recombinaison homologue (« HR ») avec l'enzyme XRCC2 (« X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cell ») peuvent également intervenir et réparer fidèlement le mésappariement. Adapté d'après Fear, 2013 [33].

3.1.2. Mécanisme moléculaire de la commutation isotypique

La commutation de classe ou CSR va permettre de juxtaposer la séquence VDJ codant pour la séquence variable d'IgH avec un autre gène de région constante le C μ ou C δ . Le système s'appuie sur des séquences « switch » en amont de chaque gène constant. Ces

séquences switch sont la cible d'AID qui introduit des mésappariements par la déamination de certaines bases nucléotidiques dC en dU. L'accès d'AID à ces séquences est permise par la mise en route d'une transcription à partir d'un promoteur en 5' de la région switch (identifié $I\mu$, $I\gamma$, $I\alpha$ ou $I\epsilon$) qui permet de désolidariser les 2 brins d'ADN. Cette transcription est régulée par des co-sigaux que reçoit la cellule (cytokines) et par des mécanismes épigénétiques pour le contrôle de l'accès de ces séquences à la RNA polymérase [33]. Ces mésappariements sont pris en charge par UNG et APE1 qui vont créer un site abasique ou cassure simple brin. Lorsque des cassures simple brin sont également formées à proximité sur le brin complémentaire, des cassures double brin sont créées sur les régions switch permettant de relier la région VDJ à un autre gène constant et d'exciser le matériel génétique intercallant après circularisation. Ce mécanisme de réparation des cassures double brin fait appel essentiellement au système NEJH (« non homologous end joining ») (Figure 13) [33].

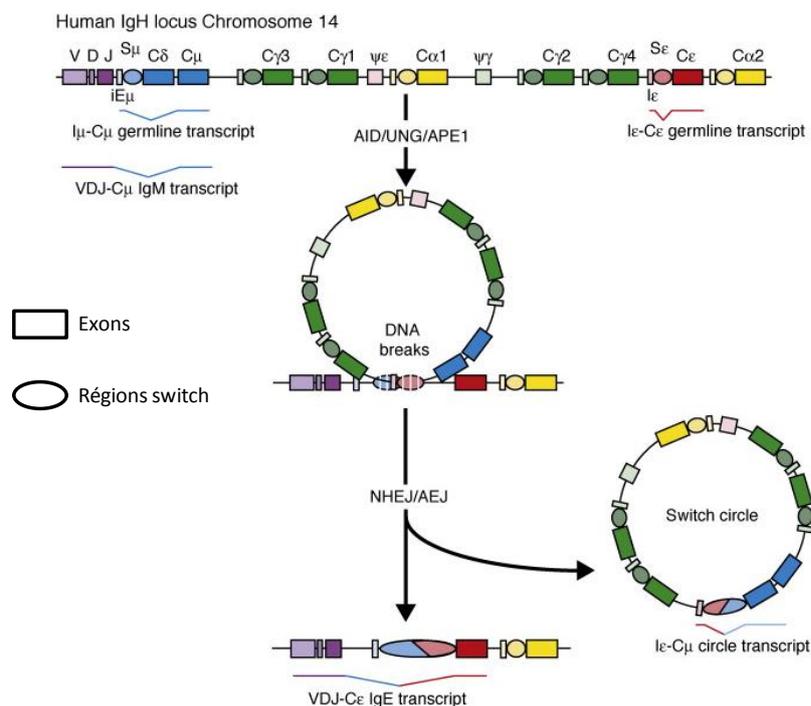


Figure 13 : Principe de la commutation de classe induite par l'action d'AID.

La configuration germinale du locus IgH est schématisée après réarrangement VDJ fonctionnel. Sous l'action d'AID, UNG et APE1, des cassures double-brin de l'ADN sont produites au niveau des régions switch rapprochées par enroulement de la séquence. La réparation de cette cassure entraîne une recombinaison et l'ADN intercalaire est excisé sous forme circulaire. Adapté d'après Fear, 2013 [33].

3.1.3. Stades terminaux de différenciation lors de la réponse T-dépendante

Le lymphocyte B mémoire

Dans la zone claire apicale du CG, les centrocytes peuvent se différencier en lymphocytes B mémoire. Ces lymphocytes B mémoire ont pour fonction de patrouiller dans l'organisme et d'initier une réponse immune rapide et intense (réponse immune secondaire) lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène. Ces lymphocytes B mémoire sont des lymphocytes à longue durée de vie et expriment le marqueur CD27. Bien que tous les isotypes de chaînes lourdes soient possibles, l'immunoglobuline de surface est une IgG pour la grande majorité d'entre eux.

Le plasmocyte à longue durée de vie

Une autre partie des centrocytes devient des plasmocytes à longue durée de vie. Le plasmocyte est le stade terminal de la différenciation B. Sous l'effet des facteurs de transcription BLIMP1 (« B lymphocyte induced maturation protein 1 ») et IRF4 (« interferon regulatory 4 »), l'expression de Pax5 est réprimée, levant l'inhibition de l'expression de XBP1 (X-box binding protein 1), un autre facteur de transcription nécessaire à la différenciation plasmocytaire [34]. La cellule B réprime alors l'expression de l'immunoglobuline de surface, des co-récepteurs CD79A/B et du CD20 entre autre. L'expression de CD38 et CD138 est à l'inverse fortement stimulée. Le plasmocyte différencié est une cellule nichée dans la moelle osseuse et sécrète l'immunoglobuline qu'il produit.

3.2. Réponse immune T-indépendante

Selon le type d'antigène, la réponse immune B peut se faire en dehors du CG et de manière indépendante du Th CD4+. Les lymphocytes B de la zone marginale sont particulièrement sensibles aux antigènes T-indépendants et plusieurs types de réponses sont possibles.

La réponse T-indépendante de type 1 (TI-1) est déclenchée par des antigènes microbiens capables d'activer le BCR et les TLR des lymphocytes B, le 2nd signal TLR palliant à l'absence

des Th CD4+. Ces antigènes comportent des motifs répétitifs et correspondent au lipopolysaccharide, à des lipopeptides, à de l'ADN bactérien riche en CpG ou de l'ARN viral [35].

La réponse de type TI-2 est déclenchée par des antigènes multivalents capables de lier fortement plusieurs molécules de BCR en même temps à la surface du lymphocyte. Dans la réponse TI-2 un 2nd signal n'est pas nécessaire. Cette activation massive du BCR transduit un message passant essentiellement par l'enzyme Btk. Ces antigènes correspondent aux polysaccharides des bactéries encapsulées (pneumocoque, méningocoque, *Haemophilus*) mais également à des virus encapsulés [35].

Les réponses TI-1 et TI-2 sont capables d'induire la différenciation plasmocytaire et la formation de lymphocytes B mémoire. Il a également été décrit une réponse TI-3 régulée par des cellules de l'immunité innée telles que les polynucléaires neutrophiles, polynucléaires basophiles, les macrophages ou encore les mastocytes. Cette réponse de type TI-3 ne fait pas intervenir le BCR mais permet l'activation d'AID et la survenue de SHM. Ce mécanisme identifié comme « TI-3 » constitue une voie de pré-diversification Ag-indépendante du répertoire [35].

LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE

1. Définition OMS 2008 de la Leucémie Lymphoïde Chronique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est définie par la classification OMS 2008 comme un syndrome lymphoprolifératif appartenant au groupe des néoplasies B matures. La prolifération clonale est constituée de petits lymphocytes matures qui expriment le marqueur CD5 et une faible quantité d'immunoglobuline de surface. La LLC infiltre le sang périphérique, la moelle et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) avec des degrés variables au cours de la maladie [36].

Une lymphocytose B absolue $\geq 5G/l$ dans le sang périphérique a été définie comme seuil pour distinguer la LLC de son variant tumoral le lymphome lymphocytaire (« small lymphocytic lymphoma » ou SLL) et des lymphocytoses B monoclonales (voir plus loin). Les experts du groupe de travail international sur la LLC (iWCLL pour « international workshop on CLL ») recommandent également que cette lymphocytose soit persistante depuis au moins 3 mois même si le diagnostic de LLC est possible dans le cas où une lymphocytose B clonale $< 5G/l$ est associée à des cytopénies centrales ou des signes cliniques généraux [36].

2. Repères historiques de la LLC

En 2000, Terry Hamblin a publié dans *British Journal of Haematology* une revue des aspects historiques de la leucémie lymphoïde chronique [37].

Le mot de « leucémie » n'a été utilisé pour la première fois qu'en 1847 par l'allemand Virchow. Il ne s'agissait alors que de descriptions cliniques de pathologies infiltrant le sang et associées à une splénomégalie et des adénopathies. L'infiltration médullaire n'a été constatée qu'en 1870 par Neumann [37].

La cytologie a également progressé pendant ce siècle grâce à Ehrlich qui a mis au point des méthodes de coloration permettant d'observer les noyaux et les détails du cytoplasme. Par le biais de cette avancée chimique et des progrès techniques concernant les microscopes, Türk fut le premier en 1903 à définir des critères diagnostiques de la LLC [37].

Les lymphomes ont été décrits pour la première fois en 1832 par Sir Thomas Hodgkin (qui individualisa la « maladie de Hodgkin » uniquement sur des critères cliniques) et c'est à nouveau Virchow qui introduisit en 1847 le terme de « lymphosarcome » pour décrire ces maladies tumorales infiltrant les organes lymphoïdes. Dès lors, la distinction entre leucémie et lymphome avec phase leucémique circulante fit débat [37].

En 1928, Richter décrivit l'apparition de lymphomes à grandes cellules chez des patients atteints de LLC. L'intérêt du chlorambucil a été établi dès 1955. Vers la fin des années 60, les travaux de Wintrobe, Galton et Dameshek permirent d'identifier pour la première fois la grande variabilité de l'évolution clinique de la LLC en distinguant les LLC prolifératives des LLC stables. Parallèlement, ils établirent que la LLC correspondait à une accumulation progressive de lymphocytes « non fonctionnels », bien qu'à cette époque le rôle des lymphocytes dans l'immunité n'était pas connu [37].

Sur le plan technologique, les premiers compteurs de cellules par impédance ont été développés dans les années 50 (Wallace Coulter) [38]. Le premier cytomètre en flux commercialisé au début des années 70 (Hemalog D produit par Technicon) utilisait des marquages chromogènes d'enzymes pour différencier automatiquement les sous-populations de polynucléaires [38]. Les premiers cytomètres en flux utilisant un laser Argon et des marquages par anticorps fluorescents ont été développés par 2 entreprises américaines en 1974 (Becton-Dickison : Fluorescent Analyzer Cell Sorter ou « FACS ») et en 1975 (Coulter : Two Parameter Sorter -1 ou « TPS-1 ») [38].

Le phénotype B des cellules de LLC fut établi dans les années 70 par immunomarquages avec des anticorps anti-IgM. Dès lors, il a été démontré que les cellules de LLC exprimaient faiblement l'IgM par rapport aux lymphocytes B normaux. La description de phases leucémiques de lymphomes à cellules du manteau, un LNH B CD5+ représentant un

diagnostic différentiel avec la LLC, n'a été réalisée qu'en 1989 (De Oliveira *et al.*) Enfin, les critères diagnostiques immunophénotypiques actuels avec un score en 5 points ont été établis en 1994 (Matutes *et al.*) et améliorés en 1997 (Moreau *et al.*).

Sur le plan clinique, en 1975 puis en 1981, Rai et Binet mettaient au point respectivement 2 systèmes de classification clinico-biologique des patients atteints de LLC. Parallèlement, les complications auto-immunes de la LLC (anémie hémolytique, thrombopénie, neutropénie, aplasie, ...) étaient décrites. Les complications infectieuses ont été également établies au milieu du XX^{ème} siècle.

La publication en 1999 du rôle pronostique majeur des mutations somatiques (Damle *et al.* et Hamblin *et al.*) et de la classification pronostique des anomalies cytogénétiques (Döhner *et al.*) marquèrent l'entrée dans le XXI^{ème} siècle. Enfin, depuis 2010, le séquençage haut-débit met en lumière l'hétérogénéité moléculaire de la LLC.

3. Epidémiologie

3.1. Epidémiologie descriptive

3.1.1. Fréquence observée de la LLC

En 2012, 355000 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués en France. Les cancers les plus fréquents étaient les cancers de la prostate (56800), cancers du sein (48700), cancers colorectaux (42000) et cancers du poumon (39500). Le nombre de nouveaux cas d'hémopathies malignes est estimé à 35000 soit 10% environ de tous les cas incidents de cancers [1,39].

Les dernières analyses épidémiologiques des registres français révèlent que 4464 nouveaux cas de LLC ont été diagnostiqués en France en 2012 (soit 1.2% de tous les nouveaux cas incidents de cancers). Environ 60% de cas concernaient des hommes [39]. L'âge médian au diagnostic en France en 2012 était 71 ans pour les hommes et 74 ans pour les femmes. Son incidence brute est estimée à 8,7/100000 et 5,4/100000 respectivement pour les

hommes et les femmes (taux standardisés sur la population mondiale 4,4/100000 et 2,2/100000) [39]. Le diagnostic de LLC est peu fréquent avant 60 ans (Figure 14).

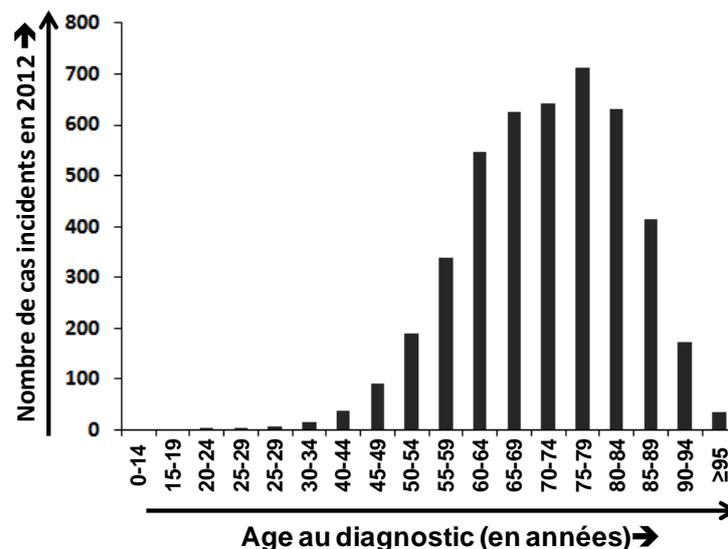


Figure 14 : Age au diagnostic des cas incidents de LLC en France en 2012.

Adapté d'après Monnereau *et al.* [1]

La LLC était au 1^{er} rang des hémopathies chez l'homme et au 3^{ème} rang chez la femme (Figure 15). La LLC est donc une maladie de la personne âgée puisqu'elle est exceptionnelle avant 40 ans, rare avant 50 ans et sa fréquence augmente à partir de 60 ans.

L'incidence de la LLC évaluée entre 1980 et 2012 a montré une forte croissance liée à l'allongement de l'espérance de vie et à la démocratisation du dépistage par cytométrie en flux. On note tout de même une diminution de cette incidence entre 2005 et 2012. L'analyse française attribue cette variation d'une part aux modifications récentes des critères diagnostiques (*i.e.* lymphocytose clonale absolue $\geq 5G/l$) et probablement à un défaut de déclaration du fait de la généralisation de l'accès à l'immunophénotypage en dehors des structures hospitalières universitaires [39]. Cette tendance dégressive de l'incidence de la LLC est constatée également dans les registres canadiens et des Etats-Unis [40]. La

comparaison de 2 registres américains : le SEER (« Surveillance Epidemiology and End Results ») géré au niveau fédéral par le NCI (« National Cancer Institute ») et le registre du réseau de santé des vétérans de l'Arkansas montrent une différence de 38% de l'incidence de la LLC. Cette disparité a été directement mise en rapport avec une sous-déclaration dans le registre SEER due en partie aux modifications récentes de l'accès aux soins [41].

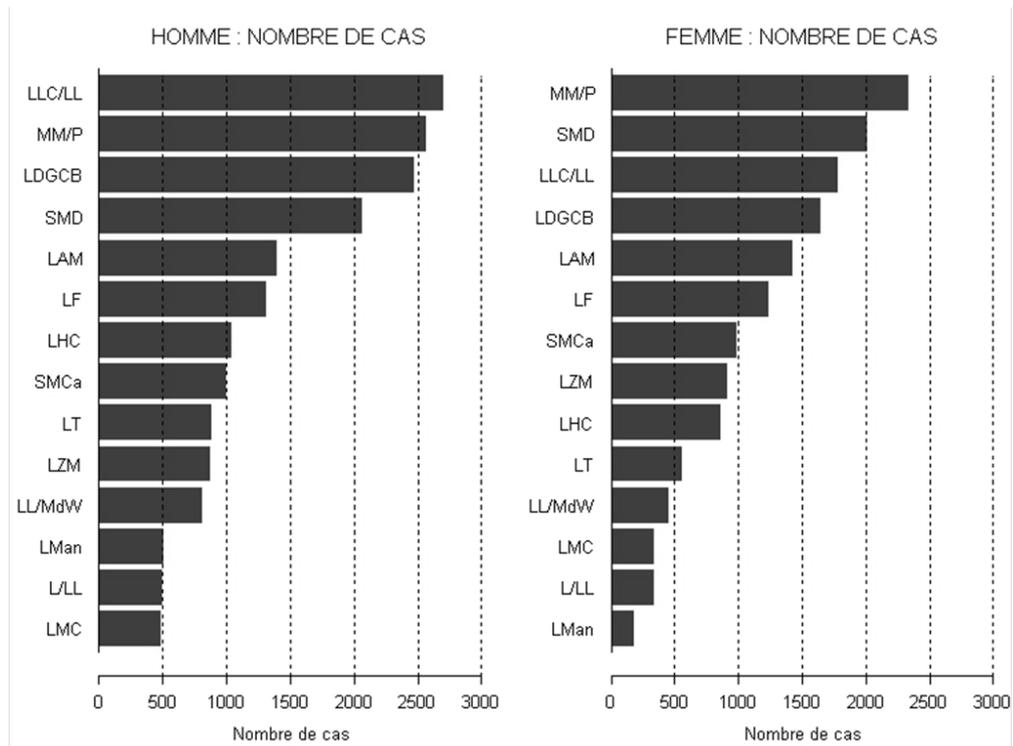


Figure 15 : Nombre de cas incidents par hémopathies en France en 2012.

Les histogrammes représentent les nombres de cas incidents estimés en 2012. LLC/LL : leucémie lymphoïde chronique/lymphome lymphocytaire ; MM/P : myélome multiple/plasmocytome ; LDGCB : lymphome diffus à grandes cellules B ; SMD : syndrome myélodysplasique ; LAM : leucémie aigüe myéloïde ; LF : lymphome folliculaire ; LHC : lymphome de Hodgkin classique ; SMCa : autres syndromes myéloprolifératifs chroniques ; LT : lymphomes T et NK ; LZM : lymphome de la zone marginale ; LL/MdW : lymphome lymphoplasmocytaire/macroglobulinémie de Waldenström ; LMan : lymphome à cellules du manteau ; L/LL : leucémie aigüe lymphoblastique/lymphome lymphoblastique ; LMC : leucémie myéloïde chronique. Adapté d'après Monnereau *et al.*, 2013 [1].

3.1.2. *Disparités géographiques et ethniques de l'incidence de la LLC*

L'incidence des lymphomes B et de la LLC en particulier est très variable selon la région du globe. La LLC est très fréquente dans les pays industrialisés d'Europe de l'Ouest et d'Amérique du nord alors qu'il s'agit d'une entité rare en Asie où les lymphomes T ou NK sont au premier plan (cf. endémie de l'infection par le virus HTLV1 dans certaines régions et rôle de l'EBV [40]). Des enquêtes épidémiologiques réalisées aux Etats-Unis et en Angleterre ont révélé que la LLC reste peu fréquente chez les asiatiques et les noirs africains vivant dans ces zones géographiques et que la protection perdure dans les générations suivantes [42,43]. Ces données reflètent une prédisposition génétique (ou ethnique) forte dans le développement de la LLC [44]. Enfin, la maladie semblerait être plus agressive dans la population asiatique [45] où elle touche des individus plus jeunes [46].

3.1.3. *Existence de formes familiales de LLC et prédisposition génétique*

La LLC est le lymphome pour lequel la marque d'une prédisposition familiale est la plus forte [36] et concerne 5% des patients [47]. Compte-tenu de la rareté de la maladie (taux d'incidence standardisé à 4,4/100000 pour les hommes, soit chaque année 1 diagnostic sur 27000 habitants), un patient dont au moins 1 des membres de sa famille est également atteint par la LLC est considéré comme un cas « familial » [47]. Les familles à haut risque présentent également une agrégation anormale de cas d'autres syndromes lymphoprolifératifs B comme la macroglobulinémie de Waldenström par exemple [47].

Le risque relatif de développer une LLC chez les parents au premier degré de patients atteints par cette hémopathie est de 8,5 (IC95% : 6.1 – 11.7) [40]. De la même façon, une lymphocytose B monoclonale de type LLC (« MBL CLL-like ») peut être retrouvée dans 13% à 18% des parents au premier degré de patients atteints de LLC alors que la fréquence de ce type de clone est de 3% à 5% dans la population générale [47,48].

Sur le plan phénotypique, la surexpression de la cytokine BAFF dans les familles à haut risque de SLP avait été discutée dans la littérature mais des études menées sur de larges

cohortes n'ont pas retrouvé, ou seulement dans une très faible mesure, de différence avec les groupes contrôles [47].

Sur le plan génétique, l'allèle DRB1*11 du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) a également été associé aux formes familiales de LLC [49] et une analyse du répertoire des gènes *IGHV* a montré de différences avec les LLC sporadiques et une fréquence élevée de cas ayant fait l'expérience des SHM [50].

Les études de type GWAS (« genome wide association study ») ont également retrouvé près de 50 gènes associés à un risque accru de survenue de LLC. Les anomalies concernées sont toutes des polymorphismes ou « single nucléotide polymorphism » (SNP) et aucune vraie « mutation » n'a été retrouvée. La revue des principales études de GWAS dans la LLC révèle un certain manque de reproductibilité entre les différentes analyses puisque les régions associées au risque de maladie sont variables d'une série à l'autre [47]. Certains de ces polymorphismes concernent des gènes impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire (*CD38*, *TNF*, *IL10*, *IRF4*, ...) ou de l'apoptose (*CASP8*, *BAX*, ...) alors que d'autres sont localisés dans des régions chromosomiques moins bien connues situées en 2q, 6p, 11q, 15q et 19q [47,51–54]. En 2010, une méta-analyse réalisée au travers du projet « CUMAGAS-CLL » avait permis de revoir toutes les données GWAS publiées jusqu'en 2009 et a sélectionné les gènes *BAX*, *GSTM1*, *GSTT1*, *IL10*, *LTA*, *MTHFR*, *P2RX7*, *TNF* [51]. Les différents gènes retrouvés et leur fonction biologique sont résumés dans le Tableau 1.

| Gène | Nom complet | Localisation | Fonction |
|--------------|---|--------------|---|
| Bax | BCL2-Associated X Protein | 19q13.33 | apoptose |
| GSTM1 | Glutathione S-transferase mu 1 | 1p13.3 | détoxification de produits endogènes ou xénobiotiques |
| GSTT1 | Glutathione S-transferase theta 1 | 1p13.3 | détoxification de produits endogènes ou xénobiotiques |
| IL10 | Interleukine-10 | 1q32.1 | réponse immunitaire, prolifération des lymphocytes B |
| LTA | Lymphotoxine Alpha | 6p21.33 | réponse immunitaire |
| MTHFR | Méthylentetrahydrofolate Reductase | 1p36.22 | métabolisme de la méthionine |
| P2RX7 | Purinergic Receptor P2X, Ligand-Gated Ion Channel | 12q24.31 | canal ionique ATP-dépendant |
| TNF | Tumor necrosis factor | 6p21.33 | inflammation |

Tableau 1 : Principaux gènes impliqués dans la prédisposition génétique de la LLC.

Adapté d'après Zintzaras et Kitsios, 2010 [51]

3.1.4. *Evaluation des évolutions épidémiologiques futures de la LLC*

Selon les prévisions épidémiologiques réalisées par le consortium GLOBOCAN en 2012, le nombre de nouveaux cas de LNH devrait globalement augmenter de 21% en France en 2025 par rapport à aujourd'hui par l'effet conjoint d'une évolution de l'incidence propre et de la démographie. Pour la LLC, une étude allemande récente a montré qu'en conséquence du vieillissement de la population, la prévalence de la maladie augmente alors que son incidence reste stable sur leurs données [55].

3.2. Epidémiologie explicative :

Les études épidémiologiques explicatives spécifiques de la LLC ne se démarquent pas de celles réalisées sur l'ensemble des LNH. Les différents facteurs influençant le développement d'une LLC concernent donc les facteurs de susceptibilité génétique exposés plus haut (paragraphe 3.1.3 ci-dessus), les facteurs environnementaux professionnels ou domestiques et les facteurs liés au mode de vie.

3.2.1. *Impact des facteurs environnementaux :*

Les rayonnements ionisants

Les radiations ionisantes ont été reliées depuis près de 100 ans avec une surmortalité et la survenue d'hémopathies, en particulier des leucémies aiguës et leucémies myéloïdes chroniques. Le lien avec la survenue de LLC est peu clair. Les données initiales sur la population japonaise de la région d'Hiroshima concernaient une population dans laquelle la LLC est très rare. De plus, des biais de classifications des hémopathies perturbent l'analyse statistique [41]. Une récente étude française sur les employés du CEA, d'AREVA et d'EDF entre 1968 et 2004 et exposés professionnellement à des radiations (rayons X ou gamma) n'a pas retrouvé d'augmentation du risque relatif de LLC contrairement aux cancers solides, leucémie myéloïde chronique, leucémies aiguës, et aux maladies cardiovasculaires [56].

Les agents chimiques

Des études épidémiologiques larges ont retrouvé une association positive faible entre le risque relatif de LLC et les professions agricoles. Les agents chimiques utilisés dans l'agriculture ont été incriminés bien qu'aucune étude n'ait réalisé d'analyse sur la base de molécules chimiques précises [41].

Travail en horaires de nuit

Une étude récente vient de mettre en évidence que certains gènes dont l'expression varie sur le nyctémère sont dérégulés dans la LLC. Parmi ces gènes, *c-Myc* et la cycline D1 sont surexprimés par rapport aux contrôles. Ensuite, parmi les patients atteints de LLC, cette dérégulation était significativement plus importante chez les travailleurs de nuit et corrélée au taux sanguin de mélatonine. Les auteurs concluent que le travail de nuit est donc potentiellement un facteur d'évolution de la LLC [57].

Antécédents médicaux et traitements

Certaines enquêtes cas-témoin ont mis en évidence une fréquence élevée d'infections dans les années précédant le diagnostic de LLC bien qu'il ne puisse être défini s'il s'agit d'évènements déclencheurs ou de conséquence d'un déficit immunitaire préalable lié à la LLC. Les infections retrouvées sont des infections bactériennes (pneumonie, infections ORL, cellulites, ...) ou virale (grippe, zona, ...) [58]. La pneumonie est cependant liée à un risque de survenue d'une LLC jusqu'à 5 ans après l'infection (odds ratio : 1,4 ; CI95% : 1,2 – 1,8)[59].

A l'inverse, les pathologies inflammatoires auto-immunes ne sont pas associées à un risque augmenté de LLC [60].

3.2.2. Facteurs liés au mode de vie

Compte-tenu de la faible incidence de la maladie ($\approx 5/100000$), les associations retrouvées entre les facteurs liés au mode de vie et le risque de LLC sont variables d'une étude à l'autre et les méta-analyses ne retrouvent pas de lien statistiquement marqué en dehors d'une analyse dans certains sous-groupes.

Selon une revue sur les facteurs de risque liés à la LLC publiés par Linet *et al.* en 2007, la consommation de tabac et l'utilisation de teintures capillaires seraient positivement associées à la maladie. A l'inverse, le niveau d'activité physique ou la surcharge pondérale n'ont pas montré de lien évident avec la LLC [41].

3.2.3. Exposition solaire et vitamine D

Certaines similitudes avaient été observées entre l'épidémiologie des mélanomes et celles des lymphomes suggérant un lien éventuel entre les rayons ultraviolets et les lymphopathies matures. Les enquêtes épidémiologiques menées en ce sens ont donné des résultats discordants mais il semblerait qu'une association positive puisse exister entre exposition solaire et LNH [61] mais ne concernerait pas la LLC [62]. Cependant, une méta-analyse publiée en 2010 conclue à l'absence de preuves scientifiques suffisantes et que le taux de vitamine D liée à l'exposition solaire constitue un facteur de confusion majeur dans ces études [63].

En effet, les enquêtes épidémiologiques récentes ont montré qu'un taux élevé de vitamine D est un facteur potentiel de protection contre la survenue de LLC en particulier [64]. Chez les patients atteints de LLC de stade A, une étude américaine a également associé en 2011 un déficit en vitamine D avec une évolution plus rapide de la maladie [65], ce qui a été confirmé par une étude européenne l'année suivante [66].

L'augmentation du taux de vitamine D semble donc être un facteur protecteur contre la LLC tout comme pour d'autres tumeurs solides [67]. Enfin, il a été récemment démontré qu'un polymorphisme du gène *VDR* codant pour le récepteur de la vitamine D3 (« Vitamin D (1,25-Dihydroxyvitamin D3) Receptor ») pourrait être associé au risque de lymphome [68].

4. Microenvironnement de la LLC

La dépendance des cellules de LLC aux *stimuli* du microenvironnement a été récemment revue par plusieurs auteurs [69–71]. Les microenvironnements ganglionnaires et médullaires sont relativement proches d'un point de vue structurel et souvent non dissociés dans la littérature. Cependant, Herishanu *et al.* a montré par comparaison de profil d'expression de gènes que le microenvironnement ganglionnaire est la pierre angulaire de cette lymphopathie [72]. Dans cette étude, 150 gènes étaient surexprimés entre les B tumoraux ganglionnaires et ceux du sang périphérique. De même, plus de 20 gènes étaient surexprimés entre les B tumoraux de la moelle osseuse et ceux du sang, dont presque tous étaient également surexprimés dans les ganglions. Les gènes surexprimés spécifiquement dans les ganglions portaient la signature de l'activation du BCR et de NF- κ B et les gènes surexprimés dans la moelle correspondaient essentiellement à des gènes de résistance à l'apoptose [72].

Schématiquement, ces interactions concernent le trafic cellulaire des cellules tumorales, l'activation du BCR, des TLRs et les signaux des cellules environnantes. Les cellules de LLC peuvent également modifier leur microenvironnement par la sécrétion de cytokines et l'émission de microparticules.

4.1. Trafic cellulaire et « homing » des cellules tumorales au sein des zones de prolifération

Au cours de la LLC, la masse circulante est le contingent le plus facilement exploré. Il n'est pourtant constitué, pour l'essentiel, que de cellules quiescentes puisque seulement 0.1% à 1% d'entre elles sont des cellules en division [73]. Cet aspect est cohérent avec le caractère indolent de la LLC par rapport à d'autres lymphomes caricaturalement progressifs dont le lymphome de Burkitt est l'archétype [74]. Il est actuellement admis que la progression de la LLC a lieu au sein de « centres prolifératifs » situés dans les ganglions et plus modestement dans la moelle osseuse [69,72]. Il est d'ailleurs parfois observé sur des

myélogrammes de patients des formations pseudofolliculaires, absentes des moelles normales, composées de cellules B clonales, de lymphocytes T et de cellules semblables à des cellules dendritiques folliculaires [75].

La régulation du trafic cellulaire, ou « homing », à partir du sang périphérique vers ces centres de prolifération est communément appelée migration transendothéliale (MTE) et consiste en un phénomène de diapédèse ou de pseudoempéripolèse. On peut schématiquement présenter le processus en 3 phases successives : le signal attractant (chimiotactisme), l'adhésion cellulaire et transduction du signal d'adhésion.

4.1.1. *Le chimiotactisme ciblant les cellules de LLC*

Les cellules de LLC reçoivent en premier lieu un signal de chimiotactisme via des chemokines de type CXCL9, 10, 11, 12, 13, CCL19 et 21 constitutivement sécrétées par les cellules stromales des ganglions ou de la moelle osseuse. Le signal de migration est capté par les cellules tumorales grâce aux récepteurs CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR7 et permet d'initier le chimiotactisme vers les cellules endothéliales [76]. L'axe de signalisation CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 peut être pharmacologiquement inhibé par le plerixafor.

4.1.2. *L'adhésion cellulaire*

Les protéines d'adhésion de type β_2 -intégrine comme les dimères CD18/CD11a (« lymphocyte function antigen-1 » ou LFA1) ou CD18/CD11c, de type $\alpha_4\beta_1$ -intégrine comme le dimère CD49d/CD29 (« very late antigen-4 » ou VLA4), de type sélectine (CD62L ou L-sélectine) ou encore le CD44, jouent un rôle important dans l'établissement du contact cellule à cellule [69,76,77]. Les cas de LLC exprimant fortement les marqueurs CD44 et CD11c sont d'ailleurs associés à des infiltrations spléniques plus fréquentes [70]. La surexpression de ZAP70 influence également la réponse aux chemokines en renforçant les voies de signalisation des récepteurs CCR7 et CXCR4 [69,78].

Il a récemment été mis en évidence *in vivo* que l'expression de la L-sélectine (CD62L) favorise la MTE des cellules de LLC au niveau des veinules à endothélium épais (HEV pour « High Endothelial Venule »), une structure particulière de certains vaisseaux ganglionnaires,

et que le CD62L est surexprimé chez les patients qui présentent des adénopathies [79]. Certains auteurs ont montré que les cas de LLC progressives qui présentent une réponse intense au BCR, présentaient une sous-expression du CXCR4 et du CD62L en réponse à la stimulation antigénique associée à une diminution de la capacité migratoire [80]. Selon les auteurs, ces résultats étaient en faveur d'une MTE essentiellement dépendante du BCR dans les LLC progressives.

4.1.3. Le relais intracellulaire du signal d'adhésion :

Deux protéines, RhoH (« ras homolog family member H ») et TAPP2 (« tandem pleckstrin homology domain protein 2 »), ont montré un rôle significatif dans la régulation du trafic cellulaire des cellules de LLC en régulant le cytosquelette des cellules tumorales.

La protéine RhoH est une protéine de la famille Rho-GTPase initialement décrite dans le lymphocyte T où elle permet le recrutement de ZAP70 sur le domaine intracellulaire de CD3 ζ [81] et de Lck au niveau du signalosome du TCR [82]. Dans la LLC, RhoH est surexprimée par rapport aux cellules B normales et son niveau d'expression est corrélé à ZAP70 [70]. RhoH régule des composants du cytosquelette en réponse au BCR [70]. Des expériences réalisées chez des modèles murins de LLC (souris E μ -TCL1^{T β}) dont le gène RhoH a été inactivé (souris E μ -TCL1^{T β} ;RhoH -/-) montrent que les cellules tumorales B perdent leur capacité migratoire en réponse au BCR [83]. De plus, en étudiant le mécanisme d'action du lénalidomide (un immunomodulateur) sur la LLC, il a été démontré que cette molécule induit la perte de fonction de RhoH dans des cellules primaires de patients cultivées *in vitro*. Cette régulation négative de RhoH a également été retrouvée *in vivo* chez les patients atteints de LLC et traités par lénalidomide [83].

Enfin, la protéine TAPP2 est une protéine contenant un domaine pleckstrin-homology (PH) permettant de reconnaître l'inositol-triphosphate généré par la PI3K [84]. L'expression de TAPP2 est corrélée au statut ZAP70 des cellules de LLC. TAPP2 est également surexprimée en réponse à une activation de la PI3K et régule le cytosquelette pour permettre l'adhésion à la matrice extracellulaire [85].

4.2. Implication des TLRs :

Les cellules de LLC présentent le même profil d'expression des TLRs que les lymphocytes B normaux (*i.e.* TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR9) [86]. L'expression du TLR4 est cependant plus faible que chez les lymphocytes contrôles et diminue au cours de l'évolution de la maladie [87]. La stimulation des TLRs permet d'activer la cellule de LLC via le facteur de transcription NF- κ B [88,89].

Le TLR9 a été le plus étudié dans cette pathologie. Les cellules de LLC sont particulièrement sensibles au signal du TLR9 et sa stimulation *in vitro* par des oligodéoxynucléotides riches en îlots CpG (CpG ODNs) induit l'expression du marqueur d'activation CD38 [86]. La stimulation du TLR7 et du TLR9 potentialise le signal du BCR des LLC mutées ou non mutées [90]. Sur une courte série de 41 patients, la forte expression du TLR9 était associée avec une survie avant le 1^{er} traitement (TFS pour « treatment free survival ») plus longue [91] mais des études fonctionnelles ultérieures ont montré une certaine ambivalence de ce récepteur : il peut déclencher l'apoptose des cellules de LLC au statut IgVH muté (voir plus loin) [92] mais promouvoir la survie de LLC au statut IgVH non muté [93,94] et favoriser la résistance à la fludarabine *in vitro* [95]. Au final, le signal du TLR9 définirait 2 groupes pronostiques [96].

In vivo, les cellules de LLC ne sont pas les seules à exprimer le TLR9. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) en particulier, présentent physiologiquement un récepteur TLR9 fonctionnel. D'une part, la stimulation du TLR9 des cellules B tumorales induit l'expression de molécules du CMH de classe II ou le CD86 ce qui leur conférerait un caractère immunogène et accessible à l'immunité anti-tumorale des lymphocytes T cytotoxiques. Les pDC activées par le TLR9 engagent une promotion de la réaction immune anti-tumorale en sécrétant entre autre de l'IFN α [97]. Ces données suggèrent un effet bénéfique des agonistes du TLR9 dans la LLC et a d'ores et déjà donné lieu à des essais cliniques de phase I [97] et de phase II dans certaines tumeurs solides, associés à de la chimiothérapie ou de la radiothérapie. Le principe est de produire une « vaccination » *in vivo* en activant le TLR9 dans un contexte de lyse tumorale [98]. Les CpG ODN développés dans

les essais cliniques appartiennent au groupe B et ont été modifiés pour limiter les effets indésirables (saignements, immunodépression, organomégalies) [98]. Une dernière approche innovante est de coupler un agoniste du TLR9 avec un siRNA ciblant un oncogène exprimé dans la tumeur hématopoïétique, comme STAT3 par exemple [99]

Au final, s'il est clair que les TLRs, en particulier le TLR9, sont fonctionnels dans la LLC, il n'est pas aisé aujourd'hui de conclure quant à l'attitude à adopter vis-à-vis de ce récepteur. D'un côté, l'utilisation de CpG ODN inhibiteurs [100] pourrait limiter la résistance à la fludarabine dans les centres de prolifération. D'un autre côté, l'utilisation de CpG ODN activateurs permet de stimuler une immunité anti-tumorale dont l'effet sera peut-être supérieur à celui de la promotion directe des cellules clonales. Dans ces cellules, des données très récentes viennent de démontrer que la transduction du signal du TLR9 implique l'activation de Btk [101,102], laissant suggérer un conflit potentiel entre l'utilisation d'un inhibiteur de cette PTK (ibrutinib) et la stimulation de l'immunité anti-tumorale par des CpG ODN. Enfin, utiliser le TLR9 pour l'adressage de siRNA spécifiques de la LLC (Bcl2, BclXL, Mcl1, ...) est un axe de développement prometteur.

4.3. Interactions cellulaires

Les interactions cellulaires concernent principalement les cellules folliculaires dendritiques, les lymphocytes T et NK, les cellules stromales et « nurse-like cell » ou cellules « nourricières » dérivées des monocytes.

4.3.1. *Rôle support des cellules folliculaires dendritiques :*

Chez les patients atteints de LLC, les CFD sont présentes dans les structures pseudofolliculaires des ganglions ou de la moelle osseuse des patients avec une infiltration nodulaire [103]. Ils s'agit de cellules relativement rares dans le tissu infiltré et peu de données sont disponibles les concernant [29,72].

Les CFD sécrètent de l'IL15 et la cytokine BAFF et expriment parallèlement des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1). Elles protègent les cellules de LLC de l'apoptose spontanée ou induite par la fludarabine *in vitro* via l'induction de MCL1 [72,104].

4.3.2. Interactions avec les lymphocytes T

Le compartiment des lymphocytes T est très remanié au cours de la LLC. On observe en particulier une augmentation de leur nombre absolu avec une inversion du ratio CD4/CD8. Malgré leur nombre, ces lymphocytes T sont peu fonctionnels. Ils présentent tout d'abord un phénotype activé (CD69+, CD57+, HLA-DR+, CD28^{low/-}, CD62L^{low/-}) avec une expansion oligoclonale, suggérant une possible activation antigénique [105]. Ils présentent ensuite un phénotype « d'épuisement » moléculaire avec des anomalies des vésicules stockant le granzyme. Ces lymphocytes « épuisés » sont peu fonctionnels mais surexpriment anormalement l'IL-2, le TNF- α et l'IFN- γ , pouvant jouer un rôle dans la promotion du clone B. Le profil global d'expression de gènes des lymphocytes T de LLC est également anormal [105]. Les lymphocytes T de LLC présentent en particulier des anomalies du métabolisme du cytosquelette ce qui a pour conséquence de limiter leur capacité à former une synapse immunologique avec les cellules présentatrices d'antigènes [105]. Ce déficit fonctionnel peut être reproduit par co-culture préalable de lymphocytes T issus de donneurs sains avec des cellules primaires de LLC avant de les stimuler par des lymphocytes B autologues activés par l'antigène [106]. Le clone de LLC limite également les capacités immunologiques des lymphocytes T en sécrétant de l'IL-10 et du TGF- β , et en exprimant à sa surface des ligands inhibiteurs tels le CD200, CD270, CD274, CD276 [71].

Parallèlement à ces déficits fonctionnels, on note une augmentation des lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4+/CD25+. Ces lymphocytes ont pour fonction de limiter la réponse immunitaire. La proportion de Treg augmente dans les stades avancés de la maladie [105].

Enfin, ces lymphocytes T sont recrutés au sein du microenvironnement par les cellules de LLC. Les cellules tumorales sécrètent les chemokines CCL3 et CCL4 qui attirent les lymphocytes T [105]. La production de ces chemokines par les cellules de LLC est fortement stimulée par l'activation du BCR au sein du centre de prolifération [105]. Les lymphocytes T

rencontrés au contact des cellules de LLC sont de phénotype CD4⁺ et sont activés. Ces lymphocytes T CD4⁺ activés expriment le CD154 (ou CD40L) et l'IL-4 qui activent le clone B et favorise sa prolifération et le protège de l'apoptose [71].

4.3.3. Interactions avec les lymphocytes NK

Les lymphocytes NK sont également altérés dans leur fonctionnalité. De la même façon que les lymphocytes T, il s'agit essentiellement d'anomalies du cytosquelette limitant leur capacité à former une synapse immunologique [105]. Le mécanisme de ces perturbations est peu connu mais passerait par des facteurs solubles et par l'expression du HLA-G par les cellules tumorales [105]. Le nombre de lymphocytes NK diminue dans les stades avancés de la maladie et dans les LLC au statut IgVH non muté alors qu'il est élevé dans les MBL. Le ratio Ly NK/Ly B de LLC peut d'ailleurs prédire le pronostic des patients [105].

4.3.4. Cellules stromales

Les cellules stromales correspondent à un ensemble de cellules mésenchymateuses localisées (« mesenchymal stromal cells » ou MSC) dans la moelle osseuse qui physiologiquement supportent l'hématopoïèse [71]. On peut également les retrouver dans tous les organes qui contiennent du tissu conjonctif, y compris les organes lymphoïdes, la rate et le thymus où elles peuvent réguler la réponse immune [107]. Le dialogue entre les cellules stromales et les cellules de LLC est bidirectionnel. Les surnageants de culture de cellules de LLC activent les récepteurs PDGFR des MSC et des contacts cellule-cellule induisent l'activation de la PKC β et de NF- κ B dans ces cellules [105]. Chez les patients atteints de LLC, les MSC expriment le marqueur d'activation α -SMA (« alpha-smooth muscle actin ») [71].

Les cellules stromales sécrètent du CXCL12 qui attire par chimiotactisme les cellules B tumorales dans le microenvironnement via leur récepteur CXCR4. Après quelques heures de co-culture *in vitro*, des phénomènes de pseudoempéripolèse peuvent être observés, témoignant d'une symbiose entre les 2 types cellulaires [105]. Par contact cellule-cellule, les MSC protègent les cellules de LLC de l'apoptose chimio-induite. Cette protection passe par

l'activation de NF- κ B de manière PI3K dépendante [71]. Les MSC expriment des molécules d'adhésion comme VCAM-1 et participent à la production de la matrice extracellulaire en relarguant de la fibronectine. VCAM-1 et fibronectine sont des ligands de la molécule d'adhésion VLA4 (CD49d/CD29) qui active la voie PI3K/Akt des cellules de LLC. Enfin, sous l'effet de la stimulation des MSC, les cellules tumorales expriment les protéines MMP-9 et VEGF. MMP-9 est une métalloprotéinase qui favorise la migration des cellules de LLC en dégradant la matrice extracellulaire. Le VEGF est un facteur de croissance du tissu endothélial qui promeut le développement du réseau vasculaire. MMP-9 et VEGF peuvent activer les cellules de LLC par effet autocrine/paracrine et ainsi favoriser la résistance et le développement du clone dans la moelle et les ganglions [71].

Les cellules stromales protègent également les cellules de LLC du stress oxydatif. Les cellules de LLC génèrent elles-mêmes une grande quantité de dérivés réactifs de l'oxygène (« reactive oxygen species » ou ROS). Les cellules ont besoin de synthétiser une grande quantité de GSH (gluthation), ce qui nécessite en particulier de réduire la cystine en cystéine. Les cellules de LLC ont de très faibles capacités à capter la cystine du milieu. L'apoptose spontanée des cellules de LLC en culture *ex vivo* sans cellules stromales peut en partie s'expliquer par le stress oxydatif généré. Les cellules stromales sont capables de capter une grande quantité de cystine et de la réduire en cystéine avant de la relarguer dans le microenvironnement [70].

Enfin, certains travaux actent pour une implication des voies NOTCH, Wnt et Hh dans la LLC. Les cellules stromales expriment les ligands de ces différents récepteurs. Les voies NOTCH1 et NOTCH2 sont constitutivement activées dans les cellules malignes de LLC [107]. Des mutations du gène *NOTCH1* sont retrouvées dans une fraction des patients (voir plus loin) [108].

4.3.5. Cellules nourricières monocytoïdes ou « nurse-like cells »

Il s'agit de cellules dérivées des monocytes circulants et sont proches des macrophages. Dans la LLC, les cellules nourricières, ou NLC (« nurse-like cells »), ont été découvertes dans des cultures prolongées de PBMC issues de patients atteints de LLC. Dans ces cultures était

observée l'apparition de cellules adhérentes CD68+ autour desquelles les cellules clonales étaient regroupées [109]. *In vitro*, les cellules de LLC sont capables d'induire la formation de NLC à partir de monocytes issus d'un donneur sain. A l'inverse, les lymphocytes B normaux en sont incapables. Cette maturation du monocyte intervient par des contacts cellule-cellule et par l'expression d'HMGB1 par les cellules de LLC [71,110]. Ces NLC ont été par la suite retrouvées *in vivo* dans les ganglions et la moelle osseuse. Les cellules de LLC sont également capables d'induire la migration des monocytes en sécrétant les chemokines CCL3 et CCL4 [71].

Un parallèle peut être fait avec le microenvironnement du lymphome folliculaire où la présence de macrophages CD68+ infiltrant la tumeur (« tumor infiltrating macrophages » ou TAM) favorise le développement de l'hémopathie [111] et représente un facteur de mauvais pronostic [112]. On observe également dans les lymphomes de Hodgkin et les lymphomes B diffus à grandes cellules, tout comme dans les tumeurs solides, la présence de TAM ou LAM (« lymphoma infiltrating macrophages ») [105]. Filip *et al.* a étudié le profil d'expression de gène des NLC de LLC. Ses résultats montrent que les NLC sont proches des TAM mais se différencient par l'expression forte du CD14 et la production intense de dérivés réactifs de l'oxygène [113]. Il a d'autre part été démontré que la monocytose absolue circulante est positivement associée à un pronostic péjoratif des patients atteints de LLC et que la population monocyttaire circulante est anormale chez ces patients [114–116].

Les NLC produisent du CXCL12, chemokine stimulant la migration des cellules de LLC. Parallèlement, les NLC protègent les cellules tumorales de l'apoptose. Cette protection fait intervenir la sécrétion par les NLC de protéines de la super-famille du TNF, BAFF (« B cell activating factor » anciennement BLys pour « B Lymphocyte Stimulator ») et APRIL (« a proliferation inducing ligand ») [71]. Les récepteurs de BAFF (BAFF-R, BCMA et TACI) et d'APRIL (BCMA et TACI) sont exprimés par les cellules de LLC. Leur stimulation inhibe l'apoptose et induit l'expression de c-MYC. Dans les cellules de LLC, une coopération c-MYC/BAFF peut être mise en évidence [71].

Les NLC expriment aussi le CD31 et la plexin-B1, qui sont les ligands du CD38 et du CD100, des récepteurs exprimés sur les cellules de LLC. La stimulation de ces récepteurs protège les cellules tumorales de l'apoptose et peut induire la prolifération [71]. La plexin B1 est également exprimée par les cellules stromales et les lymphocytes T [71]. Les NLC expriment la protéine d'inflammation MIF (« migration inhibitory factor ») qui active les cellules de LLC via le récepteur CD74. Le CD74 correspond à la chaîne invariante li du CMH de classe II [70]. Il a récemment été démontré que la stimulation du CD74 par le MIF induit la surexpression du CD84 sur les cellules de LLC qui participe à la résistance contre l'apoptose [117].

4.3.6. Rôle du CD5 et de ces ligands

Les cellules de LLC sont caractérisées par l'expression du marqueur CD5 qui est également présent sur tous les lymphocytes T normaux. Le CD5 est un récepteur de la famille SRCR (« scavenger receptor cystein rich ») [118]. De multiples ligands du CD5 ont été décrits : le CD72 (exprimé par les lymphocytes B), les domaines FR de la chaîne lourde des immunoglobulines, des motifs moléculaires d'agents pathogènes (PAMP pour « pathogen associated molecular pattern ») et le CD5 lui-même [118]. Au niveau fonctionnel, l'expression du CD5 active constitutivement les voies Erk et NFAT. Le domaine intracellulaire du CD5 contient des régions de structure proche des ITAMs et peut recruter les tyrosines kinases Syk et ZAP70. Cette activation basale de Erk et NFAT est la marque de lymphocytes B anergiques et le CD5 augmente le seuil d'activation du BCR [119].

Au final, le CD5 reconnaît divers ligands et est capable d'activer certaines voies dans le lymphocyte B mais il exerce plutôt une fonction inhibitrice sur le signal du BCR. Le rôle du CD5 dans la LLC reste peu connu.

4.3.7. Rôles des facteurs angiogéniques produits par les cellules tumorales

Les cellules de LLC expriment différents facteurs angiogéniques capables de promouvoir la néovascularisation des tissus infiltrés. Ces facteurs angiogéniques peuvent également avoir des effets autocrines/paracrines sur les cellules tumorales elles-mêmes. Les cellules de

LLC produisent donc : VEGF (« vascular endothelial growth factor »), bFGF (« basic fibroblast growth factor »), PDGFA et PDGFB (« platelet-derived growth factors A et B »), ANG-2 (« angiopoïétine-2 »), TSP-1 (« thrombospondine 1 ») et MMP-9 (« metalloprotéinase 9 »). Les effets sur les cellules de LLC protègent de l'apoptose et favorisent le développement de la tumeur. L'expression élevée du VEGF est associée à un pronostic plus défavorable [120].

4.3.8. LLC et microparticules

Les vésicules extracellulaires regroupent 3 types de particules : les nanoparticules (30 à 100nm) dont font partie les exosomes issus du mécanisme d'endocytose et 2 types de microparticules issues soit d'un relargage actif (« shedding particles ») par la cellule (0.1 à 1µm), soit de l'apoptose (corps apoptotiques, 1 à 4µm en général) [121,122]. Les microparticules relarguées et les corps apoptotiques sont donc formés à partir de la membrane plasmique de la cellule d'origine. Toutes les cellules de l'organisme peuvent libérer des microparticules. Ces microparticules sont impliquées dans de très nombreux processus physiologiques ou pathologiques. En particulier, elles sont impliquées dans la réponse immunitaire et les cancers où elles font partie intégrante du microenvironnement [121,122]. Ces microparticules permettent la communication intercellulaire en propageant des molécules membranaires de la cellule d'origine, des protéines et des microARN en suspension dans la particule elle-même [121,122].

Peu de données sont publiées sur le rôle des microparticules dans la LLC. Une étude récente a mis en évidence des microparticules de 20 à 300nm dans le plasma de patients atteints de LLC et dans les surnageants de culture [123]. Par analyse du profil protéique des particules et des cellules malignes, il a été démontré que les microparticules présentent un profil particulier suggérant un relargage spécifique et une implication dans la communication avec les cellules environnantes [123].

En 2010, Gohsh *et al.* retrouvait une augmentation du titre de microvésicules dans le plasma des patients associée avec l'évolution du stade de la maladie [124]. En menant une étude fonctionnelle, les auteurs ont mis en évidence que les microvésicules de LLC stimulaient les cellules stromales médullaires via la voie Akt/mTOR/HIF-1 α et conduisait à la

sécrétion de VEGF [124]. Parallèlement, les microvésicules modulaient l'expression de la cycline D1 et de c-MYC dans les cellules stromales via la voie de la β -caténine [124]. Finalement cette équipe a révélé la transmission par les microvésicules d'un récepteur tyrosine kinase sous forme activé (*i.e.* phosphorylée), nommé Axl, qui est lié à l'activation de la voie Akt dans les cellules destinataires [124]. L'année suivante, cette équipe mettait en évidence la phosphorylation constitutive d'Axl dans les cellules de LLC [125]. La forme phosphorylée d'Axl était associée physiquement aux formes phosphorylées de Lyn, Syk/ZAP70 et PLC- γ 2. Un inhibiteur d'Axl induisait une apoptose massive des cellules de LLC révélant un rôle de ce récepteur dans le développement de la lymphopathie [125].

5. Phase précoce de la maladie : la lymphocytose B monoclonale

5.1. Définition des lymphocytoses B monoclonales

Les lymphocytoses B monoclonales (« monoclonal B lymphocytosis » ou MBL) regroupent les situations asymptomatiques associées à la circulation dans le sang périphérique d'un clone B dont la valeur absolue est $<5G/l$. Ces MBL sont observées en l'absence d'infections ou de maladies auto-immunes, sans adénopathies et sans cytopénies [126].

La classification des MBL dépend d'abord de l'immunophénotypage puis de la lymphocytose absolue. On dénombre ainsi :

- Les MBL « CLL-like » : représentent 75% des cas de MBL et correspondent à des lymphocytes B monoclonaux CD5+ ayant un score de Matute à 4 ou 5 comme les LLC classiques (voir chapitre diagnostic biologique de la LLC).
- Les MBL « CD5+ atypiques » ou « atypical CLL-like » : correspondent à des lymphocytes B monoclonaux CD5+ mais avec des anomalies phénotypiques par rapport aux cellules de LLC classiques, absence du CD23, expression forte du CD20 ou de l'Ig de surface

- Les MBL CD5- : correspondent à des lymphocytes B CD5-, phénotypiquement différents des cellules de LLC.

Selon la taille du clone circulant, on peut distinguer les « clinical MBL », avec une lymphocytose anormale mais toujours <5G/l et les « low-count MBL » avec une lymphocytose totale parfaitement normale (*i.e.* <4G/l) [126].

Une autre classification des MBL CLL-like est retrouvée dans la littérature selon la lymphocytose clonale circulante. Il s'agit des MBL « low » (MBL^{Lo}) définies par un clone circulant <0.2G/l et les MBL « high » (MBL^{Hi}) définies par un clone entre 0.2G/l et <5G/l [127].

Pour note, avant que le seuil de diagnostic de la LLC ne soit fixé à 5G/l en 2008, les patients porteurs d'une MBL CLL-like étaient classés en LLC de stade 0 de la classification de Rai en particulier, ce qu'il faut prendre en compte dans l'analyse des séries de patients et des données épidémiologiques antérieures à cette date [126].

5.2. Epidémiologie et histoire de la maladie :

La fréquence des MBL est évaluée aux alentours de 3% dans la population générale et peut atteindre plus de 10% selon la sensibilité de la technique de cytométrie en flux employée (augmentation du nombre d'anticorps et analyse d'un très grand nombre d'évènements, jusqu'à $5 \cdot 10^6$). Cette fréquence de la MBL augmente particulièrement avec l'âge. Elle est plus fréquente chez les personnes apparentées au 1^{er} degré à un patient ayant développé une LLC, évaluée entre 13% et 18% [126,128].

Le risque d'évolution vers une LLC authentique (*i.e.* lymphocytose clonale $\geq 5G/l$) est d'environ 1% à 2% par an. Il a été montré que pratiquement tous les patients atteints de LLC avaient présenté une phase de MBL au préalable [126]. En 2008, Rawstron *et al.* a identifié un seuil à 1.9G/l pour le clone B en-dessous duquel la lymphocytose restait stable après 5

années de suivi chez 90% des patients concernés [129]. Dans cette étude, le principal risque d'évolution était la lymphocytose clonale initiale.

La fréquence des MBL CLL-like est supérieure à celles des LLC, signifiant que certains facteurs intrinsèques (mutations, ...) ou extrinsèques (infection, auto-antigène, ...) pourraient déclencher la progression tumorale du clone. Par exemple, il a été montré que le taux de Treg, limitant la réponse immunitaire anti-tumorale, était plus élevé dans les MBL avec une lymphocytose élevée (clinical MBL) [126]. Enfin, la fréquence des MBL CLL-like est plus élevée (28%) chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C (HCV) [126], et il a été récemment démontré que les BCR de LLC issus du réarrangement du gène *IGHV1-69* étaient capables de reconnaître des antigènes du virus HCV [130].

5.3. Biologie comparative des MBL CLL-like et des LLC :

Les cellules clonales B de MBL CLL-like sont biologiquement très proches des LLC. Les mutations de *TP53*, *ATM*, *SF3B1* ou *NOTCH1* sont très rares dans ces faibles populations tumorales [126]. Le même spectre de répertoire IgVH et d'anomalies cytogénétiques que dans les LLC est retrouvé dans les MBL CLL-like. Cependant, il semble que les MBL^{Hi} se distinguent des MBL^{Lo} par une plus grande fréquence d'utilisation du gène *IGHV1-69* en configuration germinale et des gènes *IGHV3-23* et *IGHV4-34* mutés alors que les MBL^{Lo} utilisent majoritairement les gènes *IGHV4-59* et *IGHV4-61* qui sont très rares dans les LLC constituées [128,131]. De même les MBL^{Lo} présentent une plus grande fréquence de caryotypes normaux ou de del(13q) isolée que les MBL^{Hi} [132,133].

Des données récentes suggèrent que l'évolution des clones de MBL vers des LLC constituées ainsi que l'acquisition d'anomalies cytogénétiques et génétiques de haut risque est probablement prédéterminée par le BCR des cellules [127].

6. Aspects cliniques, diagnostic biologique, évaluation pronostique et principes de prise en charge des patients atteints de LLC : actualités et bilan pratique

6.1. Les aspects cliniques de la LLC

6.1.1. Circonstances de découverte et diagnostic clinique

Les circonstances de découverte de la maladie sont très fréquemment fortuites, par la mise en évidence d'une hyperlymphocytose sur la NFS lors d'un bilan de routine. Les phases précoces de la maladie sont volontiers asymptomatiques et il existe un continuum entre la MBL et le diagnostic de LLC. Lorsque la maladie évolue, les patients présentent progressivement des adénopathies grossièrement symétriques, qui peuvent parfois devenir importantes et l'on parle alors de « bulky disease ». Parallèlement, l'infiltration médullaire progresse et peut aboutir à des cytopénies centrales par envahissement de la moelle hématopoïétique par le clone B. Cette évolution clinique est retranscrite dans 2 systèmes de classification clinico-biologique, la classification de Rai et la classification de Binet.

Le lymphome lymphocytaire (« small lymphocytic lymphoma » ou SLL) est une forme tumorale de LLC. Le diagnostic de SLL correspond à la présence d'adénopathies ou d'une splénomégalie alors que le clone B de type « LLC » est $<5G/l$ dans le sang périphérique [134].

6.1.2. Les systèmes de classification clinico-biologique des patients

La classification de Rai est majoritairement utilisée en Amérique du nord. En 1975, Rai *et al.* décrivaient initialement 4 stades de la maladie notés 0, I, II, III et IV associés à une espérance de vie décroissante [135]. Elle est souvent utilisée actuellement dans une forme simplifiée en 3 classes : 0, I/II et III/IV (Tableau 2).

La classification de Binet a été publiée en 1981 et est principalement utilisée en Europe [136]. Cette classification en 3 stades, inchangée depuis, est représentée dans le Tableau 2. Cette classification dépend de la présence d'une cytopénie (anémie et/ou thrombopénie), du nombre d'aires ganglionnaires atteintes (+/-3 aires ganglionnaires). Les aires ganglionnaires au nombre de 5 sont alors définies comme suit : aire cervicale, aire axillaire,

aire pelvienne, splénomégalie, hépatomégalie. Au diagnostic, environ 70% des patients présentent les critères de stade A de la classification de Binet, 20% des patients sont en stade B et 10% environ au stade C.

| Classification de Rai | | Classification de Binet | |
|-----------------------|--|-------------------------|--|
| stade 0 | lymphocytose clonale dans le sang ou la moelle | stade A | <3 aires ganglionnaires atteintes |
| stade I | présence d'adénopathies | stade B | ≥3 aires ganglionnaires atteintes sans cytopénie |
| stade II | présence d'une splénomégalie ou hépatomégalie | | |
| stade III | présence d'une anémie | stade C | anémie et/ou thrombopénie |
| stade IV | présence d'une thrombopénie | | |

Tableau 2 : Critères de classification clinico-biologique de Rai et de Binet.

6.1.3. Le temps de doublement des lymphocytes ou TDL

Le temps de doublement des lymphocytes (TDL) est le reflet direct de l'activité du clone. Ce marqueur très simple et pragmatique compare les lymphocytoses absolues entre 2 points de suivi. Un TDL inférieur à 6 mois est un critère devant faire évaluer l'indication d'un traitement (voir plus loin) [137]. Certains patients peuvent présenter un TDL < 6 mois mais être asymptomatiques, le TDL ne peut donc pas être le seul paramètre posant l'indication d'un traitement spécifique de la LLC [138]. Le TDL n'est pas directement interprétable pour les patients avec une lymphocytose < 30G/l pour lesquels une période > 6 mois peut être nécessaire pour voir la lymphocytose doubler [137]. Enfin, les hyperlymphocytoses majeures parfois rencontrées au diagnostic ou au décours d'une LLC rapidement progressive (*i.e.* > 100G/l) ne sont pas associées à un risque de leucostase contrairement à ce qui est décrit pour les leucémies aiguës très hyperleucocytaires [137].

6.1.4. L'évolution clinique des patients atteints de LLC

On estime qu'environ 30% des patients ne nécessiteront aucun traitement et ces patients présenteront une espérance de vie proche de la population générale et que 25% des patients mourront directement de leur LLC.

La 1^{ère} cause de mortalité des patients atteints de LLC sont les infections. Le profil d'infections correspond aux infections opportunistes des patients immunodéprimés, avec en particulier des infections pulmonaires à *Pneumocytis jiroveci*. L'hypogammaglobulinémie qui s'installe progressivement au cours de l'évolution de la maladie est en partie responsable de la forte sensibilité aux infections. L'injection d'Ig polyvalentes est d'ailleurs réalisée en cas d'hypogammaglobulinémie sévère associée à des infections répétées. L'immunité cellulaire est également atteinte chez les patients et peut être accentuée par les traitements [139,140].

Enfin, 5% à 10% des patients vont évoluer sous la forme d'un syndrome de Richter [141]. Il s'agit de la transformation de la LLC en lymphome B agressif à grandes cellules. Il se manifeste par l'apparition d'adénopathies rapidement progressives, non symétriques, associées à une forte altération de l'état général et un fort taux de LDH. Cette transformation est focale, avec un point de départ ganglionnaire à partir du clone de LLC. Le diagnostic est histologique et correspond le plus souvent à un lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) mais des « Richtérisation » de type lymphome de Hodgkin sont rarement observées.

Les patients atteints de LLC peuvent également développer en parallèle de leur hémopathie initiale un authentique lymphome T, d'évolution en règle générale agressive. De plus, la fréquence des tumeurs solides chez ces patients est supérieure à la population générale et souligne le déficit de l'immunité cellulaire au cours de la maladie.

6.1.5. Les complications auto-immunes :

Les complications auto-immunes concernent 5% à 10% des patients atteints de LLC [142] et jusqu'à 20% dans les stades avancés [143]. Elles peuvent se présenter sous 4 formes : anémie hémolytique auto-immune (AHAI), environ 7% des cas, thrombopénie auto-immune (PTI), environ 2% à 4% des cas, et plus rarement neutropénie auto-immune (<1%) et érythroblastopénie pure (<1%) sans infection à parvovirus B19 associée [142]. D'autres complications auto-immunes sont parfois décrites : pemphigus paranéoplasique, cryoglobulinémie ou neuropathies (anticorps anti-MAG) [144]. D'autres complications ne sont pas d'origine auto-immune dans la LLC : (i) angioœdème acquis par consommation du C1-inhibiteur (C1-INH) par les cellules tumorales sans Ac anti-C1-INH et (ii) néphropathies par dépôt de chaînes légères [144].

Ces manifestations auto-immunes sont corrélées aux autres marqueurs biologiques de mauvais pronostic de la LLC : IgVH non muté, expression de ZAP70 ou du CD38 [144].

Seulement 50% environ des patients présentant un test de Coombs direct positif (TCD) développent une hémolyse associée. Les principaux antigènes concernés sont ceux du système Rhésus et la protéine Bande 3 qui peuvent être présentés par les cellules de LLC aux lymphocytes T et déclencher une réaction auto-immune [143,145]. De manière plus globale, l'auto-immunité au cours de la LLC peut être la conséquence de : (i) une présentation d'Ag par la LLC, bien que cette fonction soit peu effective dans ces cellules clonales par rapport aux B normaux, (ii) dépression globale du système immunitaire qui laisse se développer des effecteurs auto-réactifs, (iii) production d'un auto-Ac par la LLC (*cf.* pemphigus paranéoplasique et agglutinine froide) et (iv) une activation des cellules clonales par leur BCR polyréactif qui favorise la présentation d'antigène [144].

Des études menées dans les années 80 et 90 avaient relevé la fréquence des AHAI chez les patients atteints de LLC traités par fludarabine ou chlorambucil, particulièrement en monothérapie [144]. Cette fréquence augmentée est expliquée par la déplétion en Treg consécutive à l'emploi de ces molécules et par ce fait favorise le développement de lymphocytes auto-réactifs. Il semblerait que la combinaison de la fludarabine avec le

rituximab et le cyclophosphamide (protocole RFC), protège de l'apparition d'une AHAI puisque la fréquence de cet évènement n'est pas augmentée avec cette immunochimiothérapie chez les patients présentant une AHAI ou un TCD positif non liés à la fludarabine [144]. Toutefois, son usage reste controversé dans ces situations où d'autres protocoles sans fludarabine (RCD : rituximab, cyclophosphamide, dexaméthasone ou BR : bendamustine, rituximab) sont parfois choisis [146].

Il a récemment été rapporté que la découverte d'un TCD positif avec ou sans AHAI était un facteur de mauvais pronostic chez les patients au stade A de la maladie [147].

Enfin, la distinction entre stade C « infiltratif » et stade C « immun » est discutée dans la littérature. Globalement, la présence d'un épisode de cytopénie auto-immune dans l'année du diagnostic est un facteur de mauvais pronostic sur la survie par rapport aux patients de stade A classique. L'espérance de vie de ces patients est cependant plus proche de celle des patients de stade B que des patients de stade C infiltratif [148].

6.2. Cytologie :

6.2.1. *Cytologie sanguine, ombres de Gümprrecht et atypies*

L'observation du frottis sanguin révèle dans la grande majorité des cas une accumulation de petits lymphocytes matures, semblables morphologiquement aux lymphocytes B normaux. Ce lymphocyte mature se caractérise par une taille réduite, un rapport nucléocytoplasmique élevé, une chromatine dense et des contours nucléaires +/- réguliers. Le lymphocyte de LLC typique présente de « mottes » de chromatine prenant l'aspect « d'écailles de tortue » sur le noyau.

Ces lymphocytes banaux sont presque systématiquement associés à la présence d'ombres de Gümprrecht qui sont des lymphocytes clonaux déchirés lors de la réalisation du frottis sanguin (Figure 16). Elles représentent donc en soi des artéfacts d'étalement. Ces ombres ne sont pas spécifiques en soit de la LLC, sont en nombre variable d'un patient à

l'autre et témoignent de la fragilité cellulaire du clone tumoral. Ces ombres doivent leur nom à leur « inventeur », un pathologiste allemand nommé F. Gümprrecht qui décrivit ces artéfacts à la fin du XIXème siècle [149]. Leur association à la LLC est décrite depuis plus de 60 ans [150]. En 2007 puis en 2009, une équipe américaine a démontré que le nombre d'ombres de Gümprrecht était associé positivement avec une survie globale plus longue [151,152]. Ces résultats ont été confirmés en 2010 par une équipe européenne [153].

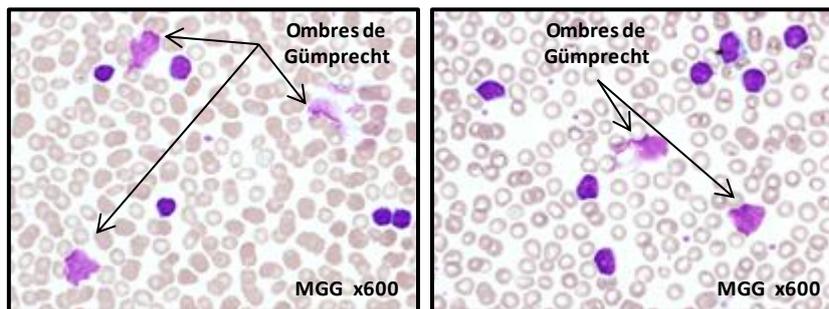


Figure 16 : Ombre de Gümprrecht observables sur les frottis sanguin.

Des atypies peuvent être assez fréquemment observées au décours de la LLC et leur type et leur nombre peut varier lorsque la maladie évolue. Une cytologie sanguine commune est définie par un nombre d'atypies <15% des lymphocytes et des prolymphocytes <10%. La présence de plus de 15% d'atypies définit un variant « atypique » en cytologie, des prolymphocytes entre 10% et 55% définissent un variant prolymphocytaire de LLC, et des prolymphocytes >55% est le critère diagnostique de la leucémie prolymphocytaire B (BPLL), une entité nosologique différente de la LLC [36]. La principale anomalie morphologique rencontrée est la présence d'un noyau grossièrement clivé, formant une large échancrure facilement discernable de la fine encoche des centrocytes de lymphomes folliculaires. Les prolymphocytes sont des cellules légèrement plus grandes que le petit lymphocyte, leur chromatine est toujours mature mais ils sont caractérisés par un nucléole proéminent aux contours souvent soutenus. Des atypies moins bien systématisées sont aussi observables, il s'agit de lymphocytes matures de taille moyenne avec des irrégularités nucléaires, on peut également observer quelques grandes cellules activées, très basophiles à la coloration MGG

qui sont des para-immunoblastes. Ces para-immunoblastes peuvent représenter jusqu'à 3% des lymphocytes circulant dans une LLC de cytologie commune. Enfin, chez de rares patients on peut mettre en évidence une différenciation lymphoplasmocytaire, semblable à celle retrouvée dans les LPL/MW. Il s'agit de cellules présentant un noyau excentré, de basophilie variable et avec parfois une ébauche d'archoplasme.

6.2.2. *Cytologie médullaire :*

Le myélogramme n'est pas nécessaire au diagnostic d'une LLC typique mais peut être réalisé au cours de la maladie (exploration de cytopénies ou autres, ...). La cytologie médullaire retrouve une infiltration lymphocytaire constante mais variable, évoluant de 20% à 30% jusqu'à un envahissement total dans les stades C de la classification de Binet. L'aspect morphologique est identique à celui du sang. Les infiltrations faibles (20% à 30%) sont difficilement distinguables d'une moelle normale en l'absence d'atypies.

Très rarement sur l'aspiration médullaire, il est possible d'observer la formation de « pseudo-follicules » dans la moelle de patients atteints de LLC. La présence de pseudofollicules est facilement mise en évidence sur une biopsie ostéo-médullaire. Il s'agit d'un regroupement cellulaire initié par les cellules clonales qui reproduit la structure d'un follicule ganglionnaire avec des cellules folliculaires dendritiques et des lymphocytes T et B. Ces structures correspondent aux centres de prolifération cellulaire évoqués plus haut.

6.2.3. *Cytologie / histologie ganglionnaire :*

Les ganglions envahit par la LLC montrent en histologie une perte de l'architecture ganglionnaire normale avec un envahissement diffus de petits lymphocytes matures. Dans les cas de transformation (Richter), on observera des plages de grandes cellules lymphoïdes ornées d'atypies nucléaires prononcées. Ces grandes cellules expriment fortement le marqueur de prolifération Ki67.

6.3. Caractérisation immunophénotypique

6.3.1. *Score de Matutes*

L'immunophénotypage des cellules circulantes est un élément essentiel au diagnostic de la LLC. En 1994 puis en 1997, l'équipe de Matutes *et al.* a publié l'utilisation de 5 marqueurs pour le calcul d'un score diagnostique (i.e. score de Matutes) [154,155] qui est actuellement un standard international [36,137].

Typiquement, les cellules de LLC expriment les marqueurs CD5 et CD23, le marqueur FMC7 est négatif et les marqueurs CD22, CD79b ainsi que l'immunoglobuline de surface sont très faiblement exprimés par rapport aux lymphocytes B normaux. Le calcul du score est réalisé comme suit : CD5+ (1 point), CD23+ (1 point), FMC7 négatif (1 point), CD22 ou CD79b négatifs ou faibles (1 point), Ig de surface faible (1 point). Le diagnostic de LLC est classiquement associé à un score à 4 ou 5.

6.3.2. *Les diagnostics différentiels de la LLC*

La LLC « typique » est donc une hyperlymphocytose B clonale, constituée de petits lymphocytes matures sans atypies, et dont le score de Matutes est égal à 4 ou 5. La présence d'atypies cytologiques particulières (noyau clivé, irrégularités nucléaires, différenciation lymphoplasmocytaire, présence de nucléoles) ou de marqueur phénotypiques inhabituels (expression du FMC7, score de Matutes <4) doit évoquer la possibilité d'un diagnostic différentiel avec un autre lymphome B à petites cellules : lymphome à cellules du manteau, lymphome de la zone marginale, leucémie à prolymphocytes, Ces diagnostics différentiels ne seront pas traités dans ce manuscrit.

6.3.3. *Phénotype complémentaire classiquement utilisé en routine pour le diagnostic des LNH B (ZAP70 exclu)*

Un phénotypage assez complet a été récemment réalisé sur une série de LLC et de MBL [156]. Les résultats sont donnés à titre informatif dans la figure ci-dessous (Figure 17). Les caractéristiques immunophénotypiques majeures sont reprises en détail par la suite.

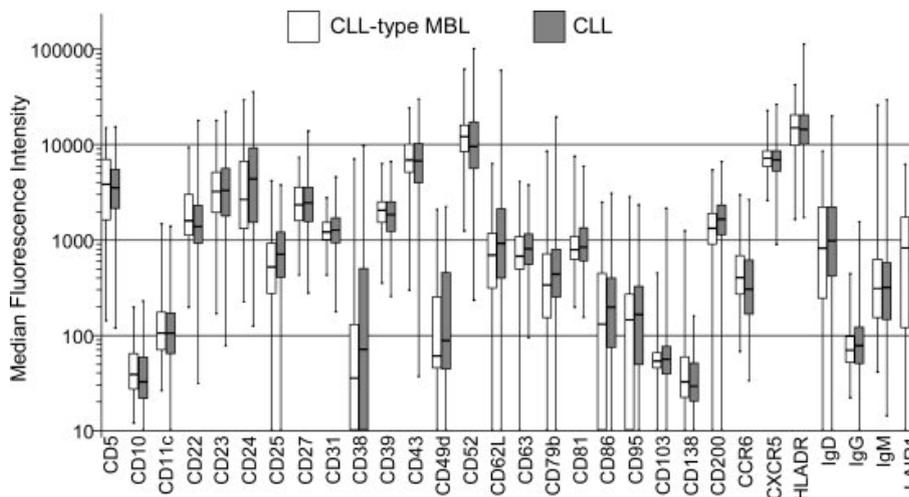


Figure 17 : Immunophénotypage complet d'une série de LLC et de MBL.

Adapté d'après Rawstron *et al.*, Cytometry part B, 2010 [156].

Sous expression du marqueur panleucocytaire CD45 et du CD20

CD45 : la sous expression du CD45 par les cellules de LLC par rapport aux cellules B normales, aux autres LNH B ou encore aux lymphocytes T autologues est une caractéristique de la LLC en cytométrie en flux. En dehors des hémopathies immatures lymphoïdes ou myéloïdes, la LLC est le seul LNH mature à présenter cette sous-expression d'intensité variable mais systématique [157–159].

CD20 : le CD20 est un marqueur du lignage B. Le niveau d'expression du CD20, comme celui du CD45, est une caractéristique immunophénotypique des clones de LLC [160].

Les marqueurs d'activation :

CD38 : ce marqueur est exprimé dans environ 15% à 20% des cas [161]. Le seuil de positivité en cytométrie est variable d'une étude à l'autre (classiquement 7%, 20% et 30%). Le CD38 est une protéine transmembranaire capable de jouer un rôle de récepteur (adhésion aux cellules stromales par l'intermédiaire du CD31) et un rôle enzymatique en contrôlant le signal calcique et la prolifération cellulaire [162–164]. L'expression du CD38 est fortement corrélée au statut IgVH non muté [165] mais son expression est variable au cours du temps et il ne peut pas être utilisé comme un marqueur du statut mutationnel puisque environ 30% des cas de LLC sont discordants sur ces 2 paramètres [162,166]. L'expression du

CD38 est cependant un marqueur de mauvais pronostic confirmé sur plusieurs séries indépendantes [138]. L'expression du CD38 sur les cellules tumorales circulantes reflèterait un passage récent dans les centres de prolifération ganglionnaires et donc le turn-over global de la masse tumorale [167]. Récemment, les résultats d'une étude observationnelle multicentrique prospective italienne ont démontré la relevance clinique d'un score pronostique basé sur 3 paramètres pourtant souvent associés, le CD38, ZAP70 et le statut IgVH [168]. Les patients avec un score à 0, 1 ou 2/3 étaient associés à des profils d'expression de gènes différents et prédisaient la survie sans progression même dans le sous-groupe des patients au stade Rai 0 (371 patients) [168].

CD25 : il s'agit de la chaîne alpha du récepteur à l'IL2 et il correspond au récepteur de haute affinité pour cette interleukine. Ce récepteur est fortement exprimé dans la tricholeucémie (forme non variante) [169]. Ce marqueur peut être exprimé faiblement sur les cellules de LLC et signe une activation par le BCR tout comme le CD69 et le CD71 peu explorés [170]. Dans une étude israélienne récente 15% environ des cas présentent un niveau élevé de CD25 sans que ce paramètre ne soit lié au pronostic ni au stade clinique de la maladie [171].

Les marqueurs non liés à l'activation

CD11c : il s'agit d'une molécule d'adhésion fonctionnant sous forme de dimère avec le CD18 (formation de la gp150/95). Le CD11c est variablement exprimé par près de 50% des clones de LLC [172–174].

CD43 : il s'agit d'une sialoprotéine exprimée sur presque la totalité des clones de LLC [175]. Le CD43 est un récepteur de la galectine 1, un lectine exprimé par les cellules stromales en particulier [176]. Le CD43 est à ce titre utilisé dans les protocoles standardisés de maladie résiduelle de LLC [160]. Ce marqueur discrimine les LLC des phases leucémiques de LNH de la zone marginale qui sont négatives pour le CD43 [177,178].

CD52 : il s'agit d'un petit peptide glycosylé de 12 acides aminés (21 à 28 kDA) dont l'adhésion à la surface de la cellule est dépendante d'une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) et existe sous 2 isoformes (CD52-I et CD52-II). Le CD52 est

exprimé sur tous les lymphocytes B, T et NK, les monocytes, les macrophages, les éosinophiles et les cellules dendritiques. Sa fonction n'est pas complètement clarifiée mais il participerait entre autre à l'activation des Treg [179]. L'expression du CD52 présente un intérêt clinique par la possibilité de traiter les patients avec un anticorps monoclonal anti-CD52 (alemtuzumab) qui se lie aux 2 isoformes. L'alemtuzumab avait été initialement développé pour lutter contre la GVHD et le rejet de greffon au cours de l'allogreffe [180]. Les hémopathies concernées sont principalement la LLC mais aussi la B-PLL, la MW et les LNH-T dont les LGL à lymphocytes T [181]. Le niveau d'expression sur les cellules de la LLC est plus bas que celui des lymphocytes B normaux sauf pour les cas de SLL [181]. Les cellules de LLC expriment plus de CD52 que de CD20 et les cas réfractaires au rituximab par diminution acquise du CD20 surexpriment souvent le CD52 en parallèle [180]. Des essais de quantification des cibles antigéniques ont été réalisés pour évaluer la possibilité de déterminer un seuil prédictif de la réponse mais l'objectif semble difficile à atteindre [182].

CD27 : ce marqueur signe les lymphocytes B mémoires non tumoraux et est universellement exprimé sur les cellules de LLC, un autre témoin de l'expérience de l'antigène comme la présence de mutations somatiques [178,183].

Autres marqueurs étudiés depuis les années 2000 :

CD200 : il s'agit de la glycoprotéine MRC OX-2, ou MOX2, de la super-famille des immunoglobulines. L'expression du CD200 dans le système hématopoïétique a été découvert sur la LLC en 2006 [184] mais n'est pas spécifique de la LLC. Le CD200 est positif dans 100% des cas de LLC alors qu'il n'est pas retrouvé dans les phases leucémiques de lymphomes à cellules du manteau, un autre LNH-B CD5+ [185,186]. Il est également exprimé sur les lymphocytes B et T normaux [187]. Lorsqu'il se fixe sur son récepteur, le CD200R exprimé par les monocytes, les neutrophiles, les basophiles, les cellules dendritiques et les macrophages, il délivre un signal inhibiteur [185,188]. Les souris CD200^{-/-} présente une population macrophagique constitutivement activée [189]. Ce marqueur a récemment été proposé pour diagnostiquer les LLC atypiques avec score de Matutes à 3 [190].

CD49d : il s'agit d'une molécule d'adhésion comme le CD11c. Une importante étude multicentrique internationale réalisée sur un peu moins de 3000 patients à montré que l'expression du CD49d au seuil de 30% était le plus puissant des marqueurs pronostiques accessibles en CMF sur les critères de survie globale et survie avant premier traitement [191]. Il est exprimé par près de 40% des cas de LLC [192].

CD44 : il s'agit d'une glycoprotéine de surface impliquée dans les interactions cellules à cellules qui reconnaît l'acide hyaluronique de la matrice extracellulaire encore appelée « lymphocyte homing receptor » [193]. Elle est fortement exprimée sur toutes les cellules de LLC [194]. Sur le plan physiopathologique, le CD44 peut former un complexe avec le CD38, le CD49d et MMP-9 (Matrix MetalloPeptidase-9), qui est absent des lymphocytes B normaux, et qui favorise la migration et l'invasion tissulaire [195]. Dans un modèle murin de LLC (souris transgénique E μ -TCL1) et sur des cellules primaires, le CD44 active la voie PI3K/Akt et protège les cellules tumorales de l'apoptose via l'induction de Mcl1 (voir plus loin) [196,197]. L'utilisation d'un Ac monoclonal humanisé anti-CD44 a récemment montré une induction de l'apoptose *in vitro* spécifique des cellules primaires de LLC ZAP70 positives [193]. La fixation de l'Ac induisait l'internalisation du CD44 alors colocalisé avec ZAP70 par microscopie confocale. Des expériences de xénogreffe de cellules de LLC chez la souris ont pu mettre en évidence un disparition du clone tumoral après injection de l'Ac monoclonal anti-CD44 [193].

CD69 : il s'agit d'un marqueur d'activation du lymphocyte B normalement exprimé que quelques heures après l'activation et appartient à la famille des récepteurs de type lectine de type II [198]. Son expression sur les cellules de LLC est connue depuis plus de 10 ans [199]. Son expression a été corrélée à un pronostic péjoratif [200].

CD71 : il s'agit du récepteur de type 1 de la transferrine (TfR1) [201] qui est également un marqueur d'activation du lymphocyte tumoral de LLC [199]. L'expression du CD71 est associée à une maladie plus progressive mais n'est pas un marqueur indépendant du pronostic des patients [202]. Il est intéressant de noter que les cellules de LLC progressives sont également fréquemment porteuses de mutations du gène *SF3B1* (voir plus loin) qui

sont elles-mêmes associées à l'anémie réfractaire avec excès de sidéroblastes (ARS), une myélodysplasie caractérisée par un métabolisme anormal du fer dans les cellules tumorales.

CD1d : il s'agit d'une molécule membranaire de la famille du CMH associée à la β 2-microglobuline qui sert à présenter des antigènes de nature phospholipidique ou glycolipidique aux lymphocytes iNKT [203]. Les iNKT sont des lymphocytes T de l'immunité innée présentant un TCR $\alpha\beta$ presque invariant (invariant NKT ou NKT de type I) les distinguant des NKT de type II [204]. L'expression du CD1d est associée à celle du CD38 et au mauvais pronostic de patients [205–207]. Le nombre de lymphocytes NKT est diminué lorsque la maladie progresse parallèlement à l'augmentation des Treg [206,208]. Il semble que la population NKT ait un rôle protecteur dans l'évolution de la LLC mais le lien direct avec les cellules tumorales via le CD1d n'est pas encore clairement établi.

CD180 : il s'agit d'un récepteur de la famille des TLR, RP105, qui module le signal du TLR4 dont le rôle sur ce récepteur est ambigu [209]. Sa stimulation permet de sensibiliser les cellules au signal du BCR. Son expression est ensuite diminuée après activation du BCR. Son expression est globalement plus faible dans la LLC que sur les lymphocytes B normaux, mais les plus hauts niveaux d'expression sont associés au statut non muté du locus IgVH [210]. Environ 50% des cellules de LLC sont capables de s'activer en réponse à ce récepteur [211]. La faible expression du CD180 distingue cependant les cellules de LLC des cellules de lymphomes de la zone marginale et surtout du sous-type de lymphome splénique de la zone marginale qui surexprime fortement ce récepteur par rapport aux lymphocytes B normaux [212].

CD84 : il s'agit d'un récepteur de type Ig. Son expression dans les cellules de LLC est dépendante de l'activation du récepteur CD74 (chaîne invariante Ii du CMH de classe II) par le MIF sécrété par les nurse-like cells dans le microenvironnement. Toutes les cellules de LLC surexpriment fortement ce marqueur qui est également retrouvé sur les lymphocytes B, T, les cellules dendritiques et les plaquettes. Sa surexpression dans la LLC est présente dès les stades Rai 0. L'activation du CD84 active Akt et protège les cellules de l'apoptose spontanée.

Il est supposé que la voie MIF/CD74/CD84 joue un rôle important dans le développement précoce de la maladie [117].

CD26 : il s'agit de la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) qui est exprimée après activation de la cellule B mais aussi sur les lymphocytes T et NK ainsi que des cellules non hématopoïétiques. Son expression est associée à celle du CD38 et du CD49d [213]. Dans la LLC, le CD26 peut être également exploré par dosage de sa fraction soluble [214].

HLA-G : cette protéine membranaire est un antigène de la famille de CMH classe I. Son rôle physiologique est de réguler la réponse immune. Il a été découvert sur les trophoblastes où il prévient une réaction immunitaire maternofoetale [215]. Il agit en activant des récepteurs sur les cellules du système immunitaire : lymphocytes T et NK, cellules dendritiques. Cet antigène est surexprimé dans 30% des cas environ [216,217]. Il est corrélé aux autres marqueurs de mauvais pronostic tel CD38, taux de LDH, stade Binet et représente un marqueur pronostique. L'expression de l'HLA-G pourrait favoriser l'échappement immunitaire des cellules tumorales mais également les infections chez les patients. Il a été récemment démontré que l'expression de HLA-G est corrélée à l'expression de son récepteur CD85j sur les cellules tumorales mais le rôle fonctionnel de cet axe paracrine potentiel n'a pas été étudié [91].

CD8 : l'expression ectopique de ce marqueur typique du lymphocyte T (tout comme le CD5) a été retrouvée à la très faible fréquence de 1.1% dans une série de 5523 patients du laboratoire allemand du München Leukemia Laboratory (MLL). L'expression du CD8 était associée dans un modèle multivarié à un délai avant traitement plus court [218].

6.4. Anomalies cytogénétiques

6.4.1. Anomalies récurrentes

Les multiples travaux réalisés dans les années 90 par l'équipe allemande de Döhner *et al.* ont permis de révéler les anomalies cytogénétiques récurrentes et leur pronostic dans la LLC [219]. L'analyse cytogénétique des clones de LLC a représenté un certain challenge pendant des années pour les biologistes du fait du très faible index mitotique des cellules tumorales sanguines [220]. Différents agents mitogènes ont été utilisés pour induire la division cellulaire : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), lipopolysaccharide (LPS), pokeweed mitogen (PKW), TPA + interleukine 2 (IL-2) ou plus récemment le CD40L [221]. Jusqu'en 2006, seulement 40% à 50% des caryotypes de LLC présentaient des anomalies clonales alors qu'elles étaient présentes dans 80% des cas si la FISH interphasique était utilisée [219]. En 2006, suite aux travaux préalables de Decker *et al.* sur le DSP30 (un oligo-CpG de type B activant le TLR9 des lymphocytes B) [222,223], l'équipe allemande de Dicker *et al.* du MLL a publié une technique de stimulation associant l'IL2 au DSP30 et permettant d'obtenir des mitoses dans 95% des cas [220].

La cytogénétique de LLC est réalisée sur sang périphérique stimulé par IL2 + DSP30. Le caryotype par cytogénétique conventionnelle est systématiquement associé à l'analyse FISH interphasique (ou applications PCR équivalentes de type QMPSF) [137,224,225]. Cet examen est recommandé avant l'initiation du traitement et permet de retrouver des anomalies clonales dans 80% des LLC étudiées. La classification pronostique de Döhner, basée sur les anomalies cytogénétiques del(13q), trisomie 12, del(11q) et del(17p), est toujours appliquée même si des précisions ont été apportées par les multiples travaux de génétiques ultérieurs.

6.4.1.1. Del(13)(q14)

La délétion interstitielle du bras long du chromosome 13 ou del(13)(q14) est l'anomalie la plus fréquente dans la LLC. Elle concerne 35% à 55% des patients [108,219]. Elle est associée au statut muté du locus IgVH. Lorsqu'elle est isolée, cette anomalie définit un groupe de patient de très bon pronostic [226,227]. La région délétée est variable et cible le

gène *DLEU2*. La région minimale systématiquement délétée dans ce gène code pour des micro-ARN (miR), les miR-15a et miR-16-1. Ces miRs régulent négativement, entre autre, l'expression de Bcl2 (voir plus loin), une protéine anti-apoptotique majeure [226]. L'évaluation du niveau d'expression de Bcl2 en cytométrie permet de prédire la présence de la cel(13)(14) [228].

La del(13q) peut être retrouvée à l'état bi-allélique dans 20% des cas environ mais cette conformation ne semble pas influencer le pronostic des patients [229].

Des analyses à haute résolution du génome par SNP-array ont permis de décrire 3 types de del(13)(q14) : type Ia, Ib, et type II. La délétion de type Ia, mono ou bi-allélique est la délétion minimale qui implique le plus souvent le locus miR-15a/miR-16-1 et représente 2/3 des del(13)(q14). La délétion de type Ib, légèrement plus grande, mono ou bi-allélique, implique toujours le locus miR-15a/miR-16-1, elle représente 1/3 des del(13)(q14). Enfin, la délétion de type II, encore plus large, presque toujours mono-allélique, élimine le locus miR-15a/miR-16-1 et le gène suppresseur de tumeur *Rb*. Cette délétion de type II concerne 14% des patients non traités et est associée à une maladie plus évolutive que les 2 types I [230].

6.4.1.2. Trisomie 12

La trisomie 12 concerne 11% à 16% des patients [108,219]. Cette anomalie est associée à des cas de LLC atypiques sur le plan cytologique et phénotypique (expression du FMC7 ou expression forte de l'Ig de surface fréquents) [231,232]. La trisomie 12 est associée à un pronostic défavorable et sa fréquence est plus élevée (36%) dans les cas de lymphomes lymphocytiques, une forme tumorale de LLC [233]. Les récentes données du séquençage à haut débit ont révélé que la trisomie 12 est également associée à une fréquence élevée de la mutation de *NOTCH1*. La présence de cette mutation permet de stratifier les patients porteurs d'une trisomie 12 en 2 groupes au pronostic significativement différent. La mutation de *NOTCH1* a un effet délétère sur la survie des patients [234–236].

La trisomie 12 est également associée à d'autres trisomies concernant les chromosomes 18 et 19. Les cas de triple trisomie 12, 18 et 19 ou de trisomie 12 associée à la translocation

t(14 ;19) impliquant le locus *IgH* et *BCL3* ont été associés à des cas de LLC switchées IgG avec réarrangement du gène *IGHV4-39* [108]. Enfin, des délétions du bras long du chromosome 14 ou del(14q) ont été récemment associées à la trisomie 12, à la mutation de *NOTCH1* et au statut IgVH non muté, identifiant un groupe pronostique péjoratif [237].

6.4.1.3. Del(11)(q22q23)

La délétion du bras long du chromosome 11 ou del(11)(q22q23) concerne 11% à 18% des patients [108,219]. La région minimale délétée située entre 11q22.3 et 11q23.1 (2 à 3 Mb) contient le gène suppresseur de tumeur *ATM* (« ataxia-telangiectasia mutated », voir le paragraphe 6.5.1 page 85). La protéine ATM est impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN en activant p53. Environ 1/3 des patients porteurs de la délétion d'*ATM* présente des mutations du second gène *ATM* situé sur l'allèle non délété [108]. Cette anomalie est associée à un mauvais pronostic et atteint des patients plus jeunes avec une présentation souvent tumorale, en particulier de localisations abdominales inhabituelles au cours de la LLC [226]. La délétion d'*ATM* est également un marqueur prédictif puisque ces LLC répondent faiblement aux agents alkylants en monothérapie alors que l'immunochimiothérapie de type FCR permet d'obtenir des taux de réponse satisfaisants [108]. Enfin, des délétions du gène *BIRC3* (« Baculoviral IAP Containing 3 », voir paragraphe 6.5.1 page 85), situé en 11q22.2 et souvent délété en même temps qu'*ATM*, a été proposé comme potentiellement responsable du mauvais pronostic de délétions 11q [238]. Les délétions de ce gène sont discutées en même temps que les mutations qui le concernent (voir plus loin).

6.4.1.4. Del(17)(p13)

La délétion du bras court du chromosome 17 est souvent totale mais la région minimale est située en 17p13.1. Cette anomalie concerne 3% à 7% des patients au diagnostic [108,219] mais sa fréquence augmente dans les cas réfractaires à la chimiothérapie [226]. Cette région contient le gène suppresseur de tumeur *TP53*. *TP53* est le « gardien du génome » en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire lorsque l'ADN est lésé et évite ainsi l'accumulation d'anomalies génétiques [108]. Environ 80% des cas de délétion mono-

allélique de *TP53* sont associés à des mutations sur le second allèle [226]. D'autre part, environ 5% des patients présentent des mutations mono-alléliques de *TP53* sans del(17p) [239]. Les altérations de *TP53* sont souvent associées à des caryotypes complexes (*i.e.* ≥ 3 anomalies) eux-mêmes de mauvais pronostic [240] même après une allogreffe [241]. La cytologie des LLC avec altérations de p53 est souvent atypique avec un contingent augmenté de prolymphocytes [242].

Dans tous les cas, toutes les altérations de *TP53* (délétion, mutation ou combinaison des 2) sont prédictives d'une résistance aux traitements à base de fludarabine, même associée au cyclophosphamide et au rituximab. Ces altérations prédisent également une survie très courte (médiane de survie de 47 mois pour la del(17p) par exemple [243]) et représentent une indication d'allogreffe chez les patients les plus jeunes [137].

6.4.1.5. Del(6)(q21)

Environ 6% des patients sont porteurs de cette anomalie à l'état isolé, elle est plus fréquemment rencontrée au sein de caryotypes complexes [219,244]. Elle est associée à une cytologie atypique, l'expression plus fréquente du CD38 et à une lymphocytose plus élevée. Cette anomalie est de pronostic intermédiaire comme la trisomie 12 et les autres cytogénétiques sans del(11), del(17) et non complexes [244].

6.4.1.6. Anomalies moins fréquentes :

D'autres anomalies récurrentes mais peu fréquentes (<5%) ont été décrites dans la LLC. On peut citer la duplication 8q24 et la duplication 3q26 réalisant des trisomies partielles [219]. Ces anomalies impliquent respectivement les loci de l'oncogène *MYC* et du gène *PIK3CA* [245]. Le gène *PIK3CA* code pour la sous-unité alpha de la PI3K (sous unité p110 qui porte l'activité catalytique de la PI3K) [245]. Des délétions du bras court du chromosome 8 peuvent également être décrites. Ces 3 anomalies semblent favoriser l'évolution du clone et sont associées à un suivi avant premier traitement plus court [245]. La délétion intersticielle du bras long du chromosome 14, associée dans 1/3 des cas à une trisomie 12, entre

également dans cette catégorie d'évènements peu fréquent associés aux autres facteurs pronostiques péjoratifs (statut IgVH non muté, mutations *NOTCH1*) [237].

6.4.1.7. Translocations

La fréquence des translocations impliquant les loci des gènes des immunoglobulines est évaluée entre 4% et 7% [219,246]. Le locus IgH est situé en 14q32 et est bien plus fréquemment impliqué que le locus de la chaîne légère kappa (22q11) ou lambda (2p11) [108]. Ces translocations concernent essentiellement les gènes *BCL2* (18q21) et *BCL3* (19q13) [246,247]. La translocation impliquant *BCL11A* (2p16) est associée à une cytologie atypique et un statut IgVH non muté [248]. Ces anomalies ont été associées à un pronostic péjoratif [246,249]. Le gène partenaire semble nuancer le pronostic, une étude française récente a identifié que les translocations impliquant *BCL2* sont plus indolentes que celles impliquant *BCL3* [247]. De rares cas de translocation impliquant le gène *CCND1* (11q13), typique des lymphomes à cellules du manteau, ont été décrits. Ces cas présentaient fréquemment des atypies cellulaires et une expression positive du FMC7 [250]. Enfin, la prévalence de réarrangement impliquant *c-MYC* (8q24), identique à celle retrouvée dans les lymphomes de Burkitt, est <1%. Elles sont souvent associées à la del(17p), la del(11q) ou à un caryotype complexe. Le bilan pronostique de cette accumulation d'évènement est fortement péjorative [251].

Les translocations n'impliquant pas le locus IgH sont également rares dans la LLC et souvent associées à des caryotypes complexes. Dans ces translocations, le bras long du chromosome 13 est souvent remanié [252].

6.4.1.8. Les cytogénétiques complexes et évolution clonale

La complexité du caryotype dans la LLC est définie par ≥ 3 anomalies. Elle est associée à la del(17p) ou la del(11q), le statut IgVH non muté ou l'expression du CD38 [108]. Un caryotype complexe est également plus fréquemment retrouvé chez les patients ayant reçu plusieurs lignes de traitement. Globalement, un caryotype complexe est de mauvais pronostic et peut prédire une mauvaise réponse au traitement [108,253].

L'évolution clonale est définie par l'apparition de nouvelles anomalies cytogénétiques en cours d'évolution. Cette évolution clonale a été plus fréquemment retrouvée dans les cas de LLC avec des marqueurs de mauvais pronostic tels que l'expression de ZAP70 ou le statut non muté du locus IgVH même si toutes les séries ne retrouvent pas cette association [254]. La fréquence de l'évolution clonale est d'environ 15% si seule la cytogénétique conventionnelle est réalisée et 30% si l'analyse par FISH est appliquée [254]. Elle est plus fréquemment rencontrée chez les patients qui ont été traités par chimiothérapie [255]. Toutefois, le profil des anomalies acquises est identique entre les patients préalablement traités ou non ce qui est un élément de preuve pour l'hypothèse de la préexistence des anomalies à très faible pourcentage dans la masse tumorale initiale [255]. Le traitement consiste donc simplement en une pression de sélection qui permettra aux clones les plus résistants (délétion de p53, ...) d'être majoritaires à la rechute [255]. Globalement, l'impact sur le pronostic de l'évolution clonale est plutôt péjoratif, et révélateur d'une instabilité génomique, mais n'est pas toujours indépendant des autres marqueurs pronostiques classiques selon les séries [254].

En 2011, la découverte par SNP-array du chromothripsis a défini une nouvelle forme de complexité initialement décrite dans la LLC puis retrouvée dans 2% à 3% des cancers et 25% des tumeurs osseuses [108,256]. Il s'agit d'un évènement cataclysmique survenant sur 1 chromosome et en 1 division cellulaire. Le chromosome est disloqué puis réarrangé de manière aléatoire dans une tentative de la cellule pour sauver ce matériel génétique (Figure 18) [256]. Une étude récente sur les patients inclus dans l'essai clinique CLL8 a retrouvé la présence d'un chromothripsis dans 5% des cas. Les chromosomes atteints étaient variables. Le pronostic était péjoratif en analyse univariée mais cet évènement était fortement associé au statut IgVH non muté, à la del(17p) et la del(11q) [257].

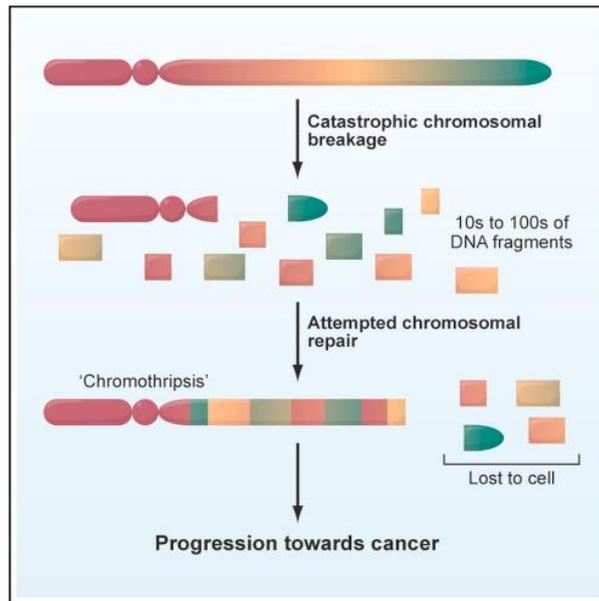


Figure 18 : Schéma représentant le déroulement du chromothripsis.

Adapté d'après Stephens *et al.*, Cell, 2011 [256].

6.4.1. Apports des techniques de haute résolution CGH-array et SNP-array

Les techniques de cytogénétiques modernes sur puces ADN (« array »), telles que l'hybridation génomique comparative (CGH-array) et l'analyse des « single nucleotide polymorphism » (SNP-array), sont des techniques d'analyses du génome de haute résolution [258]. Elles présentent l'avantage de s'affranchir des étapes de cultures stimulées préalables car elles utilisent l'ADN tumoral. Les premières expériences de CGH appliquées à la LLC datent du début des années 90 [259] mais la technique a évolué avec l'utilisation de puces recouvertes d'oligonucléotides (CGH-array). La CGH-array permet de détecter des variations de nombre de copies de régions chromosomiques (CNV), qu'il s'agisse de gains ou de pertes. Les pertes de matériels constituent des pertes d'hétérozygoties (« loss of heterozygotie » ou LOH). Certaines LOH sont dites « neutres sur le nombre de copies » (« copy neutral LOH » ou cnLOH) [260]. Ces cnLOH correspondent à la perte d'un chromosome (complète ou partielle) qui est remplacée par la région correspondante dupliquée du second chromosome réalisant ainsi une disomie uniparentale (« uniparental disomy » ou UPD) complète ou partielle (pUPD) [261]. La CGH-array ne permet pas de mettre en évidence les réarrangements équilibrés dont les cnLOH font partie contrairement à la SNP-array, plus récente et beaucoup

résolutive, initialement développée pour le génotypage (identification pour chaque SNP du génotype « AA », « AB » ou « BB ») [261].

Le nombre d'anomalies récurrentes révélées par ces technologies est donc plus élevé que celles accessibles par cytogénétique conventionnelle et FISH interphasique [226]. Ces anomalies supplémentaires, récemment revues dans la littérature [258] sont des gains en 2p ou 20q et des pertes dans les régions 8p, 18q et 22q. Les pertes en 22q11 sont liées au réarrangement du locus *JGL* [262]. Les gains en 2p ont été associés à la surexpression de l'oncogène *MYCN* [263].

6.4.1.1. Télomères et télomérase

Les télomères sont constitués de courtes séquences d'ADN répétées en tandem situées sur chaque extrémité des chromosomes. La séquence télomérique répétée (TTAGGG)_n est conservée dans le phylum des vertébrés [264] et s'étend chez l'homme sur 10 à 15kb [265]. Les très nombreuses répétitions de cette séquence particulière favorise la formation de structures secondaires de l'ADN appelées D-loop et T-loop qui stabilisent la structure [266]. Ces régions télomériques protègent les chromosomes de recombinaison illégitimes et de la dégradation. A chaque division cellulaire, un peu de matériel télomérique est perdu (50 à 200pb) [265]. Lorsque la longueur des télomères devient critique (la « Hayflick limit ») [267], une instabilité génomique est observée et déclenche la mort cellulaire. Dans certains cas, des fusions chromosomiques illégitimes se produisent avant que la mort cellulaire ne survienne et sont à l'origine d'aberrations chromosomiques et de cancers [265].

Les lignées cellulaires sont des cellules ayant pu réacquérir *in vitro* la capacité de stabiliser voire de rallonger leurs télomères [266]. Les tumeurs malignes peuvent également avoir un avantage à régénérer leurs télomères pour stabiliser leur processus prolifératif. Ainsi, le raccourcissement des télomères peut favoriser l'apparition de tumeurs mais les tumeurs déjà constituées peuvent également avoir besoin de stabiliser ou rallonger leurs télomères pour continuer à proliférer [265].

La régénération des télomères est sous la dépendance de la reverse transcriptase hTERT (human Telomere Reverse Transcriptase) qui est capable de synthétiser de l'ADN *de novo* à partir d'un brin matrice d'ARN nommé TER (telomere RNA) [265]. Un processus alternatif d'élongation des télomères (ALT) indépendant de la télomérase a également été décrit [265]. La télomérase hTERT présente enfin des activités indépendantes de sa fonction d'élongation des télomères, en régulant l'expression de gènes (Cycline D1, c-MYC, IL6, IL8, vimentine, ...), la fonction mitochondriale ou encore en produisant des ARNs double brin (dsRNA), qui peuvent au final promouvoir la croissance tumorale [267].

L'étude des télomères est déjà ancienne dans la LLC mais les données récentes apportent un nouvel éclairage. Les cellules de LLC présentent initialement un déficit dans la fonction de maintenance des télomères puisque leur raccourcissement est corrélé à l'évolution de la LLC. La télomérase n'est réactivée que dans une phase terminale de l'évolution [266]. Le raccourcissement des télomères est fortement lié au statut IgVH non muté et à la présence d'une trisomie 12, del(11q) ou del(17p) et est associé à un mauvais pronostic [268,269]. La longueur des télomères est stable au cours de l'évolution de la LLC et n'est pas affectée par le traitement, ceci suggère donc que la longueur des télomères reflète celle de la cellule d'origine du clone B [270]. Des données récentes de séquençage haut-débit ont retrouvé une association entre les mutations récurrentes de *POT1* (« Protein Of Telomere 1 »), présente chez 3,5% des patients, et la présence d'anomalies télomériques et chromosomiques dans la LLC [271]. Un SNP situé sur le gène *POT1* a également été identifié comme marqueur de susceptibilité génétique pour le développement d'une LLC [54]. Les autres mutations récurrentes (voir plus loin) des gènes *NOTCH1*, *SF3B1* et *TP53* sont également plus fréquentes dans les cas de LLC avec télomères courts [270].

Le niveau d'expression de la télomérase est supérieur dans les LLC au statut IgVH non muté par rapport aux LLC mutées. Même si le signal du BCR peut induire l'expression de hTERT dans les 2 sous-groupes de LLC, le BCR des LLC non mutées est le plus efficace dans cette fonction [272]. La reverse transcriptase hTERT présente également une régulation post-transcriptionnelle importante dans la LLC. Plusieurs variants d'épissages coexistent et seul l'ARNm de grande taille code pour une protéine fonctionnelle [273]. Le niveau

d'expression de tous les variants d'épissage est corrélé à celui du variant de grande taille. Ce niveau d'expression est positivement corrélé au statut IgVH non muté et à l'agressivité de la maladie [273]. La télomérase peut enfin participer à la résistance à la fludarabine dans les LLC agressives à cytogénétique péjorative selon un mode d'action indépendant de son activité de reverse transcriptase [274]. Cette résistance est médiée par la fixation de la protéine Ku80, un acteur majeur du mécanisme de réparation des lésions de l'ADN induite par la fludarabine, sur l'ARN matrice hTR. L'inhibition de sa fixation par compétition avec un oligo synthétique rétabli la sensibilité à l'apoptose chimio-induite [274].

6.5. Les mutations et dérégulation d'expression de gènes

6.5.1. Les mutations récurrentes dans la LLC

Le nombre de mutations récurrentes retrouvées dans la LLC a considérablement évolué en quelques années par l'application des techniques de séquençage haut-débit à cette pathologie. Des études pangénomiques puis des approches de séquençage ciblé dans des explorations longitudinales ont permis d'établir la fréquence de ces mutations, leur association à la progression ou la résistance au traitement, et d'aborder l'architecture intratumorale de la LLC.

Le travail mené par Landau *et al.* [275], reflète la plasticité de la masse tumorale des patients atteints de LLC. Dans un premier temps, un panel de mutations récurrentes a été identifié. Ensuite, il a été possible de discerner des mutations clonales, présentes dans plus de 80% du clone ou « driver-mutation » (*i.e.* mutation de *MYD88*) et des mutations sous-clonales, présentes dans une minorité des cellules clonales (*i.e.* mutations de *TP53*). Concernant les mutations de *TP53*, une étude longitudinale de quelques patients de cette série a montré que ces mutations préexistaient au diagnostic, puis la population *TP53^{mut}* a été progressivement sélectionnée par les traitements cytotoxiques successifs pour aboutir à une masse tumorale réfractaire à la chimiothérapie. Cette observation a été reproduite par d'autres équipes [276]. Enfin, des mutations sous-clonales ont pu être mises en évidence

dans près de 67% des patients sur une série de 178 patients avec marqueurs de mauvais pronostic non traités (*i.e.* IgHV non muté, réarrangement *IGHV3-21*, 17p-, 11q- ou +12) [277].

Les paragraphes suivants reprennent les principaux gènes mutés dans la LLC avec leur fréquence et leur signification pronostique et fonctionnelle lorsqu'elle est établie.

TP53 : la protéine p53 codée par ce gène, localisé sur le chromosome 17p13.1, est un acteur essentiel à la réponse aux dommages touchant l'ADN. Cette protéine, souvent nommée « gardien du génome » permet, comme décrit précédemment, d'arrêter le cycle cellulaire en cas de lésion de l'ADN et permet de déclencher l'apoptose. Les chimiothérapies à base d'agents alkylants, entre autres, fonctionnent sur ce principe et leur efficacité est tributaire de la fonction de p53. Les mutations de ce gène sont associées dans plus de 80% des cas à la délétion de l'autre allèle (del(17p)), aboutissant ainsi à une atteinte bi-allélique du gène [278]. Les mutations de *TP53* peuvent également ne pas être associées à la délétion 17p mais la valeur prédictive de résistance à la fludarabine reste identique [239,279–286]. L'analyse des données de l'essai clinique prospectif allemand CLL8 publiée en 2014 a montré que les mutations de *TP53* étaient un marqueur indépendant de la rechute (Hazard Ratio=2,123, 95%CI : 1,400 – 3,218, p<0.001) et de mauvais pronostic sur la survie après traitement par immunochimiothérapie (FCR) en 1^{ère} ligne (Hazard Ratio=3,014, 95%CI : 1,889 – 4,808, p<0,001) [287] .

Au final, les altérations de TP53 concernent 10% à 15% des patients au diagnostic (5% à 10% de délétions + 5% environ de mutations seules). La recherche des mutations de TP53 avant la mise en place d'un traitement à base de fludarabine est actuellement recommandée en ciblant au minimum les exons 4 à 9 du gène [288]. La question de la signification clinique de petits clones, <20% de la masse tumorale totale, a été récemment posée. Ces faibles charges mutationnelles sont inaccessibles au séquençage Sanger et le séquençage de nouvelle génération est la technique de choix compte-tenu de la taille et de la diversité des mutations du gène *TP53*. Les résultats actuels font débat, dans certaines séries, la détection de sous-clone était péjorative sur le pronostic des patients [282] alors que l'effet délétère

n'a été retrouvé que pour les charges mutationnelles >20% dans une série allemande du MLL de presque 4000 patients [289]. Sur le plan pratique, les altérations de *TP53* sont à l'origine de 50% environ des cas de LLC réfractaires à la fludarabine, la seconde moitié nécessite donc toujours des investigations [276].

ATM : la protéine ATM (« Ataxia Telangiectasia Mutated »), est également impliquée dans la réparation des altérations de l'ADN. La prédisposition au cancer chez les patients atteints d'ataxie-télangiectasie a été mise en évidence 4 années avant la découverte du gène *ATM* en 1995 [290]. En physiologie, ATM active p53 par phosphorylation en réponse à des cassures doubles brin de l'ADN [291]. Les altérations génétiques d'*ATM* sont associées à un mauvais pronostic de patients atteints de LLC. Comme exposé plus haut, *ATM* peut être invalidé par délétion du locus du gène situé en 11q22.3 mais ce gène est également concerné par des mutations.

A l'inverse de *TP53*, les délétions 11q sont moins fréquemment associées à des mutations du second allèle d'*ATM* (30% à 50% des cas [292–296]). Les mutations mono-alléliques sans délétions présentent une mauvaise réponse aux dommages de l'ADN et sont associées un mauvais pronostic [292]. A l'inverse, la délétion 11q sans mutation du second allèle présente une réponse conservée aux altérations de l'ADN, la détection d'une mutation *ATM* sur le second allèle identifie donc un sous-groupe de plus mauvais pronostic au sein des patients del(11q) [293,294]. Ce sous-groupe présenterait le même pronostic que les patients porteurs d'anomalies de *TP53* [296]

La fréquence des mutations d'*ATM* dans la LLC est d'environ 10% dont la moitié seulement est associée à la délétion, soit une fréquence cumulée des anomalies d'*ATM* estimable entre 15% et 20% [292–294]. La structure du gène *ATM* est très complexe, les mutations répertoriées sur la base COSMIC sont réparties sur tout le gène, et leur exploration n'est pas envisageable par séquençage Sanger. Récemment, le gène *BIRC3*, situé juste 6 Mb en amont d'*ATM* en 11q22.2 a été impliqué dans la résistance à la fludarabine des clones de LLC.

BIRC3 : le gène *BIRC3* (« Baculoviral IAP Containing 3 », anciennement nommé c-IAP2 : « cellular Inhibitor of Apoptosis ») a été révélé dans la LLC par NGS. Les mutations de *BIRC3* ont été initialement retrouvées dans 24% des cas de LLC réfractaires et étaient mutuellement exclusives des altérations de *TP53* [297]. Sur le plan fonctionnel, BIRC3 est une E3 ubiquitine ligase et un régulateur négatif de la voie d'activation non canonique de NF-κB. BIRC3 appartient à la famille « IAP » et à l'état basal, BIRC3 régule négativement la protéine MAP3K14 (anciennement NIK) en catalysant son ubiquitination et sa dégradation [298]. Lorsque la voie alterne de NF-κB est activée (signal CD40L par exemple), BIRC3 est recrutée au niveau du récepteur, se dimérise avec son homologue BIRC2 (c-IAP1) et tous deux catalysent leur propre dégradation ubiquitination-dépendante. MAP3K14 n'est alors plus dégradée et active la voie alterne de NF-κB [298].

Les mutations décrites de *BIRC3* sont des mutations perte de fonction et ont toutes été décrites à l'état hétérozygote [299]. Elles surviennent dans le domaine RING qui est porteur de l'activité d'ubiquitination. Les protéines BIRC3 mutantes sont des dominants négatifs induisant une activation constitutive de la voie alterne de NF-κB dans les cellules tumorales même à l'état hétérozygote [299]. De manière intéressante, la plupart des délétions du locus sont des délétions partielles qui emportent la région C-terminale fonctionnelle de la protéine. Mutations et délétions ont la même conséquence : une protéine BIRC3 tronquée est exprimée et joue un rôle de dominant négatif associé à une hyper-activation de la voie alterne de NF-κB [238].

Dans la LLC, les mutations de BIRC3 sont très rares (+/-1%) alors que les délétions sont plus fréquentes (3%) et peuvent parfois être associées. Au total, les altérations de BIRC3 concernent <5% des patients non traités et augmentent en cours d'évolution et après traitement [238].

Etant donné la grande proximité des gènes *BIRC3* et *ATM* sur le génome, il a été émis l'hypothèse que *BIRC3* pourrait être le principal gène responsable du pronostic sombre des patients porteurs de délétions 11(q22q23) compte-tenu de la faible fréquence des altérations bi-alléliques d'*ATM* chez ces patients et de l'existence de délétions interstitielles

ne touchant que *BIRC3* et épargnant *ATM* [295]. Les résultats publiés en rapport avec cette hypothèse sont discordants. Dans la publication initiale de D. Rossi *et al.*, les patients porteurs d'une altération de *BIRC3* (mutation/délétion) présentaient une survie globale identique à celle des patients porteurs d'une altération de *TP53*. La présence d'une altération de *BIRC3* était un marqueur pronostique indépendant et équivalent à p53 en analyse multivariée alors que les délétions 11q ne l'étaient pas [238]. Une étude ultérieure menée en Angleterre analysant une série de patients ayant été inclus dans un essai clinique (CLL4), n'a pas retrouvé le même impact des altérations de *BIRC3* sur la survie [296]. Dans cette étude, il a été mis en évidence que les altérations de *BIRC3* étaient associées à une délétion d'*ATM* dans 100% des cas et représentaient 83% des patients avec délétion d'*ATM*. Ensuite, parmi les patients avec altération de *BIRC3*, 40% environ étaient porteurs de mutations d'*ATM* et donc coïncidaient avec une altération bi-allélique d'*ATM*. Les analyses de survie globale en analyse multivariée ont révélé que les patients avec altération bi-allélique d'*ATM* avaient la même espérance de vie que ceux porteurs d'altérations de *TP53*, alors que les patients porteurs d'altérations de *BIRC3* avec altération mono-allélique d'*ATM* avaient la même survie globale que les patients sans anomalies de *TP53*. L'analyse de la survie sans progression a tout de même retrouvé un effet défavorable des altérations de *BIRC3* mais cet effet était de niveau intermédiaire par rapport aux cas avec altérations bi-alléliques d'*ATM*.

En conclusion, si l'implication de *BIRC3* comme gène responsable d'une progression modérément plus rapide des patients avec del(11q) semble évidente, la valeur prédictive de la réponse au traitement des altérations de ce gène n'a pas été validée.

SF3B1 : le gène *SF3B1* (« Splicing Factor 3b subunit 1 ») est localisé sur le chromosome 2q33.1, code pour une protéine du splicéosome. Le splicéosome est une machinerie complexe régulant l'épissage des ARNm. Des mutations récurrentes de ce gène ont été décrites dans la LLC touchant essentiellement les codons 662, 666 et surtout 700, la mutation K700E étant la plus fréquente [278]. Il s'agit de mutations faux-sens aboutissant à la perte de fonction de *SF3B1*. Les clones porteurs de ces mutations montrent des anomalies d'épissage de certains ARN [300].

Les mutations de *SF3B1* concernent environ 10% à 15% des patients. La fréquence est plus basse au diagnostic et augmente en cours d'évolution ou après traitement [108,275]. Le gène *SF3B1* a été retrouvé muté dans près de 44% des cas de LLC présentant le BCR stéréotypé du subset#2 (*i.e.* réarrangement *IGHV3-21* canonique, voir paragraphe dédié) [301]. Ces mutations sont également plus fréquentes dans les LLC avec del(11q) [302].

Les mutations de *SF3B1* sont associées à un pronostic intermédiaire sur la survie sans traitement et la survie globale. Cet impact pronostique a été confirmé sur plusieurs études indépendantes de grande ampleur [281,300,302–305]. L'analyse des données de l'essai clinique prospectif allemand CLL8 identifie les mutations de *SF3B1* comme marqueur indépendant de prédiction d'une rechute après traitement par immunochimiothérapie (FCR) en 1^{ère} ligne (Hazard Ratio = 1,346, IC95% : 1,037 – 1,747, p=0,026) [287].

NOTCH1 : le gène *NOTCH1*, situé sur le locus 9q34.3, code pour un récepteur membranaire de la famille *NOTCH* [108]. Ces récepteurs possèdent un domaine extramembranaire composé de plusieurs motifs répétés du récepteur EGF (Epidermal Growth Factor-like). Les ligands des récepteurs *NOTCH1* appartiennent à 2 familles de molécules : Jagged et Delta [306]. Lorsque le ligand est reconnu, le domaine intracytoplasmique est clivé et libéré dans le cytoplasme (*NOTCH* intra-cellular Domain ou NICD). Le clivage de NICD fait intervenir la γ -sécrétase pour laquelle il existe des inhibiteurs pharmacologiques. Ce fragment NICD rejoint alors le noyau où il joue le rôle de facteur de transcription [306]. Le signal *NOTCH1* augmente la survie cellulaire et favorise la résistance à l'apoptose. Le signal *NOTCH1* peut moduler le signal NF- κ B [307], l'expression de molécules d'adhésion (CD11c, CD49d), et *NOTCH1* est un gène cible de p53 [107]. Les cellules de LLC expriment les ligands Jagged1 et 2, suggérant une possible stimulation autocrine ou paracrine [306].

La mutation de *NOTCH1* retrouvée dans la LLC correspond dans 75% à 80% des cas à une délétion de 2 bases de l'exon 34 codant pour le domaine PEST de la protéine : *NOTCH1* c.7544_7545delCT p.P2515fs*4 [308]. Cette mutation cause un décalage du cadre de lecture et génère un codon stop prématuré. Le domaine PEST est le domaine de régulation du NICD.

Le fragment NICD est dégradé par ubiquitination sur le domaine PEST et dégradation par le protéasome. La mutation correspond donc à une mutation gain de fonction par la perte du domaine de régulation. *NOTCH1* est également muté dans les LAL-T, ces mutations participent au développement de la maladie [309,310] mais impacteraient peu le pronostic selon une méta-analyse récente [311]. Le profil de mutation dans les LAL-T est différent puisque elles surviennent majoritairement dans les domaines de dimérisation N-terminal ou C-terminal des régions extra-cytoplasmique et intra-cytoplasmique [312].

La fréquence des mutations de *NOTCH1* dans la LLC a été initialement évaluée aux environs de 10% mais de récentes séries publiées de patients au stade précoce de la maladie retrouve des fréquences plus faibles aux alentours de 4% à 5% [108,305].

Globalement la mutation de *NOTCH1* dans la LLC est associée à un mauvais pronostic confirmé sur plusieurs séries indépendantes [281,302,305,313–315]. La mutation *NOTCH1* a été associée à la trisomie 12 [234,236,316] et permet d'identifier chez ces patients un sous-groupe de plus mauvais pronostic [234,235]. La mutation de *NOTCH1* a également été associée à un plus grand risque de transformation (syndrome de Richter) [313,317–319]. Enfin, l'analyse des données de l'essai prospectif allemand CLL8 semble identifier une absence de bénéfice du rituximab (dans l'association RFC) par rapport la double association FC chez les patients porteur d'une mutation de *NOTCH1* [287].

FBXW7 : « F-Box And WD Repeat Domain Containing 7 » est une E3 ubiquitine ligase dont le gène est situé sur le locus 4q31.3. Il s'agit de la protéine qui catalyse l'ubiquitination de *NOTCH1* sur son domaine PEST et déclenche ainsi sa dégradation. C'est un régulateur négatif de *NOTCH1* et de *MYC* [320]. Les mutations de *FBXW7* correspondent à de mutations avec perte de fonction et seraient associées à une potentialisation du signal de la voie *NOTCH1*. Ces mutations sont aussi présentes dans les LAL-T [310].

Les mutations de *FBXW7* ont été retrouvées à très faible fréquence dans la LLC par rapport à celles de *NOTCH1* (2% à 3%) [302]. A ce titre et parallèlement à ce qui a été décrit dans le LAL-T, leur impact pronostique ou fonctionnel dans cette pathologie est associé à celui de mutations de *NOTCH1* [300,302,316].

MYD88 : le gène de « Myeloid Differentiation Primary Response 88 » est situé en 3p22.2. Les mutations activatrice de ce gène (la mutation L265P en particulier) ont été décrite initialement dans près de 90% des MW et certains ZML souvent associés à la sécrétion d'une IgM monoclonale [321–323]. Le gène *MYD88* est concerné par des mutations gain de fonction. Il code pour une protéine adaptatrice impliquée dans la transduction du signal des TLRs [324]. Les mutations de *MYD88* sont associées à un signal NF-κB constitutif.

La fréquence des mutations de *MYD88* dans la LLC est faible et n'excède pas 5% [275,281,302,305,325,326]. Les mutations de *MYD88* sont associées à des cas de LLC de bon pronostic avec statut IgVH muté et del(13q) isolée [281,302], elle serait plus fréquente chez les patients plus jeunes [325]. Les mutations de *MYD88* présentent la particularité d'être des mutations clonales retrouvées dans la totalité de la masse tumorale [275].

XPO1 : ce gène code pour l'exportine 1 et se trouve sur le locus 2p15. Il s'agit d'une nucléoporine qui régule le trafic de plusieurs protéines entre le cytosol et le noyau. Les mutations de *XPO1* sont rares (2% à 3%) et il n'est actuellement pas décrit de valeur pronostique associée [234,302,326]. Elles pourraient cependant représenter un marqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs de l'exportine 1 récemment testés *in vitro* [327].

KLHL6 : ce gène code pour la protéine « Kelch-Like Family Member 6 » et se trouve sur le locus 3q27.3. La famille des protéines KLHL est impliquée dans la régulation de l'ubiquitination d'autres protéines en s'associant en particulier à l'E3 ubiquitine ligase Cullin-3 [328]. La fréquence de cette mutation est faible dans la LLC et associée à un profil de bon pronostic (IgVH muté) comme les mutations de *MYD88* [326].

POT1 : ce gène code pour la « Proteine Of Telomeres 1 » et est localisé en 7q31.33. Cette protéine est impliquée dans la protection des télomères contre l'érosion progressive. Ce gène est muté dans 3,5% des cas de LLC et est associé à des anomalies de structure des télomères. La fréquence des mutations atteint 9% dans le sous-groupe des LLC non mutées [271]. Ce gène est globalement surexprimé dans la LLC par rapport aux lymphocytes B normaux [269].

SAMHD1 : ce gène code pour la protéine « Steril Alpha Motif and Histidin-aspartic Domain 1 » et est localisé en 20q11.23. L'implication de ce gène dans la LLC est récente. Elle a été recherchée suite à l'observation d'un cas de LLC chez un jeune patient de 24 ans atteint du syndrome d'Aicardi-Goutières. Ce syndrome est dû à une mutation constitutionnelle du gène *SAMHD1* et est caractérisé par une encéphalopathie rappelant celles liées à des infections intra-utérines (calcifications intracrâniennes) et associée à un lupus érythémateux disséminé avec hyperproduction d'IFN de type I [329]. La protéine SAMHD1 est une deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase qui limite la réplication du virus VIH-1 dans les lymphocytes T CD4+ non activés en dégradant le pool de dNTP nécessaires à la reverse transcription du génome viral [330].

La recherche de mutations de *SAMHD1* dans une série de patients protocolaires atteints de LLC a révélé que 11% des patients réfractaires ou en rechute présentaient une mutation de ce gène [330]. Les mutations de *SAMHD1* ont pour conséquence une perte d'expression de la protéine. Ces données tendent à impliquer SAMHD1 dans le développement et la progression de la LLC.

6.5.2. *Dérégulation des microARN (miRNA)*

Plusieurs microARNs sont dérégulés dans les cellules de LLC et ont été intensément étudiés. Cependant, les variations d'expression au cours de la maladie et les variations liées à la méthode d'étude employée ont limité leur développement en tant que marqueurs pronostiques [138]. Brièvement, les miRNAs chez l'homme sont des ARN simple brin (ssRNA) de 22 nucléotides environ qui régulent négativement, par appariement complémentaire, l'expression de gènes en induisant la dégradation de leur ARNm ou en stoppant sa traduction. Près de 250 gènes codant pour des miRNAs sont connus chez les mammifères, certains sont des gènes indépendants alors que d'autres miRNAs sont codés dans les introns de gènes codant pour des protéines (les « mirtrons »), orientés dans le même sens que le gène principal et composant ainsi une « unité » transcriptionnelle [331]. Le produit brut de transcription est un « pri-miRNA » avec une structure secondaire complexe (motifs en épingle, boucles) et pris en charge dans le noyau par un « complexe

processeur » composé entre autres des protéines Drosha et Pasha. Ce complexe clive certaines régions du pri-miRNA et simplifie sa structure secondaire. Le transcrit est alors un « pré-miRNA » déplacé vers le cytosol par l'exportine 5. Le pré-miRNA est alors pris en charge par le complexe Dicer qui va simplifier encore par clivage la structure secondaire du pré-miRNA et relarguer le miRNA fonctionnel associé à une séquence RNA complémentaire notée « miRNA* ». Le duplex miRNA :miRNA* est ensuite associé au complexe RISC, la chaîne miRNA* est relarguée, et la structure nouvellement formée peut alors interagir spécifiquement sur les ARNm cibles [331].

La dérégulation des miRNAs est observée dans la plupart des cancers, hématopoïétiques ou non, ainsi que dans des processus non tumoraux (diabète, maladies cardiovasculaires, ...) [332–335]. Certains miRNAs contrôlant le processus tumoral, ou « oncomiRs », pourraient représenter des cibles thérapeutiques pour le traitement de certains lymphomes [336]. Les stratégies ciblant les miRNA surexprimés consistent soit en l'administration d'oligonucléotides anti-sens ou « antagomiRs » ou encore des ARNs synthétiques capables de séquestrer les miRNA ou « miRNA sponges » [331].

La dérégulation des miRNAs a été extensivement étudiée dans la LLC. On reconnaît actuellement 13 miRNAs qui sont différemment exprimés entre les LLC mutées/ZAP- et les LLC non mutées/ZAP+ (*i.e.* miR-15a, miR-195, miR-221, miR-23b, miR-155, miR-223, miR29a-2, miR-24-1, miR-29b-2, miR-146, miR-16-1, miR-16-2, and miR-29c) [138,331]. Au final, le profil d'expression de certains miRNAs est corrélé à la physiopathologie et associé au pronostic de la LLC (miR-21, miR-29, miR-34a, miR-181b, miR-223) [138,331].

Ces microARNs sont également retrouvés « libres » dans le plasma des patients. Ils circulent au sein des microparticules sécrétées par les cellules clonales. Par exemple, une concentration élevée du miR-155 dans le plasma est associée aux LLC réfractaires [337]. La sécrétion des microARNs dans les cancers solides peut agir sur le microenvironnement tumoral. En particulier, ils peuvent activer les cellules immunitaires exprimant le TLR8 et favoriser une réaction inflammatoire locale [338].

Les principaux miRNAs impliqués dans la physiopathologie de la LLC sont repris ici avec les détails fonctionnels associés.

miR-15/miR-16-1 : ces 2 miRNAs sont codés dans la région délétée située en 13q14 impliquée dans près de 50% des cas de LLC [339]. Ces miRNAs régulent les protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Mcl1, la cycline D1 et Wnt3A [340]. Des modèles murins ont validés la perte de miR-15 et miR-16-1 dans le développement de clone B de type LLC (souris KO) [331]. Des mutations germinales de miR-15 et miR-16-1 ont été retrouvées chez 2% des cas de LLC [331].

miR-29 : ce miRNA joue le rôle de suppresseur de tumeur en régulant négativement l'expression de divers oncogènes dont TCL1, MCL1 ou CDK2 [331]. Le miR-29 est sous-exprimé dans les LLC progressives et a été testé en tant que marqueur pronostique [138].

miR-181b : ce miRNA est également sous exprimé dans les LLC progressives et sert de marqueur pronostique [331]. Sa sous-expression est également associée à la chimiorésistance [138]. Le miR-181b présente un rôle fonctionnel complexe en régulant la voie NF- κ B, Bcl2, TCL1 et le cycle cellulaire entre autre. Son expression est sous la dépendance de STAT3 [138,341].

miR-21 : ce miRNA est surexprimé au cours de l'évolution de la LLC et peut également servir de marqueur pronostique en association avec la sous-expression du miR-181b ou avec la FISH p53 (score « 21FK ») [138,342]. Les cibles de miR-21 sont multiples, il régule négativement p53 et positivement le signal NF- κ B [343].

miR-34a : la famille miR34 sont des gènes cible de p53. Leur expression est fortement diminuée lorsque *TP53* est délété ou dans les LLC chimiorésistantes [138,331]. Ils régulent positivement l'apoptose et la sénescence cellulaire en réponse à l'activation de p53 [331].

miR-223 : ce miRNA est sous-exprimé dans les LLC à statut IgVH non muté et cette sous-expression est associée à une maladie évolutive [138,331]. Plusieurs cibles sont connues (C/EBP β , E2F1, FOXO1, NFI-A) et globalement régulent la voie NF- κ B entre autre [344].

miR-150 et miR-155 : ces 2 miRNAs ont été associés au statut IgVH non muté. La surexpression conjointe de miR-21 et miR-155 a été associée à l'activation de la voie PI3K [345]. Le miR-150 est moins exprimé dans les LLC non mutées/ZAP+ que dans les LLC mutées/ZAP-. Il régule négativement l'expression des protéines GAB1 et FOXO1, régulateurs négatifs du BCR, ce qui aurait pour conséquence de potentialiser le signal du récepteur à l'antigène [346].

Cluster miR-17-92 : ce cluster codé par le locus MIR17HG localisé en 13q31.3. La transcription de ce locus conduit à une ARN polycistronique comportant 6 miRNAs : miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92a-1 [347]. Ces miRNAs régulent positivement l'expression de l'oncogène c-Myc [348]. Ce cluster de miRNA ainsi que les miR-155, miR-181 et miR-29, peut réguler la signalisation du BCR dans les cellules de LLC [349]. Ensuite, l'amplification de la région 13q31.3 a été mise en évidence dans les syndromes de Richter post-LLC et associée à la surexpression de c-Myc. Dans ces tumeurs, quelques rares translocations de c-Myc sont retrouvées et semblent mutuellement exclusives de l'amplification 13q31.3 [348].

6.5.3. Autres gènes dérégulés dans la LLC (hors ZAP70) :

Les études de profil d'expression de gènes (GEP) ont révélé plusieurs autres cibles pertinentes dans la physiopathologie de cette hémopathie. Le principal gène issu de ces études est *ZAP70* et fera l'objet d'un développement particulier (paragraphe 7.5.1 page 127).

LPL : il s'agit de la lipoprotéine-lipase. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérol. Elle régule donc le métabolisme lipidique et est exprimée dans les cellules musculaires, les adipocytes et les cellules de glande mammaire [138]. Ce gène est surexprimé dans la LLC, sans ségrégation particulière par rapport au statut mutationnel IgVH. Le niveau d'expression est fortement corrélé au pronostic de patients en terme de survie globale et de survie sans traitement en particulier chez les patients de très faible risque (stade A, ZAP70 et CD38 négatif, IgVH muté) [138]. La combinaison de la surexpression de LPL dans les LLC non mutées et de la surexpression de ADAM29,

surexprimé dans les LLC mutées, permet de calculer un ratio LPL/ADAM29 fortement associé au statut IgVH [350]. Pourtant, le rôle fonctionnel de cette enzyme dans la LLC n'est pas encore établi [351].

CLU1 : Ce gène (CLL upregulated gene 1) situé en 12q22 est surexprimé dans la LLC et particulièrement dans les cas évolutifs mais n'est pas corrélé à la présence de la trisomie 12 [138]. Le niveau de cette surexpression est un marqueur pronostique non indépendant car fortement corrélé, en revanche, au statut IgVH non muté, ZAP70 ou CD38 positifs. Cette surexpression a été proposée comme marqueur de maladie résiduelle après traitement intensif [138].

TOSO : il s'agit d'un récepteur du fragment Fc des IgM [352]. Il avait été précédemment nommé « Fas inhibitory molecule 3 » ou FAIM3. Ce récepteur est surexprimé dans les LLC de mauvais pronostic où il favorise la résistance à l'apoptose induite par la liaison du ligand FasL sur son récepteur Fas [353]. Cette action protectrice est indirecte et médiée par la liaison sur TOSO de fragment Fc μ [354]. La surexpression de TOSO sur la LLC est induite par le BCR [355] mais est négativement régulée par le TLR7 ou le TLR9 [354]. La fixation de fragment Fc μ sur TOSO induit son internalisation et sa dégradation dans le lysosome, pouvant participer ainsi à l'activation du lymphocyte B [354]. Par comparaison avec des lymphocytes B normaux, les cellules de LLC montrent globalement une surexpression de TOSO (23xN), avec des variations positivement corrélées au mauvais pronostic, et pourrait être un marqueur utile suivi par Q-PCR [356].

MCL1 : « Myeloid Cell Leukemia sequence 1 » est une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl2. Son expression est négativement régulée par les miR-15a et miR16-1, fréquemment délétés dans la LLC (*cf.* del(13q) chez presque 50% de patients) [340]. L'expression de Mcl1 est par ailleurs induite par la stimulation du CD44 [196,197]. Récemment, le niveau d'expression de Mcl1 dans les cellules de LLC a été corrélé à la résistance à l'ABT-737. L'ABT-737 est une nouvelle molécule thérapeutique, de la famille des BH3 mimétiques, qui agit sur la LLC en inhibant Bcl2 et Bcl-XL mais pas Mcl1 [357]. Le niveau d'expression de Mcl1 peut être pharmacologiquement modulé par diminution de son

expression (dasatinib) ou par induction de son inhibiteur physiologique Noxa (fludarabine, bortezomib) [357]. Ces données montrent donc que l'expression de Mcl1 pourrait être prédictive de la résistance à l'ABT-737 en monothérapie et poser l'indication d'une association thérapeutique [357].

TCL1 : « T cell leukemia/lymphoma 1 » est un oncogène découvert dans les leucémies prolymphocytaires T porteuses d'une translocation ou inversion en 14q32.2 juste en amont du locus *IGH* (14q32.3). Les souris exprimant constitutivement Tcl1 dans leur cellules B développent des lymphomes B qui ressemblent aux formes agressives de LLC chez l'homme dans lesquelles on retrouve également une surexpression de Tcl1 [358]. Alors que Tcl1 peut potentialiser la voie Akt, dans la LLC il semble que son rôle oncogénique soit lié à la potentialisation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (liaison entre Tcl1 et CBP/P300) et par l'inhibition du complexe à fonction de facteur de transcription AP-1 [358]. L'expression de Tcl1 est régulée négativement par les miR-29 et miR-181 qui sont sous-exprimés dans les formes agressives de LLC. Ce mécanisme est particulièrement associé à la délétion 11q22 [359].

HS1 : il s'agit de « hematopoietic cell Lyn substrate 1 », une protéine ciblée par le BCR et qui agit sur réseau d'actine du cytosquelette. La surexpression de HS1 dans la LLC a été découverte lors d'une analyse protéomique comparative entre des LLC non mutées CD38+ et des LLC mutées CD38- [360]. Dans cette étude *princeps*, toutes les cellules de LLC surexprimaient HS1 et les LLC agressives présentaient essentiellement une forme constitutivement phosphorylée. Le niveau d'expression de HS1 a ensuite été positivement corrélé aux autres marqueurs pronostiques et la chimiorésistance [361,362]. Dans un modèle murin, l'hyperexpression de HS1 agissait sur le cytosquelette et favorisait l'infiltration des organes par les cellules de LLC [363]. Le traitement des cellules de LLC surexprimant par le dasatinib (inhibiteur de Lyn) diminuait les formes phosphorylées de HS1 et de ces cibles Vav et Erk [364]. Dans un modèle murin, le dasatinib inhibait l'infiltration ganglionnaire par la LLC [364].

Cortactin : il s'agit d'une protéine homologue de HS1 qui présente une dérégulation parallèle à cette protéine. Cette publication récente est un argument de plus liant le BCR, le cytosquelette et le développement de la LLC [365].

GALNT11 : ce gène code pour l'enzyme « UDP-N-acetyl- α -d-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11 » ou « GalNAc-Ts ». Elle est localisée dans l'appareil de Golgi intervient dans la glycosylation de plusieurs protéines à la surface cellulaire [366]. Une étude récente vient de publier que la GalNAc-Ts est surexprimée dans 96% des LLC et par les lymphocytes T normaux [366]. A l'inverse, les lymphocytes B normaux l'expriment très peu. L'augmentation de son ARNm en RQ-PCR était associée à l'augmentation des antigènes glycosylés. Le niveau d'expression de GALNT11 était corrélé à celui de la LPL et au statut IgVH [366].

HIF-1 α : il s'agit de « hypoxia induces factor 1 alpha », un facteur de transcription exprimé normalement en réponse à l'hypoxie. Les cellules de LLC expriment fortement HIF-1 α , y compris en condition de normoxie. Dans les cellules de LLC, HIF-1 α induit l'expression du VEGF, de MIF et d'autres ligands qui, par effet autocrine, peuvent activer les cellules tumorales et promouvoir l'expression de Bcl2 et d'IL-8 entre autres [367].

6.5.4. Anomalies des mécanismes de régulation épigénétique des gènes

La régulation épigénétique des gènes est complexe et fonctionne par modification réversible de l'ADN lui-même ou des histones, protéines qui s'associent formant des complexes qui régulent la structure de la chromatine. Brièvement, les DNA-méthyltransférases (DMNTs) méthylent les îlots CpG des régions promotrices de gènes et/ou des régions internes au gène lui-même et éteignent son expression. Les histones acétyltransférases (HATs) catalysent l'acétylation des histones et ce qui potentialise l'expression des gènes concernés. L'action des HATs est équilibrée par les histones déacétylases (HDACs). Les histones peuvent également être méthylées sur leur résidus lysine par des histones méthyltransférases (HMTs) et déméthylées par des histones déméthylases (HDMTs), et leur action sur le niveau d'expression des gènes est variable selon les sites de méthylation sur l'histone [368]. La méthylation de l'histone 3 (H3) est la plus significative : la méthylation de

la lysine 4 (H3K4me) favorise l'activité transcriptionnelle du gène alors que la méthylation de la lysine 9 (H3K9me) la réprime. Le « code histone » se complexifie encore car les lysines peuvent être mono, bi ou triméthylées [369]. Enfin l'expression des gènes peut être modulée par des variations de la composition des complexes d'histones régulant la région chromatinienne où ils se trouvent [368]. Ces modulations épigénétiques sur l'ADN et les histones sont étroitement associées : lorsque la transcription d'un gène doit être éteinte, les histones sont déacétylées, puis l'ADN et les histones sont méthylés pour verrouiller le locus [369,370]. Les modifications épigénétiques du niveau d'expression de gène est transmissible aux cellules filles au travers de la mitose et même à la descendance des individus au travers du processus méiotique [371].

Les anomalies d'expression de gènes codant pour des protéines ou des miRNAs rencontrées dans la LLC sont régulées au niveau épigénétique. Par exemple, l'expression de *ZAP70* est contrôlée par la méthylation de plusieurs régions riches en GC localisées dans la région 5'-UTR du gène ou dans le 1^{er} intron, ces régions sont déméthylées dans les LLC au statut IgVH non muté ce qui conduit à une surexpression du gène *ZAP70* dans ces cellules [372].

L'ADN des cellules de LLC présente une hypométhylation générale, commune avec l'ensemble des cellules tumorales, avec une hyperméthylation des régions comportant les gènes suppresseurs de tumeurs [369,372].

L'hypométhylation des séquences répétées alpha-satellites des régions centromériques favorise les réarrangements chromosomiques et l'instabilité génomique et cette hypométhylation est associée aux altérations de p53 dans la LLC [369,372]. L'hypométhylation des gènes codant pour *Bcl2*, *Mcl1*, *Tcl1*, *CLLU1* ou encore *LPL* est responsable de la surexpression de ces protéines dans la LLC [372]. Parallèlement, les régions promotrices des miR-21, miR-29, miR34a et miR-155 sont également hypométhylées [372].

Parmi les gènes fréquemment hyperméthylés on peut citer *TWIST2* qui code pour un répresseur de la transcription de *TP53* ou le gène *SLIT2* également impliqué dans le cancer

du poumon. Le statut de méthylation des gènes *HOXA*, *BTG4* et *CD38* permet de calculer un score prédictif de l'évolutivité des LLC mutées indépendamment du statut *CD38* [372]. Le gène *DAPK1* code pour un suppresseur de tumeur et est hyperméthylé dans les cellules de LLC d'une part et, d'autre part, son statut hyperméthylé constitue dans la population générale un facteur de susceptibilité génétique pour le développement d'une LLC [372]. Enfin, les gènes codant pour les miR-129, miR-9 et miR-708 sont également hyperméthylés et ses miRNAs régulent négativement l'expression de *XPO1*, *POT1* et *NOTCH1* respectivement [372]. Des mutations de ces gènes ont été récemment impliquées dans la physiopathologie de la LLC [275,281,302,326].

6.6. Cas particulier de l'évaluation fonctionnelle du statut p53 et ATM

Compte-tenu de la complexité et du coût des études du statut de p53 (muté et/ou délété) et d'ATM (muté et/ou délété), certaines équipes ont développé des techniques d'évaluation fonctionnelle de p53 et ATM par PCR ou cytométrie en flux. Ces différentes techniques ont été récemment revues par le groupe de travail européen sur la LLC (ERIC) [373]. Le principe de ces approches est basé sur 2 constats : (i) lorsque p53 est muté et transcriptionnellement inactif, la protéine est stabilisée dans la cellule (*i.e.* sa concentration augmente) et (ii), lorsque p53 est fonctionnel, il y a un équilibre entre son activateur ATM stimulé par des altérations de l'ADN qui stabilise la protéine p53 et son inhibiteur MDM2 qui régule la dégradation de p53 par ubiquitination.

Le niveau d'activité transcriptionnelle de p53 peut être évalué par RQ-PCR de ces gènes cibles : p21, CD95 (Fas), Puma, Bax et miR34a [373].

RQ-PCR miR34a : évalue le niveau basal d'expression de ce gène cible de p53. Cette technique pourrait également détecter quelques cas d'inactivation d'ATM mais est limitée par la taille du clone mutant (>50%) [373].

RT-MLPA p21, Bax, Puma, CD95 : évalue en 1 PCR l'induction de l'expression de ces 4 gènes cibles de p53 16h après irradiation des cellules. Le principal facteur limitant est la taille du clone muté. Un développement de cette technique pour détecter l'expression des gènes cibles d'ATM est en cours de validation [373].

RQ-PCR p21 : évalue le niveau d'expression de ce gène cible de p53 16h après irradiation des cellules. Si des agents cytotoxiques (fludarabine ou doxorubicine) sont utilisés pour altérer l'ADN, il est possible de discerner les anomalies de p53 des anomalies d'ATM. La fludarabine induit différents types d'altération de l'ADN et active à la fois p53 de manière indépendante et dépendante d'ATM. La doxorubicine induit des cassures double-brin et active p53 de manière dépendante d'ATM [373].

Expression de p53 et p21 en cytométrie en flux : dans le dernier développement de ce test, le niveau d'expression basal de p53 et les niveaux d'expression conjoints de p53 et p21 après traitement par étoposide ou nutlin-3a (inhibiteur de MDM2) permet de discerner les anomalies de p53 et d'ATM. L'étoposide est un agent cytotoxique qui active p53 via ATM entre autre. Deux catégories de réponses peuvent être décrites chez les non répondeurs à l'étoposide (*i.e.* absence d'induction de p53 et p21) [373]:

- Catégorie 1 : absence de correction par la nutlin-3a → mutation de p53
- Catégorie 2 : correction par la nutlin-3a → mutation d'ATM

6.7. Le récepteur à l'antigène des cellules de LLC

L'étude moléculaire du locus de la chaîne lourde des immunoglobulines (IgH) est un élément important de l'évaluation pronostique de patients. Le principal paramètre évalué est celui du statut mutationnel au seuil de 2% par rapport à la séquence germinale (LLC mutées de bon pronostic vs LLC non mutées de mauvais pronostic). Le répertoire peut également impacter le pronostic (réarrangement du gène *IGHV3-21* et autres BCR stéréotypés). Compte-tenu des multiples particularités de la génétique des

immunoglobulines dans la LLC, ces informations ont été traitées dans un chapitre dédié (voir ci-après).

6.8. Les marqueurs pronostiques sériques

De très nombreux marqueurs sériques sont également liés à la physiopathologie de la LLC ou capables de prédire l'évolutivité de la maladie. Leur valeur pronostique de certains d'entre eux a été établie depuis plusieurs dizaines d'années. Leur significativité clinique est largement confirmée et les taux de LDH ou de B2M en particulier sont toujours utilisés pour l'évaluation pronostique des patients. D'autres sont d'exploration plus récente.

En réalisant une recherche systématique sur la base de données Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) avec les mots-clés : « plasma » OR « serum » AND « CLL », nous avons retrouvé plus de 1000 entrées. Après analyse rapide, 47 marqueurs sériques ont été répertoriés dont une majorité correspondent à des molécules relarguées par le clone tumoral (CD20, CD52, CD44, ...), des facteurs de croissance du lymphocyte B (BAFF, APRIL, ...) ou d'adressage cellulaire (SDF-1, CCL3, CCL4, ...), des cytokines de l'inflammation (TNF α , IL-8, IL-6, ...), des régulateurs de la néoangiogénèse (VEGF, FGF, ...) ou encore des molécules liées au métabolisme lipidique (leptine, adiponectine). L'ensemble des marqueurs sont résumés dans le Tableau 3. On peut souligner ici le travail exhaustif mené depuis le début des années 90 par l'équipe italienne de Molica *et al.* dans l'exploration des marqueurs sériques associés à la LLC (plus d'une vingtaine de publications sur le sujet).

Seuls les marqueurs sériques les plus pertinents pour la physiopathologie ou la prédiction de l'évolution de la maladie sont repris plus en détail par la suite.

| Relargage par la cellule clonale | Cytokines du système immunitaire | Autres molécules du microenvironnement |
|----------------------------------|----------------------------------|--|
| Immunoglobuline | BAFF | SDF-1 |
| CD20 | APRIL | VEGF |
| CD25 (IL-2R) | APRIL | FGF |
| CD26 | CD40L (CD154) | angiopoietine-2 |
| CD27 | CCL3 (MIP-1 α) | leptine |
| CD40 | CCL4 | adiponectine |
| CD44 | TNF α | IGF-1 |
| CD52 | IL-1 | TPO |
| CD54 | IL-4 | CD14 |
| CD80 | IL-6 | CA-125 |
| CD83 | IL-8 | |
| CD138 (syndecan-1) | IL-9 | |
| HMGB1 | IL-10 | |
| Progranuline | IFN γ | |
| FAS et FASL | TRAIL | |
| p53 | TRAIL-R | |
| Ki-67 | | |
| MMP-9 | | |
| ICAM-1 | | |
| VCAM-1 | | |

Tableau 3 : Principaux marqueurs sériques modifiés au cours de la LLC.

(revue non exhaustive de la littérature).

6.8.1. Les enzymes liées à l'activité tumorales

LDH : la lactate déshydrogénase est une enzyme exprimée dans plusieurs types cellulaires. Elle intervient dans le métabolisme des carbohydrates en transformant le lactate-pyruvate. C'est un tétramère constitué à partir de sous-unités H (« heart ») ou M (« muscle ») et l'on dénombre 5 iso-enzymes selon les combinaisons exprimées. Le tissu lymphoïde et les cellules néoplasiques expriment l'iso-enzyme LDH3 (H₂M₂) composant 20% à 30% du pool de LDH circulant à l'état physiologique (les hématies contiennent les iso-enzymes LDH1 et LDH2 qui sont augmentés au cours des hémolyses). Le dosage enzymatique est basé sur l'activité globale des 5 iso-enzymes circulants.

L'augmentation des LDH est associée aux autres marqueurs de mauvais pronostic et les taux sont particulièrement élevés en cas de syndrome de Richter [108].

B2M : la β_2 -microglobuline est une protéine impliquée dans la structure du complexe du CMH de classe I. Sa production est augmentée sur les cellules tumorales. Sa concentration sérique est l'intégration de sa production et de son élimination rénale (filtration glomérulaire et réabsorption tubulaire). Des taux élevés de B2M sont associés à des stades plus avancés de LLC. Parmi les patients de stade A, le taux sérique de B2M a une valeur pronostique sur la survie sans traitement [108].

TK : la thymidine kinase est une enzyme impliquée dans la synthèse de l'ADN. Elle phosphoryle la désoxythymidine. Son taux sérique physiologique est très bas et son augmentation est liée à la masse tumorale et à sa prolifération. Les taux de TK les plus élevés ont été associés aux LLC agressives, au statut IgVH non muté, à un TDL court, une cytogénétique défavorable [108]. Dans une étude, le taux de TK a été associé à la réponse à la fludarabine puisque 80% des patients avec de faibles taux sériques avaient répondu à la chimiothérapie contre 45% pour les patients avec taux sériques élevés [374]. Une étude européenne récente a validé la valeur pronostique du dosage de TK en précisant que les taux sériques diminuent physiologiquement avec l'âge [375].

6.8.2. *Les molécules dérivées du clone de LLC*

Chaînes légères libres sériques : le dosage des chaînes légères libres sériques (« free light chain » ou FLC) par néphélométrie est une technique qui permet d'évaluer les taux de chaîne κ ou λ libres et de suivre le ratio κ/λ . Ce test avait été initialement développé pour le suivi du myélome et des amyloses. En 2007, Martin *et al.* démontrait que 44% des patients atteints de LLC présentaient un dosage des FLC anormal alors qu'une dysglobulinémie n'était détectable que dans 11% des patients par électrophorèse et immunofixation. Par la suite, 5 études indépendantes montraient qu'une dysglobulinémie était détectable par le dosage des FLC dans 40% à 50% des patients de chaque série. Toutes associaient un dosage FLC anormal à une médiane de TFS plus courte et 3 avec une médiane de survie globale significativement réduite et toujours l'impact pronostic restait pertinent en analyse multivariée [376–380]. L'étude de Tsai *et al.* a exploité une sérothèque de 77000 patients ayant été inclus dans un protocole prospectif sur la survenue de cancers solides (prostate,

ovaire, poumon, colorectum) [381]. Parmi eux, 109 avaient développé une LLC. La reprise de leur sérum a montré qu'une dysglobulinémie était détectable chez 38% d'entre eux par dosage FLC, 13% présentaient un composant monoclonal détectable par électrophorèse et 3% avaient une hypogammaglobulinémie avant que le diagnostic de LLC ne soit posé. Ces anomalies pouvaient ont pu être détectées jusqu'à 9.8 années avant la découverte de la LLC [381].

Collectivement, ces datas montrent que (i) la dysglobulinémie dans la LLC est sous-estimée par l'usage seul de l'électrophorèse, (ii) la dysglobulinémie impacte défavorablement le pronostic et (iii) la dysglobulinémie est un évènement très précoce ce qui est en faveur d'une sécrétion par le clone plutôt qu'une dysimmunité résiduelle lorsque le taux de gammaglobulines chute. Toutefois, les discordances entre l'isotype de la chaîne légère retrouvée dans les pics monoclonaux sériques et celui du clone de LLC phénotypé méritent d'être discutées.

CD23s : le CD23 est le récepteur de faible affinité des IgE. Il est exprimé à la surface des cellules clonales et une fraction de cette protéine circule dans le plasma. La valeur pronostique de cette fraction soluble a été largement étudiée. Un taux élevé de CD23s constitue un marqueur de mauvais pronostic au diagnostic ainsi qu'au cours du suivi du patient. La méthode de dosage de référence est la technique ELISA [382–390]. Récemment, une équipe française a publié une méthode de dosage en cytométrie en flux utilisant des billes (« cytometry bead array » ou CBA) donnant des résultats parfaitement corrélés à l'ELISA [382]. Certains auteurs ont évalué avec succès le temps de doublement du taux de CD23s en tant que marqueur pronostique [384].

sCD200 : ce récepteur de la super-famille des Ig est exprimé à la surface des cellules de LLC et associé défavorablement au pronostic. La fraction soluble du CD200 (sCD200) est également associée aux stades avancés de la maladie [391]. Cette fraction soluble est libérée depuis la membrane plasmique des cellules tumorales par l'action d'ADAM28 [391]. Il a également été montré que le taux de sCD200 circulant favorise l'infiltration de l'organisme par les cellules de LLC dans des expériences de xénogreffe chez la souris. Cet effet était

dépendant des lymphocytes T puisque leur déplétion par l'OKT3 abolissait l'effet du sCD200 [392].

6.8.3. *Dosage sériques des cytokines ou autres molécules*

BAFF : la protéine BAFF est un facteur de prolifération des lymphocytes B. Il est largement impliqué dans le microenvironnement de la LLC (voir plus haut). Il a été montré sur 2 études indépendantes que les taux sériques de BAFF permettent de prédire de manière indépendante des autres marqueurs pronostiques biologiques, le temps avant traitement des patients de stade A de la classification de Binet [393,394]. Un fait notable est que ce sont les faibles taux circulants de BAFF qui ont montré un effet péjoratif sur le pronostic des patients [393,394] et des taux diminués ont dans la LLC ont été confirmés sur d'autres séries [395] et des cellules primaires de LLC sécrètent moins de BAFF que les B normaux [396]. On peut citer une 3^{ème} étude ayant comparé les taux sériques de BAFF entre des patients atteints de LLC familiale et des patients atteints de LLC sporadique. Les taux de BAFF étaient bas pour 93% des cas de LLC sporadiques par rapport aux témoins sains alors que seulement 60% des cas de LLC familiales présentaient cette sous-expression, suggérant un contrôle différent de BAFF sur le développement tumoral dans les 2 types de LLC [397].

APRIL : il s'agit également d'un facteur de prolifération du lymphocyte B, proche de BAFF, et impliqué dans le microenvironnement de la LLC. A l'inverse de BAFF, les taux sériques d'APRIL sont significativement plus élevés chez les patients LLC que chez les contrôles [393,395,398]. Les taux sériques élevés d'APRIL prédisent indépendamment un pronostic péjoratif de la LLC, en particulier pour les stades A [395,398].

Vitamine D : le taux de 25-hydroxy-vitamine D ou « 25(OH)D » est dépendant de l'exposition solaire et est classiquement impliqué dans le métabolisme calcique. Les patients atteints de LLC et d'autres LNH présentent des taux de 25(OH)D significativement plus bas que les témoins sains. La profondeur du déficit vitaminique était corrélé aux stades Binet avancés, au statut ZAP70 et CD38 [399]. Le taux de vitamine D pouvait également prédire le temps avant premier traitement dans 2 autres études indépendantes [65,66]. Dans une étude européenne prospective a montré qu'un taux élevé de 25(OH)D était un facteur

protecteur contre le développement d'une LLC, que ce soit la vitamine D naturelle ou une supplémentation médicamenteuse [64]. Cette étude n'avait pas retrouvé d'impact de la vitamine D sur les autres lymphomes, pourtant les taux sériques de vitamine D semblent montrer un effet bénéfique dans beaucoup d'autres cancers chez l'homme [67,400,401].

IL9 : une seule étude a rapporté en 2014 des taux sériques d'IL9 augmentés chez 20/47 patients atteints de LLC alors que cette interleukine restait indétectable chez des contrôles sains et les 27 autres patients. Les taux sériques d'IL9 ainsi que le niveau d'expression de son ARNm dans les PBMC étaient fortement associés au statut ZAP70 et IgVH [402].

6.9. Evaluation pronostique et traitement en pratique courante

Seuls quelques uns des paramètres décrits précédemment sont utilisés en pratique courante pour évaluer le pronostic du patient et poser l'indication d'un traitement spécifique de la LLC. La prise en charge des patients atteints de LLC vient d'être récemment mise à jour en 2013 par le groupe international de la LLC (iwCLL) [137].

6.9.1. *Le principe de la prise en charge*

La LLC est une maladie incurable survenant essentiellement chez la personne âgée. La LLC est d'autre part une maladie indolente mais son évolution très variable d'un patient à l'autre. Le but de la prise en charge (PEC) est de prolonger la survie lorsque cela est possible ou d'améliorer le confort de vie.

Compte-tenu des résultats d'essais cliniques antérieurs, il n'est actuellement pas recommandé de traiter les patients asymptomatiques de stade A, cette phase d'observation est fréquemment surnommée « wait and see » ou encore « watch and wait ». Ce paradigme pour la PEC des stades précoces sera peut-être abrogé dans quelques temps du fait de l'avantage en terme de survie globale des patients de stade A de haut risque (*i.e.* ≥ 2 des paramètres suivants : TDL <6 mois, TK >10 UI/l, IgVH non muté, del(17p), del(11q) ou trisomie 12) traités précocement par l'association FCR (voir plus loin) par rapport à ceux ayant été

traités plus tardivement [403]. Les patients de stade B peuvent encore bénéficier d'un simple suivi tant qu'aucun symptôme d'évolutivité n'est observé (Tableau 4). Les patients de stade C requièrent une PEC spécifique de la LLC lorsque celle-ci est possible (cf. évaluation des comorbidités chez les patients âgés). L'hypogammaglobulinémie ne constitue pas en soi une indication d'un traitement spécifique de la LLC mais elle sera corrigée par injections régulières d'Ig polyvalentes pour prévenir les infections.

| Signes d'évolutivité : |
|---|
| Apparition d'une anémie ou thrombopénie centrale |
| Splénomégalie avec débord costal ≥ 6 cm ou splénomégalie progressive ou symptomatique |
| Adénopathie massive ≥ 10 cm ou adénopathie progressive ou symptomatique |
| Augmentation de la lymphocytose de $>50\%$ en 2 mois |
| Temps de doublement des lymphocytes < 6 mois |
| AHAI ou PTI réfractaire au corticoïdes ou autres immunosuppresseurs |
| Symtomes spécifiques : <ul style="list-style-type: none"> → Perte de poids $\geq 10\%$ en mois de 6 mois → Asthénie symptomatique (<i>i.e.</i> ECOG performans status ≥ 2) → Fièvre $\geq 38^\circ\text{C}$ depuis plus de 2 semaines sans infection → Sueurs nocturnes depuis au moins 1 mois sans infection |

Tableau 4 : Signes d'évolutivité de la LLC selon les recommandations internationales.

Références : [137,225]

Il est également recommandé de réaliser au diagnostic et avant tout traitement les principaux examens biologiques complémentaires pour évaluer le pronostic des patients, surtout lorsque celui-ci doit être inclus dans un protocole thérapeutique. En pratique, seule la cytogénétique et la FISH sont obligatoires, en particulier pour la détection de la del(17p) qui est prédictive d'une résistance à la fludarabine. Les autres examens, tout comme la recherche des mutations de *TP53*, sont recommandés. Le bilan biologique des facteurs pronostiques de la LLC devrait, dans l'idéal, comporter les examens suivants :

- Cytogénétique + FISH (+/- mutations *TP53*)
- Dosage des LDH, B2M, TK, CD23s

- Détermination du statut mutationnel IgVH, dépistage du réarrangement du gène IGHV3-21
- Expression du CD38 et ZAP70
- Electrophorèse des protéines sériques (hypogammaglobulinémie, composant monoclonal)
- Test de Coombs direct

6.9.2. Les options thérapeutiques actuelles

Lorsque l'indication du traitement est posée et que les facteurs pronostiques ont été réalisés, en particulier la cytogénétique, le choix du traitement de 1^{ère} ligne prendra en compte : (i) des critères d'âge et de comorbidités (patients sans comorbidités ou « fit » ou patient avec comorbidités importantes ou « unfit ») et (ii) le statut p53. Le schéma décisionnel général est présenté dans la Figure 19, mais des adaptations sont possibles au cas par cas. La mise en évidence d'une altération de *TP53* (délétion ou mutations) est une indication d'allogreffe chez le patient jeune.

Lorsque la LLC réévolue après la 1^{ère} ligne de traitement, la qualité de la réponse et le délai de survenue de la rechute interviennent dans l'arbre décisionnel. Brièvement, les LLC réfractaires à la 1^{ère} ligne ou ayant rechuté dans les 2 ans qui ont suivi la fin du premier traitement, constitue une indication d'allogreffe chez les patients jeunes, quelque soit le statut p53. Celui-ci peut d'ailleurs être réévalué avant chaque nouveau traitement. Pour les patients non éligibles à l'allogreffe, des protocoles de traitement à base d'alemtuzumab sont recommandés en cas d'altération de p53. Dans les cas de rechutes précoces sans anomalie de p53, il est plutôt préférable de ne pas réutiliser le traitement de la 1^{ère} ligne mais de choisir des drogues alternatives comme la bendamustine par exemple. Pour les rechutes tardives (*i.e.* >2 ans), le protocole thérapeutique de 1^{ère} ligne peut être réappliqué.

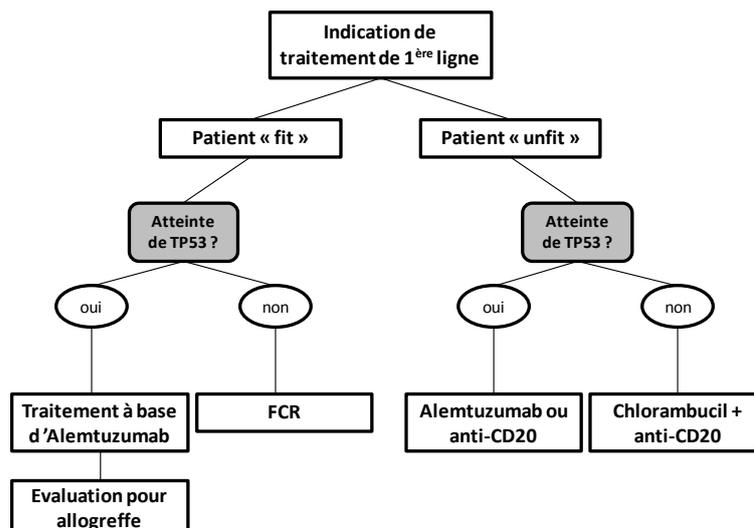


Figure 19 : Orientation du choix de traitement de première ligne de la LLC.

D'après les recommandations internationales [137].

6.9.3. Les critères de réponses au traitement et maladie résiduelle

Les critères de réponses au traitement ont été décrits en détail dans les recommandations du groupe de travail international sur la LLC [225].

La rémission complète est définie en 5 points :

- Maladie résiduelle (MRD) négative dans le sang et/ou la moelle (*i.e.* MRD<10⁻⁴)
- Absence d'adénopathies significatives (*i.e.* ≥1.5 cm)
- Absence de splénomégalie et d'hépatomégalie
- Absence de signes généraux (fièvre, sueurs, altération de l'état général, ...)
- Amélioration des paramètres de la NFS (*i.e.* neutrophiles ≥1.5G/l, plaquettes ≥100G/l et hémoglobine ≥11g/dl).

Une réponse partielle au traitement est définie par une diminution de 50% de la lymphocytose périphérique et des adénopathies et des cytopénies réduites de 50%. Les autres cas correspondent soit à une maladie stable ou une maladie progressive le cas échéant.

L'évaluation de la maladie résiduelle (MRD) sur sang ou moelle est réalisée par cytométrie en flux. Les critères de réponse complète sont une absence de cellules B clonales dans le sang et une MRD $<10^{-4}$ dans la moelle (soit <1 cellule de LLC/10000 leucocytes) ce qui correspond à la concentration des lymphocytes B CD5+ polyclonaux rencontrés dans le sang normal [404]. Les premières méthodes standardisées consistaient à des protocoles 4 couleurs. Aujourd'hui, le groupe de travail européen (ERIC) précise qu'une recherche de clonalité des cellules CD19+/CD5+ définie par une restriction d'expression des chaînes légères de surface κ/λ peut être suffisante dans une majorité de cas [160]. Dans les situations d'interprétation délicate, l'ERIC-CLL recommande l'utilisation d'un panel standardisé de protocoles 6 couleurs [160].

En 2012, Böttcher *et al.* démontrait au travers de l'essai clinique prospectif allemand CLL8, qu'une MRD $<10^{-4}$ dans le sang ou la moelle après la fin du traitement était un facteur pronostique indépendant sur la survie sans progression et la survie globale [405]. Au cours de cet essai, certaines discordances entre le niveau de MRD dans le sang et la moelle ont été décrites. Il s'agissait essentiellement de cas où la MRD médullaire restait positive alors que le sang était négatif. En raison de la probable rémanence des anticorps monoclonaux à distance de la fin de traitement, il est recommandé de ne réaliser la MRD sanguine qu'au moins 3 mois après la dernière injection d'anticorps, et dans le cas contraire, la MRD médullaire est préférée [225].

Une étude américaine récente menée au centre MD Anderson vient de confirmer l'intérêt pronostique de la MRD médullaire en fin de traitement par cytométrie en flux chez les patients traités par immuno-chimiothérapie (protocole FCR, voir plus loin) [406]. Des discordances entre moelle et sang ont également été décrites. Dans cette étude, la MRD avait également été réalisée après 3 cycles de traitement (sur 6 cycles au total). L'analyse des résultats a montré qu'une MRD médullaire négative à 3 mois prédit aussi bien la survie sans progression et la survie globale qu'une MRD négative en fin de traitement [406]. Les auteurs posent alors la question d'une désescalade du traitement des patients sur la base d'une MRD précoce à mi-parcours.

Enfin, une autre étude italienne a comparé 3 méthodes d'évaluation de la MRD : cytométrie 4 couleurs (recommandation initiale de l'ERIC utilisée dans l'étude du MD Anderson), cytométrie 8 couleur et Q-PCR spécifique d'allèles (amorces spécifiques de la région jonctionnelle de chaque clone). Les auteurs ont confirmé la valeur pronostique de la MRD mais ils n'ont retrouvé aucune différence significative entre les 3 techniques utilisées [407]. Une équipe allemande avait cependant préalablement démontré que l'approche par PCR était plus sensible pour les MRD très faibles inférieures au seuil de 10^{-4} [408]. La MRD moléculaire peut également être réalisée par séquençage de nouvelle génération (NGS). Une équipe américaine a publié en 2013 une étude comparative de l'approche NGS par rapport à la Q-PCR dans l'évaluation de la MRD des patients atteints de LLC et ayant été allogreffés [409]. Dans cette étude, la limite de détection du clone était de 10^{-6} et la limite de quantification de 10^{-5} , soit 10 fois plus sensible que la Q-PCR. Le temps de doublement de la MRD <12 mois avec des charges alléliques $\geq 10^{-5}$ prédisait un risque de rechute de 50% à 1 an après l'évaluation de la MRD et de 90% à 2 ans post-MRD [409].

6.9.4. *Les nouvelles options thérapeutiques*

Ce chapitre reprend les principales avancées ou innovations thérapeutiques concernant la LLC et n'est pas le reflet exhaustif de tous les essais cliniques actuellement réalisés.

6.9.4.1. Les nouvelles molécules thérapeutiques et nouvelles voies ciblées

Ibrutinib et idelalisib : ces 2 molécules, l'ibrutinib (inhibiteur de BTK, ancien PCI-32765) et l'idélalisib (inhibiteur de PI3K δ , ancien CAL-101) se distinguent particulièrement des autres et viennent d'obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux Etats-Unis dans le traitement de la LLC. Ces 2 molécules ciblent les voies du BCR et sont actives même sur les cas de LLC avec délétions de p53 [410]. Leur action est caractérisée par une « chasse » ganglionnaire, conduisant à une fonte des adénopathies et à une hyperlymphocytose majeure et persistante dans le sang périphérique [411,412]. Cette hyperlymphocytose ne doit pas être interprétée comme un critère « classique » de mauvaise réponse au traitement telle que ceux que l'on applique pour évaluer les résultats d'agents cytotoxiques ou d'anticorps monoclonaux (voir plus haut). Les modalités de ces nouveaux

traitements ressemblent à celles de la leucémie myéloïde chronique depuis l'avènement des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK). Il s'agit d'une prise journalière en continu, ce qui n'est pas sans poser des problèmes de coût.

Fostamatinib : c'est un inhibiteur de la kinase Syk, enzyme-clé de la transduction du signal du BCR. Il s'agit de la prodrogue du R406 qui avait été extensivement étudié *in vitro* et qui est capable d'inhiber le signal basal du BCR (signal tonique) sur les cellules non activées par l'antigène [413]. Cette prodrogue est administrable *per os*. Les effets indésirables principaux sont neutropénie, thrombopénie et diarrhée. Cette molécule est actuellement en phase III de son développement.

Dasatinib : c'est un ITK de 2^{ème} génération développé initialement pour le traitement de la LMC grâce à son activité inhibitrice sur Abl. Le dasatinib présente également une activité inhibitrice des Src-kinases. Dans le lymphocyte B, la Src-kinase Lyn permet d'initier le signal du BCR en phosphorylant les tyrosines spécifiques des régions ITAM des co-récepteurs CD79A et CD79B. Dans la LLC, il y a surexpression de la Src-kinase Lyn sous forme activée [414], avec une forme cytoplasmique anormale [415]. Les essais du dasatinib chez des patients atteints de LLC ont montré une efficacité sur les adénopathies alors que la lymphocytose circulante était peu impactée [137]. Chez les patients réfractaires à la fludarabine, l'association du dasatinib a un effet modeste sur la réponse à cet agent cytotoxique [416].

Un autre développement pharmacologique innovateur concerne l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl2 et apparentés. Cette inhibition est réalisée par des inhibiteurs directs de Bcl2 ou des petits peptides du groupe des « BH3 mimétiques » (par analogie à leurs équivalents physiologique [137]).

ABT-199 : il s'agit d'un inhibiteur spécifique de Bcl2. Une dose unique d'ABT-199 administrée à 3 patients atteints de LLC réfractaire a induit une lyse tumorale importante en 24h [417].

AT-101 : il s'agit d'un BH3 mimétique administrable *per os* qui agit sur Bcl2, Bcl-XL et Mcl1. Il permet de limiter les effets du microenvironnement sur la chimiorésistance. Des

essais de phase I/II en association avec le rituximab ou le lénalidomide ont donné des résultats satisfaisants [137,418].

Des agents immunomodulateurs ou des anticorps monoclonaux anti-CD20 de 2^{nde} génération sont également testés cliniquement :

Lénalidomide : il s'agit d'une molécule proche du thalidomide utilisé dans les années 50 comme sédatif et anti-nauséeux avant que son action immunomodulatrice et son efficacité dans le myélome ne soient démontrées. Chez les patients atteints de LLC, le lénalidomide a permis d'obtenir 30% à 50% de réponse complètes en monothérapie. Le taux de réponse est amélioré lorsqu'il est associé au rituximab, même chez les patients réfractaires porteurs d'une del(17p) [419]. Cependant la triple association lénalidomide + rituximab + fludarabine présente une trop forte toxicité [137]. Une particularité de l'utilisation du lénalidomide chez les patients est le phénomène de «flambée ganglionnaire» : il s'agit d'une sensation d'échauffement intense des ganglions, un phénomène observé uniquement chez les malades atteints de LLC [137].

Enfin, des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CdK) comme le flavopiridol, des inhibiteurs d'HDAC comme l'acide valproïque, sont également explorés [137]. Les inhibiteurs de γ -sécrétase pourraient être particulièrement efficaces chez les patients porteur de mutations activatrice de *NOTCH1* [420]. La voie de stimulation du clone par les cytokines BAFF/APRIL peut être inhibée par un ligand inhibiteur du récepteur TACI (atacept) et le récepteur du CXCL12 (SDF-1), le CXCR4, peut être inhibé par le plerixafor [71]. Des tests *in vitro* suggèrent un intérêt pour la geldanamycine, un inhibiteur de Hsp90 chez les patients porteurs d'anomalies de p53 [421].

6.9.4.2. Les nouveaux anticorps

Obinutuzumab (GA-101) : il s'agit d'un Ac monoclonal anti-CD20 de 2^{nde} génération qui se distingue, en particulier des précédents comme le rituximab, par l'orientation du fragment Fc une fois fixé à la surface de la cellule. Ce fragment Fc plus « disponible » augmente l'efficacité de cet anti-CD20 de 2^{nde} génération en activant plus fortement la lyse

cellulaire par ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps), ADCP (phagocytose cellulaire dépendante des anticorps) ou CDC (cytotoxicité dépendante du complément) [422]. Les essais cliniques de phase III ont montré en particulier une plus grande efficacité de l'association GA-101+chlorambucil par rapport à rituximab+chlorambucil chez des patients comme non préalablement traités définis « unfit » qui sont les patients majoritairement rencontrés en pratique courante [423].

Des anticorps ciblant de nouveaux antigènes comme le CD23 (lumiliximab) ou le CD37 (TRU-016 : une molécule à structure brevetée proche d'une IgG humanisée mais plus petite qu'un Ac (brevet SMIP™)) sont également potentiellement efficaces pour traiter les patients atteints de LLC [424]. Le blinatumomab, un anticorps bi-spécifique anti-CD19 et anti-CD3 (technologie BiTE™), utilisé avec succès dans les LAL-B [425–427], pourrait également présenter un intérêt dans les lymphopathies B matures [424].

6.9.4.3. Immunothérapie et thérapie « immunogénique »

L'immunothérapie ou la vaccination anti-tumorale est un défi de longue date. Deux approches ont bénéficié d'une activité de recherche intense.

Vaccination anti-tumorale et modulation de l'immunogénicité des cellules malignes

La réaction immune anti-tumorale par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) est peu efficace dans la LLC. Des approches de vaccinations anti-tumorales ont été développées pour induire une réponse immunitaire efficace. Les premiers essais ont consisté à injecter au patient des cellules tumorales oxydées autologues [428]. Parallèlement des tentatives de vaccinations par injection de cellules dendritiques allogéniques ou autologues « pulsées » ont été réalisées. Le principe était de stimuler in vitro des cellules dendritiques avec des lysats tumoraux ou des corps apoptotiques [429–431]. Enfin, des vaccinations peptidiques ont permis d'obtenir une certaine réponse immunitaire anti-tumorale, en utilisant en particulier le peptide RHAMM (Receptor for Hyaluronic Acid Mediated Motility), un antigène tumoral exprimé par les cellules de LLC [432]

La thérapie « immunogénique » et récepteurs chimériques de l'antigène (CAR)

Il s'agit là d'une innovation remarquable aux confins de l'immunothérapie et de la thérapie génique. Il est actuellement possible de modifier génétiquement *in vitro* les lymphocytes T du patient pour induire l'expression d'un récepteur chimérique de l'antigène (« chiméric antigen receptor » ou CAR) composé (i) d'un domaine extracellulaire de type Ig capable de reconnaître le CD19, (ii) d'un domaine transmembranaire généralement issu du CD8 et (iii) d'une combinaison de domaines intracellulaires activateurs [433]. Cette nouvelle approche, ou thérapie « immunogénique », a été testée avec succès dans des essais cliniques de phase I/II concernant des patients atteints de LLC [433].

7. Le BCR : mutations somatiques, répertoire et rôle de ZAP70

L'étude des gènes codant pour le BCR dans la LLC a probablement conduit à la plus célèbre des découvertes dans cette lymphopathie. En 1999, Le statut mutationnel du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (IgVH) a permis de répondre en grande partie à l'hétérogénéité de l'évolution clinique de la LLC, en particulier pour les patients de stade peu avancé [434]. L'analyse de ce locus s'est ensuite affinée avec l'analyse du répertoire et la description de BCR dits « stéréotypés », permettant de nuancer dans certains cas l'information pronostique brute du statut mutationnel [435]. Cette valeur pronostique du BCR a été relayée au niveau phénotypique tout d'abord (CD38, ZAP70, ...) puis au niveau génétique, jusqu'à très récemment par le séquençage haut débit, dévoilant peu à peu un nouveau visage de la maladie. La grande dépendance des cellules de LLC à l'engagement du BCR a ouvert la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques [436].

L'étude du répertoire du BCR des cellules de LLC a commencé au début des années 90 et il était déjà connu que les cellules de LLC présentaient des mutations somatiques dans près de 50% de cas [434]. Le seuil de 98% pour définir le statut muté ou non muté avait été choisi pour rendre compte des nombreux polymorphismes des gènes de la chaîne lourde du BCR [434].

7.1. Le statut mutationnel du locus IgVH

7.1.1. Statut mutationnel et pronostic

En 1997, Oscier *et al.* relatait la différence du taux de mutations somatiques du locus IgVH des LLC de mauvais pronostic avec trisomie 12 (10 patients, taux moyen de mutation à 0.34%) et des LLC de bon pronostic avec del(13q) isolée (12 patients, taux moyen de mutation à 6.4%) [437].

En 1999, 2 publications simultanées ont clairement établi la valeur pronostique du statut mutationnel du locus IgVH dans la LLC [438,439]. L'équipe anglaise de Hamblin *et al.* a démontré la différence significative de survie globale sur une série de 84 patients selon leur statut mutationnel [438]. Avec un seuil à 2% (soit 98% d'identité), l'analyse du statut mutationnel du locus IgVH permettait une stratification pronostique majeure avec une médiane de survie de 393 mois (24 ans) contre 95 mois (8 ans) pour les LLC « mutées » et « non mutées » respectivement. Cette étude retrouvait également un biais de réarrangement du gène *IGHV1-69* dans les cas de LLC non mutées. L'équipe américaine de Damle *et al.* avaient étudié une série de 47 patients. Bien que les données de survie globale n'aient été analysées que sur les 25 patients de stade Rai intermédiaire (I/II), les auteurs ont retrouvé l'impact pronostique du statut mutationnel IgVH avec le seuil de 2% [439]. Les médianes de survies étaient comparables entre les 2 études, avec ici une médiane de 17 ans et 9 ans pour les LLC mutées et non mutées respectivement. Dans cette seconde étude, une association forte avec l'expression du CD38 avait été démontrée [439].

Par la suite, cette valeur pronostique du statut mutationnel a été confirmée sur plusieurs autres études de plus grande ampleur [243,305,440]. Une équipe française a également démontré que le statut mutationnel est indépendant et complémentaire du stade Binet [441]. Au final, la prévalence du statut IgVH non muté dans les différentes séries publiées a évolué de 26% à 40% sur les premières études majeures [166,243,442,443]. Alors que cette proportion semble plus proche de 40% sur les dernières grandes séries européennes ($n > 1000$) [227,302] et l'étude d'Agathangelidis *et al.* sur plus de 7000 séquences de toute

l'Europe à retrouvé 45% de cas non mutés [435]. Sur nos dernières données personnelles publiées, nous avons retrouvé une fréquence de LLC non mutées évaluée à 40% (60/150).

Après cette première « révélation » du statut mutationnel, une « réplique » identifiant la très forte association du statut non muté avec la surexpression de ZAP70 par analyse de profil d'expression de gènes a « secoué » le monde de la LLC [442,444]. Il s'en est suivi de multiples tentatives pour identifier le meilleur marqueur capable de prédire le statut mutationnel des cellules clonales [434]. La recherche du ou des vrais « surrogates » (*i.e.* « substituts »), a identifié 4 candidats principaux : ZAP70, CD38, l'enzyme LPL et le récepteur immature de la Laminine (iLR) [350,434]. Le CD38 s'est avéré être un mauvais marqueur compte-tenu de discordances dans 30% des cas environ et d'une variation de son expression au cours de l'évolution de la maladie dans 25% des cas [434]. Les études de corrélation du statut ZAP70 évalué par cytométrie en flux ont donné de meilleurs résultats, toutefois, alors que les premières études retrouvaient des taux de concordance autour de 94% [442,445], une 3^e étude utilisant un Ac anti-ZAP70 différent n'a retrouvé que 77% de concordance [446]. Les résultats publiés de notre équipe montrent une concordance évaluée entre 78% [447] et 87% [448] selon la technique utilisée. Le récepteur immature de la laminine est surexprimé à la surface des LLC mutées et donne un taux de concordance d'environ 80% [449]. Des essais visant à déterminer au mieux le pronostic des patients ont combiné le statut mutationnel, CD38 et ZAP70 [450]. D'autres ont élaboré un score avec 6 marqueurs phénotypiques (CD62L, CD54, CD49c, CD49d, CD38 et CD79b) permettant d'identifier 3 groupes corrélés au statut IgVH et ZAP70 [451].

7.1.2. La signification du statut mutationnel et origine de la cellule maligne

AID est l'enzyme clé qui contrôle à la fois les mutations somatiques (SHM) et la recombinaison de classe (CSR). Il avait été admis que les cellules de LLC pouvaient être des cellules B naïves de part la double expression IgM et IgD à leur surface [452]. Cependant l'observation de mutations somatiques dans presque 50% des cas est un argument contre cette hypothèse [434,452]. L'expression dans presque tous les cas du CD27, marqueur des B mémoire post-centre germinatif, est un argument de plus dans cette direction [434,452].

Si on pose alors la question de la cellule d'origine de la LLC, la simple comparaison de la génétique du BCR laisse apparaître une dichotomie évidente : les LLC mutées seraient issues du centre germinatif contrairement aux LLC non mutées. Il apparaît d'ailleurs sur plusieurs études qu'environ 1/3 des cas de LLC mutées présentent des mutations dans la région 5' non traduite (5'-UTR) du gène Bcl6 qui sont spécifiques du passage dans le centre germinatif et qui surviennent sous l'action d'AID [453–456].

Cependant, la surexpression du CD38 est principalement retrouvée sur les LLC non mutées. Le CD38 est également un marqueur d'activation dont l'expression est physiologiquement induite dans le centre germinatif. Donc ce phénotype CD38+ serait en faveur de cellules B dites « on going mutations » [452]. Les cellules de LLC non mutées expriment d'ailleurs l'ARNm d'AID et ses variants d'épissage, alors que très peu de LLC mutées expriment AID [457]. A ce niveau, 3 hypothèses sont possibles pour expliquer le phénotype des cellules de LLC non mutées :

- Il pourrait s'agir de cellules B ayant effectivement fait l'expérience de l'antigène mais possédant d'emblée un BCR de haute affinité, ce qui n'induirait pas le phénomène de SHM [452].
- Il pourrait s'agir de cellules B ayant répondu à un antigène T-indépendant [452] d'autant plus que la voie NOTCH2, caractéristique des lymphocytes B de la zone marginale, est constitutivement activée dans la LLC [458] et contrôle l'expression du CD23 dans ces cellules [459–461].
- Il pourrait s'agir de cellules B naïves authentiques qui auraient acquis l'expression du CD27, CD38, CD5 et AID au cours de la transformation maligne [452].

7.2. Expression d'AID et recombinaison de classe des cellules de LLC

Les cellules de LLC sont IgM+/IgD+. Cependant, une faible proportion de cas de LLC ont fait l'expérience de la recombinaison de classe (CSR). Environ 6% des cas de LLC expriment une IgG de surface sans IgM [462] mais plusieurs études suggèrent qu'une certaine proportion du clone fait l'expérience de la recombinaison de classe [452,463–465].

Les cellules de LLC démontrent une certaine dissociation entre les phénomènes de SHM et CSR [466]. L'enzyme AID est paradoxalement exprimée dans les cellules de LLC non mutée alors qu'il est rare de trouver des transcrits messagers de cette enzyme dans les LLC mutées [466]. L'analyse des régions pré-switch portent les mutations caractéristiques de l'action d'AID [466]. De même, lorsqu'on induit l'expression d'AID dans les cellules de LLC mutées par activation, l'ARNm d'AID est exprimé et associé à l'apparition de mutations dans les régions pré-switch sans provoquer de SHM [466]. Ces résultats suggèrent que le phénomène de SHM dans les LLC requiert d'autres éléments régulateurs qui ne semblent pas présents dans ces cellules [466].

En 2009, Marantidou *et al.* ne retrouvaient pas de différence significative du niveau d'expression des différents variants d'épissage de l'ARNm d'AID entre les cellules de LLC de phénotype IgM/IgD ou de phénotype IgG [457]. En 2002, Opezzo *et al.* détectait des ARNm d'Ig relatives au clone mais avec des isotypes de chaîne lourde différents dans 11/25 cas de LLC, certaines cellules pouvant même rarement exprimer une IgM, une IgD et une IgG ou IgA membranaire [452], mais seulement 6/11 LLC IgG ou IgA étaient non mutées [452]. En réalité, toutes les LLC ayant fait l'expérience de la CSR pour exprimer un BCR de classe IgG n'appartiennent pas au groupe des LLC non mutées. Par exemple, les LLC de phénotype IgG qui expriment un BCR stéréotypé utilisant le gène *IGHV4-39* (subset#8 défini plus loin) sont classiquement des LLC non mutées [467,468]. A l'inverse, les LLC IgG qui expriment un BCR stéréotypé utilisant le gène *IGHV4-34* (subset#4) sont classiquement des LLC mutées et ce subset est caractérisé par une grande diversité intraclonale sur la base des mutations acquises au niveau des gènes des immunoglobulines [467,469–471].

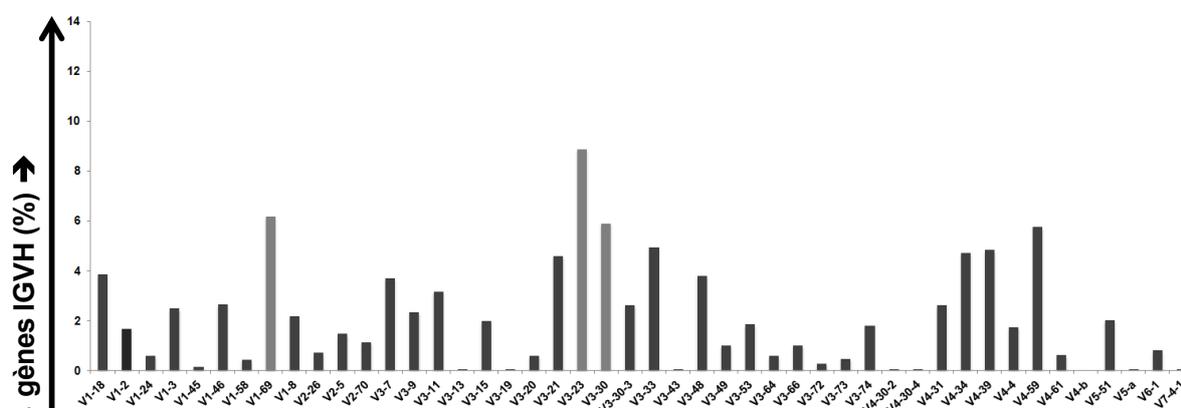
Ces données démontrent la relation complexe entre l'expression d'AID, le statut mutationnel IgVH et la recombinaison de classe. La dissociation des fonctions d'AID, *i.e* SHM *versus* CSR, n'est pas une règle stricte dans la LLC.

7.3. Le répertoire du BCR et BCR stéréotypés

La physiologie du BCR est marquée par une grande variabilité contrôlée au cours du développement initial du lymphocyte B (maturation antigène indépendante) et de la réponse immune (maturation antigène dépendante). La juxtaposition des diversités combinatoires et jonctionnelles, parfois accompagnée de SHM le cas échéant, permet d'évaluer la probabilité que 2 lymphocytes différents aboutissent à un BCR identique à environ 10^{-12} [472]. L'accumulation depuis de nombreuses années des données de séquences IgHV concernant la LLC et la mise au point de nouveaux procédés bioinformatiques pour les analyser permet aujourd'hui d'avoir un point de vue global sur le répertoire BCR dans cette pathologie [472]. Même si seuls les gènes IGVH sont discutés dans les analyses de BCR stéréotypés, les gènes IGDH et IGJH subissent également une pression de sélection [473] tout comme les gènes des chaînes légères [474].

Le répertoire IgHV des cellules de LLC est partiellement biaisé par rapport à celui des lymphocytes B normaux. L'étude exhaustive menée par Agathangelidis *et al.* en 2012 compilant plus de 7000 séquences de LLC [435] permet la comparaison aux résultats obtenus par Boyd *et al.* en 2010 sur des lymphocytes B périphériques normaux de 12 donneurs sains [475]. Cette comparaison révèle une plus grande fréquence d'utilisation des gènes *IGHV1-2*, *IGHV1-69*, *IGHV3-7* et *IGHV4-34* dans la LLC (Figure 20). Les autres gènes fréquemment réarrangés du groupe VH3 (*i.e.* *IGHV3-21*, *IGHV3-23*, *IGHV3-30* et *IGHV3-74*) et du groupe VH4 (*i.e.* *IGHV4-39* et *IGHV4-59*) sont utilisés avec des fréquences identiques dans les cellules de LLC et les lymphocytes B normaux. Parallèlement au biais d'utilisation des gènes *IGHV*, certains réarrangements avec les gènes *IGHD* et *IGHJ* sont observés dans la LLC. Les gènes *IGHV1-69* et *IGHV1-2* sont souvent réarrangés avec les gènes *IGHD3-3* (30%) et *IGHD6-19* (23%) respectivement [435]. Les gènes *IGHV1-69* et *IGHV3-21* sont également souvent réarrangés avec le gène *IGHJ6* (56% et 70% respectivement) [435]. A l'inverse, les autres gènes *IGHV* fréquents tels que *IGHV3-7*, *IGHV3-23* et *IGHV4-34*, ne montrent pas de spécificités de réarrangement avec certains gènes *IGHD* ou *IGHJ* [435]. Les réarrangements des gènes *IGHV1-69* et *IGHV1-2* sont très fréquemment pas ou peu mutés (*i.e.* <2%) et les réarrangements des gènes *IGHV4-34*, *IGHV3-7* et *IGHV3-23* sont très fréquemment mutés.

Répertoire IGHV des B normaux d'après Boyd *et al.*, Journal of Immunology, 2010



Répertoire IGHV des B de LLC d'après Agathangelidis *et al.*, Blood, 2012

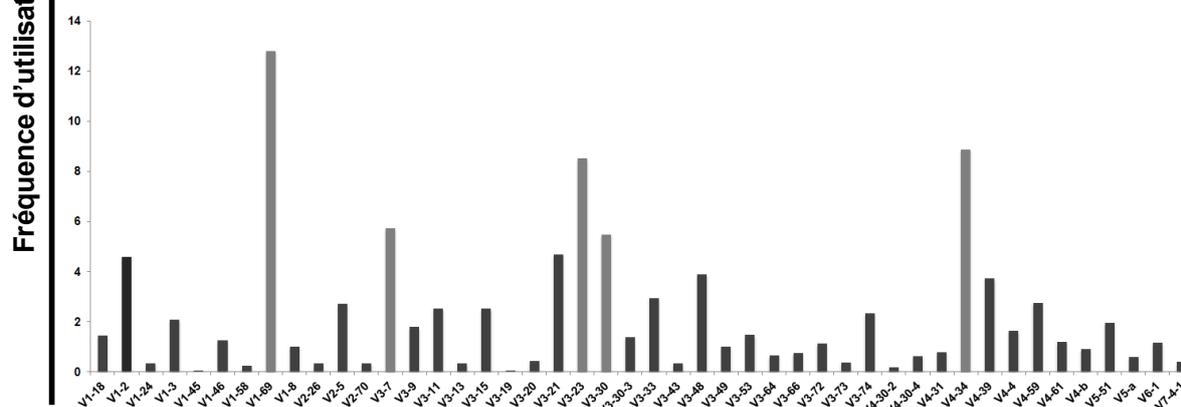


Figure 20 : Comparaison des répertoires IGHV des lymphocytes B normaux et des lymphocytes B de LLC.

La figure représente les fréquences de réarrangement des différents gènes IGHV dans les lymphocytes B normaux et les lymphocytes B de LLC tels que publiés dans les travaux de Boyd *et al.* (> 100000 séquences obtenues à partir de 12 volontaires sains, Boyd *et al.*, [475]) et d'Agathangelidis *et al.* (>7000 séquences de LLC, Agathangelidis *et al.*, [435]). Les barres grises identifient les gènes IGHV dont la fréquence est $\geq 5\%$ dans chaque groupe de lymphocytes B).

L'analyse des séquences d'immunoglobulines des cellules de LLC sur de grandes séries de patients a permis de mettre en évidence la présence de BCR stéréotypés. Le terme générique de BCR stéréotypé correspond à des séquences d'immunoglobulines dont les motifs hypervariables HCDR3 sont très proches du point de vue de la séquence en acides aminés. Deux BCR sont définis comme appartenant au même stéréotype si leur séquence en acides aminés du motif HCDR3 partagent 50% d'identité en acides aminés et 70% de

similarités basée sur les caractéristiques physicochimiques des acides aminés [435]. Les stéréotypes identifiés définissent des « subsets » identifiés par un numéro (ex. subset#1, subset#2, ...). Si on étudie plus fréquemment la séquence de la chaîne lourde de manière isolée, la définition complète d'un BCR stéréotypé implique également une chaîne légère qui répond aux critères de stéréotypie. La mise en évidence de BCR stéréotypés dans la LLC signifie que les cellules B clonales de plusieurs patients différents partagent un BCR presque identique, probablement à cause d'une pression de sélection par un antigène de structure très proche [467,476].

Il est désormais admis qu'environ un tiers des LLC présente un BCR stéréotypé [435,467,472,476–478] et que leur fréquence peut varier selon la zone géographique [479]. Il a été décrit plus d'une centaine de subsets. Agathangelidis *et al.*, ayant mené la plus large étude, a défini 19 subsets qualifiés de « majeurs » qui regroupent en fréquence 12% de tous les cas de LLC et 40% de tous les BCR stéréotypés décrits dans cette pathologie [435]. Les BCR stéréotypés sont plus fréquemment rencontrés dans les LLC non mutées. Certains de ces subsets sont associés à une valeur pronostique. Les données biologiques récentes ont permis de leur associer des anomalies cytogénétiques récurrentes et des mutations de gènes impliquées dans l'évolution du clone. Les principaux subsets impactant le pronostic sont répertoriés ci-après.

Subset#1 : constitué par le réarrangement de gènes *IGHV* du clan I (*i.e.* *IGHV1*, *IGHV5* et *IGHV7*) associé à une chaîne légère Kappa *IGKV1-39* [467]. Les LLC avec BCR stéréotypé du subset#1 présentent une fréquence élevée de *del(11q)* et de mutations de *NOTCH1*. Le subset#1 est associé à un mauvais pronostic.

Subset#2 : constitué par le réarrangement du gène *IGHV3-21* et du gène *IGHJ6*. Il est associé à une chaîne légère Lambda (*IGLV3-21*) [467]. La valeur péjorative de ce BCR stéréotypé sur le pronostic de la LLC est connu depuis plus de 10 ans [480]. Ce BCR fait exception puisque son taux de mutation est supérieur à 2% mais le pronostic associé est équivalent à celui des LLC non mutées. Les LLC avec BCR stéréotypé du subset#2 présentent une fréquence élevée de *del(13q)* isolée et de mutations de *SF3B1*.

Subset#4 : constitué par le réarrangement du gène *IGHV4-34* et une chaîne légère Kappa *IGKV2-30* [467]. Il est associé à une chaîne légère Kappa et à des LLC de phénotype IgG. Les LLC avec BCR stéréotypé du subset#4 ne présentent pas d'accumulation d'évènement génétique particulier. Ces cas de LLC sont de bon pronostic et touche fréquemment des patients plus jeunes.

Subset#8 : constitué par le réarrangement du gène *IGHV4-39*. Il est associé à une chaîne légère Kappa *IGKV1-39* [467] et également à un phénotype IgG des cellules clonales. Les LLC avec BCR stéréotypé du subset#8 présentent une fréquence élevée de trisomie 12 et de mutations de *NOTCH1* ou *FBXW7*. Le subset#8 est associé à un mauvais pronostic avec en particulier un risque de transformation (syndrome de Richter) évalué à 68% à 5 ans sur une série italienne de 2009 [481].

Subset#10, #28 et #59 : ces subsets moins fréquents présentent des caractéristiques proches de celles du subset#8.

Certains de ces stéréotypes ont pu être retrouvés dans des populations B normales [482]. Par exemple, des lymphocytes B avec les caractéristiques du subset#8 sont présents dans le sang de donneurs sains et leur nombre augmente avec l'âge [482]. L'analyse de Darzentas *et al.* montre que 80% des BCR « très » stéréotypés (*i.e.* groupes de BCR extrêmement homogènes définis par des algorithmes biostatistiques spécifiques) rencontrés dans la LLC reposent sur le réarrangement de seulement 6 gènes *IGHV* (*IGHV1-69*, *IGHV1-3*, *IGHV1-2*, *IGHV3-21*, *IGHV4-34* et *IGHV4-39*) et que, à l'exception des gènes *IGHV3-21* et *IGHV4-34*, ils sont tous non mutés. Cette observation est en faveur de l'hypothèse selon laquelle ces lymphocytes B fréquents et peu mutés sont issus d'une immunité « innée » [483]. Les auteurs identifient alors, sur la base de la stéréotypie des BCR, 2 groupes de LLC : (i) un groupe avec des BCR stéréotypés, le plus souvent non mutés, probablement en rapport avec des lymphocytes B « innés » et (ii) un groupe avec des BCR non stéréotypés, *i.e.* tous particuliers et uniques, le plus souvent mutés, vraisemblablement en rapport avec des lymphocytes post-centre germinatif. Cette analyse fait écho avec les hypothèses émises presque 10 années plus tôt selon lesquelles les LLC non mutées

pourraient être issus de lymphocytes B normaux CD5+ ressemblant aux lymphocytes B1 chez la souris. Ces lymphocytes B1 murins ont pour caractéristique d'être localisés essentiellement dans le péritoine, d'être souvent poly- ou autoréactifs et entrent dans le cadre de l'immunité innée [452].

7.4. La spécificité antigénique, BCR tonique et BCR autonome

Compte-tenu de la forte prévalence des BCR stéréotypés, l'hypothèse selon laquelle les cellules de LLC pourraient être stimulées par un ou des antigènes particuliers a été testée par plusieurs équipes. Il en ressort effectivement que les cellules de LLC produisent des anticorps autoréactifs et polyréactifs, capables de reconnaître en particuliers des antigènes exprimés par les corps apoptotiques [226]. Les auto-antigènes fréquemment retrouvés dans la littérature correspondent soit à des peptides du cytoquelette (vimentine, filamine, ...) ou des particules oxydées de lipoprotéines de faible densité (« low density lipoprotein » ou LDL). Ces auto-antigènes sont exposés lors de l'apoptose des cellules. Les mêmes études ont également retrouvé que les BCR des LLC sont également capables de reconnaître des antigènes bactériens (lipopolysaccharide, polysaccharide capsulaire). Les BCR des LLC non mutées sont très fréquemment polyréactifs vis-à-vis de ces antigènes. [484–486]. Il pourrait s'agir pour une partie d'entre eux de super-antigènes, capables de reconnaître le BCR par leurs régions FR et activer les cellules B quelque soit leur spécificité épitopique [226]. Ceci suggère une réponse immune de type T1-2 Btk-dépendante, peut-être en lien avec la grande efficacité clinique de l'ibrutinib (inhibiteur de Btk) discutée plus loin.

Les cellules de LLC présentent également un signal BCR « tonique ». Le signal tonique du BCR correspond à la transduction d'un signal par le récepteur en l'absence de ligand et en l'absence de mutation activatrices sur les co-récepteurs CD79A et CD79B [487]. Il a été retrouvé dans plusieurs études qu'il est possible de mettre en évidence la phosphorylation de cibles du BCR (Syk, Lyn, Erk, ...) en l'absence de stimulation du BCR [436]. Ce signal tonique du BCR a également été retrouvé dans les lymphocytes B CD5+ normaux chez l'homme [488].

Enfin, il a récemment été mis en évidence que certains BCR de LLC étaient capables de reconnaître par leur région hypervariable CDR3 un épitope spécifique localisé sur les régions non variables de la chaîne lourde du BCR. Ce motif localisé dans la région FR2 peut alors être reconnu par une molécule de BCR adjacente portant le CDR3 spécifique et donc activer le signal du récepteur. Cette modalité particulière de signalisation a été appelée signal « autonome » du BCR [489,490].

A notre connaissance et selon des résultats non publiés de notre équipe, il n'a pas été mis en évidence de mutations activatrices des domaines ITAM de CD79A et CD79B dans la LLC.

7.5. Structure et fonction de ZAP70 dans les lymphopathies B

ZAP70 (ζ -Associated-Protein of 70 kDa) est une protéine tyrosine kinase (PTK) décrite initialement dans les lymphocytes T et NK [491]. Elle est codée par un gène situé sur le chromosome 2 en position q12 et participe à la réponse du lymphocyte T vis-à-vis de l'antigène via son récepteur TCR spécifique (« T Cell Receptor »). ZAP70 est une protéine homologue de Syk avec laquelle elle partage 73% d'identité de séquence. Syk joue un rôle crucial dans la réponse du lymphocyte B à l'antigène via son récepteur, le BCR (B Cell Receptor), et forme avec ZAP70 une famille particulière de PTK : la famille Syk [492].

7.5.1. ZAP70, structure et régulation

ZAP70 présente une structure très proche de celle de sa protéine homologue Syk. Cette structure comporte donc 2 domaines SH2 (« Src Homology domain type 2 ») à son extrémité N-terminale, qui sont espacés par une région appelée interdomaine A. En position C-terminale se trouve le domaine kinase, et celui-ci est séparé du dernier domaine SH2 par une région régulatrice importante, l'interdomaine B (Figure 21). Chacun de ses domaines possède des particularités fonctionnelles revues par l'équipe de Au-Yeung [493].

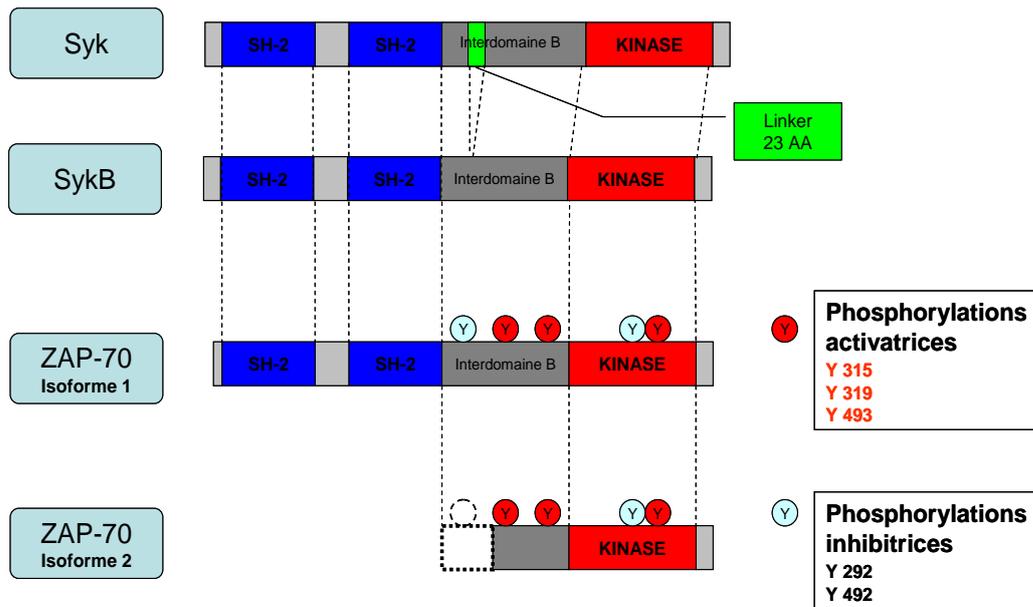


Figure 21 : Structure schématique des différents isoformes de ZAP70 et Syk.

Les cadres bleus représentent les domaines SH-2, le cadre rouge symbolise le domaine kinase. La région linker de 23 AA particulière à Syk est représentée par le cadre vert. Les principaux résidus tyrosines phosphorylés lors de l'activation sont indiqués par des ronds rouges pour les résidus activateurs et des ronds bleus pour les résidus régulateurs négatifs.

7.5.1.1. Les domaines SH2 :

Les domaines SH2 sont des structures comportant une poche de reconnaissance des résidus tyrosine phosphorylés. Ils sont responsables du recrutement de ZAP70 (et de Syk) sur les régions ITAMs (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ») situés aux extrémités distales intracytoplasmiques des homodimères CD3 ζ (composant transmembranaire du TCR). La séquence de ces ITAMs est un motif conservé [D/ExxYxxI/Lx₍₆₋₈₎YxxI/L] et lorsque le TCR lie le complexe antigène/CMH, des kinases de la famille Src, Lck et Fyn, phosphorylent les résidus tyrosines des ITAMs. Lorsque ces deux résidus tyrosines sont phosphorylés, le TCR peut alors recruter ZAP70. La disposition en tandem des 2 domaines SH2 de ZAP70 revêt une importance fonctionnelle particulière : l'espacement entre les 2 domaines constitue l'interdomaine A et correspond rigoureusement à l'espacement des 2 phosphotyrosines des ITAMs. Cette particularité garantit ainsi la spécificité de l'interaction. Cependant, la conformation de l'interdomaine A, constitué d'un motif en hélice α flexible,

est sujette à modification : dans la forme auto-inhibée de ZAP70, cet espacement n'est plus idéal et rend la double liaison impossible.

7.5.1.2. L'interdomaine B :

Cette région de ZAP70 comporte 3 tyrosines qui sont phosphorylées par Lck lors de l'activation du TCR. Ces résidus tyrosines permettent l'ancrage de protéines diverses sur ZAP70 qui joue ainsi un double rôle de PTK et de protéine adaptatrice pour activer les voies relais du signal du TCR.

La première tyrosine de l'interdomaine B est la tyrosine Y292. Les données expérimentales sur ce résidu tyrosine suggèrent qu'il joue un rôle de régulateur négatif de l'activité de ZAP70, cependant le mécanisme précis par lequel la tyrosine 292 phosphorylée diminue l'activité de ZAP70 n'est pas compris à ce jour. Les tyrosines 315 et 319 ont un rôle de régulateur positif de la fonction de ZAP70 et sont toutes deux phosphorylées par Lck après stimulation du TCR. En plus du rôle d'ancrage de protéines relais, la phosphorylation sur Y315 et Y319 bloque la conformation de ZAP70 dans sa forme activée en empêchant la protéine de revenir à sa forme auto-inhibée. Ainsi les tyrosines Y315 et Y319 semblent jouer un rôle de régulateur positif de ZAP70 avec une importance critique du site Y319.

7.5.1.3. Régulation du domaine kinase :

Le site kinase de ZAP70 est situé dans la partie C-terminale de la protéine. Il contient 2 résidus tyrosines, Y492 et Y493, situés sur la boucle d'activation du domaine. Ces résidus peuvent être phosphorylés par Lck ou par ZAP70 lui-même. Des études de mutants de ZAP70 ont mis en évidence leur rôle régulateur de l'activité du domaine kinase. En effet, le mutant Y492F présente une augmentation de l'activité kinase, alors que le mutant Y493F voit son activité très diminuée. Ces résultats suggèrent donc que le site Y492 joue le rôle d'un régulateur négatif de l'activité kinase et ZAP70, et le site Y493, d'un régulateur positif. Cependant, la phosphorylation en Y493 n'est pas le seul évènement permettant à la boucle d'activation d'adopter une conformation ouverte active.

7.5.1.4. Comparaison de ZAP70 et de Syk :

Bien que les deux PTK soit des protéines homologues et présentent un niveau assez élevé de redondance fonctionnelle, certaines particularités méritent d'être relevées.

Tout d'abord, les deux domaines SH2 de Syk présentent une poche de liaison aux phosphotyrosines dite « complètes », alors que le domaine SH2 N-terminal de ZAP70 est constitué d'une poche « incomplète » : sa liaison au second résidu tyrosine phosphorylé résulte d'une coopération complémentaire avec le domaine SH2 C-terminal qui vient compléter cette zone d'interaction [494]. Ensuite, le domaine SH2 C-terminal de Syk possède une charge positive supérieure à celle du domaine correspondant de ZAP70. Ces deux critères ont pour conséquence que les deux domaines SH2 de Syk présentent une affinité supérieure pour les régions ITAMs doublement phosphorylées [495].

L'interdomaine A de Syk est lui aussi composé d'un motif en hélice- α , cependant, des analyses cristallographiques comparées de ZAP70 et Syk montrent que ce domaine est beaucoup plus flexible pour Syk. La conséquence fonctionnelle est que l'interdomaine A de Syk présente un potentiel d'interaction, avec d'autres régions protéiques, supérieur à celui de ZAP70. En effet, l'interdomaine A interagit avec le domaine en hélice séparant les deux phosphotyrosines des régions ITAMs lorsque ces PTK y sont liées.

L'interdomaine B de Syk contient plusieurs résidus tyrosines phosphorylables lors de l'activation. Ces résidus constituent, parallèlement à ce qui a été décrit pour ZAP70, des points d'ancrage pour d'autres protéines.

Tyrosine 290 : ce résidu est situé dans l'insert de 23 acides aminés que seule la forme pleine taille de Syk possède. Des expériences réalisées avec un mutant Y290F montrent que ce résidu augmente l'activité de Syk mais ne constitue pas pour autant un point critique pour l'activation de la PTK.

Tyrosine 317 : elle correspond à la tyrosine 292 de ZAP70. L'expression dans des cellules B d'un mutant de Syk délété pour ce résidu montre une hyperactivation du BCR après stimulation.

Tyrosine 342 : elle correspond au résidu Y315 de ZAP70.

Tyrosine 346 : ce résidu est indispensable pour le recrutement des adaptateurs cytosoliques en aval de Syk. Le résidu correspondant sur ZAP70 est Y319, qui revêt aussi une importance cruciale pour l'activation du TCR.

Tyrosines 525/556 : elles sont situées dans la boucle d'activation du domaine kinase de Syk. Leur phosphorylation est essentielle pour l'activation de Syk et elles correspondent aux résidus Y492 et Y493 de ZAP70. Cependant, Syk peut activer ces résidus par autophosphorylation, ce que ne peut pas faire ZAP70 qui est dépendante des Src-kinases à ce niveau.

Notons enfin que Syk se différencie, en particulier, de ZAP70, par la présence dans son interdomaine B d'un insert de 23 acides aminés, le linker de 23 AA (Figure 21). Cet insert augmente l'affinité des domaines SH2 pour les phospho-ITAMs. Il a d'ailleurs été décrit un isoforme de Syk dépourvu de cet insert, SykB [496].

Au-delà des nombreuses similitudes observées entre ZAP70 et Syk, il apparaît donc que Syk est une PTK donc l'activation est beaucoup moins régulée de ZAP70. Cette particularité pourrait expliquer l'utilisation de Syk par beaucoup de types cellulaires différents et dans des voies de signalisation bien distinctes du BCR. Par comparaison, l'expression de ZAP70 est relativement restreinte au lignage lymphoïde.

7.5.1.5. Cas particulier de l'isoforme tronqué de ZAP70

L'isoforme 2 de ZAP70 (TZK) correspond à la région C-terminale de la forme pleine taille et présente une masse moléculaire de 36 kDa [497]. Le clivage intervient au niveau de la méthionine 308 et élimine les 2 domaines SH2 et la partie proximale de l'interdomaine B. Cet isoforme conserve donc les résidus tyrosines Y315 et Y319 de l'interdomaine B et

l'intégralité du domaine kinase, contenant 2 tyrosines régulatrices Y492 et Y493. Le rôle de variant est actuellement inconnu.

7.5.2. ZAP70 au cours de la lymphopoïèse B normale

L'expression de ZAP70 est décrite au cours de la lymphopoïèse B normale. Tout d'abord, il a été démontré, chez la souris, que ZAP70 intervient lors de la transition Pro-B/Pre-B au cours de la maturation des lymphocytes B [498]. Dans cette étude, un rôle redondant dans la signalisation du pré-BCR est décrit pour Syk et ZAP70. L'expression de ZAP70 a été ensuite démontrée chez l'homme jusqu'au stade pré-B précoce de la différenciation B normale [499]. Dans une autre étude menée par Crespo *et al.*, l'expression de ZAP70 a été retrouvée dans le contingent de progéniteurs B CD10+/CD19+/CD34+, avec un niveau d'expression inférieur à celui des lymphocytes T [500]. Les auteurs ont ensuite recherché l'expression de ZAP70 dans les lymphocytes B matures issus d'amygdales et du sang périphérique de volontaires sains par qRT-PCR et immunofluorescence. Aucun de ces compartiments n'a permis de mettre en évidence l'expression de ZAP70 dans les cellules B matures aux stades post-médullaires [500]. L'ensemble de ces données démontrent que ZAP70 est exprimé au cours des phases précoces de la lymphopoïèse B et participe au signal du pré-BCR avant d'être réprimé.

Cependant, d'autres études ont décrit l'expression de ZAP70 dans les lymphocytes B activés chez l'homme *in vivo* [501]. Dans l'étude de Cutrona *et al.*, l'ARNm de ZAP70 a été détecté uniquement dans la fraction des lymphocytes B activés CD38+ issus d'amygdales, mais pas dans les cellules B quiescentes périphériques [501]. L'expression de ZAP70 dans les lymphocytes B matures paraît être inductible *in vitro*, par une stimulation polyclonale avec diverses combinaisons de CD40L, IL4, IL6, IL10, IL15 ou CpG ODN [502]. Les travaux menés par Scielzo et son équipe viennent appuyer ces 2 dernières études [503]. Enfin, il a été décrit que l'activation du TLR9 par des GpC ODN induit la surexpression de ZAP70 par les lymphocytes B IgM+, via MyD88 et mTOR [504]. On peut noter que l'activation du BCR et du TLR2 n'a pas permis la surexpression de ZAP70 dans cette étude. Enfin, aucune corrélation n'a été révélée à ce jour entre l'expression de ZAP70 et le statut CD5+ du lymphocyte B.

7.5.3. ZAP70 et lymphopathies B

L'étude transcriptomique menée par Rosenwald *et al.* a été la première à démontrer que ZAP70 est anormalement surexprimé dans les LLC dont la séquence de la région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines (région IgVH) est non mutée [444]. L'expression de ZAP70 était connue jusqu'alors comme restreinte exclusivement aux lymphocytes T et NK [491].

La surexpression de ZAP70 a ensuite été recherchée dans l'ensemble des lymphopathies B. Les travaux de Sup *et al.* [505] et d'Admirand *et al.* [506] en 2004, Carreras *et al.* en 2005 [507] et Scielzo *et al.* en 2006 [503] ont recherché l'expression de ZAP70 par immunohistochimie (IHC) sur des coupes de ganglion infiltrés par des lymphomes B. Il apparaît ainsi que la LLC est l'hémopathie présentant la plus grande fréquence de surexpression de ZAP70, avec 47% de cas positifs en moyenne sur les 3 séries (Tableau 5). Les autres lymphomes B présentant une surexpression de ZAP70 sont essentiellement les lymphomes de Burkitt (30%) et les lymphomes à cellules du manteau (13%). Environ 2% seulement des lymphomes de la zone marginale et des lymphomes diffus à grandes cellules B dans ces 3 études. Enfin, 2 seuls cas de lymphome de Hodgkin (LH) ont été retrouvés positifs dans la série de Sup *et al.*

Les 2 principales hémopathies B concernées par la surexpression de ZAP70 sont donc la LLC et le lymphome de Burkitt.

| Pathologie | Sup <i>et al.</i> 2004 | | Admirand <i>et al.</i> 2004 | | Carreras <i>et al.</i> 2005 | | Scielzo <i>et al.</i> 2006 | |
|------------|------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| | nb cas total | nb cas positifs (%) | nb cas total | nb cas positifs (%) | nb cas total | nb cas positifs (%) | nb cas total | nb cas positifs (%) |
| LLC | 26 | 12 (46%) | 37 | 11 (30%) | 52 | 34 (65%) | 38 | 18 (47%) |
| MCL | 6 | 1 (17%) | 39 | 5 (13%) | 36 | 3 (8%) | 4 | 2 (50%) |
| Burkitt | 6 | 0 (0%) | 12 | 1 (8%) | 31 | 9 (31%) | | |
| DLBCL | 76 | 4 (5%) | 26 | 0 (0%) | 42 | 1 (2%) | 6 | 2 (33%) |
| ZML | 22 | 0 (0%) | 42 | 1 (2.4%) | 23 | 1 (4%) | 27 | 5 (19%) |
| FCL | 40 | 0 (0%) | 21 | 0 (0%) | 19 | 0 (0%) | 15 | 5 (33%) |
| LPL | 5 | 0 (0%) | 10 | 0 (0%) | | | | |
| MM | | | 10 | 0 (0%) | | | 20 | 4 (20%) |
| LH | 136 | 2 (1.5%) | 16 | 0 (0%) | 14 | 0 (0%) | | |
| LAL-B | 24 | 7 (29%) | 6 | 5 (83%) | 7 | 2 (29%) | 2 | 2 (100%) |

Tableau 5 : Fréquence observées de l'expression de ZAP70 dans les lymphopathies B.

Le tableau reprend les résultats de l'étude de l'expression de ZAP70 par immunohistochimie dans les lymphopathies B de 4 séries indépendantes publiées [503,505–507]. Pour chaque série, la première colonne rend compte du nombre total de cas étudiés et la colonne de droite indique le nombre de cas positifs retrouvé. La proportion en % est indiquée entre parenthèses.

7.5.3.1. Cas particulier des leucémies aigues lymphoïdes B

L'expression de ZAP70 a aussi été retrouvée dans environ 40% des cas de leucémies aigues lymphoïdes B (LAL-B) [499,503,505–507]. Selon la classification du stade de maturation des LAL-B de l'EGIL (« European Group of Immunophenotyping of Leukemia ») représentée dans le Tableau 6 [508], les LAL-B les plus immatures (BI et BII) présentent la plus grande fréquence d'expression de ZAP70 [500,509], ce qui est cohérent avec leur contrepartie normale. Un travail récent a également testé la surexpression de ZAP70 et de Bcl2 pour différencier les lymphoblastes B des hématogones lors du suivi des patients atteints de LAL-B. Cependant, seulement 7/23 (30%) patients présentaient une surexpression de ZAP70 par rapport aux hématogones dans cette étude, avec des variations importantes au cours du traitement et entre les blastes circulants ou médullaires [510].

| EGIL | cyCD79a, CD22, CD19 | CD10 | cyIgM | sIg |
|--------------------------|--------------------------------|-------------|--------------|------------|
| BI (pro B) | + | - | - | - |
| BII (commune) | + | + | - | - |
| BIII (pré B) | + | + | + | - |

Tableau 6 : Classification des LAL-B selon l'EGIL.

La classification des LAL-B selon l'EGIL distingue les LAL-BI à III selon le stade de maturation grâce à l'expression différentielle des marqueurs CD79a intracytoplasmique (cyCD79a), CD22, CD19, CD10, chaîne μ intracytoplasmique (cyIgM). (European Group of Immunophenotyping of Leukemia) [508].

7.5.4. ZAP70 en tant que facteur pronostic de la LLC

La LLC est la seule pathologie pour laquelle le statut ZAP70 est validé comme facteur pronostic. La publication initiale menée par Crespo *et al.* avait révélé que l'expression de ZAP70 était corrélée à plus 90% (32/35) avec le statut IgVH non muté [445]. Ces résultats ont été confirmés par les autres équipes même si les taux de discordance pouvaient varier.

Au regard du temps écoulé avant traitement (TTFT : « Time To First Treatment »), il était d'abord apparu que ZAP70 pourrait être un meilleur marqueur du mauvais pronostic que le statut non muté du locus IgVH (HR=4,9 et 2,5 respectivement) [450,511]. Une étude ultérieure réalisée sur 1229 patients en analyse multivariée a mis en évidence que l'expression de ZAP70 et de CD38 en cytométrie en flux sont les 2 facteurs pronostiques corrélés de façon indépendante au TTFT [512]. Une autre étude réalisée après un suivi prolongé de 262 patients de stade A a démontré que le statut IgVH non muté, ZAP70 et CD38 sont 3 facteurs de risque indépendants en analyse multivariée influençant le TTFT et un système de score prenant en compte indépendamment ces 3 facteurs permettait de classer les patients à faible risque (aucun facteur péjoratif, HR=1), à risque intermédiaire (1 facteur péjoratif, HR=2,8) et à haut risque (2 ou 3 facteurs péjoratifs, HR=8,0) [513]. La discrimination de ces 3 groupes de patients est statistiquement significative et corrélée avec

une analyse transcriptomique qui retrouve des profils différents pour chacun des groupes [513].

7.5.5. Rôle fonctionnel de ZAP70 dans la LLC-B

Il a été suggéré que ZAP70 peut être activée dans le lymphocyte B immature et participer à la transduction du signal via le BCR [498]. Son expression ectopique dans les lymphocytes B matures de la LLC rend donc légitime la question de son implication physiopathologique dans ce lymphome. Trois mécanismes principaux sont à ce jour décrits : potentialisation du signal du BCR, activation de Hsp90 (« Heat Shock Protein of 90 kDa ») et potentialisation de la réponse aux signaux de migration des chemokines.

7.5.5.1. Potentialisation du signal du BCR

Les travaux initiaux sur l'impact fonctionnel de ZAP70 sur la signalisation du BCR ont été réalisés par la même équipe californienne de TJ Kipps *et al.* Tout d'abord, les cellules de LLC exprimant ZAP70 seraient plus sensibles à la stimulation du BCR que les cellules ZAP70 négatives, indépendamment du statut mutationnel du locus IgVH et malgré un niveau d'expression de Syk identique [514]. Après pontage de l'IgM de surface, ZAP70 est phosphorylée et peut être co-immunoprécipitée avec Syk et CD79b [514]. La transfection de cellules de LLC ZAP70 négatives avec un vecteur ZAP70 permettait d'augmenter le signal du BCR ce qui était révélé par une augmentation de la phosphorylation de Syk, BLNK et PLC γ , une augmentation du signal calcique et une potentialisation de l'activation de NF- κ B [515]. L'expression de ZAP70 par les cellules de LLC permettrait donc une signalisation plus efficace du BCR IgM et pourrait expliquer le caractère plus agressif des LLC ZAP70 positives.

La même équipe a ultérieurement démontré par transfection de variants mutés de ZAP70 que l'augmentation du signal du BCR est indépendante de sa fonction kinase [516]. De même, un mutant Y292F (site d'ancrage de Cbl) permet lui aussi l'augmentation du signal BCR, suggérant que la liaison de Cbl sur ZAP70 n'est pas un facteur limitant de la transduction du signal dans les LLC [516]. A l'inverse, les domaines SH2 de ZAP70 étaient indispensables à son action sur le BCR, mettant en évidence que cette PTK doit être recrutée

au sein du signalosome proximal du BCR pour agir. Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle ZAP70 favorise la transduction du signal du BCR des cellules de LLC en jouant le rôle d'une protéine adaptatrice [516]. Une équipe indépendante a montré par ailleurs que ZAP70 était très peu phosphorylé après stimulation du BCR des cellules de LLC par rapport à Syk, un autre argument pour un mode d'action de ZAP70 très différent de celui initialement décrit dans la réponse au TCR [517]. Enfin, des expériences de transfection de ZAP70 dans des cellules de lymphome de Burkitt de la lignée BJAB ont par ailleurs permis de démontrer que ZAP70 prolonge le signal du BCR en diminuant son internalisation post-stimulation [517].

7.5.5.2. Activation de Hsp90

Hsp90 est une protéine chaperonne impliquée dans plusieurs types de cancers. Dans sa forme active elle stabilise, de façon ATP-dépendante, certains oncogènes référencés comme ses « clients » : récepteurs aux hormones stéroïdes, MAPK, Akt ou des formes mutantes de p53 entre autres [518].

Il a été mis en évidence que les cellules de LLC ZAP70 positives expriment une forme active de Hsp90 qui n'est pas retrouvée dans les LLC ZAP70 négatives [519]. Dans cette étude de Castro *et al.*, le traitement des cellules par un inhibiteur de Hsp90 (17-AAG ou 17-DMAG, dérivés de la geldanamycine) induit spécifiquement l'apoptose des LLC ZAP70 positives. Les inhibiteurs de Hsp90 insuivaient le clivage de PARP-1 et la baisse du niveau d'expression de ZAP70 dans les cellules sensibles. Cette baisse d'expression de ZAP70 n'était pas retrouvée lorsque l'apoptose était induite par la fludarabine, indiquant qu'il s'agit probablement d'un mécanisme spécifique. Enfin, la transfection de cellules de LLC ZAP70 négatives avec un vecteur ZAP70 pouvait induire l'expression de la forme active de Hsp90 et rendait les cellules sensibles au 17-AAG ou 17-DMAG [519].

Ces résultats suggèrent que ZAP70 peut induire l'activation de Hsp90, que ZAP70 pourrait être un « client » de Hsp90 et que Hsp90 protège les cellules de LLC ZAP70 positives de l'apoptose. La question d'autres oncogènes en aval de Hsp90 se pose également.

7.5.5.3. Potentialisation de la réponse aux cytokines

Les cytokines sont des médiateurs biochimiques très diversifiés et impliqués, entre autres, dans les phénomènes de migration cellulaire (chimiotactisme) et de « homing » (recrutement cellulaire dans un microenvironnement particulier). Elles peuvent également dispenser aux cellules cibles des signaux de survie.

Il a été démontré que les cellules de LLC ZAP70 positives surexpriment CCR7 à leur surface (récepteur des cytokines CCL19 et CCL21 qui recrutent les lymphocytes B dans le ganglion lymphatique après la rencontre avec l'antigène) [520]. Dans les cellules ZAP70 positives, la réponse à la stimulation du CCR7 était également potentialisée [520]. De plus, ces mêmes cellules montrent une sensibilité accrue au CXCL12, appelé aussi SDF1, cytokine impliquée dans le homing des cellules au sein de la niche stromale. La stimulation par le CXCL12 induisait une prolongation de la phosphorylation de Erk et de la survie globale en culture *ex vivo*. Ces phénomènes étaient partiellement abolis par un inhibiteur de MEK (PD98059) [520]. Une seconde étude a aussi révélé une hypersensibilité au CXCL12 dans le groupe des LLC ZAP70 et CD38 positives [163]. Les mêmes conclusions ont été retrouvées *in vitro* lorsque des cellules de lignée de type Burkitt étaient transfectées avec ZAP70 [78]. *In vivo*, lorsque des cellules de lignée Burkitt étaient injectées dans des souris immunodéficientes NOD/SCID, la surexpression de ZAP70 favorisait significativement l'infiltration médullaire ou des organes lymphoïdes chez ces animaux [521,522].

Cette sensibilité particulière des cellules ZAP70 positives à ces signaux de survie et de migration pourrait renforcer le caractère agressif de ces LLC.

7.5.6. Conséquences sur les tests *in vitro* de prolifération et l'apoptose :

La relation directe entre ZAP70 et le BCR tant en physiologie qu'en pathologie, et l'implication importante de la génétique du locus IgVH dans le pronostic de la LLC, font de la question du devenir de la cellule après pontage du BCR un point d'intérêt particulier. En effet, les tests fonctionnels permettent-ils de relier le BCR, ZAP70 et la régulation de l'apoptose ou de la prolifération ?

La première étude publiée par Nédellec *et al.* en 2005 sur la réponse à la stimulation du BCR et le statut ZAP70 a été réalisée à partir de cellules B triées issues de 41 patients [523]. La stimulation du BCR a été réalisée par culture des cellules dans des puits dont les parois ont été « coatées » avec un Ac anti-rabbit-F(ab')₂. Un rabbit F(ab')₂ anti-human IgM a ensuite été rajouté au milieu à 10 µg/ml. Ce mode de stimulation est très intense puisque le coating des puits va permettre un pontage à grande échelle des BCR à la surface des cellules. Au final, cette méthode a permis aux auteurs de classer les LLC en 3 groupes. Dans le groupe I, les cellules sont restées inertes, dans le groupe II les cellules ont réagi à la stimulation. Le groupe II se sépare en IIa dans lequel la stimulation a induit la prolifération des cellules de LLC-B, et dans le groupe IIb les cellules se sont engagées vers l'apoptose. Dans cette étude, le groupe I aréactif était constitué des LLC CD38-/ZAP70-, le groupe IIa prolifératif concernait des cellules exprimant modérément CD38 et ZAP70, et le groupe IIb regroupait des cellules exprimant fortement CD38 et ZAP70. Les auteurs ont interprété l'apoptose massive des cellules ZAP70 positives par le fait que seule une forte stimulation du BCR pourrait avoir un effet délétère [524], ce qui a été rendu possible par ZAP70.

La même année, l'équipe de Petlikowski *et al.* publiait aussi une étude de stimulation du BCR de cellules primaires de LLC (PBMC totaux) [525]. Deux stimulations du BCR ont été comparées : stimulation par un anticorps anti-IgM soluble à 10 µg/ml et la stimulation par un anti-IgM immobilisé sur des billes. La stimulation soluble a induit l'apoptose dans les LLC mutées et non mutées (assimilables au statut ZAP70 négatif et ZAP70 positif). Ce phénomène a été relié à une activation de Akt, Erk, PLCγ2 mais pas de NFκB, JNK, ni p38 MAPK. Cette activation incomplète est plus marquée pour les LLC mutées. D'un autre côté, la forte stimulation provoquée par l'anti-IgM immobilisé n'a pas induit d'apoptose et a permis une meilleure activation des voies de signalisation en aval du BCR, et, de plus, elle a été la seule à procurer une protection vis-à-vis de la fludarabine via une induction de Mcl-1 PI3K-dépendante. Dans cette étude, il n'y avait pas de différence significative entre les LLC mutées et non mutées et une faible activation du BCR induisait l'apoptose alors que stimulation intense favorisait la survie cellulaire.

Un résultat similaire a été retrouvé en 2009 par l'équipe de Gobessi *et al.* La stimulation du BCR de cellules B triées de LLC par un anticorps immobilisé prévenait l'apoptose *in vitro* probablement par la surexpression de Mcl-1. Cette protection était abolie par l'inhibiteur de Syk R406 (métabolite actif du fostamatinb) mais aucune corrélation entre la sensibilité au R406 et le statut ZAP70 n'a été mise en évidence dans cette série [526].

Enfin, une dernière étude fonctionnelle sur la stimulation *in vitro* du BCR des cellules primaires de LLC confirme en partie les résultats de Nédellec et de Petlickovski. Deglesne *et al.* a montré qu'une stimulation faible par un Ac anti-IgM soluble induit l'apoptose des LLC mutées et non mutées, par contre, la stimulation par un anticorps immobilisé (plaque 96 puits coatée) distinguait des LLC « non répondeuses » et des LLC montrant une diminution de l'apoptose [527]. Au regard de l'expression de ZAP70 dans cette série, 90% (18/20) des cellules exprimant ZAP70 étaient retrouvées dans le contingent des LLC qui répondent positivement à la stimulation du BCR. Toutefois, 44% des LLC qui réagissaient *in vitro* (14/32) n'exprimaient pas ZAP70. Ces résultats, obtenus à partir de cellules B triées, suggèrent donc que ZAP70 n'était pas indispensable à l'hyperréactivité du BCR.

Il apparaît donc que les tests fonctionnels de prolifération et d'apoptose après stimulation du BCR sur les cellules primaires de LLC présentent une certaine hétérogénéité dans la littérature. Les différences entre les anticorps utilisés et les modes de stimulation sont sans doute à l'origine de cette observation.

Au final, 3 études ont démontré qu'une stimulation faible du BCR par un anti-IgM soluble induit l'apoptose de l'ensemble des cellules primaires de LLC [525,527,528]. Une seule a mis en évidence une prolongation de la survie sous cette stimulation, potentialisée par CD40 [529]. Les tests fonctionnels publiés ne permettent donc pas clairement de conclure sur le rôle de ZAP70 dans le contrôle de l'apoptose et de la prolifération cellulaire vis-à-vis de la réponse au BCR. Ces données de la littérature seront discutées avec nos résultats expérimentaux propres.

8. Synthèse brève

La LLC est une maladie fréquente qui touche essentiellement les personnes âgées. De part les effets conjugués du vieillissement de la population et de la plus grande systématisation des dépistages, la prévalence de cette hémopathie toujours incurable tend à augmenter. Ce constat pose, plus encore qu'hier, la question de la bonne gestion des traitements appliqués, tant en termes de bénéfice sur la morbimortalité que de pharmac-économie, puisque les patients peuvent vivre avec leur maladie pendant de très nombreuses années.

La compréhension de la physiopathologie de la LLC revêt ainsi un enjeu important. En particulier, nous savons désormais que ce syndrome lymphoprolifératif évolue probablement à partir d'une phase préclinique (MBL CLL-like) à partir de laquelle environ 1% des personnes atteintes développent une authentique LLC chaque année.

Nous avons vu que les cellules tumorales sont particulièrement dépendantes des signaux perçus depuis leur microenvironnement. A titre d'exemple, la stimulation chronique du BCR semble être un élément clé dans le développement du clone. Après avoir fait preuve de leur grande efficacité clinique, de nouvelles molécules inhibant les voies de signalisation de ce récepteur, l'ibrutinib et l'idelalisib, ont d'ailleurs obtenu récemment une AMM aux Etats-Unis et seront très prochainement disponibles en France.

Au plan diagnostique, la LLC revêt une grande homogénéité : il s'agit d'un syndrome lymphoprolifératif B chronique associant une polyadénopathie indolente et une accumulation progressive de petits lymphocytes matures présentant des « clés phénotypiques » précises, reprises dans le calcul du score de Matutes.

Les données moléculaires de la cellule tumorale de LLC, acquises depuis les années 2000, bouleversent cette apparente homogénéité. Au-delà de la dichotomie du statut mutationnel du locus IgVH ou de la surexpression de ZAP70, il est désormais possible d'individualiser des groupes de patients aux caractéristiques propres sur la base des données immunogénétiques (BCR stéréotypés), cytogénétiques (délétions p53, ...) et génétiques

(mutations *BIRC3*, *SF3B1*, *NOTCH1*, ...). En exemple, comme nous l'avons vu, l'expression du BCR stéréotypé *IGHV3-21* (subset#2) est fréquemment associée aux mutations du gène *SF3B1* et ces formes de LLC progressent rapidement malgré un statut IgVH muté de bon pronostic.

Ainsi, malgré une présentation clinique et biologique assez uniforme, la LLC apparaît très hétérogène au plan moléculaire, avec certainement des histoires naturelles différentes selon les patients. Prendre en compte cette hétérogénéité conduira certainement à définir de nouvelles thérapies ciblées.

PROBLEMATIQUE

ET OBJECTIFS

III. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Le CHU de Limoges présente un recrutement relativement important de patients atteints de LLC avec environ 100 nouveaux diagnostics par an. Depuis 2005, les cas de LLC sont documentés de manière exhaustive sur le plan biologique. Chaque dossier regroupe les données cytologiques (description des atypies), les données immunophénotypiques incluant plus récemment la surexpression de ZAP70, une cytogénétique complète avec un caryotype conventionnel et la recherche par FISH ou QMPSF des anomalies principales et une étude moléculaire du statut mutationnel IgVH. Un travail d'archivage systématique du matériel biologique a été réalisé au sein de la tumorothèque/cellulothèque TUMOLIM labellisée INCa et IBISA correspondant à des culots secs et des cellules conservées en DMSO. En parallèle, nous collaborons étroitement avec l'Unité de Recherche Clinique en Hématologie (URCH) du CHU, permettant ainsi un accès aux données cliniques pertinentes. Ainsi, la collection de prélèvements issus de patients atteints de LLC est complètement annotée.

Dans ce contexte, nous avons initié au sein de l'UMR CNRS 7276 un travail de recherche sur la LLC. Notre objectif était d'aborder la problématique de l'hétérogénéité des patients en explorant les paramètres biologiques susceptibles d'influencer l'évolution précoce de la maladie. Parmi les multiples axes de recherche possibles, notre travail s'est articulé autour de 3 caractéristiques de la LLC : la fragilité cellulaire, la sécrétion d'une immunoglobuline et la surexpression de ZAP70.

MATERIELS

ET METHODES

IV. MATERIELS ET METHODES

(Hors ceux exposés dans les articles publiés)

1. Cultures cellulaires et stimulation du BCR :

1.1. Lignées cellulaires :

Les lignées BL2 et BL41 sont des lignées de lymphome de Burkitt non infectées par le virus Epstein-Barr (EBV). Ces lignées présentent la translocation t(8;14), caractéristique des lymphomes de Burkitt et à l'origine de la surexpression constitutive de l'oncogène c-Myc. De plus, elles expriment une immunoglobuline de surface de type IgM. Les cellules BL2 et BL41 se différencient essentiellement par leur statut p53 : la lignée BL2 exprime une protéine p53 sauvage (phénotype p53WT pour « wild-type ») et la lignée BL41 une protéine p53 mutée sur son site de fixation à l'ADN (phénotype p53^{R248Q}). Il s'agit d'une mutation ponctuelle qui aboutit au remplacement du résidu arginine en position 248 par un résidu glutamine. Cette protéine p53 mutée peut être phosphorylée et se tétramériser mais demeure transcriptionnellement inactive.

Les transfections cellulaires ont été réalisées en phase exponentielle de croissance par électroporation. Le système de nucléofection Amaxa a été utilisé avec le tampon V et le programme R013 pour les deux lignées (Amaxa, Köln, Germany).

1.2. Cellules primaires de LLC

Le recueil de cellules primaires a été réalisé à partir de reliquats de prélèvement sanguins adressés au laboratoire d'hématologie du CHU Dupuytren après accord du comité d'éthique de notre institution.

Les cellules mononuclées périphériques (PBMC) ont été isolées par centrifugation en gradient de densité (MSL) (Eurobio, Courtaboeuf, France) et reprises à la concentration de 10^6 cellules par ml de milieu de culture.

1.3. Culture cellulaire et pontage du BCR

Les cultures cellulaires ont été réalisées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL-Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) additionné de : 10% de sérum de veau fœtal (Clontech, Palo Alto, CA, USA) décomplémenté 30 min. à 56°C, 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, d'acides aminés et de vitamines non essentiels (tous fournis par Gibco BRL-Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Les cellules ont été maintenues en culture à 37°C, en atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂.

Le pontage du BCR a été réalisé par ajout dans le milieu de culture d'un fragment F(ab')₂ de chèvre anti- IgM humain soluble à la concentration finale de 10 µg/ml (SouthernBiotech, AL, USA).

1.4. Révélation du BCR tonique par le pervanadate

Le signal tonique du BCR (*i.e.* sans ligand) a été révélé selon la méthode publiée par Griffin *et al.* [488]. Brièvement, 100µl d'une solution de pervanadate à 30mM a été préparée extemporanément à partir d'une solution mère d'orthovanadate 100mM (17µl) additionnée de peroxyde d'hydrogène 3% (6µl) et de PBS 1X (qsp 100µl). La solution a été incubée 5 à 10 min. dans l'obscurité avant utilisation. La stimulation était de 5 min. avec une concentration finale de pervanadate de 50µM.

2. Cytométrie en flux :

2.1. Quantification de l'apoptose :

Les cellules ont été préalablement lavées et reprises dans 100 µl de tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) additionné de Ca^{2+} et Mg^{2+} (Gibco BRL-Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) préalablement refroidi à 4°C. 5 µl d'annexine V marquée par la FITC (BD Bioscience, NJ, USA) a été ajouté aux cellules et incubé pendant 15 min. dans la glace. La suspension a ensuite été diluée par 400 µl de PBS Ca^{2+} + Mg^{2+} pour analyse par cytométrie en flux (FacsCalibur, Becton-Dickinson, NJ, USA). 1 µl d'iodure de propidium (IP) (Invitrogen, CA, USA) a été rajouté juste avant l'analyse comme marqueur de l'intégrité membranaire.

2.2. Marquage intracytoplasmique de ZAP70:

La mesure du niveau d'expression de ZAP70 a été réalisée selon la méthode du ratio isoclonique développée et publiée par notre équipe [447]. Brièvement, le marquage est réalisé sur le sang total ou les lignées en suspension dans 2 tubes séparés : 1 contrôle isoclonique + 1 tube « test ». Dans le tube contrôle isoclonique, les sites spécifiques de fixation de l'anticorps monoclonal (mAb) anti-ZAP70 (clone SBZAP, Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) ont préalablement été saturés par un excédent d'Ac SBZAP non marqué, permettant de mesurer la fluorescence non spécifique de l'Ac SBZAP-PE. Le fenêtrage est réalisé grâce au co-marquage du CD45, CD5 et CD19.

3. Explorations protéiques :

3.1. Extraction des protéines :

Les cellules ont été préalablement lavées 2 fois dans du tampon PBS froid (Eurobio, Ullis, France). L'extraction a ensuite été réalisée avec 20 µl de tampon RIPA pour 10^6 million de cellules (Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA), additionné, selon les recommandations

du fournisseur, d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (orthovanadate de sodium, cocktail d'inhibiteur de protéase et fluorure de phenylméthanesulfonyl). Les tubes ont été incubés 30 min. sur la glace avec une agitation toutes les 5 à 10 minutes. Une centrifugation à 12500g pendant 15 min. a ensuite été réalisée à 4°C pour culotter les débris membranaires. La concentration en protéines a ensuite été mesurée par dosage spectrofluorimétrique avec un réactif dérivé de la méthode de Bradford (Biorad protein assay, Biorad, CA, USA) selon les recommandations du fournisseur. Les extraits ont alors été conservés à -20°C.

Les extractions ne nécessitant pas la révélation de phosphoprotéines furent réalisées par 20 µl de tampon Laemli + β-mercaptoéthanol (Biorad, CA, USA). Les extraits ont été brièvement soniqués, incubés 30 min. dans la glace avec agitation toutes les 5 à 10 minutes puis conservés à -20°C.

3.2. Western-blot :

20 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits après dilués au demi dans du tampon Laemli + β-mercaptoéthanol qui sert de tampon de charge. Un volume équivalent à 10⁶ de cellules a été déposé pour les extraits réalisés directement au tampon Laemli. Les extraits n'ont pas été portés à ébullition. La séparation électrophorétique des protéines a été réalisée sur gel de polyacrylamide 8% en conditions dénaturantes (technique SDS-PAGE). Le transfert a été effectué sur membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) préalablement activée par l'éthanol. Les membranes ont ensuite été saturées à température ambiante pendant 1h dans du tampon TTBS + lait 5% w/v (TRIS Buffered Saline + Tween-20 1%, Biorad, CA, USA).

Les anticorps primaires ont été utilisés au 1/1000^{ème} dans du lait 5% TTBS ou au 1/500^{ème} dans du tampon TTBS + 5% de BSA (Bovine Serum Albumine, Euromedex, Mundolsheim, France) pour les anticorps dirigés contre les phosphoprotéines. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : serum polyclonal de lapin anti-ZAP70 (Upstate Biotechnology, NY, USA) ; anti-Syk polyclonal de lapin, clone N-19 ; anti-phospho Syk (Tyr525/526) polyclonal de lapin (Cell Signalling, MA, USA) ; anti-phospho Erk p44/p42 MAPK (Thr202/Tyr204)

monoclonal de lapin, clone 20G11 ; anti-Erk p44/p42 MAPK monoclonal de souris, clone L34F12 ; anti- α -tubuline monoclonal de souris, clone B5.2.1 (Sigma Aldrich, MO, USA).

Les anticorps secondaires marqués par la HRP (HorseRadish Peroxydase) utilisés dilués au 1/5000^{ème} dans du lait 5% TTBS (Ac de chèvre anti-IgG de souris ou Ac de chèvre anti-IgG de lapin, BioRad, Ca, USA). Les révélations sont réalisées avec le kit de chimioluminescence ECL-Plus (GE-Healthcare, Buckinghamshire, UK) selon les recommandations du fournisseur.

3.3. Mesure de la phosphorylation de ZAP70 (Y319) par ELISA

La détection et le niveau de phosphorylation de la tyrosine 319 de ZAP70 a été réalisée par technique ELISA commerciale PathScan® Phospho-Zap-70 (Tyr319) Sandwich ELISA kit selon les recommandations du fournisseur (Cell Signalling, MA, USA).

4. Biologie moléculaire :

4.1. Préparation des acides nucléiques :

L'ADN a été extrait à partir de 10^6 cellules et purifié sur colonne (DNA Blood, Qiagen, Germany) selon les recommandations du fournisseur. L'ARN a été extrait à partir de 10^7 cellules préalablement lavées dans du PBS froid. Le culot cellulaire a été repris dans 1 ml de tampon TRIzol (Ambion, Life-Technologies, Carlsbad, CA, USA). Après extraction par le chloroforme, l'ARN a été purifié sur colonne de silice (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Germany). Les ADNc (ADN complémentaires) ont été obtenus par reverse-transcription (RT) à partir de 1 μ g d'ARN à l'aide du kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem, Carlsbad, CA) et les amorces random hexamères fournies.

4.2. PCR, RQ-PCR et séquençage

Les amplifications par PCR pour le clonage ont été réalisées avec le kit Accuprime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity.

Les réactions de qRT-PCR ont été réalisées à partir des ADNc avec les sondes de type Taqman (marquées FAM - TAMRA). Le gène c-Abl a été choisi comme référence pour la quantification relative (Applied Biosystem, Hs00245443_m1). La qRT-PCR a été réalisée en duplicate avec 50ng d'ADNc par puits. Le témoin utilisé pour calculer les $\Delta\Delta C_t$ est de l'ADNc de lymphocytes totaux issu d'un pool d'échantillon sanguin de volontaires sains. Les taux d'expression relatif (TER) sont calculés selon la formule : $TER = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les PCR en temps réel ont été réalisées sur l'appareil ABI Prism 7000 (Applied Biosystem).

Le séquençage a été réalisé selon la méthode des didéoxynucléotides de Sanger. La réaction d'amplification unidirectionnelle a été réalisée avec le kit Big Dye Terminator v1.1 et analysé sur le séquenceur 16 capillaires 3130 XL genetic analyzer (Applied Biosystem).

4.3. Clonage dans le vecteur pcDNA3

4.3.1. Cultures bactériennes

Les cellules Escherichia coli des souches TOP10 et DH5 α (Invitrogen, CA, USA) ont été utilisées pour cloner et amplifier des vecteurs d'intérêt. Ces souches bactériennes sont chimio-compétentes. Leur culture a été réalisée à 37°C dans du milieu LB Broth liquide sous agitation ou bien sur milieu gélosé LB Agar (tous deux fournis par Invitrogen, CA, USA). L'ampicilline a été additionnée à 100 μ g/ml aux milieux de culture pour sélectionner les clones recombinants. La transformation des bactéries a été réalisée selon les recommandations du fournisseur.

4.3.2. Vecteur pCR2.1 TOPO TA Cloning (Invitrogen)

Ce vecteur plasmidique de 3.9 kb possède le gène de résistance à l'ampicilline AmpR et le site d'insertion de l'ADN d'intérêt est situé à l'intérieur du gène codant pour la β -galactosidase. Cette enzyme permet à la bactérie de dégrader le X-Gal (composé déposé extemporanément sur la gélose) en un métabolite bleu. Ainsi, seules les colonies blanches ont amplifié un vecteur avec un insert.

4.3.3. Vecteur pcDNA3

Le vecteur pcDNA3 est un vecteur d'expression eucaryote de 5.5kb. IL possède un promoteur fort en 3' de la zone d'insertion (promoteur issu du virus CMV), un site multiple de clonage, un gène de résistance à la néomycine et le gène AmpR de résistance à l'ampicilline. Ce vecteur peut être utilisé en transfection transitoire ou en transfection stable après insertion au hasard dans le génome des cellules cibles.

4.3.4. Réactions enzymatiques et purification d'ADN utiles au clonage

Les enzymes de restriction, la phosphatase alcaline CIP (Calf Intestinal Phosphatase), le fragment Klenow de l'ADN polymérase I et la T4 DNA Ligase proviennent de New-England Biolabs. Ces enzymes ont été utilisées selon les recommandations des fournisseurs. La purification sur gel a été réalisée avec le kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen), les minipréparations d'ADN plasmidique avec le kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) et les maxipréparations avec le kit NucleoBond plasmid purification AX500 (Macherey-Nagel).

RESULTATS

V. RESULTATS

Nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes biologiques qui contrôlent l'histoire naturelle de la maladie.

Parmi le large champ d'investigations possibles, nous avons choisi d'étudier 3 caractéristiques de la LLC pour lesquelles nous disposons du matériel biologique nécessaire.

Nous avons sélectionné les facteurs suivants :

- La fragilité cellulaire
- La sécrétion de l'IgM
- L'expression de ZAP70

Les 2 premiers ont été choisis parce qu'ils sont peu étudiés bien que soupçonnés de jouer un rôle dans l'histoire de la maladie. Le 3^e facteur a été choisi parce que son rôle dans la transformation du lymphocyte B reste mal comprise.

Ce chapitre reprend les 3 articles de la thèse, replacés dans leur contexte scientifique et brièvement discutés, ainsi que les résultats non publiés sur le rôle fonctionnel de ZAP70 dans le lymphocyte B.

ARTICLE 1 :

1. Introduction :

Les ombres de Gümprrecht ont été décrites sur le frottis sanguins dès la fin du XIX^e siècle [149] et ces particularités cytologiques sont associées à la LLC depuis plus de 60 ans [150]. Cette fragilité cellulaire, bien que presque toujours observable, est d'intensité variable entre les différents patients. En 2009 puis en 2010, les travaux de Nowakowski *et al.* [152] et de Johansson *et al.* [153], ont respectivement démontré que cet artefact d'étalement avait un lien avec l'évolution de la maladie et un impact sur le pronostic des patients.

D'autre part, la faible expression du CD45 par les cellules de LLC est également une caractéristique connue en pratique diagnostique. De plus, nous avons remarqué que l'expression du CD45 pouvait être altérée lorsque les cellules de LLC subissaient un pré-traitement plus agressif (multiplication des lavages successifs, centrifugation rapides, ...).

Nous avons donc voulu savoir si le niveau d'expression du CD45 pouvait refléter la fragilité cellulaire telle qu'elle est observée sur le frottis sanguin.

Notre travail, publié dans *American Journal of Hematology*, démontre que les cellules de LLC qui expriment le plus faiblement le CD45 sont bien les cellules les plus fragiles. Parallèlement aux résultats obtenus sur les 2 séries publiées sur les ombres de Gümprrecht, nous pouvions identifier 2 histoires de la maladie différentes sur la base du niveau de CD45 exprimé.

2. Article 1 :

American Journal of Hematology

Very low levels of surface CD45 reflect CLL cell fragility, are inversely correlated with trisomy 12 and are associated with increased treatment free survival.

D. Rizzo, A. Lotay, I. Marfak, JL. Faucher, N. Gachard, F. Trimoreau, E. Guerin,

D. Bordessoule, A. Jaccard, J. Feuillard

3. Discussion de l'article 1

Nous avons choisi de travailler sur des patients atteints de LLC en stade A afin que la série soit homogène. Nous avons ainsi pu mettre en évidence le lien entre fragilité cellulaire et la faible expression du CD45.

Le niveau de CD45 permettait certes d'identifier 2 groupes dont l'évolutivité de la maladie était différente. L'observation des courbes de Kaplan-Meier de la TFS montrent une séparation tardive des ces 2 groupes de patients, signifiant probablement un effet modéré de la fragilité cellulaire sur l'histoire de la maladie. Parallèlement, tout comme d'autres études indépendantes [530], nous n'avons pas pu reproduire le résultat de Nowakowski *et al.*[152] ni de Johansson *et al.* [153]. Ceci montre donc que la formation des ombres de Gümprrecht est un artéfact dépendant de multiples paramètres. Nous avons initialement discuté la faible reproductivité du décompte manuel au microscope. Dans une étude récente, la numérisation d'image de cytologie avec l'appareil CellaVision DM1200™ n'a pas retrouvé d'impact du nombre d'ombre sur le pronostic [531]. Au-delà de la variabilité entre observateur, les paramètres techniques de réalisation des frottis rentrent probablement en jeu également (rugosité de lames employées, force exercée à l'étalement, étaleur-colorateur automatique, ...). Néanmoins, il faut noter que seules les 3 plus larges séries publiées ont retrouvé une valeur pronostique des ombres [152,153,532]. Il est tout à fait possible que sur de faibles effectifs, un biais de recrutement et le manque de puissance statistique ne permettent pas de mettre en évidence des effets mineurs.

Nos résultats démontrent par ailleurs la relative spécificité de la sous-expression du CD45 au sein des LNH-B (Figure 1 de l'article). Bien que variable, les cellules de LLC présentaient une expression significativement plus faible du CD45 que les cellules des autres LNH-B.

Nous avons ensuite retrouvé que la trisomie 12 était significativement plus fréquente dans les cas de LLC avec un niveau de CD45 plus élevé, et donc des cellules plus résistantes. A l'inverse, 80% (16/20) des cas avec del(13q) isolée de très bon pronostic appartenaient au groupe de plus faible expression du CD45 associé aux cellules les plus fragiles. Ceci est

cohérent avec le fait que la trisomie 12 est une anomalie associée à une évolution plus rapide la LLC et à une présentation cytologique volontiers atypique et souligne, comme d'autres travaux anciens [231] ou plus récents [192,234,237,316,531,533], la singularité des cas de LLC concernés par cette anomalie. La plus forte expression du CD45 dans les LLC avec atypies cytologiques avait déjà été rapportée en 2008 dans une série italienne [158] tout comme la surexpression de l'isoforme « long » CD45RA par rapport à l'isoforme « court » CD45RO dans les LLC avec trisomie 12 [534]. Ces dernières données cautionnent l'hypothèse d'une détermination génétique de l'expression du CD45 dans la LLC.

Enfin, le lien fonctionnel entre la diminution d'expression du CD45 et la fragilité cellulaire n'est pas connu. Il est à l'heure actuelle impossible d'affirmer si cette sous-expression typique dans la LLC est la cause ou la conséquence d'anomalies du cytosquelette de la cellule B tumorale. La relation entre le CD45 et le cytosquelette a été étudié essentiellement dans le lymphocyte T [535]. Il existe cependant dans la littérature un lien possible entre la perte du CD45, l'expression dans le microenvironnement de la galectine-1 (ligand du CD45 entre autre), et la sécrétion d'Ig lors de la différenciation lymphoplasmocytaire [536]. Cette relation n'existe probablement pas dans la LLC puisque ces cellules ne montrent pas de différenciation lymphoplasmocytaire (voir article 2). Des données récemment publiées démontrent le rôle de la galectine-1 dans la progression tumorale de la LLC [537,538]. Ces résultats posent la question de l'implication de la voie du CD43 qui est également un récepteur de la galectine-1 [176] classiquement exprimé dans la LLC [160] plutôt que la voie du CD45 dans le rôle pro-tumoral de la galectine-1.

En conclusion, nous faisons le lien entre la faible expression du CD45, la fragilité cellulaire, la cytogénétique et la TFS. Ceci est une très forte indication que la LLC est associée à de profonds remaniements du cytosquelette, lesquels impactent l'histoire de la maladie.

ARTICLE 2 :

1. Introduction

La présence d'un pic monoclonal à l'électrophorèse des protéines sériques (EPS) au décours de la LLC est un fait connu de longue date. Un pic, majoritairement de nature IgM, est rapporté dans environ 10% des cas [539].

La valeur pronostique de la présence de cette Ig monoclonale n'est cependant pas très claire. Selon les séries, la présence d'un pic monoclonal est parfois associée à un mauvais pronostic [540], parfois n'influence pas l'histoire de la maladie [173,541], et certains auteurs ont également historiquement rapporté que les pics monoclonaux de la LLC n'étaient pas liés au clone B [542]. D'autre part, la découverte d'un pic IgG est attribuée aux cas de LLC ayant fait l'expérience de la recombinaison de classe ou « switch IgG ». La relation directe entre ces cas de LLC et l'ontogénie classique de cette hémopathie a été discutée [543] mais il apparaît néanmoins qu'elles présentent un répertoire BCR particulier et seraient associées à un pronostic péjoratif [540,543].

Nous avons donc voulu explorer de nouveau la signification d'un pic monoclonal dans la LLC à la lumière des nouvelles mutations (*i.e.* *SF3B1*, *NOTCH1*, *BIRC3* et *MYD88*) récemment révélées par le séquençage haut-débit [281].

Nous avons étudié rétrospectivement 150 cas de LLC, dont 27 associés à un pic IgM, 25 à un pic IgG, 41 à une hypogammaglobulinémie (groupe hypo- γ) et 57 avec une EPS normale (groupe normal- γ). Concernant les cas de LLC associés à un pic monoclonal, nous n'avons inclus que les patients pour lesquels l'isotype de la chaîne légère (κ/λ) du pic sérique et du clone était identique.

Nos résultats, acceptés pour publication dans la revue *Leukemia*, ont mis en évidence les LLC associées à un pic IgM ou IgG ont un répertoire BCR propre, accumulent les anomalies génétiques péjoratives qui influencent négativement le pronostic.

2. Article 2 :

Accepté dans la revue **Leukemia**

**IgM peak independently predicts treatment free survival in
Chronic Lymphocytic Leukemia and correlates with accumulation of
adverse oncogenetics events.**

D. Rizzo, J. Chauzeix, F. Trimoreau, JB. Woillard, F. Genevieve, A. Bouvier,
J. Labrousse, C. Poli, E. Guerin, N. Dmytruk, L. Remenieras, J. Feuillard, N. Gachard

3. Discussion de l'article 2

Dans notre série, la survie avant traitement était significativement réduite pour les cas de LLC avec pic IgM, pic IgG ou hypogammaglobulinémie par rapport aux patients avec une électrophorèse normale. Il s'agit d'une étude rétrospective et son interprétation doit évidemment prendre en compte les biais potentiels associés (biais de recrutement, biais de suivi, ...).

Nos résultats sont cohérents avec les différents travaux publiés en faveur d'une valeur pronostique péjorative du phénotype « sécrétant » des LLC. Les publications les plus récentes, utilisant le dosage des chaînes légères libres sériques, technique plus sensible que l'EPS, identifient également ce phénotype comme un marqueur de mauvais pronostic [379].

Nous nous démarquons de la large étude israélienne publiée en 2014 par Shvidel *et al.* (1113 cas) par le fait que nous avons inclus les patients à tous les stades de la classification de Binet. Shvidel et ses collaborateurs ont évalué l'impact pronostique de l'EPS uniquement sur les stades A et notre série rétrospective retrouve une association forte entre la présence d'un pic IgM et les stades Binet B ou C. D'autre part, les auteurs ne font pas mention d'une sélection selon l'isotype de la chaîne légère κ ou λ entre le clone et le pic. Au final, la question posée entre l'étude de Shvidel *et al.* et la nôtre était différente.

La question reste entière concernant les cas de LLC, relativement nombreux, associés à des composantes sériques monoclonales dont l'isotype de la chaîne légère est différent de celui du clone B circulant. S'agit-il de l'expression d'une dysimmunité non spécifique, imputable à l'âge et à l'immunodépression liée à la maladie, ou bien peut-il d'agir de sous-clones sécrétants de LLC ? Dans la continuité de ce travail, l'étude du statut mutationnel et cytogénétique des MBL CLL-like serait intéressante.

A l'inverse de la macroglobulinémie de Waldenström, nous n'avons pas retrouvé de fréquence augmentée de la mutation du gène *MYD88* dans les LLC associées à une IgM monoclonale. Nous avons revu en double lecture indépendante tous les frottis sanguins des cas de LLC avec pic IgM et nous n'avons pas retrouvé de différenciation

lymphoplasmocytaire. Cependant, l'expression du marqueur CD38, marqueur d'activation et de différenciation plasmocytaire, était significativement plus fréquente dans les groupes avec pic IgM ou IgG (46% et 54% respectivement) par rapport aux groupes avec hypogammaglobulinémie ou EPS normale (24% et 19% respectivement).

ARTICLE 3 :

1. Introduction :

Nous avons initié, à Limoges, une thématique de recherche sur le rôle fonctionnel de ZAP70 dans la LLC. En parallèle de ce travail expérimental dont les résultats sont exposés dans le prochain chapitre, nous avons saisi l'opportunité de développer en collaboration avec la société Beckman-Coulter™, une nouvelle technique pour déterminer le statut ZAP70 des cellules tumorales. Ce travail de développement faisait suite à une étude de standardisation multicentrique du marquage de ZAP70 en CMF déjà réalisée par notre équipe [448].

Cette technique était basée sur l'utilisation d'un contrôle isoclonique, permettant de mesurer spécifiquement la fluorescence non spécifique de l'anticorps SBZAP-PE. Cette approche nous a permis de mettre en évidence que les lymphocytes T de patients atteints de LLC surexpriment la tyrosine kinase ZAP70 par rapport aux lymphocytes T de sujets sains. Nous avons également mis en évidence que le niveau de ZAP70 dans ces lymphocytes T pourrait être en rapport avec la masse tumorale du clone.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue Cytometry part B.

2. Article 3 :

Cytometry part B (clinical cytometry)

**T/B Ratio Does Not Reflect Levels of ZAP70 Expression in Clonal
CLL B-Cells Due to ZAP70 Overexpression
in Patient T-Cells**

D. Rizzo, G. Bouvier, I. Youlyouz-Marfak, E. Guerin, F. Trimoreau, D. Bordessoule,

A. Jaccard, N. Gachard and J. Feuillard

3. Discussion l'article 3

La technique du ratio isoclonique utilisée ici nous permis de mettre en évidence que les lymphocytes T autologues des patients atteints de LLC surexpriment ZAP70 par rapport aux lymphocytes T des témoins sains. Cette observation avait déjà fait l'objet d'une publication sous forme de lettre par Herishanu et ses collaborateurs [544]. En cohérence avec ce travail de l'équipe israélienne, nous avons également retrouvé un lien entre le niveau d'expression de ZAP70 dans les lymphocytes T et dans les cellules tumorales (résultats non publiés, Figure 22A).

En conséquence, l'utilisation des lymphocytes T autologues en tant que témoin interne pour le marquage de ZAP70 en CMF ne correspond pas à un contrôle stable et peut aboutir à une normalisation du ratio T/B lorsque ceux-ci surexpriment fortement la tyrosine kinase. Le ratio T/B dépend donc du niveau d'expression de ZAP70 dans les lymphocytes B mais également de celui des lymphocytes T. Ceci pourrait expliquer les difficultés rencontrées en routine. Enfin, une étude récente démontre que les lymphocytes NK, exprimant également fortement ZAP70, présentent une expression stable de cette tyrosine kinase et peuvent être utilisés avec succès en tant que témoins positifs [545].

En croisant les données d'expression de ZAP70 avec les autres paramètres biologiques des patients de notre série, nous avons montré que le niveau de la tyrosine kinase dans les lymphocytes T semblait en réalité corrélé à la lymphocytose clonale circulante (résultats non publiés, Figure 22B). Ces résultats laissent donc suggérer une potentielle régulation externe de ZAP70 dans les lymphocytes T autologues des patients réactionnelle à la masse tumorale. Nos données posent ainsi la question de l'interaction entre le lymphocyte B tumoral et son environnement T.

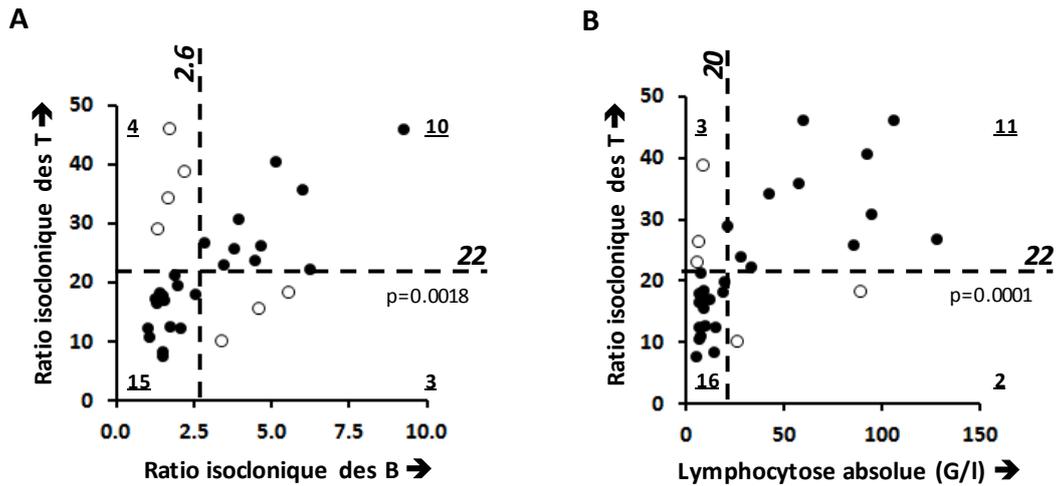


Figure 22 : Corrélation du niveau d'expression de ZAP70 dans les lymphocytes T avec celui des lymphocytes B et la lymphocytose absolue totale.

Panel A : les ratios isocloniques de ZAP70 pour les lymphocytes B et T ont été représentés sur la figure. Les seuils de 2.6 et de 22 pour les lymphocytes B et T respectivement ont été obtenus par test de maximisation du χ^2 [448]. Le seuil de 2.6 représente la valeur au-delà de laquelle la probabilité que le statut IgVH des cellules B tumorales soit non muté est la plus forte. Le seuil de 22 représente le niveau d'expression de ZAP70 des lymphocytes T au-delà de laquelle la probabilité pour que les B tumoraux surexpriment également ZAP70 (*i.e.* ≥ 2.6) est la plus forte. Panel B : le ratio isoclonique de ZAP70 pour les lymphocytes T est représenté en fonction de la lymphocytose absolue (G/l). Le seuil de 22 pour le ratio isoclonique ZAP70 des lymphocytes T est le même que celui du panel A. Le seuil de 20 G/l pour la lymphocytose a également été obtenu par test de maximisation du χ^2 . Il représente la valeur au-delà de laquelle la probabilité que les lymphocytes T surexpriment ZAP70 (*i.e.* ≥ 22) est la plus forte. Panels A et B : Le nombre de cas dans chaque cadran est indiqué et souligné. Les points en blancs représentent les cas discordants T-ZAP^{high}/B-ZAP^{low}, T-ZAP^{low}/B-ZAP^{high} et T-ZAP^{high}/Ly^{low}, T-ZAP^{low}/Ly^{high}. La valeur de la p-value du test de χ^2 associée est indiqué sur chaque figure.

ETUDE FONCTIONNELLE DE ZAP70 DANS LE LYMPHOCYTE B

1. Critères de choix des modèles de lignée cellulaire BL2 et BL41

L'étude transcriptomique menée sur la LLC par Rosenwald et ses collaborateurs [546] a donc été la première à démontrer que ZAP70 est anormalement surexprimé dans certains sous-types de lymphopathies B matures. L'expression de ZAP70 était connue jusqu'alors comme restreinte exclusivement aux lymphocytes T et NK [491]. Depuis plusieurs autres travaux ont recherché la surexpression de ZAP70 dans l'ensemble des lymphopathies B matures. La LLC est la principale pathologie concernée par la surexpression de ZAP70 avec plus de 40% des cas positifs [162], suivie du lymphome de Burkitt (30%) et du lymphome à cellules du manteau (13%) alors que l'expression de ZAP70 est anecdotique dans les autres lymphomes B [503,505–507].

Les lignées de lymphome de Burkitt BL2 et BL41 sont des modèles cellulaires pour lesquels notre laboratoire a une expérience de longue date [547]. Dans le cadre d'études fonctionnelles souvent consommatrices d'un grand nombre de cellules, nous avons cherché à développer un modèle cellulaire de surexpression de ZAP70 à partir d'une lignée cellulaire. Compte-tenu de la fréquence de cette kinase dans les lymphomes de Burkitt, les lignées cellulaires BL représentaient, en nos mains, des outils cohérents pour l'étude du rôle fonctionnel de ZAP70. Ainsi, nous avons établi par transfection un modèle de BL surexprimant ZAP70. Toutefois, il était d'emblée évident que les lignées de Burkitt présenteraient des caractéristiques très différentes des cellules primaires de LLC. Ce constat nous a amené à comparer ces 2 types cellulaires de manière à établir la liste des caractères qui permettaient de rapprocher ou d'opposer les lignées aux cellules de LLC (en particulier la signalisation et la réponse fonctionnelle à la stimulation du BCR).

D'une manière générale le long de ce travail, seule la lignée BL2, de part sont statut p53^{WT} et sa plus grande réactivité au BCR, à été utilisée de manière comparative avec les cellules primaires de LLC.

2. Validation du modèle de surexpression de ZAP70 dans la lignée BL2

2.1. Vérification du statut ZAP70 des cellules BL2 :

Nous avons tout d'abord vérifié le statut ZAP70 de nos lignées BL2 et BL41. Nous avons pour cela recherché l'ARNm de ZAP70 par RT-PCR puis la protéine ZAP70 par CMF avec notre technique de contrôle isoclonique utilisant le clone SBZAP et par WB avec le clone 1E72. Nos résultats révèlent que les lignées BL2 et BL41 expriment ZAP70 à la fois en protéine et en ARN dont les résultats sont parallèles (Figure 23). La lignée BL2 exprime plus fortement ZAP70 que la lignée BL41.

Du point de vue technique, l'approche en CMF avec le clone SBZAP-PE est plus sensible que le WB avec le clone 1E72. Notre technique WB ne nous permet pas de détecter la protéine ZAP70 dans la lignée BL41 et la détection est très faible dans la lignée BL2. Selon les expériences seule la surexpression de ZAP70 par transfection transitoire permet de voir la bande spécifique à 70kDa en WB (voir Figure 30).

2.2. Contrôle de l'implication fonctionnelle de ZAP70 dans le signalosome du BCR des modèles cellulaires BL2 et BL41 non transfectés :

Pour contrôler si la protéine ZAP70 était impliquée fonctionnellement par la signalisation du BCR dans nos modèles de lignée. Nous avons mesuré par ELISA la quantité de protéine ZAP70 activée par phosphorylation sur la tyrosine Y319 après 5 min. de stimulation du BCR par un fragment $F(ab')_2$ anti-IgM soluble à 10 $\mu\text{g/ml}$. Nos résultats montrent une nette augmentation de la phosphorylation de la tyrosine Y319 confirmant que ZAP70 participait bien au signalosome du BCR dans les lignées BL2 et BL41 (Figure 24). Donc ZAP70 est phosphorylé après stimulation du BCR.

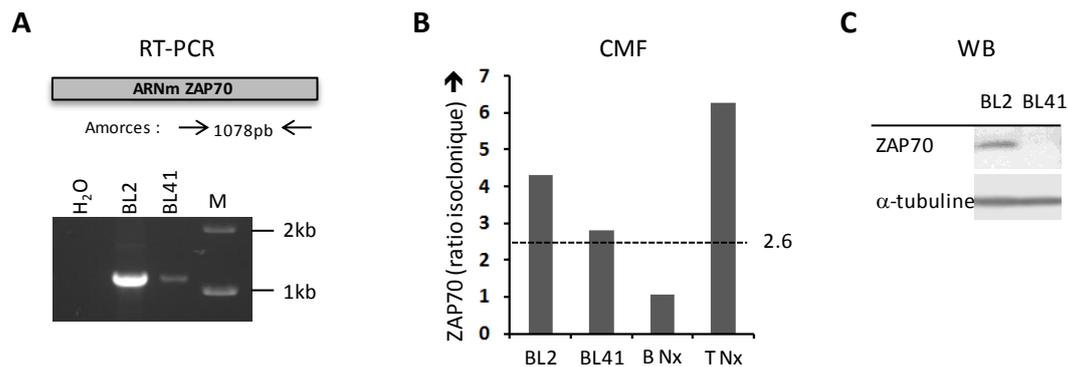


Figure 23 : Evaluation du niveau d'expression de ZAP70 dans les lignées BL2 et BL41.

Panel A : l'expression de l'ARNm de ZAP70 a été recherchée par RT-PCR. La position des amorces utilisées est indiquée par des flèches sur le schéma en haut du panel. La figure montre les bandes amplifiées de 1078pb. Panel B : l'expression de la protéine ZAP70 a été recherchée par CMF selon la technique du contrôle isoclonique que nous avons publiée avec l'Ac anti-ZAP70 clone SBZAP couplé à la phycoérythrine [447]. Les cellules des lignées BL2 et BL41 ont été marquées en parallèle avec un sang normal. La figure représente les ratios isocloniques respectifs de chaque population cellulaire (BL2, BL41, B normaux (B Nx) et T normaux (T Nx)). Le seuil de positivité à 2.6 est indiqué par une barre horizontale en pointillés. Panel C : l'expression de la protéine ZAP70 a été recherchée par western-blot avec l'Ac anti-ZAP70 clone 1E72.

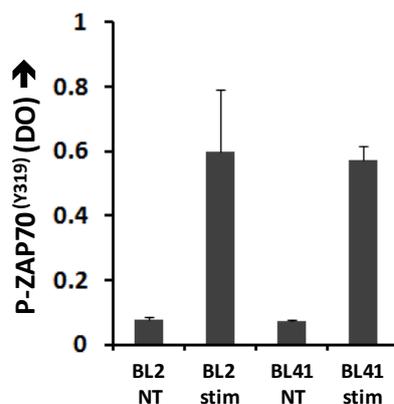


Figure 24 : Phosphorylation de la tyrosine Y319 de ZAP70 après stimulation du BCR.

Le BCR des cellules de la lignée BL2 a été stimulé 5 min. par un fragment F(ab')₂ anti-IgM soluble à 10 µg/ml. La figure représente la densité optique directement obtenue par technique ELISA mesurant la quantité de protéine phospho-ZAP70 (Y319). Les différents points de mesure sont représentés par des cercles vides. La moyenne des DO obtenues pour les 2 conditions avec ou sans stimulation du BCR sont représentées par une barre en pointillés +/- 1 écart-type (barres pleines).

3. Comparaison des lignées cellulaires et des cellules primaires de LLC

3.1. Comparaison du signal BCR tonique et de la sensibilité à la stimulation du BCR par le fragment F(ab')₂ anti-IgM :

Nous avons tout d'abord comparé le signal BCR de la lignée BL2 et des cellules primaires de LLC. Nous avons pour cela choisi de révéler l'activation du BCR par la phosphorylation de sa MAPK Erk. Les cellules ont été soumises à 2 types de stimulation : (i) stimulation par du pervanadate et (ii) stimulation par pontage du BCR avec un fragment F(ab')₂ anti-IgM. Le pervanadate est un inhibiteur de phosphatases qui est classiquement utilisé pour révéler le signal tonique du BCR (signalisation en l'absence de ligand) [488]. A l'inverse, le pontage du BCR par un fragment F(ab')₂ anti-IgM mime le contact avec l'antigène.

Les résultats montrent que la lignée BL2 et les cellules primaires de LLC présentent un signal tonique du BCR et que les 2 types cellulaires ont un BCR fonctionnel révélé par la stimulation avec le fragment F(ab')₂ (Figure 25).

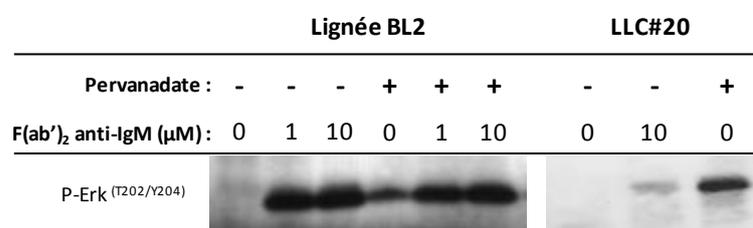


Figure 25 : Comparaison du signal NCR entre la lignée BL2 et les cellules primaires de LLC.

Les cellules de la lignée BL2 et des cellules primaires de LLC (exemple de la LLC#20) ont été soumises à une stimulation par le pervanadate et/ou le fragment F(ab')₂ anti-IgM pendant 5 min. Le signal du BCR a été révélé par détection de la phosphorylation de la MAPK Erk par WB.

3.2. Comparaison de la finalité fonctionnelle de la stimulation du BCR in vitro dans la lignée BL2 et les cellules primaires de LLC :

Nous avons comparé l'effet de la stimulation in vitro du BCR par le fragment F(ab')₂ anti-IgM sur l'apoptose cellulaire des cellules de la lignée BL2 et des cellules primaires de LLC.

4. Etude de l'impact fonctionnel de ZAP70 dans la signalisation du BCR

4.1. Clonage de ZAP70 dans un vecteur d'expression constitutive

Nous avons entrepris le clonage de ZAP70 afin de pouvoir étudier le rôle fonctionnel de ZAP70 dans notre modèle de lignée cellulaire BL parallèlement aux cellules primaires de LLC. La région traduite de l'ADNc de ZAP70 a été amplifiée à partir de la lignée BL2. L'amplicon de 2023 pb a d'abord été cloné dans le vecteur intermédiaire TOPO pCR2.1. Dans une seconde étape, la région codante a été intégrée dans le vecteur d'expression constitutive pcDNA3 à l'aide des enzymes de restriction *HindIII* et *BamHI*. L'absence de mutations dans l'amplicon de ZAP70 a été vérifiée par séquençage direct. La fonctionnalité des vecteurs a été vérifiée par western-blot 24 heures après transfection (Figure 27).

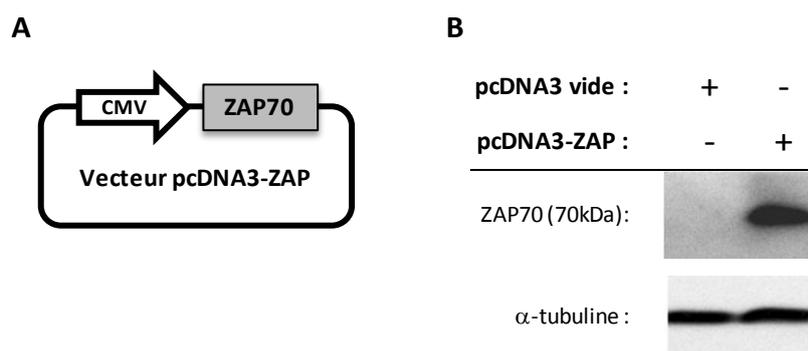


Figure 27 : Construction du vecteur d'expression constitutive pcDNA3-ZAP.

Panel A : schéma du vecteur pcDNA3-ZAP. Panel B : exemple de transfection transitoire des cellules de la lignée par le vecteur pcDNA3 vide ou le vecteur pcDNA3-ZAP70. Un western-blot a été réalisé 24h après transfection sur des extraits protéiques totaux.

4.2. Impact fonctionnel de ZAP70 dans la signalisation précoce du BCR

Nous avons évalué par western-blot la phosphorylation de la protéine Erk après 5 min. de stimulation du BCR sur les cellules de la lignée BL2 transitoirement transfectées (BL2^{ZAP+}) ou non (BL2^{CTRL}) avec le vecteur pcDNA-ZAP. Nous n'avons retrouvé aucune différence entre le niveau de phosphorylation de la protéine Erk, ni même de Syk, entre les 2 conditions de

transfection (Figure 28). Les ratios P-Erk/Erk dans les conditions stimulées étaient respectivement de 1.27 et 1.84 pour les BL2^{CTRL} et les BL2^{ZAP+}.

Ensuite, sur une série de 10 LLC consécutives comprenant 5 LLC ne surexprimant pas ZAP70 (LLC^{ZAP-}) et 5 LLC avec surexpression de ZAP70 (LLC^{ZAP+}), nous avons également évalué la phosphorylation de la protéine Erk après 5 min. de stimulation du BCR. Le statut ZAP70 des cellules tumorales était défini par un ratio isoclonique ≥ 2.6 [447]. Les résultats montrent que la phosphorylation est absente dans tous les cas de LLC sans stimulation. Après 5 minutes de pontage du BCR, la présence de phospho-Erk (T202/Y204) est détectable dans les

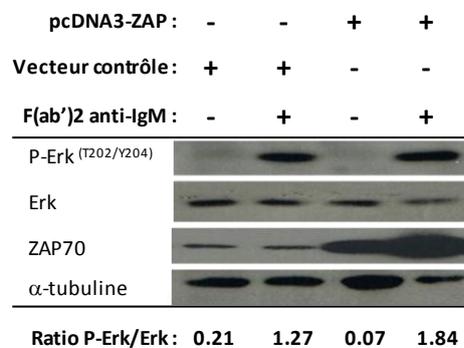


Figure 28 : Impact de ZAP70 sur la signalisation proximale du BCR.

Le BCR des cellules de la lignée BL2 a été stimulé pendant 5 min. avec le F(ab')₂ anti-IgM selon qu'elles aient été transitoirement transfectées par le vecteur pcDNA-ZAP ou le vecteur contrôle. La phosphorylation et le niveau d'expression de la MAPK Erk ainsi que les niveaux d'expression des protéines ZAP70 et α -tubuline ont été révélés par WB. Les ratios P-Erk/Erk sont indiqués sur la figure.

10 LLC même à faible niveau révélant un BCR fonctionnel de nature IgM sur ces cellules (Figure 29 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**A). La phosphorylation de la protéine Erk a été particulièrement prononcée dans 2/5 et 3/5 cas des groupes LLC^{ZAP-} et LLC^{ZAP+} respectivement. Nous avons ensuite normalisé la quantité de protéine Erk phosphorylée pour chaque cas en évaluant le ratio Phospho-Erk/Erk après numérisation des spots de western-blot. Nos résultats montrent que ce ratio est systématiquement plus élevé dans le groupe LLC^{ZAP-} par rapport au groupe LLC^{ZAP+} (Figure 29B).

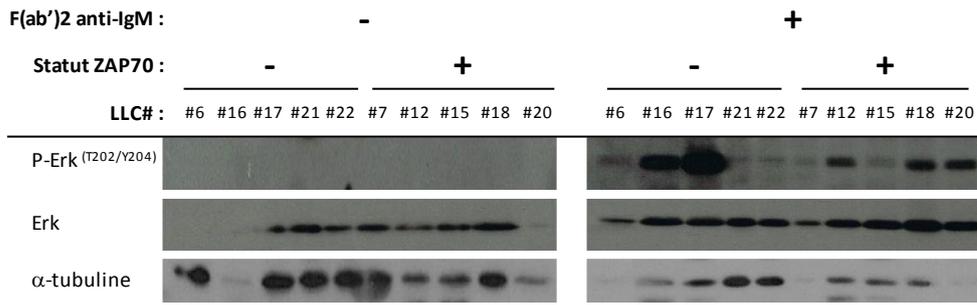
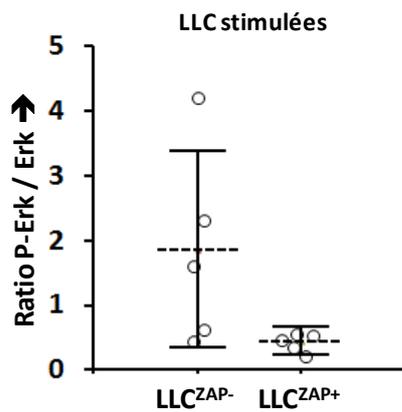
A**B**

Figure 29 : Impact fonctionnel de ZAP70 dans la signalisation précoce du BCR.

Panel A : l'induction par le BCR de la phosphorylation de la MAPK Erk a été évaluée par western-blot sur 10 LLC consécutives. La figure compare la présence de phospho-Erk dans les cellules non stimulées (à gauche) et stimulées par un fragment F(ab')₂ anti-IgM (à droite). Panel B : le ratio des charges protéiques phospho-Erk / Erk a été calculé après quantification des spots obtenu sur le western-blot. Les cercles vides représentent les différentes valeurs. La moyenne +/- 1 écart-type sont représentés par une barre en pointillés ou une des barres pleines respectivement.

En conclusion, nous ne mettons pas en évidence d'effet potentialisateur de ZAP70 sur la signalisation proximale du BCR que ce soit dans la lignée BL2 ou dans les cellules primaires de LLC. En particulier, dans les cellules de LLC, le caractère fort répondeur ou faible répondeur ne montre également pas d'association particulière avec le statut ZAP70. Ces résultats sont cohérents avec la littérature récente [553].

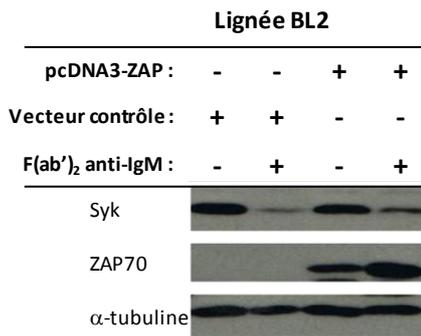
4.1. ZAP70 et dégradation de Syk après stimulation du BCR

La régulation négative tardive du BCR est caractérisée entre autre par la dégradation de la tyrosine kinase Syk après ubiquitination Cbl dépendante [554]. Nous avons évalué le niveau résiduel de Syk par western-blot après 24h de stimulation du BCR par F(ab')₂ anti-IgM sur la lignée cellulaire BL2 et sur la même série de 10 LLC.

Dans la lignée BL2, nous avons mis en évidence une dégradation de Syk après 24h de stimulation du BCR (Figure 30A). A l'inverse, dans les cellules de LLC nos résultats n'ont pas permis d'objectiver une quelconque baisse du niveau d'expression de la protéine Syk après 24h de stimulation du BCR par rapport à la condition non stimulée. Il n'y avait également aucune différence entre les LLC^{ZAP-} et les LLC^{ZAP+} sur cette série (Figure 30B).

Comme dans les résultats précédents, nous avons observé une faible expression de l' α -tubuline dans les cellules de LLC. Cette expression était de plus très variable. Bien que la charge en protéine fût identique pour chaque puits (*i.e.* 20 μ g), il ne nous a pas été possible de normaliser les quantités de protéine Syk entre les différents cas de LLC du fait de l'absence de révélation d'une autre protéine de ménage. Cette sous-expression de l' α -tubuline est peut-être à mettre en rapport avec la faible taille des cellules de LLC et la grande fragilité cellulaire dont elles font preuve. On ne peut également pas exclure une régulation particulière de cette protéine dans la LLC.

A



B

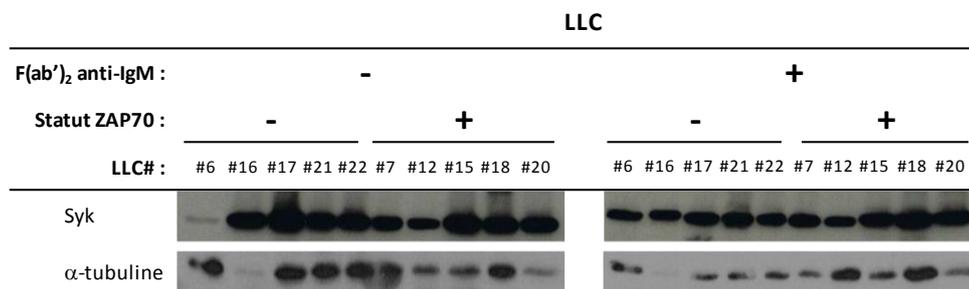


Figure 30 : Impact fonctionnel de ZAP70 dans la régulation tardive du BCR.

Panel A : les cellules de la lignée BL2 ont été stimulées ou non avec le fragment F(ab')₂ anti-IgM. Le niveau d'expression de Syk a été évaluée 24h après par WB selon qu'elles aient été transitoirement transfectées par le vecteur pcDNA-ZAP ou le vecteur pcDNA vide. Panel B : la même expérience a été réalisée sur une série de 10 LLC consécutives. Le statut ZAP70 est indiqué sur la figure.

4.2. Impact fonctionnel de ZAP70 dans le signal tonique du BCR

Nous avons voulu explorer le signal tonique du BCR (*i.e.* sans ligand) selon le statut ZAP70 des cellules tumorales. Sur une nouvelle série de 8 LLC consécutives et appariées selon leur statut ZAP70 (LLC^{ZAP-}/LLC^{ZAP+}), nous avons évalué la phosphorylation de la MAPK Erk selon que les cellules étaient stimulées ou non par le pervanadate (révélation du signal tonique) ou par le F(ab')₂ anti-IgM (signal BCR de contrôle). Nous avons évalué l'intensité des différents signaux par western-blot (Figure 31A). L'intégration numérique des spots nous a permis de comparer les ratios Phospho-Erk/Erk pour chaque condition. Nos résultats ont montré la présence d'un signal tonique du BCR pour les 8 cas de LLC. A l'exception d'1 cas de LLC^{ZAP-} (LLC#24) marqué par un disque noir sur la figure, le signal Phospho-Erk tonique était

significativement plus intense que le signal déclenché par pontage du BCR (test des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés, p-value=0.016) mais il n'y avait pas de différence selon le statut ZAP70 des cellules tumorales (Figure 31B). Pour remarque, la LLC#24 est le cas qui a présenté la plus forte stimulation de la MAPK Erk après pontage du BCR.

Au final, en nos mains, ZAP70 ne semble pas avoir d'effet sur le BCR que ce soit après activation par pontage ou sur le signal tonique du récepteur.

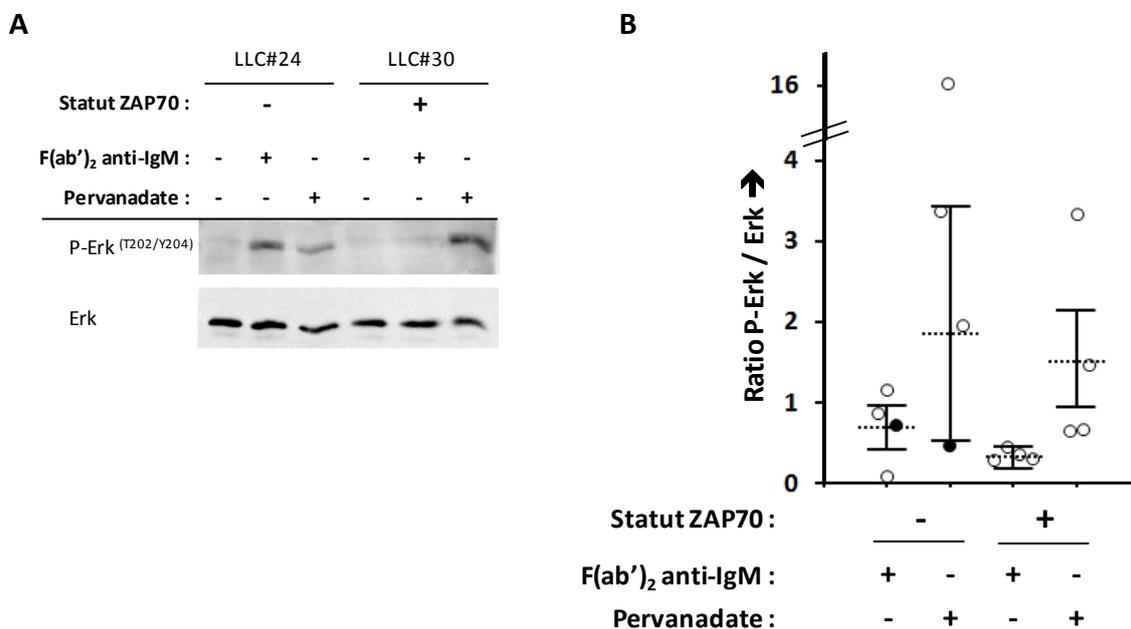


Figure 31 : Evaluation de l'impact fonctionnel de ZAP70 sur le signal tonique du BCR.

Panel A : exemple d'évaluation par western-blot du signal tonique du BCR de cellules de LLC révélé par le pervanadate. Le signal tonique du BCR est évalué par la phosphorylation de la protéine Erk. Le pontage du BCR par le F(ab')₂ anti-IgM sert de contrôle positif. Panel B : comparaison des ratios Phospho-Erk/Erk entre les 2 types de stimulation et selon le statut ZAP70 des cellules tumorales primaires. La barre en pointillés représente la moyenne, les barres pleines représentent l'intervalle +/- 1 écart-type de la moyenne. Les 2 points de données identifiés par un disque noir représentent le cas de LLC pour lequel le niveau de phosphorylation de Erk était plus élevé par la stimulation du BCR que par la révélation du signal tonique par le pervanadate (LLC#24).

5. Etude du rôle de ZAP70 dans l'équilibre apoptose / prolifération

Nous avons évalué l'effet sur l'apoptose de la transfection transitoire de ZAP70 des cellules de la lignée BL2 stimulées ou non par pontage du BCR. Nous avons retrouvé une simple tendance à la majoration de l'apoptose spontanée des cellules BL2 dans la condition où ZAP70 était surexprimée (test des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés, p -value=0.125) (Figure 32A). Dans ce modèle cellulaire, la stimulation du BCR par pontage induit une apoptose franche des cellules et il n'y avait pas de différence entre les niveaux d'apoptose induite selon les conditions BL2^{ZAP-} ou BL2^{ZAP+}.

Nous avons ensuite étudié l'impact du statut ZAP70 sur l'apoptose spontanée à 24h +/- stimulation du BCR sur des cultures *ex vivo* de cellules primaires issues d'une série consécutive de 20 LLC (12 LLC^{ZAP-} et 8 LLC^{ZAP+}). La survenue d'une apoptose spontanée a été observée dans 20/20 cas. De manière frappante, nos résultats ont montré une apoptose spontanée significativement supérieure dans le groupe LLC^{ZAP+} que dans le groupe LLC^{ZAP-} (test de Mann-Whitney, p -value=0.0030) (Figure 32B). Ensuite, dans 18/20 cas, la culture de 24h *ex vivo* en présence de F(ab')₂ anti-IgM a montré une légère protection des cellules primaires de LLC vis-à-vis de l'apoptose spontanée (test des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés, p -value=0.00021) (Figure 32B).

Les 2 cas n'ayant pas montré de bénéfice d'une stimulation du BCR vis-à-vis de l'apoptose spontanée appartenaient respectivement au groupe LLC^{ZAP-} (1 cas) et LLC^{ZAP+} (1cas) et sont individualisés des autres par des disques noirs pleins sur la figure. Globalement, l'effet protecteur du BCR n'était pas significativement différent entre les 2 groupes LLC^{ZAP-} et LLC^{ZAP+} (diminution moyenne de l'apoptose respectivement de 6.1% et 9.7% en valeur absolue, test de Mann-Whitney : p -value = 0.18)(Figure 32B).

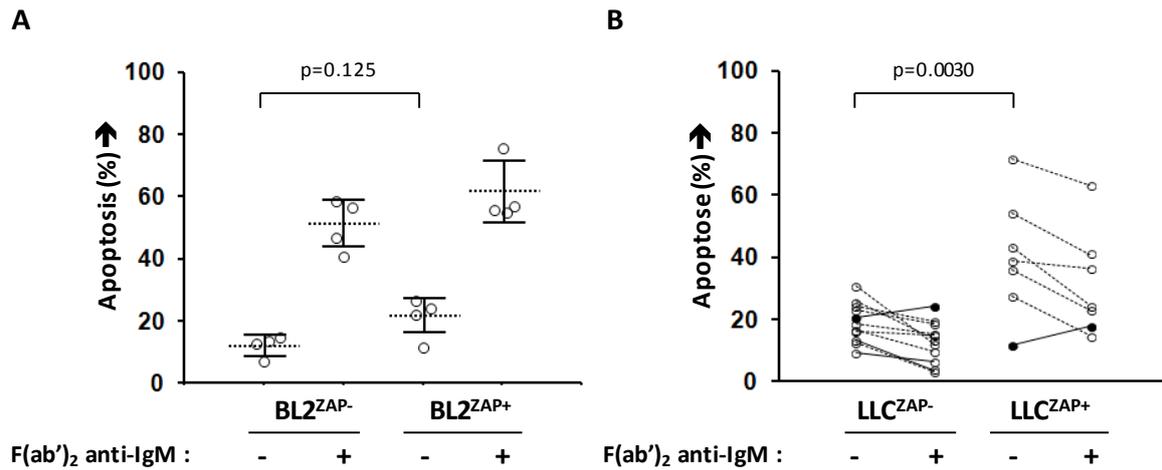


Figure 32 : Evaluation de l'impact du statut ZAP70 sur l'apoptose des cellules B.

Panel A : apoptose spontanée ou induite par pontage du BCR des cellules de la lignée BL2 transitoirement transfectées ou non par le vecteur pcDNA3-ZAP. Les barres en pointillés représentent les moyennes des groupes respectifs, les barres pleines représentent les intervalles à ± 1 écart-type. Panel B : évaluation de l'apoptose spontanée à 24h, avec ou sans stimulation du BCR, sur une série consécutive de 12 LLC^{ZAP-} et 8 LLC^{ZAP+}. Les 2 cas de LLC représentés par des disques noirs pleins correspondent aux cas de LLC pour lesquels le BCR n'a pas montré d'effet protecteur contre l'apoptose spontanée des cellules. Panels A et B : la p-value des tests des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés ou de Mann-Whitney sont respectivement indiquées sur chacune des figures.

6. Résultats préliminaires sur la relation entre statut ZAP70 et interféron α

Parce que nous avons constaté que l'interféron alpha (IFN α) pouvait induire une certaine apoptose sur les lignées BL [555], nous nous sommes demandé si ZAP70 pouvait réguler l'expression de cette cytokine.

Nous avons recherché par RQ-PCR le niveau d'expression de l'ARNm de l'IFN α dans les cellules mononucléées totales du sang périphérique (PBMC) de patients atteints de LLC^{ZAP-} (n=10) et de LLC^{ZAP+} (n=12) et de témoins sains (n=5) ainsi que dans la lignée BL2 transfectée par le vecteur pcDNA3 vide, pMAX-GFP ou pcDNA3-ZAP. Nos résultats, certes préliminaires, ont montré que le niveau d'expression de l'ARNm de l'IFN α dans les PBMC des 5 témoins était faible et ont révélé une dispersion bimodale dans les LLC^{ZAP-} (Figure 33A). Dans ce groupe de patients, 6/10 cas présentaient un taux d'expression relatif (TER) très faible et 4/10 cas présentaient un TER significativement plus élevé. En prenant comme seuil de référence la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95% du sous-groupe LLC^{ZAP-}

/IFN α ^{NEG}, nous avons mis en évidence que 10/12 cas de LLC^{ZAP+} présentaient une surexpression de l'ARNm de l'IFN α évaluée dans les PBMC totaux, cette différence était statistiquement significative entre les 2 groupes de LLC (test χ^2 , p-value=0.035). Parallèlement, sur une série de 3 transfections consécutives de la lignée BL2, nous avons montré que la transcription de l'ARNm l'IFN α était augmentée lorsqu'on induisait la surexpression de ZAP70 dans ces cellules (Figure 33B) alors que cette augmentation n'était pas retrouvée dans les transfections contrôles avec les vecteurs pcDNA3 vide ou pMAX-GFP. Enfin, selon la disponibilité des ADNc issus de ces mêmes cellules BL2 transfectées, nous avons évalué le niveau d'expression des autres interférons, IFN β et IFN γ respectivement. Nos résultats partiels n'ont pas mis en évidence d'induction significative de l'expression de IFN β ni de l'IFN γ lorsque ZAP70 était surexprimé dans la lignée BL2 (Figure 33C et D).

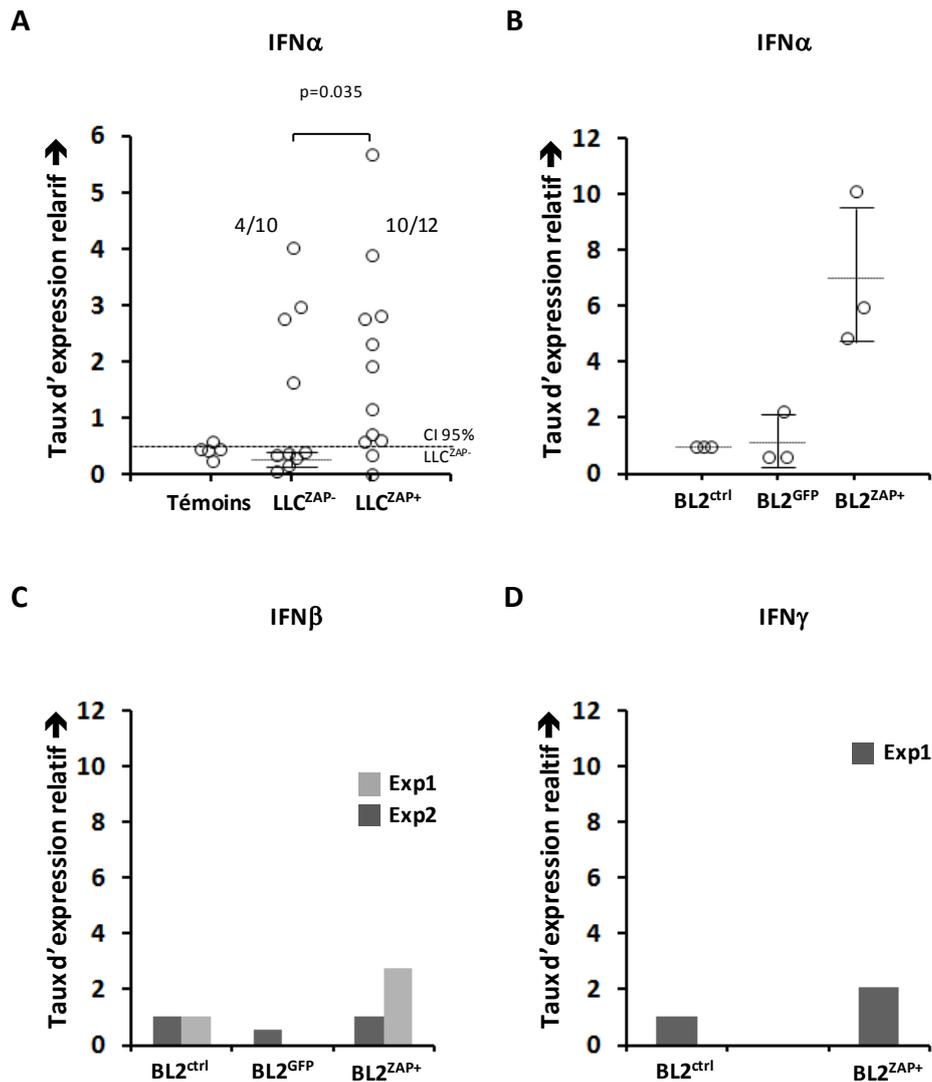


Figure 33 : Niveau d'expression de l'ARNm des interférons dans LLC et la lignée BL2.

Panel A : les taux d'expression relatifs (TER) de l'ARNm de l'IFN α ont été évalués par RQ-PCR sur des PBMC de 5 témoins sains, 10 LLC^{ZAP-} et 12 LLC^{ZAP+}. Le seuil de positivité est représenté par une barre horizontale en pointillés et a été calculé à partir de la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95% du niveau d'expression de l'IFN α dans les PBMC du sous-groupe LLC^{ZAP-}/IFN α ^{NEG} dont la moyenne +/- 1 écart-type sont indiqués par un barre en pointillés et 2 barres pleines respectivement. La proportion de cas de LLC présentant une surexpression de l'IFN α est indiquée dans la figure pour les 2 groupes de patients. La p-value du test de c2 comparant les groupes LLC^{ZAP-} et 12 LLC^{ZAP+} est indiquée sur la figure. Panel B : les TER de l'IFN α ont été évalué par RQ-PCR sur 3 transfections consécutives de cellules de la lignée BL2. Les barres en pointillés représentent les moyennes et les barres pleines les limites à +/- 1 écart-type. Panel C et D : les TER des IFN β et IFN γ mesuré par RQ-CPR sur les cellules BL2 transfectées sont indiqués respectivement sur chaque panel. Le nombre de réplicat est indiqué sur chaque figure.

7. Résultats préliminaires concernant la régulation de ZAP70 dans le lymphocyte B tumoral de LLC

En 2008, le travail de Bekeredjian-Ding et ses collaborateurs démontrait que l'expression de ZAP70 pouvait être induite dans les lymphocytes B mémoires CD27+ non tumoraux par la stimulation du TLR9 [504]. Dans cette étude, la transcription du gène codant pour ZAP70 était sous la dépendance de la voie AKT (anciennement PKB). Etant donné que les cellules de LLC ont un profil proche de celui des cellules B mémoire [556], qu'elles expriment le TLR9 et que celui-ci est activable dans ces cellules [96], nous nous sommes posé la question d'une régulation de ZAP70 par le TLR9 dans la LLC.

Pour évaluer rapidement notre hypothèse, nous avons mesuré par CMF le niveau d'expression de ZAP70 sur 5 cas consécutifs de LLC pour lesquels un examen de cytogénétique avait été demandé. La mise en culture des leucocytes totaux du sang périphérique a été réalisée par double stimulation comprenant de l'IL2 et du DSP30, un CpG-ODN (oligodéoxynucléotide) de classe B (ou type K) agoniste du TLR9 [557]. L'évaluation de l'expression de ZAP70 a été réalisée en 2 temps, avant et après 72h de culture.

Nos résultats ont montré une nette augmentation du niveau d'expression de ZAP70 dans les lymphocytes B tumoraux pour 4/5 cas (Figure 34A). Parallèlement, le niveau d'expression de ZAP70 dans les lymphocytes T autologues était également augmenté mais de manière plus modérée pour 4/5 des cas (Figure 34B). A noter que les 4 cas de LLC pour lesquels l'expression de ZAP70 a pu être augmentée étaient des LLC^{ZAP+} et que l'unique cas pour lequel l'expression de ZAP70 n'était pas réellement modifiée était une LLC^{ZAP-} qui ne correspond pas au cas pour lequel le niveau de ZAP70 a légèrement diminué dans les lymphocytes T.

Ces données ne sont que préliminaires mais suggèrent que l'expression de ZAP70 peut être induite par des *stimuli* du microenvironnement. Un travail comportant des mises en cultures dédiées de cellules primaires de LLC avec tous les contrôles nécessaires est obligatoire pour conclure formellement et identifier le mécanisme en cause.

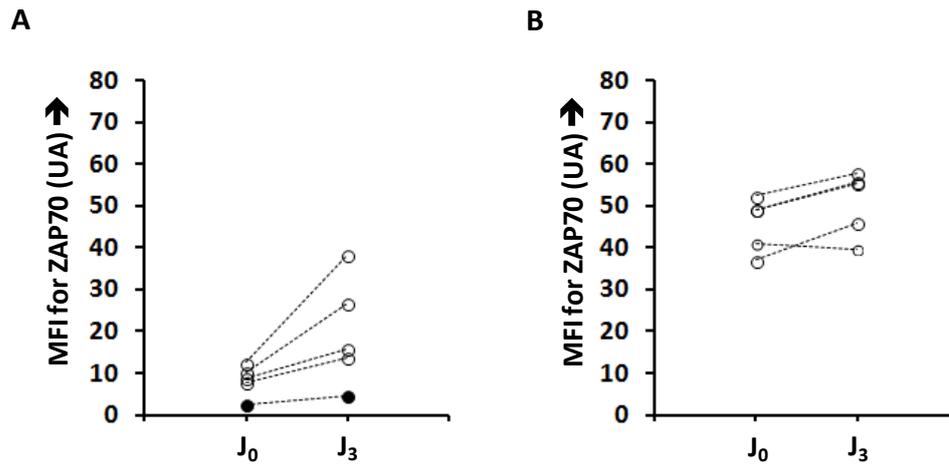


Figure 34 : Expression de ZAP70 en réponse à une stimulation par IL2 + DSP30.

Le sang total de 5 patients atteints de LLC a été mis en culture sous stimulation par IL2 + DSP30. Le niveau d'expression de ZAP70 a été évalué par CMF avant et après les 72h de culture stimulée. Les résultats présentés dans les panels A et B correspondent respectivement aux lymphocytes B tumoraux de LLC et aux lymphocytes T autologues et montrent la variation de la MFI pour ZAP70 normalisée par rapport à un contrôle négatif. Dans le panel A, le cas individualisé par des disques noirs pleins correspond à une LLC^{ZAP-} pour laquelle le niveau d'expression de ZAP70 n'a pas significativement augmenté après stimulation.

La stimulation des cellules primaires de LLC *ex vivo* est un mécanisme complexe. En effet, ces cellules B tumorales ont la capacité de sécréter un grand nombre de cytokines après stimulation par un ligand du TLR9, comme par exemple l'IL6, IL10, le TNF α , ainsi que de moduler l'expression de divers récepteurs CD25 (IL2R haute affinité), CD40, ... [222,557]. D'autre part, nos cultures ont concerné les leucocytes totaux, qui peuvent également stimuler les cellules de LLC cultivées *ex vivo* mais aussi réagir et sécréter des cytokines en réponse à une stimulation du TLR9. Ainsi, l'effet observé sur ZAP70 peut résulter de la stimulation directe des cellules tumorales par le CpG ODN ou l'IL2 ou la stimulation indirecte par des cytokines produites par les cellules tumorales elles-mêmes ou les autres leucocytes. Une combinaison de différents *stimuli* ne peut également pas être exclue.

8. Conclusion sur le rôle fonctionnel de ZAP70

A l'issu de ce travail, le rôle fonctionnel de ZAP70 reste mal défini en terme de signalisation du BCR et d'impact sur la survie cellulaire. En évaluant la réponse à la stimulation du BCR par la phosphorylation de Erk, nous ne retrouvons pas d'effet potentialisateur de ZAP70 sur les cellules de Burkitt comme sur les cellules primaires de LLC. De même, lorsque nous avons étudié le signal tonique du BCR dans les cellules de LLC, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les LLC^{ZAP+} et les LLC^{ZAP-}.

Concernant la régulation de la balance apoptose/survie des cellules, nous avons retrouvé une augmentation de l'apoptose spontanée des cellules de Burkitt transfectées et des cellules primaires de LLC^{ZAP+} par rapport aux cellules ne surexprimant pas ZAP70. Lorsque le BCR de ces cellules était stimulé, ZAP70 ne modifiait pas le type de réponse, *i.e.* BCR pro-apoptotique sur les cellules de Burkitt et BCR anti-apoptotique sur les cellules de LLC.

Enfin, nous retrouvons que l'expression de ZAP70 dans les cellules B est associée à une expression de l'IFN α dans les lignées transfectées et dans les PBMC de patients atteints de LLC. En nos mains, l'expression de ZAP70 semble être inductible après stimulation des cellules de LLC par IL2 et DSP30.

DISCUSSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

VI. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. Signification de la multitude des facteurs pronostiques dans la LLC

Comme nous l'avons exposé en introduction, une multitude de paramètres biologiques et cliniques ont été associés au pronostic des patients atteints de LLC. Certains de ces facteurs permettent de prédire l'évolution de la maladie (facteurs pronostiques au sens propre) alors que d'autres peuvent également prédire la réponse à un traitement spécifiques (facteurs prédictifs). Parmi les facteurs pronostiques, certains ont été validés dans la plupart des cohortes de patients (statut IgVH par exemple) alors que d'autres, non indépendant des marqueurs les plus « forts » (ZAP70), ou simplement moins étudiés (ombres de Gümprrecht), pourraient constituer des signaux d'alerte (« warning »). Au travers de l'exposition du panorama général des facteurs pronostiques de la LLC, nous essaierons de déterminer la signification pratique des paramètres étudiés lors de de travail de thèse.

Index pronostiques et identification des marqueurs pronostiques indépendants

Depuis quelques années, plusieurs équipes ont élaboré des « index pronostiques » de manière à identifier les marqueurs pertinents permettant de prédire l'évolution de la LLC au diagnostic et avant tout traitement. L'élaboration d'index pronostiques amène donc à hiérarchiser ces différents marqueurs entre eux.

Une équipe française avait démontré avec succès la valeur pronostique de la combinaison de 4 paramètres de routine (*i.e.* thymidine kinase sérique >10U/ml, β 2-microglobuline >2,5mg/ml, lymphocytose >13G/l et CD38 >7%) permettant de prédire la survie sans progression des patients de stade A, selon qu'ils présentaient 2 marqueurs péjoratifs ou plus, indépendamment du statut IgVH et ZAP70 [558]. L'analyse simultanée du statut mutationnel et de la surexpression de ZAP70 et CD38 a été validée par 2 équipes indépendantes pour des patients au stade précoce de la maladie [168,450]. Plus récemment, d'autres équipes ont mis au point des index pronostiques sur des cohortes de plus de 1000 patients en combinant des données cytogénétiques aux marqueurs sériques et

phénotypiques. En Angleterre, Pepper *et al.* établirent un index pronostique pour prédire la survie sans traitement et la survie globale des patient de stade A en intégrant des paramètres cliniques, le TDL, IgVH, ZAP70, CD38 et cytogénétique (classification de Döhner) [559]. Dans leur modèle, seuls le TDL, le CD38, le statut IgVH et l'âge au diagnostic permettaient de prédire indépendamment le pronostic des patients au stade précoce. Au centre de lutte contre le cancer américain MD Anderson (MDACC), un index pronostique a été élaboré en retenant les 5 paramètres suivants : présence de plus de 3 adénopathies, adénopathies de localisation cervicale, présence d'une del(17p) ou d'une del(11q), taux de LDH et statut mutationnel IgVH [560].

Comme on le voit, les paramètres pertinents de ces 2 derniers index pronostiques sont principalement le statut mutationnel IgVH, la cytogénétique, le CD38 et des marqueurs de progression du clone (LDH, adénopathies). Le statut ZAP70, de part le manque de standardisation technique et sa forte association au statut IgVH « s'efface » lorsque ce dernier paramètre est intégré. Par exemple, dans un index pronostique belge n'utilisant que des marqueurs quantifiables par RQ-PCR, ZAP70 reste un facteur pronostique indépendant [561]. Aussi, l'évaluation du statut ZAP70 en tant que simple marqueur du pronostic, *i.e.* sans contrepartie fonctionnelle identifiée, ne paraît plus à retenir actuellement si le statut mutationnel est évalué.

Les marqueurs prédictifs de la réponse thérapeutique

A l'heure actuelle le seul facteur prédictif universellement reconnu est la délétion du gène *TP53* et ces mutations qui constituent une contre-indication à l'utilisation de fludarabine, l'agent cytotoxique de référence pour le traitement de la LLC [137].

En Allemagne, Pflug *et al.* ont étudié 23 marqueurs sur une cohorte de 1948 patients inclus dans les protocoles cliniques CLL1, CLL4 et CLL8 comparant différentes modalités thérapeutiques à base de fludarabine ou de chlorambucil +/- rituximab. Dans ce modèle, le sexe, l'âge, le *performans status*, β_2 -microglobuline, TK, statut IgVH, del(11q) et del(17p) étaient les variables pertinentes pour prédire la survie des patients. Leur modèle a été confirmé sur une série de 676 patients de la Mayo Clinic aux Etats-Unis [562].

L'équipe italienne de Rossi *et al.* a mis au point un modèle intégrant la cytogénétique de Döhner (*i.e.* del(13q), +12, del(11q), del(17p)) et les mutations de *SF3B1*, *NOTCH1* et *BIRC3* [227]. Ce modèle, élaboré à partir d'une cohorte de patient inclus dans des protocoles thérapeutiques (traitement à base de fludarabine +/- rituximab), permet de prédire la survie globale du patient, donc sa réponse au traitement, tout au long de son suivi. Dans ce dernier modèle les altérations de p53 étaient associées à la survie la plus réduite.

Ces modèles de survie ont exploité des patients dont les modalités prise en charge thérapeutique étaient variables. Ils donnent un point de vue général sur les marqueurs importants dans la réponse au traitement.

Les données récemment communiquées sur l'absence de bénéfice du rituximab associé à la fludarabine et l'endoxan des patients porteurs d'une mutation de *NOTCH1* d'une part [287], et, d'autre part, la forte valeur pronostique de la MRD médullaire à mi-parcours du traitement par FCR [406], sont des pistes intéressantes pour guider le choix de la prise en charge. Si ces données sont confirmées, nous pouvons imaginer un protocole thérapeutique ou le choix du traitement FCR versus FC serait guidé par le statut mutationnel de *NOTCH1*. Ensuite, une MRD médullaire négative à 3 mois permettrait d'identifier des patients qui ne bénéficieraient pas des 3 dernières cures. Compte-tenu de l'âge des patients atteints de LLC et des comorbidités associées, on peut imaginer que l'on pourrait plus facilement proposer un protocole « FCR light » à des patients inéligibles à 6 cures de FCR complètes. Il resterait à identifier les patients présentant une indication à un traitement spécifique. Les index pronostiques, associant en particulier le modèle « intégré » publié par Rossi *et al.* [227], seraient pertinents d'autant plus que le protocole de traitement précoce (au stade A) des patients de haut risque publié par Schweighofer *et al.* a montré son efficacité [403]. Traiter précocement permettrait peut-être de pouvoir proposer une thérapie efficace à des patients de haut risque avant qu'ils ne deviennent non éligibles à ce type de prise en charge.

Cependant, quelle sera la place de ces marqueurs pronostiques et prédictifs dans un arsenal thérapeutique intégrant dorénavant des inhibiteurs de kinase dont le chef de file, l'ibrutinib, est efficace y compris en cas d'altérations de p53 ? [410]. Le modèle génétique et

cytoépigénétique de Rossi *et al.* pourrait servir dans un 1^{er} temps de modèle prédictif pour identifier les patients qui bénéficieront de ces nouvelles molécules par rapport à l'immunochimiothérapie conventionnelle.

Quid de la fragilité cellulaire et de la sécrétion d'une Ig monoclonale

La plupart des autres facteurs associés au pronostic des patients, s'ils ne sont pas retenus comme pertinents parmi la masse des paramètres biologiques ou cliniques disponibles, permettent néanmoins d'appréhender la physiopathologie de la maladie. Par exemple, la surexpression du CD49d par les cellules clonales a été présentée comme le meilleur facteur pronostique accessible par cytométrie en flux. Nous avons vu qu'au niveau fonctionnel, le CD49d est une molécule favorisant la migration tissulaire des cellules B tumorales et donc favorise l'accès de ces cellules à des signaux protecteurs du microenvironnement [191,192].

Nous avons mis en évidence que la fragilité cellulaire évaluée par le CD45 est inversement associée à une fréquence élevée de trisomie 12 [157]. Les cas de LLC avec trisomie 12 ont souvent une présentation tumorale [233] et surexpriment fréquemment le CD49d entre autre [192]. La faible expression du CD45 ferait donc le lien avec certaines anomalies du cytosquelette comme cela a été démontré avec les ombres de Gümprich et le déficit en vimentine [152,153]. Nous avons également détaillé comment le cytosquelette des cellules de LLC intervient dans la régulation de la migration cellulaire au travers des protéines RhoH et TAPP2 [70,83–85]. Au final, si le niveau d'expression du CD45 n'est pas un facteur pronostique majeur, son lien avec l'évolution des patients indique l'importance du cytosquelette dans la migration des cellules de LLC vers les centres prolifératifs.

Nous avons également mis en évidence que la présence d'une Ig monoclonale dans le sérum des patients, suggérant le caractère sécrétant du clone de LLC, est un facteur pronostique dans cette maladie et fortement associé à un stade clinique plus avancé. Ce phénotype particulier, discuté dans le paragraphe suivant, indique probablement une activation particulière de la cellule. On peut supposer que cet état activé soit, en partie, à l'origine d'une évolution plus rapide de la maladie.

2. Signification de la sécrétion de l'immunoglobuline par les cellules de LLC

Dans un second travail de recherche, nous avons montré que la sécrétion d'une IgM ou d'une IgG par les clones de LLC est associée à une évolution plus rapide vers la mise en place d'un traitement spécifique. Les pics monocloaux associés à la LLC sont des pics de faible ampleur, évalués entre 1 et 3 g/l pour près de 90% des patients de notre série. L'impact péjoratif était indépendant de l'hypogammaglobulinémie (hypo- γ). La médiane du délai écoulé entre le diagnostic et le 1^{er} traitement était de 36,5 mois, 27,7 mois, 54,2 mois et 121,7 mois respectivement pour les patients avec un pic IgM, un pic IgG, une hypo- γ ou une électrophorèse des protéines sériques normale. Le répertoire du BCR des cas de LLC associés à une Ig monoclonale est biaisé (*IGHV3-48* pour les IgM, *IGHV4-39* et *IGHV3-48* pour les IgG). De même, les cas de LLC avec Ig monoclonale circulante présentaient une accumulation d'évènements génétiques de mauvais pronostic (76% et 87% respectivement pour les pics IgM et IgG) qui n'était pas retrouvée dans les LLC avec hypo- γ (49%) malgré un pronostic similaire. Ces biais du répertoire, invariables au cours du temps, et l'accumulation spécifique d'évènements génétiques défavorables, mettent en avant la particularité des LLC sécrétantes.

Dans notre étude, nous n'avons pas retrouvé de différenciation lymphoplasmocytaire pour les cas de LLC associées à une IgM ou IgG monoclonale malgré une plus grande fréquence d'expression du CD38 (46% et 54% respectivement) par rapport aux sous-groupes hypo- γ et EPS normales (24% et 19% respectivement). L'examen cytologique n'a été réalisé que sur le sang, le tissu de référence de la LLC, et on peut poser la question de la différenciation lymphoplasmocytaire dans la moelle osseuse ou les ganglions par exemple. Le sang ne représente en réalité qu'un compartiment de transit des précurseurs de plasmocytes entre le ganglion et la moelle osseuse [563].

Le caractère sécrétant peut être acquis par les cellules B en réponse à diverses stimulations comme, entre autres, les cytokines IL2, IL6, IL10, IL21 qui active la voie STAT3 qui est indispensable à la différenciation plasmocytaire [564,565]. Le CD40 et le TLR9 qui activent la voie NF- κ B peuvent également induire la différenciation terminale du lymphocyte

B [557,566,567]. Il a été démontré que le TLR9 peut induire la production d'IgM et la recombinaison de classe dans les lymphocytes B isolés d'amygdales [557] et induire la différenciation plasmocytaire de cellules primaires de LLC *ex vivo* avec sécrétion d'Ig et de chaîne légère libre [567]. Le signal du BCR intervient aussi dans la différenciation du lymphocyte B [568] tout comme l'IFN α mais de manière plus complexe. L'hypersécrétion d'IFN α a été clairement identifiée à l'origine de la présence d'auto-anticorps dans le lupus érythémateux [569]. On ne retrouve pas de manifestation auto-immune spécifique d'organes dans la LLC, en dehors des fréquentes cytopénies auto-immunes dues à des lymphocytes B auto-réactifs différents du clone, mais la cellule de LLC pourrait tirer profit des voies activées par l'IFN α [570].

Compte-tenu du répertoire biaisé des LLC sécrétantes que nous avons mis en évidence, il est possible que ces cellules reçoivent des signaux d'activation particuliers ou plus intenses au sein des centres de prolifération ganglionnaires ou médullaires via leur BCR et autres récepteurs.

La présence d'un pic monoclonal de nature IgG pose la question de la commutation de classe dans la LLC. Les LLC « switchées » concernent une faible proportion des patients (<10%) et il est souvent observé une sous-population IgG au sein d'un clone majoritairement IgM (*cf.* discussion sur l'expression d'AID page 120). En physiologie, la commutation de classe, sous l'action d'AID, du locus C μ vers un locus C γ peut être induite par des cytokines sécrétées par les lymphocytes T Helper [28]. L'observation d'un processus de CSR a été associée à un mauvais pronostic des patients atteints de LLC [571], même si les LLC avec un BCR stéréotypé du subset#4 (*IGHV4-34*) représentent un groupe de LLC au statut IgVH muté, exprimant une IgG de surface, mais associé à un bon pronostic [543].

Dans notre série, 14/25 (56%) des LLC associées à un pic IgG présentaient un statut IgVH non muté dont 6 cas utilisant le gène *IGHV4-39* (avec 3 BCR appartenant au subset#8). Parmi les LLC avec pic IgG et un statut IgVH muté, seulement 1 cas présentait un réarrangement du gène *IGHV4-34* mais dont le CDR3 ne correspondait pas au subset#4. S'il est légitime de penser que les 4 LLC avec BCR stéréotypés des subset#4 et #8 ont certainement fait

l'expérience du switch IgG, nous n'avons pas testé la classe d'Ig de surface pour les autres cas associés à un pic IgG ni en CMF ni par PCR.

Lors de la sélection des patients pour cette étude, nous en avons rétrospectivement identifié un total de 394 LLC pour lesquelles au moins une EPS avait été réalisée entre 2005 et 2010. Un pic monoclonal était détectable chez 122 patients (31%). Par ordre de fréquence, on retrouvait : 52/122 pics IgG seuls (43%) dont 17 présentaient une chaîne légère différente du clone de LLC ; 35/122 pics IgM seuls (29%) dont 3 avec une discordance κ/λ ; 33/122 pics doubles (27%) dont 22/33 avec 1 pic κ et 1 pic λ et enfin 2 pics IgA seuls. Dans le travail publié nous avons sélectionné uniquement les patients pour lesquels la chaîne légère du pic monoclonal et du clone de LLC était identique. Cette vue d'ensemble met en évidence :

- la grande fréquence d'un pic monoclonal chez les patients atteints de LLC (31%), au diagnostic ou en cours de suivi, suggérant un terrain particulier au développement de clones ou de sous-clones sécréteurs
- la fréquence de pic IgG (43%) supérieure à la fréquence attendue des LLC switchées (10%), éventuellement compatible avec un sous-clone IgG sécrétant non identifié au diagnostic sur le sang périphérique
- la fréquence élevée des discordances κ/λ (34%), principalement pour les pics IgG, suggérant que les pics d'Ig monoclonale pourraient également provenir de cellules non apparentées au clone de LLC

Une hypothèse explicative pourrait être que les patients avec un pic monoclonal présentent un microenvironnement anormal qui favorise le développement et la différenciation du clone de LLC mais également de lymphocytes B, volontiers auto-réactifs, ce qui aboutit à la sécrétion d'une Ig monoclonale dérivée ou non de la LLC (perte du contrôle de l'auto-immunité ?). En sélectionnant uniquement les cas sans discordance κ/λ , nous avons pu mettre en évidence un biais de répertoire IgVH des LLC associées aux pics IgM et IgG. Ce résultat est plutôt compatible avec la sélection de cas de LLC sécrétantes plutôt que le développement d'un clone non spécifique. Il serait alors intéressant d'explorer les cas

avec discordance κ/λ : nous pourrions attendre une absence de biais de répertoire mais peut-être un impact sur la progression du clone de LLC liée à une hyperactivation par le microenvironnement du patient. Cette activation pourrait être mise en évidence *in vivo* en explorant la voie NF- κ B, par exemple, qui est une voie de convergence du BCR, des TLR et du CD40 entre autre.

3. Rôle fonctionnel de ZAP70 et microenvironnement des cellules tumorales

3.1. ZAP70 et signal du BCR

Le rôle fonctionnel de ZAP70 dans le lymphocyte B reste mal circonscrit. Il a été initialement publié que ZAP70 est responsable d'une potentialisation du signal du BCR après stimulation dans les cellules de LLC [514,515,572]. Cependant, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence un tel effet au travers de notre travail expérimental sur cellules primaires ou sur de lignées transfectées. Nous n'avons également pas mis en évidence d'effet majeur de ZAP70 sur le signal tonique du BCR. Ce que nous montrons, en revanche, c'est que le signal BCR est très variable d'une LLC à l'autre et que cette hypersensibilité au BCR n'est pas restreinte aux cas surexprimant ZAP70. Ces données sont cohérentes avec la littérature récente qui montre que les LLC progressives sur le plan clinique présentent cette hypersensibilité du BCR et que la surexpression de ZAP70 est simplement plus fréquente dans ce sous-groupe [527,573] et que des cellules de LLC sans ZAP70 peuvent répondre d'une manière équivalente au BCR [574]. De plus, il a clairement été démontré que ZAP70 est capable de réguler la signalisation du BCR en l'absence d'activation [517] et même en l'absence de domaine kinase fonctionnel [516]. Ces dernières données montrent que ZAP70 peut déréguler la cellule en jouant le rôle de protéine d'ancrage pour d'autres protéines cellulaires. ZAP70 agirait donc au-delà de sa seule activité de PTK, et pourrait déréguler le signalosome de divers récepteurs autres que le BCR. Ainsi, plusieurs travaux ont montré que l'expression de ZAP70 potentialise la réponse de la cellule B aux signaux de migration vers le microenvironnement médullaire en particulier [78,163,520–522,575].

Nous avons également montré expérimentalement que ZAP70 potentialise l'apoptose spontanée *ex vivo* des cellules primaires de LLC et de lignées de Burkitt transfectées. La revue de la littérature montre que la réponse *in vitro* des cellules primaires de LLC est dépendante de la méthode de stimulation employée. En effet, que ce soit sur PBMC totaux ou sur B tumoraux triés, les travaux de Petlickovski *et al.* et de Deglesne *et al.* s'accordent sur le fait que la stimulation faible du BCR par un F(ab')₂ anti-IgM soluble à 10µg/ml induit l'apoptose des cellules primaires de LLC [525,527]. A l'inverse, dans ces dernières études comme dans celle de Gobessi *et al.*, la stimulation forte du BCR par un anti-IgM fixé à la paroi des puits diminue l'apoptose spontanée [525–527], contrairement à ce que Nédellec *et al.* avait préalablement décrit [523]. Dans ces différents travaux, les LLC pouvaient être séparées en cellules peu ou non réactives (LLC non progressives) et cellules très réactives (LLC progressives).

Nous avons retrouvé que la stimulation *in vitro* du BCR par un F(ab')₂ anti-IgM soluble à la concentration de 10µg/ml protège partiellement les cellules de LLC de l'apoptose spontanée. De plus, le niveau de protection du BCR est indépendant du niveau d'expression de ZAP70. Il semblerait donc que les tests de stimulation *in vitro* du BCR sur des PBMC totaux ou cellules triées ne reflètent pas exactement les mécanismes en place *in vivo*. Ces tests doivent donc plutôt être interprétés de manière spécifique à chaque contexte expérimental et en fonction de la question posée.

3.2. ZAP70 et apoptose spontanée des cellules B tumorales

L'apoptose spontanée induite par ZAP70 dans les cellules de lignée de Burkitt transfectées et son association avec l'apoptose spontanée *ex vivo* des cellules primaires de LLC semblent, au premier abord, discordantes avec les études cliniques sur la valeur pronostique péjorative de cette PTK. Si aucune interprétation évidente n'apparaît encore à ce jour, certaines données de la littérature montrent que les cas de LLC de mauvais pronostic (*i.e.* LLC non mutées) sont plus sujettes à l'apoptose spontanée que les cas de LLC de bon pronostic [553,576]. Coscia *et al.* ont montré que cette apoptose spontanée était due à la

perte de l'activation de NF- κ B et de l'expression de Bcl2 [553]. Dans cette étude, la co-culture en présence de cellules stromales ou de lymphocytes T autologues permettaient de soutenir l'expression de Bcl2 et de diminuer l'apoptose spontanée. Ces résultats montrent donc que les cellules de LLC de mauvais pronostic sont plus dépendantes du microenvironnement *in vivo* que les cellules de LLC non progressives. Ce profil d'apoptose spontanée *ex vivo* de cellules B tumorales agressives présente quelques similitudes avec la dérégulation de l'oncogène c-Myc. La surexpression de c-Myc active à la fois le métabolisme énergétique et le cycle cellulaire ainsi que l'expression des protéines pro-apoptotiques p53 et p19^{ARF} qui, en particulier, réprimant l'expression de Bcl2 [577]. Dans la LLC, il a été démontré que l'activation du BCR induit l'expression de c-Myc [578,579] et que cet oncogène est fortement transcrit dans le microenvironnement ganglionnaire [71]. De plus, c-Myc est particulièrement dérégulé dans les LLC très agressives avec del(17p) [580]. Nos résultats expérimentaux pourraient être cohérents avec une apoptose dépendante de c-Myc dans les cellules primaires de LLC, en revanche, nous n'avons pas exploré la prolifération de ces cellules. Dans les cellules de lignée de lymphome de Burkitt, le fait que ces cellules transformées expriment un fort taux de c-Myc par la présence d'une translocation spécifique peut avoir sélectionné des mécanismes de résistance à l'apoptose c-Myc dépendante.

3.3. ZAP70 et interféron alpha

Nous avons également constaté que l'IFN α pouvait induire un faible taux d'apoptose sur les cellules de lignée de lymphome de Burkitt [555] et nous avons mis en évidence une surexpression de l'IFN α dans les PBMC de patients atteints de LLC et les cellules de lignées transfectées avec ZAP70. Les interférons sont des molécules immunomodulatrices physiologiques dérégulées dans les maladies auto-immunes ou dans certains types de cancers [581]. Dans l'organisme, la principale source d'IFN α sont les cellules dendritiques qui sécrètent cette cytokine pour activer le système immunitaire au début d'une infection virale en particulier [28]. L'IFN α a été en particulier utilisé depuis de nombreuses années dans le traitement d'hémopathies malignes telles la leucémie myéloïde chronique [582], ou certains

lymphomes B de bas grade (tricholeucémie, lymphome folliculaire, ...) [583]. L'effet pharmacodynamique de l'IFN α en cancérologie est complexe mais il repose entre autre sur la stimulation de l'immunité anti-tumorale en forçant les cellules malignes à se « dévoiler » aux cellules effectrices [584]. L'IFN α a également fait partie de l'arsenal thérapeutique destiné à traiter la LLC mais son efficacité n'a pas été démontrée, en particulier pour les formes évolutives [585]. Il a d'ailleurs été récemment mis en évidence que la signalisation de l'IFN α dans les cellules de LLC est altérée, en particulier en cas de del(11q) ou de del(17p) [586]. Dans ces cellules, un haut niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) détourne la voie pro-apoptotique de STAT1 au profit de la voie pro-proliférative de STAT3 en aval du récepteur à l'IFN α . D'autre part, les travaux de Tomic *et al.*, montrent que lorsqu'on inhibe l'activation de STAT3 par le piceatannol, les cellules de LLC retrouvent un caractère « immunogène » et déclenche la prolifération de lymphocytes T hétérologues dans des expériences de réactions lymphocytaires mixtes. Enfin, la stimulation des cellules de LLC avec de l'IFN α induit l'expression du CD38 sur les cellules tumorales [167,587] et cette cytokine constitue un signal d'activation du clone B dans le cadre d'une coopération avec les lymphocytes Th CD4+ (interaction CD40/CD40L activant la voie NF- κ B) en induisant la sécrétion d'IL6 et de TNF α (facteurs de croissance autocrines du clone tumoral) [588].

Nous émettons l'hypothèse que les LLC surexprimant ZAP70 pourraient bénéficier *in vivo* d'une stimulation autocrine ou paracrine par l'IFN α . Par le biais de l'activation de STAT3, ces cellules pourraient échapper à la surveillance immunitaire. Lors des cultures de cellules primaires *ex vivo*, l'effet délétère de l'activation de STAT1 deviendrait prédominant et expliquerait l'augmentation de l'apoptose spontanée des cellules de LLC^{ZAP70+} dans ces conditions artificielles (nécessité d'une coactivation par le CD40 ?). Si l'hypothèse est confirmée, le statut ZAP70 des cellules de LLC pourrait identifier des patients susceptibles de bénéficier d'un traitement par inhibiteurs de STAT3 dans un projet de thérapie « à la carte ».

3.4. Régulation de l'expression de ZAP70 dans les cellules de LLC

Il a été démontré que l'expression de ZAP70 peut être induite dans les lymphocytes B normaux après activation *in vivo* et *in vitro* [501–503]. Des données expérimentales publiées montrent que l'expression de ZAP70 dans les cellules de LLC est régulée au niveau épigénétique par méthylation de l'ADN dans la région 5'UTR [589–591]. Cet aspect de la régulation de ZAP70 dans la LLC est proche de la régulation épigénétique de la surexpression de LPL [592] fortement associée au statut IgVH non muté [452].

La stimulation du TLR9 de lymphocytes B normaux IgM+, en particulier, est capable d'induire l'expression de ZAP70 [504]. Nos résultats expérimentaux préliminaires sur des cellules primaires de LLC stimulées par l'IL2 et DSP30 montrent également que cette stimulation peut induire l'expression de ZAP70 dans les cellules B tumorales. Il a été démontré plus récemment que la stimulation du TLR9 induit la prolifération *ex vivo* des cellules de LLC avec statut IgVH non muté (UM-CLL) mais l'apoptose des cellules de LLC avec statut IgVH muté (M-CLL) [93] et nous avons vu que le statut IgVH non muté est fortement associé à l'expression de ZAP70 [445]. La régulation de ZAP70 dans les cellules de LLC serait cependant différente de celle de la lipoprotéine lipase (LPL), dont l'expression est également très étroitement associée au statut IgVH non muté. En effet, la stimulation des TLR est incapable d'induire l'expression de l'enzyme LPL contrairement aux signaux T-dépendant CD40/IL4 et au BCR [592].

Nous émettons l'hypothèse que l'expression de ZAP70 dans la LLC pourrait être la conséquence d'une capacité particulière des LLC non mutées à répondre aux *stimuli* de l'immunité innée via le TLR9 et l'activation de la voie NF- κ B. Des analyses de transcriptomique ont d'ailleurs identifié que la dérégulation des micro-ARN de la famille miR-17~92 dans les LLC non mutées contrôle la réponse à la stimulation du TLR9 dans ces cellules [94]. Nous savons également que le signal du TLR9 implique la participation de Btk dans les cellules dendritiques [101,102]. Nous posons alors la question d'une éventuelle implication de Btk dans la signalisation du TLR9 des cellules de LLC et de **l'inhibition** secondaire de l'expression de ZAP70. Selon cette hypothèse, le traitement par ibrutinib

inhiberait le signal TLR9 des cellules B tumorales, particulièrement des LLC non mutées. En conséquence, l'expression de ZAP70 pourrait être interrompue par défaut de stimulation ce qui limiterait la capacité des cellules à répondre aux signaux des récepteurs aux chemokines potentialisé par cette PTK [78,163,520–522]. Cette « coupure » du signal de migration pourrait participer au phénomène de « chasse » ganglionnaire observée lors de l'initiation du traitement par ibrutinib des patients atteints de LLC [411,412]. Cette hypothèse peut être nuancée par le fait que Btk peut directement participer à la transduction du signal du CXCR4 (récepteur de SDF1/CXCL12) [593] et que la mutation du récepteur CXCR4 (mutation C1013G) est impliquée dans la résistance à l'ibrutinib des lymphomes lymphoplasmocytaires [594]. Enfin, Amin *et al.* ont montré que le traitement de cellules de LLC par des inhibiteurs d'acétylases (HDAC) ou des inhibiteurs de méthylation de l'ADN peut induire l'expression de ZAP70 par déméthylation de la région promotrice du gène, ce qui pose la question de l'impact *in vivo* de cette dérégulation [589].

3.5. Hypothèses autour de la surexpression de ZAP70 dans les lymphocytes T autologues des patients atteints de LLC

Nous avons montré que les lymphocytes T autologues des patients atteints de LLC surexpriment ZAP70 par rapport aux lymphocytes T issus de donneurs sains. Des résultats identiques ont été publiés par une autre équipe en 2005 [544]. Dans notre expérience, le niveau d'expression de ZAP70 dans les lymphocytes T est corrélé à la masse tumorale circulante. ZAP70 est la kinase clé de l'activation du lymphocyte T via le TCR [595] et le TCR peut induire ZAP70 [596]. La surexpression de ZAP70 dans ces cellules témoigne certainement d'une interaction entre le clone B et les cellules T. La population lymphocytaire T est profondément remaniée au contact des cellules de LLC [597]. Nous avons vu que chez les patient atteints de LLC, les principales perturbations consistent en l'inversion du ratio CD4/CD8 et à l'augmentation du contingent des lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T CD8 dont la population augmente sont des cellules qui ne peuvent pas former correctement des synapses immunes. Ces remaniements aboutissent donc à une perte

d'efficacité à engager une réponse immune contre les cellules tumorales ou des agents pathogènes. En particulier, la sécrétion d'IL2 par les lymphocytes T autologues est inhibée alors que leur capacité à sécréter de l'IL4, un facteur de croissance des cellules de LLC, est conservée [597]. L'IFN α pourrait également intervenir dans cette perturbation des lymphocytes T puisque cette cytokine est impliquée dans les maladies auto-immunes en favorisant le développement de lymphocytes B auto-réactifs via la stimulation des lymphocytes T Helper par les cellules dendritiques [598]. Dans ce contexte, il paraît légitime de poser la question de l'effet de l'IFN α sur le niveau d'expression de ZAP70 dans les lymphocytes T. Il s'agira de déterminer quelle sous-population leucocytaire est responsable de l'augmentation du transcrite d'IFN α (B de LLC, T CD4, T CD8, T reg, cellules dendritiques, ...) et quel est l'effet spécifique de l'IFN α sur ces cellules.

3.6. Perspectives de recherche sur le rôle fonctionnel de ZAP70 dans la LLC

A l'issue de notre travail expérimental et du questionnement qui en résulte, le rôle fonctionnel de ZAP70 dans le contrôle de l'évolution de la LLC paraît être plus complexe que la seule potentialisation du signal du BCR initialement décrite. Les perspectives de ce projet pourraient se résumer en 3 questions :

Comment est induit ZAP70 dans la LLC ?

Nous poserons la question du rôle d'un signal activateur de NF- κ B (TLR9 ou CD40L) sur le contrôle de l'expression de ZAP70 selon le statut IgVH. Nous testerons l'effet de l'ibrutinib sur l'expression de ZAP70 dans les cellules de LLC non mutées et nous explorerons également son impact sur la sécrétion d'IgM, ainsi que sur le niveau d'expression du CD45 et la fragilité cellulaire.

Comment ZAP70 induit l'expression de l'IFN α ?

Nous souhaitons explorer la régulation de l'expression de l'IFN α par ZAP70. Dans cet aspect du projet nous pourrions utiliser notre modèle de surexpression de ZAP70 dans les lignées de Burkitt et confirmer les hypothèses fonctionnelles sur les cellules primaires de LLC.

Quel est l'effet de l'IFN α sur les cellules tumorales de LLC ?

Nous évaluerons le rôle de l'IFN α sur la balance STAT1/STAT3 dans les cellules de LLC et la possible synergie avec NF- κ B sur la prolifération cellulaire. Nous explorerons dans le même temps l'effet de l'IFN α sur les cellules tumorales elles-mêmes et sur leurs interactions avec les lymphocytes T autologues (induction de ZAP70, induction d'un signal CD40L, immunotolérance).

Résultats attendus :

Nous pensons pouvoir mettre en évidence que le phénotype « ZAP70+ » des cellules de LLC est au moins en partie lié à une stimulation particulière des cellules pathologiques via des récepteurs de l'immunité innée comme le TLR9. En retour, l'expression de ZAP70 serait responsable d'une sécrétion d'IFN α dont le signal serait détourné par les cellules malignes vers un effet prolifératif sur le clone B et une modification phénotypique des lymphocytes T autologues.

En cohérence avec la coopération p53/STAT1 démontrée par notre équipe [555], une synergie entre les faibles doses de fludarabine et l'IFN α permettrait d'envisager un effet pro-apoptotique de cette association sur les cellules de LLC porteuses de mutations *TP53* pour lesquelles la fludarabine seule est inefficace.

4. Conclusion générale sur le travail de thèse

Au travers de l'étude de la fragilité cellulaire, de la sécrétion d'une Ig monoclonale et du rôle fonctionnel de ZAP70, nous avons parcouru différentes voies qui contrôlent le développement du clone tumoral de LLC.

Nos résultats corroborent l'importante littérature qui démontre les relations fortes entre la LLC et son microenvironnement. En effet, la sécrétion d'une Ig monoclonale est probablement la conséquence d'une activation particulière par des signaux de lymphocytes T, de cellules folliculaires dendritiques ou autres. Le niveau d'expression du CD45 fait vraisemblablement le lien avec le cytosquelette qui est impliqué dans la régulation de la migration cellulaire, en particulier vers les centres de prolifération du clone. Enfin, la surexpression de ZAP70 dans les lymphocytes T autologues signe certainement un état d'activation de cellules T qui pourraient alors soutenir le développement tumoral par des signaux tels que le CD40L.

La revue de la littérature récente sur ZAP70 montre que ce marqueur n'est pas souvent sélectionné dans les modèles multivariés, en particulier par l'absence de consensus sur la méthode d'exploration et par sa très forte association avec le statut mutationnel du locus IgVH. Si sa valeur pronostique pure peut donc être débattue actuellement, près de 10 ans après sa « découverte » par Rosenwald *et al.* [444], nos travaux expérimentaux posent la question de ZAP70 en tant que facteur prédictif dans le cadre d'une future thérapeutique « à la carte » de la LLC. En effet, la surexpression de ZAP70 dans les cellules clonales pourrait traduire l'activation du TLR9 et/ou une implication de l'IFN α , des mécanismes qui peuvent aujourd'hui être modulés pharmacologiquement.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. A. Monnereau, L. Remonet, M. Maynadier, F. Binder-Foucard, A. Belot, X. Troussard, N. Bossard. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. Partie 2 : Hémopathies malignes. Saint-Maurice, France: Institut national de veille sanitaire; 2013. p. 88.
2. J.L. Binet. Cinq histoires de leucémie lymphoïde chronique. *Hématologie*. 2006;12(6):2-3.
3. Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. févr 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.
4. M.P. Lefranc. site IMGT Education [Internet]. [cité 16 mai 2014]. Disponible sur: <http://www.imgt.org/IMGTeducation/>
5. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp Clin Immunogenet*. 2001;18(2):100-116.
6. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Exp Clin Immunogenet*. 2001;18(3):161-174.
7. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. *Exp Clin Immunogenet*. 2001;18(4):242-254.
8. Collins AM, Sewell WA, Edwards MR. Immunoglobulin gene rearrangement, repertoire diversity, and the allergic response. *Pharmacol Ther*. 2003;100(2):157-170.
9. Tamir I, Cambier JC. Antigen receptor signaling: integration of protein tyrosine kinase functions. *Oncogene*. 1998;17(11 Reviews):1353-64.
10. Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(3):229-243.
11. Gilmore TD, Kalaitzidis D, Liang M-C, Starczynowski DT. The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. *Oncogene*. 2004;23(13):2275-2286.
12. Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol*. 2000;1(5):379-385.
13. Davi F, Faili A, Gritti C, Blanc C, Laurent C, Sutton L, Schmitt C, Merle-Béral H. Early onset of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in normal human bone marrow CD34+ cells. *Blood*. 1997;90(10):4014-4021.
14. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:541-570.

15. Nishana M, Raghavan SC. Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology*. 2012;137(4):271-281.
16. Darlow JM, Stott DI. V(H) replacement in rearranged immunoglobulin genes. *Immunology*. 2005;114(2):155-165.
17. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):251-263.
18. Gauthier L, Rossi B, Roux F, Termine E, Schiff C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(20):13014-13019.
19. Espeli M, Rossi B, Mancini SJC, Roche P, Gauthier L, Schiff C. Initiation of pre-B cell receptor signaling: common and distinctive features in human and mouse. *Semin Immunol*. 2006;18(1):56-66.
20. Van Loo PF, Dingjan GM, Maas A, Hendriks RW. Surrogate-light-chain silencing is not critical for the limitation of pre-B cell expansion but is for the termination of constitutive signaling. *Immunity*. 2007;27(3):468-480.
21. Mårtensson I-L, Almqvist N, Grimsholm O, Bernardi AI. The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett*. 2010;584(12):2572-2579.
22. Bergman Y, Cedar H. A stepwise epigenetic process controls immunoglobulin allelic exclusion. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(10):753-761.
23. Shlomchik MJ. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity*. 2008;28(1):18-28.
24. Edry E, Melamed D. Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004;173(7):4265-4271.
25. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol*. 2003;24(6):343-349.
26. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):767-777.
27. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):118-132.
28. C. Janeway, K. Murphy, P. Travers, M. Walport. *Immunobiologie*. 7eme Edition. Bruxelles, Belgique: De Boeck Université; 2009. 889 p.
29. Rezk SA, Nathwani BN, Zhao X, Weiss LM. Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. *Hum Pathol*. 2013;44(6):937-950.
30. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):22-33.

31. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:429-457.
32. Martomo SA, Gearhart PJ. Somatic hypermutation: subverted DNA repair. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(3):243-248.
33. Fear DJ. Mechanisms regulating the targeting and activity of activation induced cytidine deaminase. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(5):619-628.
34. Nutt SL, Taubenheim N, Hasbold J, Corcoran LM, Hodgkin PD. The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Semin Immunol.* 2011;23(5):341-349.
35. Vinuesa CG, Chang P-P. Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. *Nat Immunol.* 2013;14(2):119-126.
36. H.K. Müller-Hermelink, E. Montserrat, D.Catovsky, E. Campo, N.L. Harris, H. Stein. Mature B-cell neoplasms. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edition. IARC; 2008. p. 180-182.
37. Hamblin T. Historical aspects of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2000;111(4):1023-1034.
38. Shapiro HM. The evolution of cytometers. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* 2004;58(1):13-20.
39. Les cancers en France en 2013. Boulogne-Billancourt, France: Institut national du cancer; 2014. 88 p.
40. Skrabek P, Turner D, Seftel M. Epidemiology of Non-Hodgkin Lymphoma. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis.* 2013;49(2):133-138.
41. Linet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD, Richardson DB, Landgren O, Blair A, Silver S, Field RW, Caldwell G, Hatch M, Dores GM. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol.* 2007;139(5):672-686.
42. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, Ostroumova E, Bluhm EC, Rabkin CS, Devesa SS, Linet MS. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol.* 2007;139(5):809-819.
43. Mak V, Ip D, Mang O, Dalal C, Huang S, Gerrie A, Gillan T, Ramadan KM, Toze C, Au W-Y. Preservation of lower incidence of chronic lymphocytic leukemia in Chinese residents in British Columbia: a 26-year survey from 1983 to 2008. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(4):824-827.
44. Kawamata N, Moreilhon C, Saitoh T, Karasawa M, Bernstein BK, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Raynaud S, Koeffler HP. Genetic differences between Asian and Caucasian chronic lymphocytic leukemia. *Int J Oncol.* 2013;43(2):561-565.
45. Gunawardana C, Austen B, Powell JE, Fegan C, Wandroo F, Jacobs A, Pratt G, Moss P. South Asian chronic lymphocytic leukaemia patients have more rapid disease progression in comparison to White patients. *Br J Haematol.* 2008;142(4):606-609.

46. Nabhan C, Aschebrook-Kilfoy B, Chiu BC-H, Smith SM, Shanafelt TD, Evens AM, Kay NE. The impact of race, ethnicity, age and sex on clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis in the modern era. *Leuk Lymphoma*. 2014; doi:10.3109/10428194.2014.898758 [Epub ahead of print].
47. Goldin LR, Slager SL, Caporaso NE. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(4):350-355.
48. Ruchlemer R, Polliack A. Geography, ethnicity and « roots » in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(6):1142-1150.
49. Theodorou I, Abel L, Mauro F, Duprey B, Magnac C, Payelle-Brogard B, Davi F, Dighiero G. High occurrence of DRB1 11 in chronic lymphocytic leukaemia families. *Br J Haematol*. 2002;119(3):713-715.
50. Pritsch O, Troussard X, Magnac C, Mauro FR, Davi F, Payelle-Brogard B, Dumas G, Pulik M, Clerget F, Mandelli F, Chiorazzi N, Schroeder HW Jr, Leporrier M, Dighiero G. VH gene usage by family members affected with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;107(3):616-624.
51. Zintzaras E, Kitsios GD. Synopsis and synthesis of candidate-gene association studies in chronic lymphocytic leukemia: the CUMAGAS-CLL information system. *Am J Epidemiol*. 2009;170(6):671-678.
52. Lan Q, Au W-Y, Chanock S, Tse J, Wong K, Shen M, Siu LP, Yuenger J, Yeager M, Hosgood HD 3rd, Purdue MP, Liang R, Rothman N. Genetic susceptibility for chronic lymphocytic leukemia among Chinese in Hong Kong. *Eur J Haematol*. 2010;85(6):492-495.
53. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Ma Y, Robertson L, Pittman AM, Price A, Twiss P, Vijayakrishnan J, Qureshi M, Dyer MJS, Matutes E, Dearden C, Catovsky D, Houlston RS. Fine-scale mapping of the 6p25.3 chronic lymphocytic leukaemia susceptibility locus. *Hum Mol Genet*. 2010;19(9):1840-1845.
54. Speedy HE, Di Bernardo MC, Sava GP, Dyer MJS, Holroyd A, Wang Y, Sunter NJ, Mansouri L, Juliusson G, Smedby KE, Roos G, Jayne S, Majid A, Dearden C, Hall AG, Mainou-Fowler T, Jackson GH, Summerfield G, Harris RJ, Pettitt AR, Allsup DJ, Bailey JR, Pratt G, Pepper C, Fegan C, Rosenquist R, Catovsky D, Allan JM, Houlston RS. A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2014;46(1):56-60.
55. Blankart CR, Koch T, Linder R, Verheyen F, Schreyögg J, Stargardt T. Cost of illness and economic burden of chronic lymphocytic leukemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8(1):32.
56. Metz-Flamant C, Laurent O, Samson E, Caër-Lorho S, Acker A, Hubert D, Richardson DB, Laurier D. Mortality associated with chronic external radiation exposure in the French combined cohort of nuclear workers. *Occup Environ Med*. 2013;70(9):630-638.
57. Rana S, Munawar M, Shahid A, Malik M, Ullah H, Fatima W, Mohsin S, Mahmood S. Deregulated expression of circadian clock and clock-controlled cell cycle genes in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Biol Rep*. 2014;41(1):95-103.

58. Anderson LA, Landgren O, Engels EA. Common community acquired infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2009;147(4):444-449.
59. Landgren O, Rapkin JS, Caporaso NE, Mellekjaer L, Gridley G, Goldin LR, Engels EA. Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2007;109(5):2198-2201.
60. Landgren O, Gridley G, Check D, Caporaso NE, Morris Brown L. Acquired immune-related and inflammatory conditions and subsequent chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;139(5):791-798.
61. Grandin L, Orsi L, Troussard X, Monnereau A, Berthou C, Fenaux P, Marit G, Soubeyran P, Huguet F, Milpied N, Leporrier M, Hemon D, Clavel J. UV radiation exposure, skin type and lymphoid malignancies: results of a French case-control study. *Cancer Causes Control CCC.* 2008;19(3):305-315.
62. Adami J, Gridley G, Nyrén O, Dosemeci M, Linet M, Glimelius B, Ekblom A, Zahm SH. Sunlight and non-Hodgkin's lymphoma: a population-based cohort study in Sweden. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1999;80(5):641-645.
63. Negri E. Sun exposure, vitamin D, and risk of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *Nutr Cancer.* 2010;62(7):878-882.
64. Łuczyńska A, Kaaks R, Rohrmann S, Becker S, Linseisen J, Buijsse B, Overvad K, Trichopoulou A, Valanou E, Barmptsioti A, Masala G, Agnoli C, Tumino R, Panico S, Bueno-de-Mesquita HB, van Duynhoven FJB, Peeters PHM, Vermeulen R, Weiderpass E, Brustad M, Skeie G, González CA, Jakszyn P, Quirós JR, Sánchez M-J, Huerta JM, Ardanaz E, Melin B, Johansson AS, Almquist M, Malm J, Khaw K-T, Wareham N, Travis RC, Fedirko V, Romieu I, Jenab M, Gallo V, Riboli E, Vineis P, Nieters A. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and lymphoma risk: results of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(3):827-838.
65. Shanafelt TD, Drake MT, Maurer MJ, Allmer C, Rabe KG, Slager SL, Weiner GJ, Call TG, Link BK, Zent CS, Kay NE, Hanson CA, Witzig TE, Cerhan JR. Vitamin D insufficiency and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;117(5):1492-1498.
66. Molica S, Digiesi G, Antenucci A, Levato L, Mirabelli R, Molica M, Gentile M, Giannarelli D, Sperduti I, Morabito F, Conti L. Vitamin D insufficiency predicts time to first treatment (TFT) in early chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Res.* 2012;36(4):443-447.
67. Van der Rhee H, Coebergh JW, de Vries E. Is prevention of cancer by sun exposure more than just the effect of vitamin D? A systematic review of epidemiological studies. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2013;49(6):1422-1436.
68. Kelly JL, Drake MT, Fredericksen ZS, Asmann YW, Liebow M, Shanafelt TD, Feldman AL, Ansell SM, Macon WR, Herr MM, Wang AH, Nowakowski GS, Call TG, Habermann TM, Slager SL, Witzig TE, Cerhan JR. Early life sun exposure, vitamin D-related gene variants, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control CCC.* 2012;23(7):1017-1029.

69. Caligaris-Cappio F, Bertilaccio MTS, Scielzo C. How the microenvironment wires the natural history of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol.* 2014;24:43-48.
70. Ramsay AD, Rodriguez-Justo M. Chronic lymphocytic leukaemia--the role of the microenvironment pathogenesis and therapy. *Br J Haematol.* 2013;162(1):15-24.
71. Herishanu Y, Katz B-Z, Lipsky A, Wiestner A. Biology of chronic lymphocytic leukemia in different microenvironments: clinical and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27(2):173-206.
72. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, Gibellini F, Njuguna N, Lee E, Stennett L, Raghavachari N, Liu P, McCoy JP, Raffeld M, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Sherry R, Arthur DC, Maric I, White T, Marti GE, Munson P, Wilson WH, Wiestner A. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;117(2):563-574.
73. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 2005;115(3):755-764.
74. Obermann EC, Eward KL, Dogan A, Paul EA, Loddo M, Munson P, Williams GH, Stoeber K. DNA replication licensing in peripheral B-cell lymphoma. *J Pathol.* 2005;205(3):318-328.
75. Kim YS, Ford RJ Jr, Faber JA, Bell RH, Elenitoba-Johnson KS, Medeiros LJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma involving bone marrow with an interfollicular pattern. *Am J Clin Pathol.* 2000;114(1):41-46.
76. Davids MS, Burger JA. Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open J Hematol.* 2012;3(S1).
77. Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, Firestein GS, Kipps TJ. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2001;107(3):305-315.
78. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, Abrisqueta P, Carpio C, Purroy N, Bosch F, Crespo M. ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood.* 2011;118(16):4401-4410.
79. F. Lafouresse. Visualisation in vivo de l'entrée de lymphocytes B de patients atteints de Leucémie Lymphoïde Chronique à travers les vaisseaux HEVs. Paris; Congrès du GCFLLC; 2013.
80. Vlad A, Deglesne P-A, Letestu R, Saint-Georges S, Chevallier N, Baran-Marszak F, Varin-Blank N, Ajchenbaum-Cymbalista F, Ledoux D. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res.* 2009;69(16):6387-6395.
81. Gu Y, Chae H-D, Siefiring JE, Jasti AC, Hildeman DA, Williams DA. RhoH GTPase recruits and activates Zap70 required for T cell receptor signaling and thymocyte development. *Nat Immunol.* 2006;7(11):1182-1190.

82. Chae H-D, Siefring JE, Hildeman DA, Gu Y, Williams DA. RhoH regulates subcellular localization of ZAP-70 and Lck in T cell receptor signaling. *PloS One*. 2010;5(11):e13970.
83. Troeger A, Johnson AJ, Wood J, Blum WG, Andritsos LA, Byrd JC, Williams DA. RhoH is critical for cell-microenvironment interactions in chronic lymphocytic leukemia in mice and humans. *Blood*. 2012;119(20):4708-4718.
84. Wullschleger S, Wasserman DH, Gray A, Sakamoto K, Alessi DR. Role of TAPP1 and TAPP2 adaptor binding to PtdIns(3,4)P2 in regulating insulin sensitivity defined by knock-in analysis. *Biochem J*. 2011;434(2):265-274.
85. Costantini JL, Cheung SMS, Hou S, Li H, Kung SK, Johnston JB, Wilkins JA, Gibson SB, Marshall AJ. TAPP2 links phosphoinositide 3-kinase signaling to B-cell adhesion through interaction with the cytoskeletal protein utrophin: expression of a novel cell adhesion-promoting complex in B-cell leukemia. *Blood*. 2009;114(21):4703-4712.
86. Rozková D, Novotná L, Pytlík R, Hochová I, Kozák T, Bartůnková J, Spísek R. Toll-like receptors on B-CLL cells: expression and functional consequences of their stimulation. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2010;126(5):1132-1143.
87. Barcellini W, Imperiali FG, Zaninoni A, Reda G, Consonni D, Fattizzo B, Lonati S, Nobili L, Zanella A, Cortelezzi A. Toll-like receptor 4 and 9 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: relationship with infections, autoimmunity and disease progression. *Leuk Lymphoma*. 2014; doi:10.3109/10428194.2013.856426 [Epub ahead of print].
88. Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio MTS, Frenquelli M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2009;144(4):507-516.
89. Huang X, Yang Y. Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. *Expert Opin Ther Targets*. 2010;14(8):787-796.
90. Chatzouli M, Ntoufa S, Papakonstantinou N, Chartomatsidou E, Anagnostopoulos A, Kollia P, Ghia P, Muzio M, Stamatopoulos K, Belessi C. Heterogeneous Functional Effects of Concomitant B Cell Receptor and TLR Stimulation in Chronic Lymphocytic Leukemia with Mutated Versus Unmutated Ig Genes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014;192(10):4518-4524.
91. Własiuk P, Tomczak W, Zając M, Dmoszyńska A, Giannopoulos K. Total expression of HLA-G and TLR-9 in chronic lymphocytic leukemia patients. *Hum Immunol*. 2013;74(12):1592-1597.
92. Liang X, Moseman EA, Farrar MA, Bachanova V, Weisdorf DJ, Blazar BR, Chen W. Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2010;115(24):5041-5052.
93. Tromp JM, Tonino SH, Elias JA, Jaspers A, Luijckx DM, Kater AP, van Lier RAW, van Oers MHJ, Eldering E. Dichotomy in NF-kappaB signaling and chemoresistance in immunoglobulin variable heavy-chain-mutated versus unmutated CLL cells upon CD40/TLR9 triggering. *Oncogene*. 2010;29(36):5071-5082.

94. Bomben R, Gobessi S, Dal Bo M, Volinia S, Marconi D, Tissino E, Benedetti D, Zucchetto A, Rossi D, Gaidano G, Del Poeta G, Laurenti L, Efremov DG, Gattei V. The miR-17~92 family regulates the response to Toll-like receptor 9 triggering of CLL cells with unmutated IGHV genes. *Leukemia*. 2012;26(7):1584-1593.
95. Fonte E, Apollonio B, Scarfò L, Ranghetti P, Fazi C, Ghia P, Caligaris-Cappio F, Muzio M. In vitro sensitivity of CLL cells to fludarabine may be modulated by the stimulation of Toll-like receptors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013;19(2):367-379.
96. Efremov DG, Bomben R, Gobessi S, Gattei V. TLR9 signaling defines distinct prognostic subsets in CLL. *Front Biosci Landmark Ed*. 2013;18:371-386.
97. Zent CS, Smith BJ, Ballas ZK, Wooldridge JE, Link BK, Call TG, Shanafelt TD, Bowen DA, Kay NE, Witzig TE, Weiner GJ. Phase I clinical trial of CpG oligonucleotide 7909 (PF-03512676) in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(2):211-217.
98. Holtick U, Scheulen ME, von Bergwelt-Baildon MS, Weihrauch MR. Toll-like receptor 9 agonists as cancer therapeutics. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011;20(3):361-372.
99. Zhang Q, Hossain DMS, Nechaev S, Kozłowska A, Zhang W, Liu Y, Kowolik CM, Swiderski P, Rossi JJ, Forman S, Pal S, Bhatia R, Raubitschek A, Yu H, Kortylewski M. TLR9-mediated siRNA delivery for targeting of normal and malignant human hematopoietic cells in vivo. *Blood*. 2013;121(8):1304-1315.
100. Peter M, Bode K, Lipford GB, Eberle F, Heeg K, Dalpke AH. Characterization of suppressive oligodeoxynucleotides that inhibit Toll-like receptor-9-mediated activation of innate immunity. *Immunology*. 2008;123(1):118-128.
101. Wang J, Lau K-Y, Jung J, Ravindran P, Barrat FJ. Bruton's tyrosine kinase regulates TLR9 but not TLR7 signaling in human plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2014;44(4):1130-1136.
102. Lougaris V, Baronio M, Vitali M, Tampella G, Cattalini M, Tassone L, Soresina A, Badolato R, Plebani A. Bruton tyrosine kinase mediates TLR9-dependent human dendritic cell activation. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(6):1644-1650.
103. Chilosi M, Pizzolo G, Caligaris-Cappio F, Ambrosetti A, Vinante F, Morittu L, Bonetti F, Fiore-Donati L, Janossy G. Immunohistochemical demonstration of follicular dendritic cells in bone marrow involvement of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1985;56(2):328-332.
104. Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, Zapata JM, Karras JG, Tsukada N, Kipps TJ, Choi YS, Bennett F, Reed JC. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*. 2002;100(5):1795-1801.
105. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:71-81.

106. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgün G, Le Dieu R, Blum W, Byrd JC, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2427-2437.
107. Seke Etet PF, Vecchio L, Nwabo Kamdje AH. Interactions between bone marrow stromal microenvironment and B-chronic lymphocytic leukemia cells: any role for Notch, Wnt and Hh signaling pathways? *Cell Signal.* 2012;24(7):1433-1443.
108. Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, Gunnarsson R. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leuk Lymphoma.* 2013;54(11):2351-2364.
109. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of «nurselike» cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;99(3):1030-1037.
110. Jia L, Clear A, Liu F-T, Matthews J, Uddin N, McCarthy A, Hoxha E, Durance C, Iqbal S, Gribben JG. Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014;123(11):1709-1719.
111. Amé-Thomas P, Tarte K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol.* 2014;24:23-32.
112. Canioni D, Salles G, Mounier N, Brousse N, Keuppens M, Morchhauser F, Lamy T, Sonet A, Rousselet M-C, Foussard C, Xerri L. High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008;26(3):440-446.
113. Filip AA, Ciseł B, Koczkodaj D, Wąsik-Szczepanek E, Piersiak T, Dmoszyńska A. Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages? *Blood Cells Mol Dis.* 2013;50(4):263-270.
114. Herishanu Y, Kay S, Sarid N, Kohan P, Braunstein R, Rotman R, Deutsch V, Ben-Ezra J, Naparstek E, Perry C, Katz B-Z. Absolute monocyte count trichotomizes chronic lymphocytic leukemia into high risk patients with immune dysregulation, disease progression and poor survival. *Leuk Res.* 2013;37(10):1222-1228.
115. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Bertoncelli L, Martinelli S, Guarnotta C, Castelli I, Deaglio S, Debbia G, De Biasi S, Bonacorsi G, Zucchini P, Narni F, Tripodo C, Luppi M, Cossarizza A, Marasca R. The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica.* 2013;98(7):1115-1123.
116. Mazumdar R, Evans P, Culpin R, Bailey J, Allsup D. The automated monocyte count is independently predictive of overall survival from diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia and of survival following first-line chemotherapy. *Leuk Res.* 2013;37(6):614-618.
117. Binsky-Ehrenreich I, Marom A, Sobotta MC, Shvidel L, Berrebi A, Hazan-Halevy I, Kay S, Aloschin A, Sagi I, Goldenberg DM, Leng L, Bucala R, Herishanu Y, Haran M, Shachar I. CD84 is a survival receptor for CLL cells. *Oncogene.* 2014;33(8):1006-1016.

118. Soldevila G, Raman C, Lozano F. The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(3):310-318.
119. Mageed RA, Garaud S, Taher TE, Parikh K, Pers J-O, Jamin C, Renaudineau Y, Youinou P. CD5 expression promotes multiple intracellular signaling pathways in B lymphocyte. *Autoimmun Rev.* 2012;11(11):795-798.
120. Xia Y, Lu R-N, Li J. Angiogenic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2012;36(10):1211-1217.
121. Vader P, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med.* 2014; doi:10.1016/j.molmed.2010.03.002 [Epub ahead of print].
122. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):195-208.
123. Haderk F, Hanna B, Richter K, Schnölzer M, Zenz T, Stilgenbauer S, Lichter P, Seiffert M. Extracellular vesicles in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(8):1826-1830.
124. Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, Ding W, Mukhopadhyay D, Kay NE. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood.* 2010;115(9):1755-1764.
125. Ghosh AK, Secreto C, Boysen J, Sassoon T, Shanafelt TD, Mukhopadhyay D, Kay NE. The novel receptor tyrosine kinase Axl is constitutively active in B-cell chronic lymphocytic leukemia and acts as a docking site of nonreceptor kinases: implications for therapy. *Blood.* 2011;117(6):1928-1937.
126. D'Arena G, Musto P. Monoclonal B-Cell Lymphocytosis. *Transl Med UniSa.* 2014;8:75-79.
127. Henriques A, Rodríguez-Caballero A, Nieto WG, Langerak AW, Criado I, Lécresse Q, González M, Pais ML, Paiva A, Almeida J, Orfao A. Combined patterns of IGHV repertoire and cytogenetic/molecular alterations in monoclonal B lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One.* 2013;8(7):e67751.
128. Scarfò L, Zibellini S, Tedeschi A, Maura F, Neri A, Bertazzoni P, Sarina B, Nalli G, Motta M, Rossini F, Cortelezzi A, Montillo M, Orlandi E, Ghia P. Impact of B-cell count and imaging screening in cMBL: any need to revise the current guidelines. *Leukemia.* 2012;26(7):1703-1707.
129. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M, de Tute R, Owen RG, Richards SJ, Jack AS, Hillmen P. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2008;359(6):575-583.
130. Hwang K-K, Trama AM, Kozink DM, Chen X, Wiehe K, Cooper AJ, Xia S-M, Wang M, Marshall DJ, Whitesides J, Alam M, Tomaras GD, Allen SL, Rai KR, McKeating J, CATERA R, Yan X-J, Chu CC, Kelsoe G, Liao H-X, Chiorazzi N, Haynes BF. IGHV1-69 B cell chronic lymphocytic leukemia antibodies cross-react with HIV-1 and hepatitis C virus antigens as well as intestinal commensal bacteria. *PLoS One.* 2014;9(3):e90725.

131. Dagklis A, Fazi C, Scarfo L, Apollonio B, Ghia P. Monoclonal B lymphocytosis in the general population. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(3):490-492.
132. Lanasa MC, Allgood SD, Volkheimer AD, Gockerman JP, Whitesides JF, Goodman BK, Moore JO, Weinberg JB, Levesque MC. Single-cell analysis reveals oligoclonality among « low-count » monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leukemia*. 2010;24(1):133-140.
133. Lanasa MC, Allgood SD, Slager SL, Dave SS, Love C, Marti GE, Kay NE, Hanson CA, Rabe KG, Achenbach SJ, Goldin LR, Camp NJ, Goodman BK, Vachon CM, Spector LG, Rassenti LZ, Leis JF, Gockerman JP, Strom SS, Call TG, Glenn M, Cerhan JR, Levesque MC, Weinberg JB, Caporaso NE. Immunophenotypic and gene expression analysis of monoclonal B-cell lymphocytosis shows biologic characteristics associated with good prognosis CLL. *Leukemia*. 2011;25(9):1459-1466.
134. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-5032.
135. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-34.
136. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbès S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206.
137. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2013;88(9):803-816.
138. Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, Gunnarsson R. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leuk Lymphoma*. 2013;54(11):2351-2364.
139. Francis S, Karanth M, Pratt G, Starczynski J, Hooper L, Fegan C, Pepper C, Valcarcel D, Milligan DW, Delgado J. The effect of immunoglobulin VH gene mutation status and other prognostic factors on the incidence of major infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2006;107(5):1023-1033.
140. Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(1):145-153.
141. Jain P, O'Brien S. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Williston Park N*. 2012;26(12):1146-1152.
142. Hodgson K, Ferrer G, Pereira A, Moreno C, Montserrat E. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia: diagnosis and treatment. *Br J Haematol*. 2011;154(1):14-22.

143. Hall AM, Vickers MA, McLeod E, Barker RN. Rh autoantigen presentation to helper T cells in chronic lymphocytic leukemia by malignant B cells. *Blood*. 2005;105(5):2007-2015.
144. Hodgson K, Ferrer G, Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: a systematic review. *Haematologica*. 2011;96(5):752-761.
145. Galletti J, Cañones C, Morande P, Borge M, Opezzo P, Geffner J, Bezares R, Gamberale R, Giordano M. Chronic lymphocytic leukemia cells bind and present the erythrocyte protein band 3: possible role as initiators of autoimmune hemolytic anemia. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;181(5):3674-3683.
146. A. Quinquenel, C. Willekens, J. Dupuis, B. Royer, L. Ysebaert, S. de Guibert, A.S. Michallet, P. Feugier, R. Guieze, V. Levy, A. Delmer. Traitement des LLC compliquées d'anémie hémolytique auto-immune par l'association bendamustine et rituximab : étude rétrospective multicentrique. Paris; Congrès de la SFH; 2014.
147. A. Quinquenel, C. Al Nawakil, F. Baran-Marszak, V. Eclache, R. Letestu, C. le Roy, N. Varin-Blank, R. Farah, M. Boubaya, A. Delmer, V. Levy, F. Ajchenbaum-Cymbalista. Valeur pronostique du test de Coombs direct dans la leucémie lymphoïde chronique. Paris; Congrès de la SFH; 2014.
148. Visco C, Cortelezzi A, Moretta F, Falisi E, Maura F, Finotto S, Barcellini W, Ambrosetti A, Neri A, Ruggeri M, Rodeghiero F. Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia at disease presentation in the modern treatment era: is stage C always stage C. *Leuk Lymphoma*. 2013;55(6):1261-1275.
149. Gümprich F. Leukocytenzerfall im blute bei leukämie und bei schweren anämien. *Dtsch Arch KlinMed*. 1896;(26):523-48.
150. Heinivaara O. Smudge cells in lymphocytic leukemia. *Ann Med Intern Fenn*. 1959;48:69-75.
151. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Geyer SM, LaPlant BR, Call TG, Jelinek DF, Zent CS, Kay NE. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test. *Mayo Clin Proc Mayo Clin*. 2007;82(4):449-453.
152. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Zent CS, Call TG, Bone ND, Laplant B, Dewald GW, Tschumper RC, Jelinek DF, Witzig TE, Kay NE. Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(11):1844-1849.
153. Johansson P, Eisele L, Klein-Hitpass L, Sellmann L, Dührsen U, Dürig J, Nüchel H. Percentage of smudge cells determined on routine blood smears is a novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2010;34(7):892-898.
154. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK*. 1994;8(10):1640-1645.

155. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol.* 1997;108(4):378-382.
156. Rawstron AC, Shingles J, de Tute R, Bennett F, Jack AS, Hillmen P. Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and CLL-type monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) show differential expression of molecules involved in lymphoid tissue homing. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78 Suppl 1:S42-46.
157. Rizzo D, Lotay A, Gachard N, Marfak I, Faucher J-L, Trimoreau F, Guérin E, Bordessoule D, Jaccard A, Feuillard J. Very low levels of surface CD45 reflect CLL cell fragility, are inversely correlated with trisomy 12 and are associated with increased treatment-free survival. *Am J Hematol.* 2013;88(9):747-753.
158. Carulli G, Cannizzo E, Zucca A, Buda G, Orciuolo E, Marini A, Petrini M. CD45 expression in low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res.* 2008;32(2):263-267.
159. Maljaei SH, Asvadi-E-Kermani I, Eivazi-E-Ziaei J, Nikanfar A, Vaez J. Usefulness of CD45 density in the diagnosis of B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Indian J Med Sci.* 2005;59(5):187-194.
160. Rawstron AC, Böttcher S, Letestu R, Villamor N, Fazi C, Kartsios H, de Tute RM, Shingles J, Ritgen M, Moreno C, Lin K, Pettitt AR, Kneba M, Montserrat E, Cymbalista F, Hallek M, Hillmen P, Ghia P, European Research Initiative in CLL. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia.* 2013;27(1):142-149.
161. Gentile M, Mauro FR, Calabrese E, De Propriis MS, Giammartini E, Mancini F, Milani ML, Guarini A, Foà R. The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia patients studied prospectively at diagnosis: a single institute experience. *Br J Haematol.* 2005;130(4):549-557.
162. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev.* 2009;23(1):25-47.
163. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, Omedé P, Scatolini M, Jaksic O, Chiorino G, Efremov D, Malavasi F. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood.* 2007;110(12):4012-21.
164. Deaglio S, Aydin S, Grand MM, Vaisitti T, Bergui L, D'Arena G, Chiorino G, Malavasi F. CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol Med Camb Mass.* 2010;16(3-4):87-91.
165. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1840-7.
166. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic

- variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99(3):1023-1029.
167. Pittner BT, Shanafelt TD, Kay NE, Jelinek DF. CD38 expression levels in chronic lymphocytic leukemia B cells are associated with activation marker expression and differential responses to interferon stimulation. *Leukemia*. 2005;19(12):2264-2272.
 168. Gentile M, Cutrona G, Mosca L, Matis S, Fabris S, Lionetti M, Ilariucci F, Zupo S, Musolino C, Levato L, Molica S, Di Raimondo F, Vincelli I, Di Rienzo N, Pesce EA, Angrilli F, Federico M, Neri A, Ferrarini M, Morabito F. Prospective validation of a risk score based on biological markers for predicting progression free survival in Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: Results of the multicenter O-CLL1-GISL study. *Am J Hematol*. 2014;doi:10.1002/ajh.23729 [Epub ahead of print]
 169. De Toter D, Carbone A, Tazzari PL, Raspadori D, Ventura A, Reato G, Lauria F, Foa R. Expression of the IL2 receptor alpha, beta and gamma chains in hairy cell leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1994;14 Suppl 1:27-32.
 170. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004;103(12):4389-4395.
 171. Shvidel L, Braester A, Bairey O, Rahimi-Levene N, Herishanu Y, Tadmor T, Klepfish A, Ruchlemer R, Shtalrid M, Berrebi A, Polliack A, Israeli CLL Study Group. Cell surface expression of CD25 antigen (surface IL-2 receptor α -chain) is not a prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia: results of a retrospective study of 281 patients. *Ann Hematol*. 2012;91(10):1597-1602.
 172. Angelopoulou MK, Kontopidou FN, Pangalis GA. Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol*. 1999;36(2):178-197.
 173. Yin CC, Lin P, Carney DA, Handy BC, Rassidakis GZ, Admirand JH, Keating MJ, Medeiros LJ. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma associated with IgM paraprotein. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(4):594-602.
 174. Marotta G, Raspadori D, Sestigiani C, Scalia G, Bigazzi C, Lauria F. Expression of the CD11c antigen in B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma*. 2000;37(1-2):145-149.
 175. Cro L, Ferrario A, Lionetti M, Bertoni F, Zucal N N, Nobili L, Fabris S, Todoerti K, Cortelezzi A, Guffanti A, Goldaniga M, Marcheselli L, Neri A, Lambertenghi-Delilieri G, Baldini L. The clinical and biological features of a series of immunophenotypic variant of B-CLL. *Eur J Haematol*. 2010;85(2):120-129.
 176. Elola MT, Chiesa ME, Alberti AF, Mordoh J, Fink NE. Galectin-1 receptors in different cell types. *J Biomed Sci*. 2005;12(1):13-29.
 177. Dogan A, Isaacson PG. Splenic marginal zone lymphoma. *Semin Diagn Pathol*. 2003;20(2):121-127.

178. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:841-894.
179. Alinari L, Lapalombella R, Andritsos L, Baiocchi RA, Lin TS, Byrd JC. Alemtuzumab (Campath-1H) in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene.* 2007;26(25):3644-3653.
180. Gribben JG, Hallek M. Rediscovering alemtuzumab: current and emerging therapeutic roles. *Br J Haematol.* 2009;144(6):818-831.
181. Klabusay M, Sukova V, Coupek P, Brychtova Y, Mayer J. Different levels of CD52 antigen expression evaluated by quantitative fluorescence cytometry are detected on B-lymphocytes, CD 34+ cells and tumor cells of patients with chronic B-cell lymphoproliferative diseases. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72(5):363-370.
182. Tembhare PR, Marti G, Wiestner A, Degheidy H, Farooqui M, Kreitman RJ, Jasper GA, Yuan CM, Liewehr D, Venzon D, Stetler-Stevenson M. Quantification of expression of antigens targeted by antibody-based therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2013;140(6):813-818.
183. Vilpo J, Tobin G, Hulkkonen J, Hurme M, Thunberg U, Sundström C, Vilpo L, Rosenquist R. Surface antigen expression and correlation with variable heavy-chain gene mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol.* 2003;70(1):53-59.
184. McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, Maruyama T, Potter KN, Mockridge CI, Ravey EP, Qin F, Bowdish KS. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(4):1041-1046.
185. Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, Qu P, Barlogie B, Shaughnessy JD, Lorsbach RB. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol.* 2012;137(1):93-100.
186. El Desoukey NA, Afify RAA, Amin DG, Mohammed RF. CD200 expression in B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* 2012;60(1):56-61.
187. Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* 2002;23(6):285-290.
188. Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, Brooke G, Puklavec MJ, Bigler M, Song Y, Jenmalm M, Gorman D, McClanahan T, Liu M-R, Brown MH, Sedgwick JD, Phillips JH, Barclay AN. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2003;171(6):3034-3046.
189. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science.* 2000;290(5497):1768-1771.
190. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CRMC, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, Ritter EC, Rizzatti EG. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-

- cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014;86(2):98-105.
191. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nüchel H, Baldini L, Kurtova AV, Ferrajoli A, Burger JA, Gaidano G, Del Poeta G, Pepper C, Rossi D, Gattei V. CD49d Is the Strongest Flow Cytometry-Based Predictor of Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014;32(9):897-904.
 192. Zucchetto A, Caldana C, Benedetti D, Tissino E, Rossi FM, Hutterer E, Pozzo F, Bomben R, Dal Bo M, D'Arena G, Zaja F, Pozzato G, Di Raimondo F, Hartmann TN, Rossi D, Gaidano G, Del Poeta G, Gattei V. CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism. *Blood.* 2013;122(19):3317-3321.
 193. Zhang S, Wu CCN, Fecteau J-F, Cui B, Chen L, Zhang L, Wu R, Rassenti L, Lao F, Weigand S, Kipps TJ. Targeting chronic lymphocytic leukemia cells with a humanized monoclonal antibody specific for CD44. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(15):6127-6132.
 194. Domingo A, González-Barca E, Castellsagué X, Fernandez-Sevilla A, Grañena A, Crespo N, Ferrán C. Expression of adhesion molecules in 113 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship with clinico-prognostic features. *Leuk Res.* 1997;21(1):67-73.
 195. Buggins AGS, Levi A, Gohil S, Fishlock K, Patten PEM, Calle Y, Yallop D, Devereux S. Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. *Br J Haematol.* 2011;154(2):216-222.
 196. Fedorchenko O, Stiefelhagen M, Peer-Zada AA, Barthel R, Mayer P, Ecke L, Breuer A, Crispatzu G, Rosen N, Landwehr T, Lilienthal N, Möllmann M, Montesinos-Rongen M, Heukamp L, Dürig J, Hallek M, Fingerle-Rowson G, Herling M. CD44 regulates the apoptotic response and promotes disease development in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013;121(20):4126-4136.
 197. Herishanu Y, Gibellini F, Njuguna N, Hazan-Halevy I, Farooqui M, Bern S, Keyvanfar K, Lee E, Wilson W, Wiestner A. Activation of CD44, a receptor for extracellular matrix components, protects chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug induced apoptosis through MCL-1. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(9):1758-1769.
 198. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005;26(3):136-140.
 199. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan X-J, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood.* 2002;99(11):4087-4093.
 200. Del Poeta G, Del Principe MI, Zucchetto A, Luciano F, Buccisano F, Rossi FM, Bruno A, Biagi A, Bulian P, Maurillo L, Neri B, Bomben R, Simotti C, Coletta AM, Dal Bo M, de Fabritiis P, Venditti A, Gattei V, Amadori S. CD69 is independently prognostic in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive clinical and biological profiling study. *Haematologica.* 2012;97(2):279-287.

201. Smilevska T, Stamatopoulos K, Samara M, Belessi C, Tsompanakou A, Paterakis G, Stavroyianni N, Athanasiadou I, Chiotoglou I, Hadzidimitriou A, Athanasiadou A, Douka V, Saloum R, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Fassas A, Stathakis N, Kollia P. Transferrin receptor-1 and 2 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2006;30(2):183-189.
202. Del Poeta G, Del Principe MI, Maurillo L, Rossi FM, Buccisano F, Ammatuna E, Simotti C, Zucchetto A, Catalano G, Bulian P, Bruno A, Venditti A, De Fabritiis P, Gattei V, Amadori S. Spontaneous apoptosis and proliferation detected by BCL-2 and CD71 proteins are important progression indicators within ZAP-70 negative chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2010;51(1):95-106.
203. Kotsianidis I. Surface antigen expression in CLL: A new member among the mnesteres for the prognosis of bad risk disease. *Leuk Res.* 2014;38(4):423-424.
204. Rossjohn J, Pellicci DG, Patel O, Gapin L, Godfrey DI. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(12):845-857.
205. Anastasiadis A, Kotsianidis I, Papadopoulos V, Spanoudakis E, Margaritis D, Christoforidou A, Gouliamtzi S, Tsatalas C. CD1d expression as a prognostic marker for chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(2):320-325.
206. Bojarska-Junak A, Hus I, Chocholska S, Tomczak W, Woś J, Czubak P, Putowski L, Roliński J. CD1d expression is higher in chronic lymphocytic leukemia patients with unfavorable prognosis. *Leuk Res.* 2014;38(4):435-442.
207. Kotsianidis I, Nakou E, Spanoudakis E, Bouchliou I, Moustakidis E, Miltiades P, Vadikolia CM, Szydlo R, Karadimitris A, Tsatalas C. The diagnostic value of CD1d expression in a large cohort of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(3):400-408.
208. Jadidi-Niaragh F, Jeddi-Tehrani M, Ansaripour B, Razavi SM, Sharifian RA, Shokri F. Reduced frequency of NKT-like cells in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2012;29(5):3561-3569.
209. Divanovic S, Trompette A, Petiniot LK, Allen JL, Flick LM, Belkaid Y, Madan R, Haky JJ, Karp CL. Regulation of TLR4 signaling and the host interface with pathogens and danger: the role of RP105. *J Leukoc Biol.* 2007;82(2):265-271.
210. Porakishvili N, Kulikova N, Jewell AP, Youinou PY, Yong K, Nathwani A, Heelan B, Duke V, Hamblin TJ, Wallace P, Ely P, Clark EA, Lydyard PM. Differential expression of CD 180 and IgM by B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells using mutated and unmutated immunoglobulin VH genes. *Br J Haematol.* 2005;131(3):313-319.
211. Porakishvili N, Memon A, Vispute K, Kulikova N, Clark EA, Rai KR, Nathwani A, Damle RN, Chiorazzi N, Lydyard PM. CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2011;153(4):486-498.
212. Miguet L, Lennon S, Baseggio L, Traverse-Glehen A, Berger F, Perrusson N, Chenard M-P, Galois A-C, Eischen A, Mayeur-Rousse C, Maar A, Fornecker L, Herbrecht R, Felman P, Van Dorselaer A, Carapito C, Cianférani S, Mauvieux L. Cell-surface expression of the TLR homolog

- CD180 in circulating cells from splenic and nodal marginal zone lymphomas. *Leukemia*. 2013;27(8):1748-1750.
213. Cro L, Morabito F, Zucal N, Fabris S, Lionetti M, Cutrona G, Rossi F, Gentile M, Ferrario A, Ferrarini M, Molica S, Neri A, Baldini L. CD26 expression in mature B-cell neoplasia: its possible role as a new prognostic marker in B-CLL. *Hematol Oncol*. 2009;27(3):140-147.
 214. Molica S, Digiesi G, Mirabelli R, Cutrona G, Antenucci A, Molica M, Giannarelli D, Sperduti I, Morabito F, Neri A, Baldini L, Ferrarini M. Serum level of CD26 predicts time to first treatment in early B-chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2009;83(3):208-214.
 215. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*. 1990;248(4952):220-223.
 216. Nüchel H, Rebmann V, Dürig J, Dührsen U, Grosse-Wilde H. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(4):1694-1698.
 217. Attia MA, Nosair NA, Gawally A, Elnagar G, Elshafey EM. HLA-G Expression as a Prognostic Indicator in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Acta Haematol*. 2014;132(1):53-58.
 218. Kern W, Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Dicker F, Schnittger S, Haferlach T. Frequency and prognostic impact of the aberrant CD8 expression in 5,523 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2012;82(3):145-150.
 219. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.
 220. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006;108(9):3152-3160.
 221. Nguyen-Khac F. [Cytogenetic markers in chronic lymphocytic leukemia]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2010;68(3):273-276.
 222. Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, Dechow T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol*. 2000;28(5):558-568.
 223. Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000;95(3):999-1006.
 224. Bastard C, Raux G, Fruchart C, Parmentier F, Vaur D, Penther D, Troussard X, Nagib D, Lepretre S, Tosi M, Frebourg T, Tilly H. Comparison of a quantitative PCR method with FISH for the

- assessment of the four aneuploidies commonly evaluated in CLL patients. *Leukemia*. 2007;21(7):1460-1463.
225. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ, International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-5456.
226. Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:76-87.
227. Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, Deambrogi C, Khiabani H, Serra R, Bertoni F, Forconi F, Laurenti L, Marasca R, Dal-Bo M, Rossi FM, Bulian P, Nomdedeu J, Del Poeta G, Gattei V, Pasqualucci L, Rabadan R, Foà R, Dalla-Favera R, Gaidano G. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1403-1412.
228. Degheidy HA, Gadalla SM, Farooqui MZH, Abbasi F, Arthur DC, Bauer SR, Wilson WH, Wiestner A, Stetler-Stevenson MA, Marti GE. Bcl-2 level as a biomarker for 13q14 deletion in CLL. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(4):237-247.
229. Puiggros A, Delgado J, Rodriguez-Vicente A, Collado R, Aventín A, Luño E, Grau J, Hernandez JA, Marugán I, Ardanaz M, González T, Valiente A, Osma M, Calasanz MJ, Sanzo C, Carrió A, Ortega M, Santacruz R, Abrisqueta P, Abella E, Bosch F, Carbonell F, Solé F, Hernández JM, Espinet B, Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) and Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC). Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *Br J Haematol*. 2013;163(1):47-54.
230. Ouillet P, Erba H, Kujawski L, Kaminski M, Shedden K, Malek SN. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res*. 2008;68(4):1012-1021.
231. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky D. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol*. 1996;92(2):382-388.
232. Quijano S, López A, Rasillo A, Sayagués JM, Barrera S, Sánchez ML, Teodosio C, Giraldo P, Giralt M, Pérez MC, Romero M, Perdiguier L, Orfao A. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(3):139-149.
233. Daudignon A, Poulain S, Morel P, Penther D, Parmentier F, Bouchindhomme B, Fernandes J, Duthilleul P, Bastard C. Increased trisomy 12 frequency and a biased IgVH 3-21 gene usage characterize small lymphocytic lymphoma. *Leuk Res*. 2010;34(5):580-584.

234. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, Pekarsky Y, Croce CM. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*. 2012;119(2):329-331.
235. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavolaro S, Gabrielli S, Laurenti L, Marasca R, Rasi S, Fangazio M, Guarini A, Gaidano G, Foà R. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*. 2012;97(3):437-441.
236. López C, Delgado J, Costa D, Conde L, Ghita G, Villamor N, Navarro A, Cazorla M, Gómez C, Arias A, Muñoz C, Baumann T, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Cobo F, Campo E, López-Guillermo A, Montserrat E, Carrió A. Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(9):881-889.
237. Cosson A, Chapiro E, Belhouachi N, Cung H-A, Keren B, Damm F, Algrin C, Lefebvre C, Fert-Ferrer S, Luquet I, Gachard N, Mugneret F, Terre C, Collonge-Rame M-A, Michaux L, Rafdord-Weiss I, Talmant P, Veronese L, Nadal N, Struski S, Barin C, Helias C, Lafage M, Lippert E, Auger N, Eclache V, Roos-Weil D, Leblond V, Settegrana C, Maloum K, Davi F, Merle-Beral H, Lesty C, Nguyen-Khac F, on behalf of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. 14q deletions are associated with trisomy 12, NOTCH1 mutations and unmutated IGHV genes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(8):657-666.
238. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, Chiaretti S, Del Giudice I, Fabbri G, Brusca A, Spina V, Deambrogi C, Marinelli M, Famà R, Greco M, Daniele G, Forconi F, Gattei V, Bertoni F, Deaglio S, Pasqualucci L, Guarini A, Dalla-Favera R, Foà R, Gaidano G. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(12):2854-2862.
239. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, Denzel T, Winkler D, Edelmann J, Schwänen C, Döhner H, Stilgenbauer S. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*. 2008;112(8):3322-3329.
240. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2009;23(1):117-124.
241. Jaglowski SM, Ruppert AS, Heerema NA, Bingman A, Flynn JM, Grever MR, Jones JA, Elder P, Devine SM, Byrd JC, Andritsos LA. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012;159(1):82-87.
242. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999;17(1):399-408.

243. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*. 2002;100(4):1177-84.
244. Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini F, Bardi A, Roberti MG, Tammiso E, Agostini P, Ciccone M, Della Porta M, Tieghi A, Cavazzini L, Negrini M, Castoldi G. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*. 2004;18(3):476-483.
245. Brown JR, Hanna M, Tesar B, Werner L, Pochet N, Asara JM, Wang YE, Dal Cin P, Fernandes SM, Thompson C, Macconail L, Wu CJ, Van de Peer Y, Correll M, Regev A, Neuberger D, Freedman AS. Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012;18(14):3791-3802.
246. Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, Russo Rossi A, De Angeli C, Tiseo R, Bardi A, Tammiso E, Crupi R, Lenoci MP, Forconi F, Lauria F, Marasca R, Maffei R, Torelli G, Gonzalez M, Martin-Jimenez P, Maria Hernandez J, Rigolin GM, Cuneo A. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol*. 2008;142(4):529-537.
247. Nguyen-Khac F, Chapiro E, Lesty C, Grelier A, Luquet I, Radford-Weiss I, Lefebvre C, Fert-Ferrer S, Callet-Bauchu E, Lippert E, Raggueneau V, Michaux L, Barin C, Collonge-Rame M-A, Mugneret F, Eclache V, Taviaux S, Dastugue N, Richebourg S, Struski S, Talmant P, Baranger L, Gachard N, Gervais C, Quilichini B, Settegrana C, Maloum K, Davi F, Merle-Béral H. Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res*. 2011;1(1):13-21.
248. Yin CC, Lin KI-C, Ketterling RP, Knudson RA, Medeiros LJ, Barron LL, Huh YO, Luthra R, Keating MJ, Abruzzo LV. Chronic lymphocytic leukemia With t(2;14)(p16;q32) involves the BCL11A and IgH genes and is associated with atypical morphologic features and unmutated IgVH genes. *Am J Clin Pathol*. 2009;131(5):663-670.
249. Haferlach C, Dicker F, Weiss T, Schnittger S, Beck C, Grote-Metke A, Oruzio D, Kern W, Haferlach T. Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(9):851-859.
250. Cuneo A, Balboni M, Piva N, Rigolin GM, Roberti MG, Mejak C, Moretti S, Bigoni R, Balsamo R, Cavazzini P. Atypical chronic lymphocytic leukaemia with t(11;14)(q13;q32): karyotype evolution and prolymphocytic transformation. *Br J Haematol*. 1995;90(2):409-416.
251. Put N, Van Roosbroeck K, Konings P, Meeus P, Brusselmans C, Rack K, Gervais C, Nguyen-Khac F, Chapiro E, Radford-Weiss I, Struski S, Dastugue N, Gachard N, Lefebvre C, Barin C, Eclache V, Fert-Ferrer S, Laibe S, Mozziconacci M-J, Quilichini B, Poirel HA, Wlodarska I, Hagemeyer A, Moreau Y, Vandenberghe P, Michaux L, BCGHo and the GFCH. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol*. 2012;91(6):863-873.

252. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, Malcikova J, Anagnostopoulos A, Glide S, Mould S, Stepanovska K, Brejcha M, Belessi C, Davi F, Pospisilova S, Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Oscier D. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol.* 2014;89(3):249-255.
253. Foà R, Del Giudice I, Cuneo A, Del Poeta G, Ciolli S, Di Raimondo F, Lauria F, Cencini E, Rigolin GM, Cortelezzi A, Nobile F, Callea V, Brugiattelli M, Massaia M, Molica S, Trentin L, Rizzi R, Specchia G, Di Serio F, Orsucci L, Ambrosetti A, Montillo M, Zinzani PL, Ferrara F, Morabito F, Mura MA, Soriani S, Peragine N, Tavolaro S, Bonina S, Marinelli M, De Propriis MS, Starza ID, Picicocchi A, Alietti A, Runggaldier EJ, Gamba E, Mauro FR, Chiaretti S, Guarini A. Chlorambucil plus rituximab with or without maintenance rituximab as first-line treatment for elderly chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol.* 2014;89(5):480-486.
254. López C, Delgado J, Costa D, Villamor N, Navarro A, Cazorla M, Gómez C, Arias A, Muñoz C, Cabezas S, Baumann T, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Pereira A, Cobo F, López-Guillermo A, Campo E, Carrió A. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: analysis of correlations with IGHV mutational status, NOTCH1 mutations and clinical significance. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013;52(10):920-927.
255. Ouillet P, Saiya-Cork K, Seymour E, Li C, Shedden K, Malek SN. Clonal evolution, genomic drivers, and effects of therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013;19(11):2893-2904.
256. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin M-L, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell.* 2011;144(1):27-40.
257. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Bühler A, Zenz T, Bullinger L, Kühn MWM, Gerhardinger A, Bloehdorn J, Radtke I, Su X, Ma J, Pounds S, Hallek M, Lichter P, Korbel J, Busch R, Mertens D, Downing JR, Stilgenbauer S, Döhner H. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood.* 2012;120(24):4783-4794.
258. Rodríguez-Vicente AE, Díaz MG, Hernández-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. *Cancer Genet.* 2013;206(3):49-62.
259. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258(5083):818-821.
260. Improgo MR, Brown JR. Genomic approaches to chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27(2):157-171.
261. Heinrichs S, Li C, Look AT. SNP array analysis in hematologic malignancies: avoiding false discoveries. *Blood.* 2010;115(21):4157-4161.

262. Mraz M, Stano Kozubik K, Plevova K, Musilova K, Tichy B, Borsky M, Kuglik P, Doubek M, Brychtova Y, Mayer J, Pospisilova S. The origin of deletion 22q11 in chronic lymphocytic leukemia is related to the rearrangement of immunoglobulin lambda light chain locus. *Leuk Res.* 2013;37(7):802-808.
263. Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, Bastard C, Mossafa H, Leroux D, Tigaud I, De Braekeleer M, Terré C, Brizard F, Callet-Bauchu E, Struski S, Veronese L, Fert-Ferrer S, Taviaux S, Lesty C, Davi F, Merle-Béral H, Bernard OA, Sutton L, Raynaud SD, Nguyen-Khac F. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res.* 2010;34(1):63-68.
264. Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(18):7049-7053.
265. Kong CM, Lee XW, Wang X. Telomere shortening in human diseases. *FEBS J.* 2013;280(14):3180-3193.
266. Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood.* 1995;85(9):2315-2320.
267. Ding D, Zhou J, Wang M, Cong Y-S. Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer. *FEBS J.* 2013;280(14):3205-3211.
268. Sellmann L, de Beer D, Bartels M, Opalka B, Nücker H, Dührsen U, Dürig J, Seifert M, Siemer D, Küppers R, Baerlocher GM, Röth A. Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Hematol.* 2011;93(1):74-82.
269. Hoxha M, Fabris S, Agnelli L, Bollati V, Cutrona G, Matis S, Recchia AG, Gentile M, Cortelezzi A, Morabito F, Bertazzi PA, Ferrarini M, Neri A. Relevance of telomere/telomerase system impairment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53(7):612-621
270. Mansouri L, Grabowski P, Degerman S, Svenson U, Gunnarsson R, Cahill N, Smedby KE, Geisler C, Juliusson G, Roos G, Rosenquist R. Short telomere length is associated with NOTCH1/SF3B1/TP53 aberrations and poor outcome in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol.* 2013;88(8):647-651.
271. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, Conde L, Martínez-Trillos A, Villamor N, Rodríguez D, Kwarciak A, Garabaya C, Gallardo M, López-Guerra M, López-Guillermo A, Puente XS, Blasco MA, Campo E, López-Otín C. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(5):526-530.
272. Damle RN, Temburni S, Banapour T, Paul S, Mongini PKA, Allen SL, Kolitz JE, Rai KR, Chiorazzi N. T-cell independent, B-cell receptor-mediated induction of telomerase activity differs among IGHV mutation-based subgroups of chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood.* 2012;120(12):2438-2449.

273. Palma M, Parker A, Hojjat-Farsangi M, Forster J, Kokhaei P, Hansson L, Osterborg A, Mellstedt H. Telomere length and expression of human telomerase reverse transcriptase splice variants in chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol*. 2013;41(7):615-626.
274. Shawi M, Chu TW, Martinez-Marignac V, Yu Y, Gryaznov SM, Johnston JB, Lees-Miller SP, Assouline SE, Autexier C, Aloyz R. Telomerase contributes to fludarabine resistance in primary human leukemic lymphocytes. *PloS One*. 2013;8(7):e70428.
275. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, Vartanov A, Fernandes SM, Saksena G, Cibulskis K, Tesar B, Gabriel S, Hacohen N, Meyerson M, Lander ES, Neuberg D, Brown JR, Getz G, Wu CJ. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152(4):714-726.
276. Schuh A, Becq J, Humphray S, Alexa A, Burns A, Clifford R, Feller SM, Grocock R, Henderson S, Khrebtukova I, Kingsbury Z, Luo S, McBride D, Murray L, Menju T, Timbs A, Ross M, Taylor J, Bentley D. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*. 2012;120(20):4191-4196.
277. Jethwa A, Hüllein J, Stolz T, Blume C, Sellner L, Jauch A, Sill M, Kater AP, Te Raa GD, Geisler C, van Oers M, Dietrich S, Dreger P, Ho AD, Paruzynski A, Schmidt M, von Kalle C, Glimm H, Zenz T. Targeted resequencing for analysis of clonal composition of recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2013;163(4):496-500.
278. Alsolami R, Knight SJ, Schuh A. Clinical application of targeted and genome-wide technologies: can we predict treatment responses in chronic lymphocytic leukemia? *Pers Med*. 2013;10(4):361-376.
279. Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, Morel P, Fenaux P. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*. 1994;84(9):3148-3157.
280. Schnaiter A, Paschka P, Rossi M, Zenz T, Bühler A, Winkler D, Cazzola M, Döhner K, Edelmann J, Mertens D, Kless S, Mack S, Busch R, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S. NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG. *Blood*. 2013;122(7):1266-1270.
281. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, Deambrogi C, Khiabani H, Serra R, Bertoni F, Forconi F, Laurenti L, Marasca R, Dal-Bo M, Rossi FM, Bulian P, Nomdedeu J, Del Poeta G, Gattei V, Pasqualucci L, Rabadan R, Foà R, Dalla-Favera R, Gaidano G. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1403-1412.
282. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Bruscaggin A, Famà R, Rasi S, Monti S, Deambrogi C, De Paoli L, Wang J, Gattei V, Guarini A, Foà R, Rabadan R, Gaidano G. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(14):2139-2147.
283. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic

- leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009;15(3):995-1004.
284. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, Cejkova S, Svitakova M, Skuhrova Francova H, Brychtova Y, Doubek M, Brejcha M, Klabusay M, Mayer J, Pospisilova S, Trbusek M. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood.* 2009;114(26):5307-5314.
 285. Dreger P, Schnaiter A, Zenz T, Böttcher S, Rossi M, Paschka P, Bühler A, Dietrich S, Busch R, Ritgen M, Bunjes D, Zeis M, Stadler M, Uharek L, Scheid C, Hegenbart U, Hallek M, Kneba M, Schmitz N, Döhner H, Stilgenbauer S. TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood.* 2013;121(16):3284-3288.
 286. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia.* 2009;23(1):117-124.
 287. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, Bühler A, Böttcher S, Ritgen M, Kneba M, Winkler D, Tausch E, Hoth P, Edelmann J, Mertens D, Bullinger L, Bergmann M, Kless S, Mack S, Jäger U, Patten N, Wu L, Wenger MK, Fingerle-Rowson G, Lichter P, Cazzola M, Wendtner CM, Fink AM, Fischer K, Busch R, Hallek M, Döhner H. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood.* 2014;123(21):3247-3254.
 288. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, Cymbalista F, Eichhorst B, Hallek M, Döhner H, Hillmen P, van Oers M, Gribben J, Ghia P, Montserrat E, Stilgenbauer S, Zenz T, European Research Initiative on CLL (ERIC). ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2012;26(7):1458-1461.
 289. C. Haferlach. Mutations TP53 et impact sur le pronostic : une étude chez 3988 patients. New Orleans, USA; Congrès de l'ASH; 2013.
 290. Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(10):759-769.
 291. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(4):197-210.
 292. Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, Taylor AMR, Fegan C, Moss P, Stankovic T. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood.* 2005;106(9):3175-3182.
 293. Austen B, Skowronska A, Baker C, Powell JE, Gardiner A, Oscier D, Majid A, Dyer M, Siebert R, Taylor AM, Moss PA, Stankovic T. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic

- lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007;25(34):5448-5457.
294. Skowronska A, Parker A, Ahmed G, Oldreive C, Davis Z, Richards S, Dyer M, Matutes E, Gonzalez D, Taylor AMR, Moss P, Thomas P, Oscier D, Stankovic T. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012;30(36):4524-4532.
295. Rossi D, Fangazio M, Gaidano G. The spectrum of genetic defects in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):e2012076.
296. Rose-Zerilli MJ, Forster J, Parker H, Parker A, Rodríguez AE, Chaplin T, Gardiner A, Steele AJ, Collins A, Young BD, Skowronska A, Catovsky D, Stankovic T, Oscier DG, Strefford JC. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica*. 2014;99(4):736-742.
297. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, Chiaretti S, Del Giudice I, Fabbri G, Brusca A, Spina V, Deambrogi C, Marinelli M, Famà R, Greco M, Daniele G, Forconi F, Gattei V, Bertoni F, Deaglio S, Pasqualucci L, Guarini A, Dalla-Favera R, Foà R, Gaidano G. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(12):2854-2862.
298. De Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol*. 2012;34(3):200-211.
299. Rossi D, Deaglio S, Dominguez-Sola D, Rasi S, Vaisitti T, Agostinelli C, Spina V, Brusca A, Monti S, Cerri M, Cresta S, Fangazio M, Arcaini L, Lucioni M, Marasca R, Thieblemont C, Capello D, Facchetti F, Kwee I, Pileri SA, Foà R, Bertoni F, Dalla-Favera R, Pasqualucci L, Gaidano G. Alteration of BIRC3 and multiple other NF-κB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood*. 2011;118(18):4930-4934.
300. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, Werner L, Sivachenko A, DeLuca DS, Zhang L, Zhang W, Vartanov AR, Fernandes SM, Goldstein NR, Folco EG, Cibulskis K, Tesar B, Sievers QL, Shefler E, Gabriel S, Hacohen N, Reed R, Meyerson M, Golub TR, Lander ES, Neuberger D, Brown JR, Getz G, Wu CJ. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497-2506.
301. Strefford JC, Sutton L-A, Baliakas P, Agathangelidis A, Malčíková J, Plevova K, Scarfó L, Davis Z, Stalika E, Cortese D, Cahill N, Pedersen LB, di Celle PF, Tzenou T, Geisler C, Panagiotidis P, Langerak AW, Chiorazzi N, Pospisilova S, Oscier D, Davi F, Belessi C, Mansouri L, Ghia P, Stamatopoulos K, Rosenquist R. Distinct patterns of novel gene mutations in poor-prognostic stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: the case of SF3B1 and subset #2. *Leukemia*. 2013;27(11):2196-2199.
302. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, Alpermann T, Roller A, Kohlmann A, Haferlach T, Kern W, Schnittger S. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2013;28(1):108-117.

303. Rossi D, Bruscazzin A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, Fangazio M, Vaisitti T, Monti S, Chiaretti S, Guarini A, Del Giudice I, Cerri M, Cresta S, Deambrogi C, Gargiulo E, Gattei V, Forconi F, Bertoni F, Deaglio S, Rabadan R, Pasqualucci L, Foà R, Dalla-Favera R, Gaidano G. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904-6908.
304. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, Ramsay AJ, Beà S, Pinyol M, Martínez-Trillos A, López-Guerra M, Colomer D, Navarro A, Baumann T, Aymerich M, Rozman M, Delgado J, Giné E, Hernández JM, González-Díaz M, Puente DA, Velasco G, Freije JMP, Tubío JMC, Royo R, Gelpí JL, Orozco M, Pisano DG, Zamora J, Vázquez M, Valencia A, Himmelbauer H, Bayés M, Heath S, Gut M, Gut I, Estivill X, López-Guillermo A, Puente XS, Campo E, López-Otín C. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012;44(1):47-52.
305. Cortese D, Sutton L-A, Cahill N, Smedby KE, Geisler C, Gunnarsson R, Juliusson G, Mansouri L, Rosenquist R. On the way towards a « CLL prognostic index »: focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia*. 2013;28(3):710-713.
306. Arruga F, Gizdic B, Serra S, Vaisitti T, Ciardullo C, Coscia M, Laurenti L, D'Arena G, Jaksic O, Inghirami G, Rossi D, Gaidano G, Deaglio S. Functional impact of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013;28(5):1060-1070.
307. Baldoni S, Sportoletti P, Del Papa B, Aureli P, Dorillo E, Rosati E, Ciurnelli R, Marconi P, Falzetti F, Di Ianni M. NOTCH and NF- κ B interplay in chronic lymphocytic leukemia is independent of genetic lesion. *Int J Hematol*. 2013;98(2):153-157.
308. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, Marasca R, Laurenti L, Bruscazzin A, Cerri M, Monti S, Cresta S, Famà R, De Paoli L, Bulian P, Gattei V, Guarini A, Deaglio S, Capello D, Rabadan R, Pasqualucci L, Dalla-Favera R, Foà R, Gaidano G. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(2):521-529.
309. Hales EC, Taub JW, Matherly LH. New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: Targeted therapy of γ -secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell Signal*. 2013;26(1):149-161.
310. Hannon MM, Lohan F, Erbilgin Y, Sayitoglu M, O'Hagan K, Mills K, Ozbek U, Keeshan K. Elevated TRIB2 with NOTCH1 activation in paediatric/adult T-ALL. *Br J Haematol*. 2012;158(5):626-634.
311. Ma J, Wu M. The indicative effect of Notch1 expression for the prognosis of T-cell acute lymphocytic leukemia: a systematic review. *Mol Biol Rep*. 2012;39(5):6095-6100.
312. Aster JC, Blacklow SC, Pear WS. Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. *J Pathol*. 2011;223(2):262-273.
313. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Beà S, López C, Colomer D, Pinyol M, Aymerich M, Rozman M, Abrisqueta P, Baumann T, Delgado J, Giné E, González-Díaz M, Hernández JM, Colado E, Payer AR, Rayon C, Navarro B, José Terol M, Bosch F, Quesada V, Puente XS, López-Otín C, Jares P, Pereira A, Campo E, López-Guillermo A. NOTCH1 mutations

- identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2013;27(5):1100-1106.
314. Weissmann S, Roller A, Jeromin S, Hernández M, Abáigar M, Hernández-Rivas JM, Grossmann V, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S, Kohlmann A. Prognostic impact and landscape of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a study on 852 patients. *Leukemia*. 2013;27(12):2393-2396.
 315. Willander K, Dutta RK, Ungerback J, Gunnarsson R, Juliusson G, Fredrikson M, Linderholm M, Söderkvist P. NOTCH1 mutations influence survival in chronic lymphocytic leukemia patients. *BMC Cancer*. 2013;13:274.
 316. Falisi E, Novella E, Visco C, Guercini N, Maura F, Giaretta I, Pomponi F, Nichele I, Finotto S, Montaldi A, Neri A, Rodeghiero F. B-cell receptor configuration and mutational analysis of patients with chronic lymphocytic leukaemia and trisomy 12 reveal recurrent molecular abnormalities. *Hematol Oncol*. 2013;32(1):22-30.
 317. Fabbri G, Khiabani H, Holmes AB, Wang J, Messina M, Mullighan CG, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med*. 2013;210(11):2273-2288.
 318. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2013;792:173-191.
 319. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S, Cresta S, Gargiulo E, Forconi F, Guarini A, Arcaini L, Paulli M, Laurenti L, Larocca LM, Marasca R, Gattei V, Oscier D, Berton F, Mullighan CG, Foá R, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R, Gaidano G. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208(7):1389-1401.
 320. Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H, Ishida N, Okumura F, Nakayama K, Nakayama KI. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J*. 2004;23(10):2116-2125.
 321. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, Petit B, Marfak A, Rizzo D, Devesa M, Delage-Corre M, Coste V, Laforêt MP, de Mascarel A, Merlio JP, Bouabdalla K, Milpied N, Soubeyran P, Schmitt A, Bordessoule D, Cogné M, Feuillard J. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia*. 2013;27(1):183-189.
 322. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, Sheehy P, Manning RJ, Patterson CJ, Tripsas C, Arcaini L, Pinkus GS, Rodig SJ, Sohani AR, Harris NL, Laramie JM, Skifter DA, Lincoln SE, Hunter ZR. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367(9):826-833.
 323. Xu L, Hunter ZR, Yang G, Zhou Y, Cao Y, Liu X, Morra E, Trojani A, Greco A, Arcaini L, Varettoni M, Varettoni M, Brown JR, Tai Y-T, Anderson KC, Munshi NC, Patterson CJ, Manning RJ, Tripsas CK, Lindeman NI, Treon SP. MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*. 2013;121(11):2051-2058.

324. Antosz H, Sajewicz J, Marzec-Kotarska B, Dmoszyńska A, Baszak J, Jargiełło-Baszak M. Aberrant TIRAP and MyD88 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2013;51(1):48-55.
325. Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, Aymerich M, Jares P, Juan M, Rozman M, Colomer D, Delgado J, Gine E, González-Díaz M, Hernández-Rivas JM, Colado E, Rayón C, Payer AR, Terol MJ, Navarro B, Quesada V, Puente XS, Rozman C, López-Otín C, Campo E, López-Guillermo A, Villamor N. Mutations in the Toll-like receptor/MYD88 pathway in chronic lymphocytic leukemia identify a subset of young patients with favorable outcome. *Blood.* 2014; doi:10.1182/blood.2013.12.543306 [Epub ahead of print].
326. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío JMC, López C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández JM, Puente DA, Freije JMP, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjosé S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2011;475(7354):101-105.
327. Lapalombella R, Sun Q, Williams K, Tangeman L, Jha S, Zhong Y, Goettl V, Mahoney E, Berglund C, Gupta S, Farmer A, Mani R, Johnson AJ, Lucas D, Mo X, Daelemans D, Sandanayaka V, Shechter S, McCauley D, Shacham S, Kauffman M, Chook YM, Byrd JC. Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;120(23):4621-4634.
328. Dhanoa BS, Cogliati T, Satish AG, Bruford EA, Friedman JS. Update on the Kelch-like (KLHL) gene family. *Hum Genomics.* 2013;7(1):13.
329. Crow YJ. Aicardi-Goutières syndrome. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1629-1635.
330. Clifford R, Louis T, Robbe P, Ackroyd S, Burns A, Timbs AT, Wright Colopy G, Dreau H, Sigaux F, Judde JG, Rotger M, Telenti A, Lin Y-L, Pasero P, Maelfait J, Titsias M, Cohen DR, Henderson SJ, Ross MT, Bentley D, Hillmen P, Pettitt A, Rehwinkel J, Knight SJL, Taylor JC, Crow YJ, Benkirane M, Schuh A. SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage. *Blood.* 2014;123(7):1021-1031.
331. Srivastava S, Tsongalis GJ, Kaur P. Recent advances in microRNA-mediated gene regulation in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Biochem.* 2013;46(10-11):901-908.
332. Chen Z, Ma T, Huang C, Hu T, Li J. The pivotal role of microRNA-155 in the control of cancer. *J Cell Physiol.* 2014;229(5):545-550.
333. Xia H, Hui KM. Mechanism of Cancer Drug Resistance and the Involvement of Noncoding RNAs. *Curr Med Chem.* 2014 [Epub ahead of print].
334. Gong W, Xiao D, Ming G, Yin J, Zhou H, Liu Z. Type 2 diabetes mellitus-related genetic polymorphisms in microRNAs and microRNA target sites. *J Diabetes.* 2014;6(4):279-289.

335. Condorelli G, Latronico MVG, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(21):2177-2187.
336. Jardin F, Figeac M. MicroRNAs in lymphoma, from diagnosis to targeted therapy. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(5):480-486.
337. Ferrajoli A, Shanafelt TD, Ivan C, Shimizu M, Rabe KG, Nouraei N, Ikuo M, Ghosh AK, Lerner S, Rassenti LZ, Xiao L, Hu J, Reuben JM, Calin S, You MJ, Manning JT, Wierda WG, Estrov Z, O'Brien S, Kipps TJ, Keating MJ, Kay NE, Calin GA. Prognostic value of miR-155 in individuals with monoclonal B-cell lymphocytosis and patients with B chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;122(11):1891-1899.
338. Fabbri M. TLRs as miRNA receptors. *Cancer Res*. 2012;72(24):6333-6337.
339. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-15529.
340. Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ*. 2010;17(2):215-220.
341. Liu J, Shi W, Wu C, Ju J, Jiang J. miR-181b as a key regulator of the oncogenic process and its clinical implications in cancer (Review). *Biomed Rep*. 2014;2(1):7-11.
342. Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, Nicoloso MS, Dimitri F, Sampath D, Fabbri M, Lerner S, Barron LL, Rassenti LZ, Jiang L, Xiao L, Hu J, Secchiero P, Zauli G, Volinia S, Negrini M, Wierda W, Kipps TJ, Plunkett W, Coombes KR, Abruzzo LV, Keating MJ, Calin GA. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*. 2010;116(6):945-952.
343. Buscaglia LEB, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer*. 2011;30(6):371-380.
344. Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LAJ, Masters SL. miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med*. 2013;274(3):215-226.
345. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N, Sawada K. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia*. 2011;25(8):1324-1334.
346. Mraz M, Chen L, Rassenti LZ, Ghia EM, Li H, Jepsen K, Smith EN, Messer K, Frazer KA, Kipps TJ. MicroRNA-150 contributes to the proficiency of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1 genes. *Blood*. 2014; doi:10.1182/blood.2013.09.527234 [Epub ahead of print].
347. Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(8):1348-1354.

348. Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C, Rancoita PMV, Chigrinova E, Mian M, Cerri M, Rasi S, Sozzi E, Forconi F, Ponzoni M, Moreno SM, Piris MA, Inghirami G, Zucca E, Gattei V, Rinaldi A, Kwee I, Gaidano G, Bertoni F. Genomic profiling of Richter's syndrome: recurrent lesions and differences with de novo diffuse large B-cell lymphomas. *Hematol Oncol*. 2010;28(2):62-67.
349. Mraz M, Kipps TJ. MicroRNAs and B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(8):1836-1839.
350. Opezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C, Jeannel D, Vuillier F, Legarff-Tavernier M, Kimura EY, Bechet S, Dumas G, Brissard M, Merle-Béral H, Yamamoto M, Dighiero G, Davi F, French Cooperative Group on CLL. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(2):650-657.
351. Porpaczy E, Tauber S, Bilban M, Kostner G, Gruber M, Eder S, Heintel D, Le T, Fleiss K, Skrabs C, Shehata M, Jäger U, Vanura K. Lipoprotein lipase in chronic lymphocytic leukaemia - strong biomarker with lack of functional significance. *Leuk Res*. 2013;37(6):631-636.
352. Shima H, Takatsu H, Fukuda S, Ohmae M, Hase K, Kubagawa H, Wang J-Y, Ohno H. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *Int Immunol*. 2010;22(3):149-156.
353. Pallasch CP, Wendtner CM. Overexpression of the Fas-inhibitory molecule TOSO: a novel antiapoptotic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(3):498-501.
354. Vire B, David A, Wiestner A. TOSO, the Fc micro receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;187(8):4040-4050.
355. Pallasch CP, Schulz A, Kutsch N, Schwamb J, Hagist S, Kashkar H, Ultsch A, Wickenhauser C, Hallek M, Wendtner C-M. Overexpression of TOSO in CLL is triggered by B-cell receptor signaling and associated with progressive disease. *Blood*. 2008;112(10):4213-4219.
356. Hancer VS, Diz-Kucukkaya R, Aktan M. Overexpression of Fc mu receptor (FCMR, TOSO) gene in chronic lymphocytic leukemia patients. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2012;29(2):1068-1072.
357. Tromp JM, Geest CR, Breij ECW, Elias JA, van Laar J, Luijks DM, Kater AP, Beaumont T, van Oers MHJ, Eldering E. Tipping the Noxa/Mcl-1 balance overcomes ABT-737 resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012;18(2):487-498.
358. Pekarsky Y, Palamarchuk A, Maximov V, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U, Rassenti L, Kipps T, Croce CM. Tc1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(50):19643-19648.
359. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu C-G, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, Croce CM. Tc1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*. 2006;66(24):11590-11593.

360. Scielzo C, Ghia P, Conti A, Bachi A, Guida G, Geuna M, Alessio M, Caligaris-Cappio F. HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1644-1650.
361. Butrym A, Majewski M, Dzietczenia J, Kuliczowski K, Mazur G. High expression of hematopoietic cell specific Lyn substrate-1 (HS1) predicts poor survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Res.* 2012;36(7):876-880.
362. Frezzato F, Gattazzo C, Martini V, Trimarco V, Teramo A, Carraro S, Cabrelle A, Ave E, Facco M, Zambello R, Tibaldi E, Brunati AM, Semenzato G, Trentin L. HS1, a Lyn kinase substrate, is abnormally expressed in B-chronic lymphocytic leukemia and correlates with response to fludarabine-based regimen. *PloS One.* 2012;7(6):e39902.
363. Scielzo C, Bertilaccio MTS, Simonetti G, Dagklis A, ten Hacken E, Fazi C, Muzio M, Caiolfa V, Kitamura D, Restuccia U, Bachi A, Rocchi M, Ponzoni M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. HS1 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells. *Blood.* 2010;116(18):3537-3546.
364. Ten Hacken E, Scielzo C, Bertilaccio MTS, Scarfò L, Apollonio B, Barboglio F, Stamatopoulos K, Ponzoni M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Targeting the LYN/HS1 signaling axis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013;121(12):2264-2273.
365. Gattazzo C, Martini V, Frezzato F, Trimarco V, Tibaldi E, Castelli M, Facco M, Zonta F, Brunati AM, Zambello R, Semenzato G, Trentin L. Cortactin, another player in the Lyn signaling pathway, is overexpressed and alternatively spliced in leukemic cells from patients with B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Haematologica.* 2014;99(6):1069-1077.
366. Libisch MG, Casás M, Chiribao M, Moreno P, Cayota A, Osinaga E, Oppezzo P, Robello C. GALNT11 as a new molecular marker in chronic lymphocytic leukemia. *Gene.* 2014;533(1):270-279.
367. Shachar I, Cohen S, Marom A, Becker-Herman S. Regulation of CLL survival by hypoxia-inducible factor and its target genes. *FEBS Lett.* 2012;586(18):2906-2910.
368. Eglén RM, Reisine T. Screening for compounds that modulate epigenetic regulation of the transcriptome: an overview. *J Biomol Screen.* 2011;16(10):1137-1152.
369. Deltour S, Chopin V, Leprince D. [Epigenetics and cancer]. *Médecine Sci MS.* 2005;21(4):405-411.
370. Cheng X, Blumenthal RM. Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry (Mosc).* 2010;49(14):2999-3008.
371. D'Urso A, Brickner JH. Mechanisms of epigenetic memory. *Trends Genet TIG.* 2014;30(6):230-236.
372. Cahill N, Rosenquist R. Uncovering the DNA methylome in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc.* 2013;8(2):138-148.
373. Te Raa GD, Malcikova J, Pospisilova S, Trbusek M, Mraz M, Garff-Tavernier ML, Merle-Béral H, Lin K, Pettitt AR, Merkel O, Stankovic T, van Oers MH, Eldering E, Stilgenbauer S, Zenz T, Kater

- AP, European Research Initiative on CLL (ERIC). Overview of available p53 function tests in relation to TP53 and ATM gene alterations and chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(8):1849-1853.
374. Di Raimondo F, Giustolisi R, Lerner S, Cacciola E, O'Brien S, Kantarjian H, Keating MJ. Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL patients with active disease treated with fludarabine. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2001;12(5):621-625.
375. Szánthó E, Bhattoa HP, Csobán M, Antal-Szalmás P, Újfalusi A, Kappelmayer J, Hevessy Z. Serum thymidine kinase activity: analytical performance, age-related reference ranges and validation in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2014;9(3):e91647.
376. Yegin ZA, Ozkurt ZN, Yağci M. Free light chain: a novel predictor of adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2010;84(5):406-411.
377. Pratt G, Harding S, Holder R, Fegan C, Pepper C, Oscier D, Gardiner A, Bradwell AR, Mead G. Abnormal serum free light chain ratios are associated with poor survival and may reflect biological subgroups in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;144(2):217-222.
378. Morabito F, De Filippi R, Laurenti L, Zirlik K, Recchia AG, Gentile M, Morelli E, Vigna E, Gigliotti V, Calemma R, Amoroso B, Neri A, Cutrona G, Ferrarini M, Molica S, Del Poeta G, Tripodo C, Pinto A. The cumulative amount of serum-free light chain is a strong prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(24):6353-6361.
379. Maurer MJ, Cerhan JR, Katzmann JA, Link BK, Allmer C, Zent CS, Call TG, Rabe KG, Hanson CA, Kay NE, Slager SL, Witzig TE, Shanafelt TD. Monoclonal and polyclonal serum free light chains and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(10):2821-2826.
380. Sarris K, Maltezas D, Koulieris E, Bartzis V, Tzenou T, Sachanas S, Nikolaou E, Efthymiou A, Bitsani K, Dimou M, Vassilakopoulos TP, Siakantaris M, Angelopoulou MK, Kontopidou F, Tsaftaridis P, Kafasi N, Pangalis GA, Panayiotidis PP, Harding S, Kyrtsonis M-C. Prognostic significance of serum free light chains in chronic lymphocytic leukemia. *Adv Hematol*. 2013;2013:359071.
381. Tsai H-T, Caporaso NE, Kyle RA, Katzmann JA, Dispenzieri A, Hayes RB, Marti GE, Albitar M, Ghia P, Rajkumar SV, Landgren O. Evidence of serum immunoglobulin abnormalities up to 9.8 years before diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: a prospective study. *Blood*. 2009;114(24):4928-4932.
382. Grelier A, Le Garff-Tavernier M, Nauwelaers F, Sarfati M, Merle-Beral H. Soluble CD23 measurement by CBA: a convenient and reliable quantification method in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014;86(2):91-97.
383. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, Binet JL, Merle-Beral H, Bron D. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996;88(11):4259-4264.

384. Meuleman N, Stamatopoulos B, Dejeneffe M, El Housni H, Lagneaux L, Bron D. Doubling time of soluble CD23: a powerful prognostic factor for newly diagnosed and untreated stage A chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia*. 2008;22(10):1882-1890.
385. Reinisch W, Willheim M, Hilgarth M, Gasché C, Mader R, Szepefalusi S, Steger G, Berger R, Lechner K, Boltz-Nitulescu G. Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1994;12(10):2146-2152.
386. Molica S, Levato D, Dell'Olio M, Matera R, Minervini M, Dattilo A, Carotenuto M, Musto P. Cellular expression and serum circulating levels of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Implications for prognosis. *Haematologica*. 1996;81(5):428-433.
387. Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 1999;62(2):117-122.
388. Saka B, Aktan M, Sami U, Oner D, Sanem O, Dinçol G. Prognostic importance of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lab Haematol*. 2006;28(1):30-35.
389. Knauf WU, Langenmayer I, Ehlers B, Mohr B, Adorf D, Nerl CH, Hallek M, Zwingers TH, Emmerich B, Thiel E. Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1997;27(5-6):523-532.
390. Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Marschitz I, Louda N, Hubmann R, Greil R. The role of soluble CD23 in distinguishing stable and progressive forms of B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(3):549-554.
391. Twito T, Chen Z, Khatri I, Wong K, Spaner D, Gorczynski R. Ectodomain shedding of CD200 from the B-CLL cell surface is regulated by ADAM28 expression. *Leuk Res*. 2013;37(7):816-821.
392. Wong KK, Brenneman F, Chesney A, Spaner DE, Gorczynski RM. Soluble CD200 is critical to engraft chronic lymphocytic leukemia cells in immunocompromised mice. *Cancer Res*. 2012;72(19):4931-4943.
393. Ferrer G, Hodgson K, Pereira A, Juan M, Elena M, Colomer D, Roué G, Aymerich M, Baumann T, Montserrat E, Moreno C. Combined analysis of levels of serum B-cell activating factor and a proliferation-inducing ligand as predictor of disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(11):2064-2068.
394. Molica S, Digiesi G, Battaglia C, Cutrona G, Antenucci A, Molica M, Giannarelli D, Sperduti I, Gentile M, Morabito F, Ferrarini M. Baff serum level predicts time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2010;85(4):314-320.
395. Planelles L, Castillo-Gutiérrez S, Medema JP, Morales-Luque A, Merle-Béral H, Hahne M. APRIL but not BlyS serum levels are increased in chronic lymphocytic leukemia: prognostic relevance of APRIL for survival. *Haematologica*. 2007;92(9):1284-1285.

396. Sawicka-Powierza J, Jablonska E, Kloczko J, Piszcz J, Garley M, Ratajczk-Wrona W. Evaluation of TNF superfamily molecules release by neutrophils and B leukemic cells of patients with chronic B - cell lymphocytic leukemia. *Neoplasma*. 2011;58(1):45-50.
397. Molica S, Digiesi G, Mauro F, Mirabelli R, Cutrona G, Vitelli G, Morabito F, Iuliano F, Foà R, Ferrarini M. Increased serum BAFF (B-cell activating factor of the TNF family) level is a peculiar feature associated with familial chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2009;33(1):162-165.
398. Tecchio C, Nichele I, Mosna F, Zampieri F, Leso A, Al-Khaffaf A, Veneri D, Andreini A, Pizzolo G, Ambrosetti A. A proliferation-inducing ligand (APRIL) serum levels predict time to first treatment in patients affected by B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2011;87(3):228-234.
399. Aref S, Ibrahim L, Azmy E. Prognostic impact of serum 25-hydroxivitamin D [25(OH)D] concentrations in patients with lymphoid malignancies. *Hematol Amst Neth*. 2013;18(1):20-25.
400. Genc DB, Ozkan MA, Buyukgebiz A. Vitamin D in childhood cancer: a promising anticancer agent? *Pediatr Endocrinol Rev PER*. 2013;10(4):485-493.
401. Teleni L, Baker J, Koczwara B, Kimlin MG, Walpole E, Tsai K, Isenring EA. Clinical outcomes of vitamin D deficiency and supplementation in cancer patients. *Nutr Rev*. 2013;71(9):611-621.
402. Chen N, Lv X, Li P, Lu K, Wang X. Role of high expression of IL-9 in prognosis of CLL. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(2):716-721.
403. Schweighofer CD, Cymbalista F, Müller C, Busch R, Porcher R, Langerbeins P, Cazin B, Fink A-M, Dreyfus B, Ibach S, Leprêtre S, Fischer K, Vehling-Kaiser U, Eichhorst B, Bergmann MA, Stilgenbauer S, Döhner H, Leblond V, Hallek M, Levy V. Early Versus Deferred Treatment With Combined Fludarabine, Cyclophosphamide and Rituximab (FCR) Improves Event-Free Survival In Patients With High-Risk Binet Stage A Chronic Lymphocytic Leukemia – First Results Of a Randomized German-French Cooperative Phase III Trial. *Blood*. 2013;122(21):524-524.
404. Durrieu F, Geneviève F, Arnoulet C, Brumpt C, Capiod J-C, Degenne M, Feuillard J, Garand R, Kara-Terki A, Kulhein E, Maynadié M, Ochoa-Noguera M-E, Plesa A, Roussel M, Eghbali H, Truchan-Graczyk M, de Carvalho Bittencourt M, Feugier P, Béné MC. Normal levels of peripheral CD19(+) CD5(+) CLL-like cells: toward a defined threshold for CLL follow-up -- a GEIL-GOELAMS study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80(6):346-353.
405. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Bühler A, Zenz T, Wenger MK, Mendila M, Wendtner C-M, Eichhorst BF, Döhner H, Hallek MJ, Kneba M. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012;30(9):980-988.
406. Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, Burger J, Ferrajoli A, Jain N, Tambaro FP, Estrov Z, Jorgensen J, Challagundla P, Faderl SH, Wierda WG. Eradication of bone marrow minimal residual disease with first-line chemoimmunotherapy may prompt early treatment discontinuation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; doi:10.1182/blood.2013.11.538116 [Epub ahead of print].

407. Raponi S, Della Starza I, De Propriis MS, Del Giudice I, Mauro FR, Marinelli M, Di Maio V, Piciocchi A, Foà R, Guarini A. Minimal residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia patients. A comparative analysis of flow cytometry and ASO IgH RQ-PCR. *Br J Haematol*. 2014; doi:10.1111/bjh.12887 [Epub ahead of print].
408. Böttcher S, Stilgenbauer S, Busch R, Brüggemann M, Raff T, Pott C, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Döhner H, Hallek M, Kneba M, Ritgen M. Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis. *Leukemia*. 2009;23(11):2007-2017.
409. Logan AC, Zhang B, Narasimhan B, Carlton V, Zheng J, Moorhead M, Krampf MR, Jones CD, Waqar AN, Faham M, Zehnder JL, Miklos DB. Minimal residual disease quantification using consensus primers and high-throughput IGH sequencing predicts post-transplant relapse in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013;27(8):1659-1665.
410. Hutchinson CV, Dyer MJS. Breaking good: the inexorable rise of BTK inhibitors in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2014; doi:10.1111/bjh.12895 [Epub ahead of print].
411. Wodarz D, Garg N, Komarova NL, Benjamini O, Keating MJ, Wierda WG, Kantarjian H, James D, O'Brien S, Burger JA. Kinetics of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells in tissues and blood during therapy with the BTK inhibitor ibrutinib. *Blood*. 2014;doi:10.1182/blood.2014.02.554220 [Epub ahead of print].
412. Herman SEM, Niemann CU, Farooqui M, Jones J, Mustafa RZ, Lipsky A, Saba N, Martyr S, Soto S, Valdez J, Gyamfi JA, Maric I, Calvo KR, Pedersen LB, Geisler CH, Liu D, Marti GE, Aue G, Wiestner A. Ibrutinib-induced lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia: correlative analyses from a phase II study. *Leukemia*. 2014; doi:10.1038/leu.2014.122 [Epub ahead of print].
413. Suljagic M, Longo PG, Bennardo S, Perlas E, Leone G, Laurenti L, Efremov DG. The Syk inhibitor fostamatinib disodium (R788) inhibits tumor growth in the E μ -TCL1 transgenic mouse model of CLL by blocking antigen-dependent B-cell receptor signaling. *Blood*. 2010;116(23):4894-4905.
414. Ten Hacken E, Scielzo C, Bertilaccio MTS, Scarfò L, Apollonio B, Barboglio F, Stamatopoulos K, Ponzoni M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Targeting the LYN/HS1 signaling axis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(12):2264-2273.
415. Contri A, Brunati AM, Trentin L, Cabrelle A, Miorin M, Cesaro L, Pinna LA, Zambello R, Semenzato G, Donella-Deana A. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):369-378.
416. Kater AP, Spiering M, Liu RD, Doreen Te Raa G, Slinger E, Tonino SH, Beckers MM, Daenen S, Doorduyn JK, Lankheet NAG, Luijckx DM, Eldering E, van Oers MHJ. Dasatinib in combination with fludarabine in patients with refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase 2 study. *Leuk Res*. 2014;38(1):34-41.

417. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, Huang DCS, Hymowitz SG, Jin S, Khaw SL, Kovar PJ, Lam LT, Lee J, Maecker HL, Marsh KC, Mason KD, Mitten MJ, Nimmer PM, Oleksijew A, Park CH, Park C-M, Phillips DC, Roberts AW, Sampath D, Seymour JF, Smith ML, Sullivan GM, Tahir SK, Tse C, Wendt MD, Xiao Y, Xue JC, Zhang H, Humerickhouse RA, Rosenberg SH, Elmore SW. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*. 2013;19(2):202-208.
418. Masood A, Chitta K, Paulus A, Khan ANH, Sher T, Ersing N, Miller KC, Manfredi D, Ailawadhi S, Borrelo I, Lee KP, Chanan-Khan A. Downregulation of BCL2 by AT-101 enhances the antileukaemic effect of lenalidomide both by an immune dependant and independent manner. *Br J Haematol*. 2012;157(1):59-66.
419. Badoux XC, Keating MJ, Wen S, Wierda WG, O'Brien SM, Faderl S, Sargent R, Burger JA, Ferrajoli A. Phase II study of lenalidomide and rituximab as salvage therapy for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013;31(5):584-591.
420. López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Rosich L, Montraveta A, Roldán J, Matas-Céspedes A, Villamor N, Aymerich M, López-Otín C, Pérez-Galán P, Roué G, Campo E, Colomer D. The γ -secretase inhibitor PF-03084014 combined with fludarabine antagonizes migration, invasion and angiogenesis in NOTCH1-mutated CLL cells. *Leukemia*. 2014; doi:10.1038/leu.2014.143 [Epub ahead of print].
421. Lin K, Rockliffe N, Johnson GG, Sherrington PD, Pettitt AR. Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53/ATM status in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene*. 2008;27(17):2445-2455.
422. Klein C, Lammens A, Schäfer W, Georges G, Schwaiger M, Mössner E, Hopfner K-P, Umaña P, Niederfellner G. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *mAbs*. 2013;5(1):22-33.
423. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, Chagorova T, de la Serna J, Dilhuydy M-S, Illmer T, Opat S, Owen CJ, Samoylova O, Kreuzer K-A, Stilgenbauer S, Döhner H, Langerak AW, Ritgen M, Kneba M, Asikanius E, Humphrey K, Wenger M, Hallek M. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1101-1110.
424. Schnaiter A, Stilgenbauer S. Refractory chronic lymphocytic leukemia--new therapeutic strategies. *Oncotarget*. 2010;1(7):472-482.
425. Topp MS, Gökbuget N, Zugmaier G, Degenhard E, Goebeler M-E, Klinger M, Neumann SA, Horst HA, Raff T, Viardot A, Stelljes M, Schaich M, Köhne-Volland R, Brüggemann M, Ottmann OG, Burmeister T, Baeuerle PA, Nagorsen D, Schmidt M, Einsele H, Riethmüller G, Kneba M, Hoelzer D, Kufer P, Bargou RC. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood*. 2012;120(26):5185-5187.

426. Topp MS, Kufer P, Gökbüget N, Goebeler M, Klinger M, Neumann S, Horst H-A, Raff T, Viardot A, Schmid M, Stelljes M, Schaich M, Degenhard E, Köhne-Volland R, Brüggemann M, Ottmann O, Pfeifer H, Burmeister T, Nagorsen D, Schmidt M, Lutterbuese R, Reinhardt C, Baeuerle PA, Kneba M, Einsele H, Riethmüller G, Hoelzer D, Zugmaier G, Bargou RC. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011;29(18):2493-2498.
427. Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, Hijazi Y, Bargou RC, Topp MS, Gökbüget N, Neumann S, Goebeler M, Viardot A, Stelljes M, Brüggemann M, Hoelzer D, Degenhard E, Nagorsen D, Baeuerle PA, Wolf A, Kufer P. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood*. 2012;119(26):6226-6233.
428. Spaner DE, Hammond C, Mena J, Foden C, Deabreu A. A phase I/II trial of oxidized autologous tumor vaccines during the « watch and wait » phase of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2005;54(7):635-646.
429. Hus I, Roliński J, Tabarkiewicz J, Wojas K, Bojarska-Junak A, Greiner J, Giannopoulos K, Dmoszyńska A, Schmitt M. Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2005;19(9):1621-1627.
430. Hus I, Schmitt M, Tabarkiewicz J, Radej S, Wojas K, Bojarska-Junak A, Schmitt A, Giannopoulos K, Dmoszyńska A, Roliński J. Vaccination of B-CLL patients with autologous dendritic cells can change the frequency of leukemia antigen-specific CD8+ T cells as well as CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells toward an antileukemia response. *Leukemia*. 2008;22(5):1007-1017.
431. Palma M, Hansson L, Choudhury A, Näsman-Glaser B, Eriksson I, Adamson L, Rossmann E, Widén K, Horváth R, Kokhaei P, Vertuani S, Mellstedt H, Osterborg A. Vaccination with dendritic cells loaded with tumor apoptotic bodies (Apo-DC) in patients with chronic lymphocytic leukemia: effects of various adjuvants and definition of immune response criteria. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2012;61(6):865-879.
432. Giannopoulos K, Dmoszynska A, Kowal M, Rolinski J, Gostick E, Price DA, Greiner J, Rojewski M, Stilgenbauer S, Döhner H, Schmitt M. Peptide vaccination elicits leukemia-associated antigen-specific cytotoxic CD8+ T-cell responses in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2010;24(4):798-805.
433. Davila ML, Brentjens R. Chimeric antigen receptor therapy for chronic lymphocytic leukemia: what are the challenges? *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27(2):341-353.
434. Hamblin TJ. Searching for surrogates for IGHV mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2011;35(11):1432-1435.
435. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan X-J, Davis Z, van Gastel-Mol EJ, Tresoldi C, Chu CC, Cahill N, Giudicelli V, Tichy B, Pedersen LB, Foroni L, Bonello L, Janus A, Smedby K, Anagnostopoulos A, Merle-Beral H, Laoutaris N, Juliusson G, di Celle PF,

- Pospisilova S, Jurlander J, Geisler C, Tsaftaris A, Lefranc M-P, Langerak AW, Oscier DG, Chiorazzi N, Belessi C, Davi F, Rosenquist R, Ghia P, Stamatopoulos K. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*. 2012;119(19):4467-4475.
436. Robak T, Robak P. BCR signaling in chronic lymphocytic leukemia and related inhibitors currently in clinical studies. *Int Rev Immunol*. 2013;32(4):358-376.
437. Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, Stevenson FK. Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood*. 1997;89(11):4153-4160.
438. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-54.
439. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-7.
440. Doubek M, Mayer J, Obrtlíková P, Smolej L, Cmunt E, Schwarz J, Brejcha M, Kozmon P, Pospíšilová S, Brychtová Y, Pospíšil Z, Trněný M. Modern and conventional prognostic markers of chronic lymphocytic leukaemia in the everyday haematological practice. *Eur J Haematol*. 2011;87(2):130-137.
441. Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, Oppezzo P, Magnac C, Michel A, Yamamoto M, Pritsch O, Merle-Béral H, Maloum K, Ajchenbaum-Cymbalista F, Dighiero G. Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003;21(21):3928-3932.
442. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2004;363(9403):105-11.
443. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003;101(12):4944-51.
444. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194(11):1639-47.
445. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764-75.

446. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberger DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(9):893-901.
447. Rizzo D, Bouvier G, Youlyouz-Marfak I, Guerin E, Trimoreau F, Bordessoule D, Jaccard A, Gachard N, Feuillard J. T/B ratio does not reflect levels of ZAP70 expression in clonal CLL B-cells due to ZAP70 overexpression in patient T-cells. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(2):125-132.
448. Gachard N, Salviat A, Boutet C, Arnoulet C, Durrieu F, Lenormand B, Leprêtre S, Olschwang S, Jardin F, Lafage-Pochitaloff M, Penther D, Sainty D, Reminieras L, Feuillard J, Béné MC. Multicenter study of ZAP-70 expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia using an optimized flow cytometry method. *Haematologica*. 2008;93(2):215-23.
449. Friedrichs B, Siegel S, Reimer R, Barsoum A, Coggin J Jr, Kabelitz D, Heidorn K, Schulte C, Schmitz N, Zeis M. High expression of the immature laminin receptor protein correlates with mutated IGVH status and predicts a favorable prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2011;35(6):721-729.
450. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, Kay NE, Brown JR, Gribben JG, Neuberger DS, He F, Greaves AW, Rai KR, Kipps TJ. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1923-30.
451. Zucchetto A, Bomben R, Dal Bo M, Sonogo P, Nanni P, Rupolo M, Bulian P, Dal Maso L, Del Poeta G, Del Principe MI, Degan M, Gattei V. A scoring system based on the expression of six surface molecules allows the identification of three prognostic risk groups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Physiol*. 2006;207(2):354-363.
452. Oppezzo P, Magnac C, Bianchi S, Vuillier F, Tiscornia A, Dumas G, Payelle-Brogard B, Ajchenbaum-Cymbalista F, Dighiero G, Pritsch O. Do CLL B cells correspond to naive or memory B-lymphocytes? Evidence for an active Ig switch unrelated to phenotype expression and Ig mutational pattern in B-CLL cells. *Leukemia*. 2002;16(12):2438-2446.
453. Jantus Lewintre E, Reinoso Martín C, García Ballesteros C, Pendas J, Benet Campos C, Mayans Ferrer JR, García-Conde J. BCL6: somatic mutations and expression in early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(5):773-780.
454. Pasqualucci L, Neri A, Baldini L, Dalla-Favera R, Migliazza A. BCL-6 mutations are associated with immunoglobulin variable heavy chain mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2000;60(20):5644-5648.
455. Capello D, Fais F, Vivenza D, Migliaretti G, Chiorazzi N, Gaidano G, Ferrarini M. Identification of three subgroups of B cell chronic lymphocytic leukemia based upon mutations of BCL-6 and IgV genes. *Leukemia*. 2000;14(5):811-815.
456. Sarsotti E, Marugan I, Benet I, Terol MJ, Sanchez-Izquierdo D, Tormo M, Rubio-Moscardo F, Martinez-Climent JA, García-Conde J. Bcl-6 mutation status provides clinically valuable

- information in early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2004;18(4):743-746.
457. Marantidou F, Dagklis A, Stalika E, Korkolopoulou P, Korkolopoulou P, Saetta A, Anagnostopoulos A, Laoutaris N, Stamatopoulos K, Belessi C, Scouras Z, Patsouris E. Activation-induced cytidine deaminase splicing patterns in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44(4):262-267.
 458. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, Bartoli A, Coaccioli S, Screpanti I, Marconi P. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. 2009;113(4):856-865.
 459. Hubmann R, Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Duechler M, Dettke M, Berger R. Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(10):3742-3747.
 460. Hubmann R, Düchler M, Schnabl S, Hilgarth M, Demirtas D, Mitteregger D, Hölbl A, Vanura K, Le T, Look T, Schwarzmeier JD, Valent P, Jäger U, Shehata M. NOTCH2 links protein kinase C delta to the expression of CD23 in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells. *Br J Haematol*. 2010;148(6):868-878.
 461. Duechler M, Shehata M, Schwarzmeier JD, Hoelbl A, Hilgarth M, Hubmann R. Induction of apoptosis by proteasome inhibitors in B-CLL cells is associated with downregulation of CD23 and inactivation of Notch2. *Leukemia*. 2005;19(2):260-267.
 462. Geisler CH, Larsen JK, Hansen NE, Hansen MM, Christensen BE, Lund B, Nielsen H, Plesner T, Thorling K, Andersen E. Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1991;78(7):1795-1802.
 463. Cerutti A, Zan H, Kim EC, Shah S, Schattner EJ, Schaffer A, Casali P. Ongoing in vivo immunoglobulin class switch DNA recombination in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;169(11):6594-6603.
 464. Efremov DG, Ivanovski M, Batista FD, Pozzato G, Burrone OR. IgM-producing chronic lymphocytic leukemia cells undergo immunoglobulin isotype-switching without acquiring somatic mutations. *J Clin Invest*. 1996;98(2):290-298.
 465. Fais F, Sellars B, Ghiotto F, Yan XJ, Dono M, Allen SL, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Schuster M, Vinciguerra VP, Rai K, Stevenson FK, Gregersen PK, Ferrarini M, Chiorazzi N. Examples of in vivo isotype class switching in IgM+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 1996;98(7):1659-1666.
 466. Opezzo P, Vuillier F, Vasconcelos Y, Dumas G, Magnac C, Payelle-Brogard B, Pritsch O, Dighiero G. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood*. 2003;101(10):4029-4032.
 467. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, Belhoul L, Stella S, Stavroyianni N, Crespo M, Hadzidimitriou A, Sutton L, Bosch F, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Montserrat E, Fassas A, Dighiero G, Caligaris-Cappio F, Merle-Béral H,

- Ghia P, Davi F. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007;109(1):259-270.
468. Colombo M, Cutrona G, Reverberi D, Fabris S, Neri A, Fabbi M, Quintana G, Quarta G, Ghiotto F, Fais F, Ferrarini M. Intracloonal cell expansion and selection driven by B cell receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Med Camb Mass*. 2011;17(7-8):834-839.
469. Sutton L-A, Kostareli E, Hadzidimitriou A, Darzentas N, Tsaftaris A, Anagnostopoulos A, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Extensive intracloonal diversification in a subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with stereotyped IGHV4-34 receptors: implications for ongoing interactions with antigen. *Blood*. 2009;114(20):4460-4468.
470. Sutton L-A, Kostareli E, Stalika E, Tsaftaris A, Anagnostopoulos A, Darzentas N, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Temporal dynamics of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia with stereotyped IGHV4-34/IGKV2-30 antigen receptors: longitudinal immunogenetic evidence. *Mol Med Camb Mass*. 2013;19:230-236.
471. Kostareli E, Sutton L-A, Hadzidimitriou A, Darzentas N, Kouvatsi A, Tsaftaris A, Anagnostopoulos A, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Intracloonal diversification of immunoglobulin light chains in a subset of chronic lymphocytic leukemia alludes to antigen-driven clonal evolution. *Leukemia*. 2010;24(7):1317-1324.
472. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, Hatzi K, Josefsson P, Laoutaris N, Moreno C, Anagnostopoulos A, Jurlander J, Tsaftaris A, Chiorazzi N, Belessi C, Ghia P, Rosenquist R, Davi F, Stamatopoulos K. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK*. 2010;24(1):125-132.
473. Tsakou E, Agathagelidis A, Boudjoghra M, Raff T, Dagklis A, Chatzouli M, Smilevska T, Bourikas G, Merle-Beral H, Manioudaki-Kavallieratou E, Anagnostopoulos A, Brüggemann M, Davi F, Stamatopoulos K, Belessi C. Partial versus productive immunoglobulin heavy locus rearrangements in chronic lymphocytic leukemia: implications for B-cell receptor stereotypy. *Mol Med Camb Mass*. 2012;18:138-145.
474. Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, Smilevska T, Arvaniti E, Tresoldi C, Tsaftaris A, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Davi F, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K, Belessi C. Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113(2):403-411.
475. Boyd SD, Gaëta BA, Jackson KJ, Fire AZ, Marshall EL, Merker JD, Maniar JM, Zhang LN, Sahaf B, Jones CD, Simen BB, Hanczaruk B, Nguyen KD, Nadeau KC, Egholm M, Miklos DB, Zehnder JL, Collins AM. Individual variation in the germline Ig gene repertoire inferred from variable region gene rearrangements. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010;184(12):6986-6992.
476. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C, Laoutaris N, Karlsson K, Baran-Marzsak F, Tsaftaris A, Moreno C, Anagnostopoulos A, Caligaris-Cappio F, Vaur D, Ouzounis C, Belessi C, Ghia P, Davi F, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia:

- implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008;111(3):1524-1533.
477. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Forconi F, Maffei R, Laurenti L, Rossi D, Del Principe MI, Zucchetto A, Bertoni F, Rossi FM, Bulian P, Cattarossi I, Ilariucci F, Sozzi E, Spina V, Zucca E, Degan M, Lauria F, Del Poeta G, Efremov DG, Marasca R, Gaidano G, Gattei V. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *Br J Haematol*. 2009;144(4):492-506.
478. Maura F, Cutrona G, Fabris S, Colombo M, Tuana G, Agnelli L, Matis S, Lionetti M, Gentile M, Recchia AG, Di Raimondo F, Musolino C, Ilariucci F, Di Renzo N, Pesce E, Molica S, Federico M, Cortelezzi A, Morabito F, Ferrarini M, Neri A. Relevance of stereotyped B-cell receptors in the context of the molecular, cytogenetic and clinical features of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2011;6(8):e24313.
479. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, Michel A, Crespo M, Laoutaris N, Montserrat E, Anagnostopoulos A, Dighiero G, Fassas A, Caligaris-Cappio F, Davi F. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*. 2005;105(4):1678-1685.
480. Thorsélius M, Kröber A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Bühler A, Kienle D, Albesiano E, Maffei R, Dao-Ung L-P, Wiley J, Vilpo J, Laurell A, Merup M, Roos G, Karlsson K, Chiorazzi N, Marasca R, Döhner H, Stilgenbauer S, Rosenquist R. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*. 2006;107(7):2889-2894.
481. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, Laurenti L, Maffei R, Forconi F, Bertoni F, Zucca E, Agostinelli C, Cabras A, Lucioni M, Martini M, Magni M, Deaglio S, Ladetto M, Nomdedeu JF, Besson C, Ramponi A, Canzonieri V, Paulli M, Marasca R, Larocca LM, Carbone A, Pileri SA, Gattei V, Gaidano G. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009;15(13):4415-4422.
482. Potter KN, Mockridge CI, Neville L, Wheatley I, Schenk M, Orchard J, Duncombe AS, Packham G, Stevenson FK. Structural and functional features of the B-cell receptor in IgG-positive chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006;12(6):1672-1679.
483. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, Hatzi K, Josefsson P, Laoutaris N, Moreno C, Anagnostopoulos A, Jurlander J, Tsaftaris A, Chiorazzi N, Belessi C, Ghia P, Rosenquist R, Davi F, Stamatopoulos K. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia*. 2010;24(1):125-132.
484. Chiorazzi N, Hatzi K, Albesiano E. B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1062:1-12.

485. Lanemo Myhrinder A, Hellqvist E, Sidorova E, Söderberg A, Baxendale H, Dahle C, Willander K, Tobin G, Bäckman E, Söderberg O, Rosenquist R, Hörkkö S, Rosén A. A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood*. 2008;111(7):3838-3848.
486. Catera R, Silverman GJ, Hatzi K, Seiler T, Didier S, Zhang L, Hervé M, Meffre E, Oscier DG, Vlassara H, Scofield RH, Chen Y, Allen SL, Kolitz J, Rai KR, Chu CC, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Mol Med Camb Mass*. 2008;14(11-12):665-674.
487. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang J-K, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Johnson NA, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
488. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *J Exp Med*. 2011;208(1):67-80.
489. Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, Hofmann D, Surova E, Follo M, Köhler F, Wardemann H, Zirlik K, Veelken H, Jumaa H. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*. 2012;489(7415):309-312.
490. Binder M, Müller F, Frick M, Wehr C, Simon F, Leistler B, Veelken H, Mertelsmann R, Trepel M. CLL B-cell receptors can recognize themselves: alternative epitopes and structural clues for autostimulatory mechanisms in CLL. *Blood*. 2013;121(1):239-241.
491. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 1992;71(4):649-62.
492. Béné MC. What is ZAP-70? *Cytom B Clin Cytom*. 2006;70(4):204-8.
493. Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu L-Y, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A. The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol Rev*. 2009;228(1):41-57.
494. Hatada MH, Lu X, Laird ER, Green J, Morgenstern JP, Lou M, Marr CS, Phillips TB, Ram MK, Theriault K, et al. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature*. 1995;377(6544):32-8.
495. Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem*. 2001;130(2):177-86.
496. Latour S, Chow LM, Veillette A. Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996;271(37):22782-90.

497. Kuroyama H, Ikeda T, Kasai M, Yamasaki S, Tatsumi M, Utsuyama M, Saito T, Hirokawa K. Identification of a novel isoform of ZAP-70, truncated ZAP kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315(4):935-41.
498. Schweighoffer E, Vanes L, Mathiot A, Nakamura T, Tybulewicz VLJ. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity.* 2003;18(4):523-33.
499. Guillaume N, Alleaume C, Munfus D, Capiod J-C, Touati G, Pautard B, Desablens B, Lefrère J-J, Gouilleux F, Lassoued K, Gouilleux-Gruart V. ZAP-70 tyrosine kinase is constitutively expressed and phosphorylated in B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Haematologica.* 2005;90(7):899-905.
500. Crespo M, Villamor N, Giné E, Muntañola A, Colomer D, Marafioti T, Jones M, Camós M, Campo E, Montserrat E, Bosch F. ZAP-70 expression in normal pro/pre B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2006;12(3 Pt 1):726-34.
501. Cutrona G, Colombo M, Matis S, Reverberi D, Dono M, Tarantino V, Chiorazzi N, Ferrarini M. B lymphocytes in humans express ZAP-70 when activated in vivo. *Eur J Immunol.* 2006;36(3):558-69.
502. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, Darce JR, Kay NE, Jelinek DF. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia.* 2005;19(6):1018-24.
503. Scielzo C, Camporeale A, Geuna M, Alessio M, Poggi A, Zocchi MR, Chilosi M, Caligaris-Cappio F, Ghia P. ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia.* 2006;20(4):689-95.
504. Bekeredjian-Ding I, Doster A, Schiller M, Heyder P, Lorenz H-M, Schraven B, Bommhardt U, Heeg K. TLR9-activating DNA up-regulates ZAP70 via sustained PKB induction in IgM+ B cells. *J Immunol.* 2008;181(12):8267-77.
505. Sup SJ, Domiati-Saad R, Kelley TW, Steinle R, Zhao X, Hsi ED. ZAP-70 expression in B-cell hematologic malignancy is not limited to CLL/SLL. *Am J Clin Pathol.* 2004;122(4):582-7.
506. Admirand JH, Rassidakis GZ, Abruzzo LV, Valbuena JR, Jones D, Medeiros LJ. Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Mod Pathol.* 2004;17(8):954-61.
507. Carreras J, Villamor N, Colomo L, Moreno C, Ramón y Cajal S, Crespo M, Tort F, Bosch F, López-Guillermo A, Colomer D, Montserrat E, Campo E. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol.* 2005;205(4):507-13.
508. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995;9(10):1783-6.
509. Chiaretti S, Guarini A, De Propriis MS, Tavolaro S, Intoppa S, Vitale A, Iacobelli S, Elia L, Ariola C, Ritz J, Foà R. ZAP-70 expression in acute lymphoblastic leukemia: association with the

- E2A/PBX1 rearrangement and the pre-B stage of differentiation and prognostic implications. *Blood*. 2006;107(1):197-204.
510. Craig FE, Monaghan SA, Surti U, Swerdlow SH. ZAP-70 and Bcl-2 expression in B lymphoblastic leukemia cells and hematogones. *Cytometry B Clin Cytom*. 2012;82(2):85-92.
511. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(9):893-901.
512. Kern W, Dicker F, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T. Correlation of flow cytometrically determined expression of ZAP-70 using the SBZAP antibody with IgVH mutation status and cytogenetics in 1,229 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cytom B Clin Cytom*. 2009;76(6):385-93.
513. Morabito F, Cutrona G, Gentile M, Matis S, Todoerti K, Colombo M, Sonaglio C, Fabris S, Reverberi D, Megna M, Spriano M, Lucia E, Rossi E, Callea V, Mazzone C, Festini G, Zupo S, Molica S, Neri A, Ferrarini M. Definition of progression risk based on combinations of cellular and molecular markers in patients with Binet stage A chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;146(1):44-53.
514. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(13):4609-14.
515. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(5):2036-41.
516. Chen L, Huynh L, Apgar J, Tang L, Rassenti L, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2685-92.
517. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. 2007;109(5):2032-9.
518. Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol*. 2003;14(8):1169-76.
519. Castro JE, Prada CE, Loria O, Kamal A, Chen L, Burrows FJ, Kipps TJ. ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation, apoptosis, and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(7):2506-12.
520. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, Gardiner A, Mould S, Oscier D, Copplestone JA, Prentice AG. ZAP-70 expression is associated with

- enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2006;107(9):3584-92.
521. Calpe E, Purroy N, Carpio C, Abrisqueta P, Carabia J, Palacio C, Castellví J, Crespo M, Bosch F. ZAP-70 promotes the infiltration of malignant B-lymphocytes into the bone marrow by enhancing signaling and migration after CXCR4 stimulation. *PLoS One*. 2013;8(12):e81221.
 522. Purroy N, Calpe E, Abrisqueta P, Carpio C, Palacio C, Gallur L, Castellvi J, Crespo M, Bosch F. ZAP-70 Enhances Migration of Malignant B Cells towards Lymphoid Organs in a Burkitt Lymphoma Xenograft Model. *ASH Annu Meet Abstr*. 2011;118(21):2844.
 523. Nédellec S, Renaudineau Y, Bordron A, Berthou C, Porakishvili N, Lydyard PM, Pers J-O, Youinou P. B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol*. 2005;174(6):3749-56.
 524. Healy JI, Goodnow CC. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:645-70.
 525. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, Leone G, Efremov DG. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005;105(12):4820-7.
 526. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Carsetti L, Berno V, Sica S, Leone G, Efremov DG. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2009;23(4):686-97.
 527. Deglesne P-A, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, Sanhes L, Nataf J, Roger C, Varin-Blank N, Ajchenbaum-Cymbalista F. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res*. 2006;66(14):7158-66.
 528. Zupo S, Isnardi L, Megna M, Massara R, Malavasi F, Dono M, Cosulich E, Ferrarini M. CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood*. 1996;88(4):1365-74.
 529. Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, Keller SA, Cesarman E, Liou HC, Schattner EJ. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood*. 2001;98(10):3050-7.
 530. Mozaheb Z, Hasanzadeh NazarAbadi MH, Aghaee MA. Chronic lymphocytic leukemia and prognostic factors. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2012;13(7):3009-3013.
 531. Herishanu Y, Kay S, Joffe E, Ben-Ezra J, Baron S, Rotman R, Braunstein R, Dezorella N, Polliack A, Naparstek E, Perry C, Deutsch V, Katz B-Z. Integration of automated morphological features resolves a distinct group of atypical chronic lymphocytic leukemias with chromosomal aberrations. *Leuk Res*. 2014;38(4):484-489.
 532. Gogia A, Raina V, Gupta R, Gajendra S, Kumar L, Sharma A, Kumar R, Vishnubhatla S. Prognostic and Predictive Significance of Smudge Cell Percentage on Routine Blood Smear in

- Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014; doi:10.1016/j.clml.2014.02.007 [Epub ahead of print].
533. Marionneaux S, Maslak P, Keohane EM. Morphologic identification of atypical chronic lymphocytic leukemia by digital microscopy. *Int J Lab Hematol*. 2013; doi:10.1111/ijlh.12167 [Epub ahead of print].
534. Hulkkonen J, Vilpo L, Hurme M, Vilpo J. Surface antigen expression in chronic lymphocytic leukemia: clustering analysis, interrelationships and effects of chromosomal abnormalities. *Leukemia*. 2002;16(2):178-185.
535. Pang M, He J, Johnson P, Baum LG. CD45-mediated fodrin cleavage during galectin-1 T cell death promotes phagocytic clearance of dying cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;182(11):7001-7008.
536. Tsai C-M, Chiu Y-K, Hsu T-L, Lin I-Y, Hsieh S-L, Lin K-I. Galectin-1 promotes immunoglobulin production during plasma cell differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;181(7):4570-4579.
537. Croci DO, Morande PE, Dergan-Dylon S, Borge M, Toscano MA, Stupirski JC, Bezares RF, Avalos JS, Narbaitz M, Gamberale R, Rabinovich GA, Giordano M. Nurse-like cells control the activity of chronic lymphocytic leukemia B cells via galectin-1. *Leukemia*. 2013;27(6):1413-1416.
538. Giordano M, Croci DO, Rabinovich GA. Galectins in hematological malignancies. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(4):327-335.
539. Société Française d'Hématologie. Leucémie Lymphoïde Chronique. *Hématologie*. Elsevier Masson; 2011. p. 65-72.
540. Xu W, Wang Y-H, Fan L, Fang C, Zhu D-X, Wang D-M, Qiao C, Wu Y-J, Li J-Y. Prognostic significance of serum immunoglobulin paraprotein in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2011;35(8):1060-1065.
541. Shvidel L, Tadmor T, Braester A, Bairey O, Rahimi-Levene N, Herishanu Y, Klepfish A, Ruchlemer R, Berrebi A, Polliack A, the Israeli CLL Study Group. Serum immunoglobulin levels at diagnosis have no prognostic significance in stage A chronic lymphocytic leukemia: a study of 1113 cases from the Israeli CLL Study Group. *Eur J Haematol*. 2014; doi:10.1111/ejh.12290 [Epub ahead of print].
542. Beaume A, Brizard A, Dreyfus B, Preud'homme JL. High incidence of serum monoclonal Igs detected by a sensitive immunoblotting technique in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1994;84(4):1216-1219.
543. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton L-A, Chatzouli M, Scarfò L, Mansouri L, Douka V, Anagnostopoulos A, Darzentas N, Rosenquist R, Ghia P, Belessi C, Stamatopoulos K. IgG-Switched CLL Has a Distinct Immunogenetic Signature from the Common MD Variant: Ontogenetic Implications. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014;20(2):323-330.

544. Herishanu Y, Kay S, Rogowski O, Pick M, Naparstek E, Deutsch VR, Polliack A. T-cell ZAP-70 overexpression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) correlates with CLL cell ZAP-70 levels, clinical stage and disease progression. *Leukemia*. 2005;19(7):1289-91.
545. Wiggers TGH, Westra G, Westers TM, Abbes AP, Strunk A, Kuiper-Kramer E, Poddighe P, van de Loosdrecht AA, Chamuleau MED. ZAP70 in B-CLL cells related to the expression in NK cells is a surrogate marker for mutational status. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013; doi:10.1002/cytob.21132 [Epub ahead of print].
546. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194(11):1639-47.
547. Baran-Marszak F, Fagard R, Girard B, Camilleri-Broët S, Zeng F, Lenoir GM, Raphaël M, Feuillard J. Gene array identification of Epstein Barr virus-regulated cellular genes in EBV-converted Burkitt lymphoma cell lines. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2002;82(11):1463-1479.
548. Grafton G, Goodall M, Gregory CD, Gordon J. Mechanisms of antigen receptor-dependent apoptosis of human B lymphoma cells probed with a panel of 27 monoclonal antibodies. *Cell Immunol*. 1997;182(1):45-56.
549. Trujillo MA, Eberhardt NL. Kinetics of the apoptotic response induced by anti-IgM engagement of the B cell receptor is dependent on the density of cell surface immunoglobulin M expression. *DNA Cell Biol*. 2003;22(8):525-531.
550. Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri YU, Isoyama K, Yamada K, Matsuo Y, Fujimoto J. Costimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. *Leukemia*. 2003;17(6):1164-1174.
551. Lens SM, den Drijver BF, Pötgens AJ, Tesselaar K, van Oers MH, van Lier RA. Dissection of pathways leading to antigen receptor-induced and Fas/CD95-induced apoptosis in human B cells. *J Immunol*. 1998;160(12):6083-92.
552. Hase H, Kanno Y, Kojima H, Morimoto C, Okumura K, Kobata T. CD27 and CD40 inhibit p53-independent mitochondrial pathways in apoptosis of B cells induced by B cell receptor ligation. *J Biol Chem*. 2002;277(49):46950-8.
553. Coscia M, Pantaleoni F, Riganti C, Vitale C, Rigoni M, Peola S, Castella B, Foglietta M, Griggio V, Drandi D, Ladetto M, Bosia A, Boccadoro M, Massaia M. IGHV unmutated CLL B cells are more prone to spontaneous apoptosis and subject to environmental prosurvival signals than mutated CLL B cells. *Leukemia*. 2011;25(5):828-837.
554. Rao N, Ghosh AK, Ota S, Zhou P, Reddi AL, Hakezi K, Druker BK, Wu J, Band H. The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation. *EMBO J*. 2001;20(24):7085-95.

555. Youlyouz-Marfak I, Gachard N, Le Cloennec C, Najjar I, Baran-Marszak F, Reminieras L, May E, Bornkamm GW, Fagard R, Feuillard J. Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour genotoxic agents. *Cell Death Differ.* 2008;15(2):376-385.
556. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med.* 2001;194(11):1625-1638.
557. Cognasse F, Acquart S, Beniguel L, Sabido O, Chavarin P, Genin C, Garraud O. Differential production of immunoglobulin classes and subclasses by mucosal-type human B-lymphocytes exposed in vitro to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC.* 2005;43(1):22-31.
558. Letestu R, Lévy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib D, Schischmanoff O, Katsahian S, Nguyen-Khac F, Davi F, Merle-Béral H, Troussard X, Ajchenbaum-Cymbalista F. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood.* 2010;116(22):4588-4590.
559. Pepper C, Majid A, Lin TT, Hewamana S, Pratt G, Walewska R, Gesk S, Siebert R, Wagner S, Kennedy B, Miall F, Davis ZA, Tracy I, Gardiner AC, Brennan P, Hills RK, Dyer MJS, Oscier D, Fegan C. Defining the prognosis of early stage chronic lymphocytic leukaemia patients. *Br J Haematol.* 2012;156(4):499-507.
560. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do K-A, Garcia-Manero G, Cortes J, Thomas D, Koller CA, Burger JA, Lerner S, Schlette E, Abruzzo L, Kantarjian HM, Keating MJ. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011;29(31):4088-4095.
561. Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Duvillier H, Massy M, Martiat P, Bron D, Lagneaux L. Quantification of ZAP70 mRNA in B cells by real-time PCR is a powerful prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chem.* 2007;53(10):1757-1766.
562. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, Bauer K, Malchau G, Rabe KG, Stilgenbauer S, Döhner H, Jäger U, Eckart MJ, Hopfinger G, Busch R, Fink A-M, Wendtner C-M, Fischer K, Kay NE, Hallek M. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014; doi:10.1182/blood.2014.02.556399 [Epub ahead of print].
563. Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, González-García I, Brieva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood.* 2002;99(6):2154-2161.
564. Rodríguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, López-Blanco R, Campos-Caro A, Brieva JA. STAT-3 activation by differential cytokines is critical for human in vivo-generated plasma cell survival and Ig secretion. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2013;191(10):4996-5004.
565. Berglund LJ, Avery DT, Ma CS, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Wong M, Adelstein S, Arkwright PD, Bacchetta R, Bezrodnik L, Dadi H, Roifman CM, Fulcher DA, Ziegler

- JB, Smart JM, Kobayashi M, Picard C, Durandy A, Cook MC, Casanova J-L, Uzel G, Tangye SG. IL-21 signalling via STAT3 primes human naive B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood*. 2013;122(24):3940-3950.
566. Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2013;190(4):1827-1836.
567. Gutierrez A Jr, Arendt BK, Tschumper RC, Kay NE, Zent CS, Jelinek DF. Differentiation of chronic lymphocytic leukemia B cells into immunoglobulin secreting cells decreases LEF-1 expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26056.
568. Calame KL, Lin K-I, Tunyaplin C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:205-230.
569. Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet*. 2013;382(9894):819-831.
570. Ghia P, Scielzo C, Frenquelli M, Muzio M, Caligaris-Cappio F. From normal to clonal B cells: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) at the crossroad between neoplasia and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2007;7(2):127-131.
571. Palacios F, Moreno P, Morande P, Abreu C, Correa A, Porro V, Landoni AI, Gabus R, Giordano M, Dighiero G, Pritsch O, Oppezzo P. High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood*. 2010;115(22):4488-4496.
572. Pede V, Rombout A, Vermeire J, Naessens E, Vanderstraeten H, Philippé J, Verhasselt B. Expression of ZAP70 in chronic lymphocytic leukaemia activates NF- κ B signalling. *Br J Haematol*. 2013;163(5):621-630.
573. Le Roy C, Deglesne P-A, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, Boubaya M, Letestu R, Lévy V, Ajchenbaum-Cymbalista F, Varin-Blank N. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(2):356-365.
574. Perrot A, Pionneau C, Nadaud S, Davi F, Leblond V, Jacob F, Merle-Béral H, Herbrecht R, Béné M-C, Gribben JG, Bahram S, Vallat L. A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(4):e1-15.
575. Deaglio S, Aydin S, Grand MM, Vaisitti T, Bergui L, D'Arena G, Chiorino G, Malavasi F. CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol Med Camb Mass*. 2010;16(3-4):87-91.
576. Witkowska M, Nowak W, Cebula-Obrzut B, Majchrzak A, Medra A, Robak T, Smolewski P. Spontaneous in vitro apoptosis of de novo chronic lymphocytic leukemia cells correlates with risk of the disease progression. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014; doi:10.1002/cyto.b.21163 [Epub ahead of print].
577. Dang CV, O'donnell KA, Juopperi T. The great MYC escape in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2005;8(3):177-178.

578. Krysov S, Dias S, Paterson A, Mockridge CI, Potter KN, Smith K-A, Ashton-Key M, Stevenson FK, Packham G. Surface IgM stimulation induces MEK1/2-dependent MYC expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2012;119(1):170-179.
579. Pede V, Rombout A, Vermeire J, Naessens E, Mestdagh P, Robberecht N, Vanderstraeten H, Van Roy N, Vandesomepele J, Speleman F, Philippé J, Verhasselt B. CLL cells respond to B-Cell receptor stimulation with a microRNA/mRNA signature associated with MYC activation and cell cycle progression. *PloS One*. 2013;8(4):e60275.
580. Kienle DL, Korz C, Hosch B, Benner A, Mertens D, Habermann A, Kröber A, Jäger U, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(16):3780-3792.
581. Rizza P, Moretti F, Belardelli F. Recent advances on the immunomodulatory effects of IFN-alpha: implications for cancer immunotherapy and autoimmunity. *Autoimmunity*. 2010;43(3):204-209.
582. Simonsson B, Hjorth-Hansen H, Bjerrum OW, Porkka K. Interferon alpha for treatment of chronic myeloid leukemia. *Curr Drug Targets*. 2011;12(3):420-428.
583. Bekisz J, Baron S, Balinsky C, Morrow A, Zoon KC. Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharm Basel Switz*. 2010;3(4):994-1015.
584. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):836-848.
585. Mauro FR, Zinzani P, Zaja F, Gentile M, Vegna ML, Stefoni V, Marin L, Fanin R, Baccarani M, Tura S, Mandelli F. Fludarabine + prednisone +/- alpha-interferon followed or not by alpha-interferon maintenance therapy for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: long term results of a randomized study. *Haematologica*. 2003;88(12):1348-1357.
586. Tomic J, Lichty B, Spaner DE. Aberrant interferon-signaling is associated with aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(9):2668-2680.
587. Bauvois B, Durant L, Laboureau J, Barthélémy E, Rouillard D, Boulla G, Deterre P. Upregulation of CD38 gene expression in leukemic B cells by interferon types I and II. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. 1999;19(9):1059-1066.
588. Brass U, Tretter T, Schneller F, Schuler M, Huber C, Peschel C. IFN-alpha stimulates proliferation and cytokine secretion of CD40-stimulated B cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. 1999;19(4):335-343.
589. Amin S, Walsh M, Wilson C, Parker AE, Oscier D, Willmore E, Mann D, Mann J. Cross-talk between DNA methylation and active histone modifications regulates aberrant expression of ZAP70 in CLL. *J Cell Mol Med*. 2012;16(9):2074-2084.

590. Claus R, Lucas DM, Stilgenbauer S, Ruppert AS, Yu L, Zucknick M, Mertens D, Bühler A, Oakes CC, Larson RA, Kay NE, Jelinek DF, Kipps TJ, Rassenti LZ, Gribben JG, Döhner H, Heerema NA, Marcucci G, Plass C, Byrd JC. Quantitative DNA methylation analysis identifies a single CpG dinucleotide important for ZAP-70 expression and predictive of prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 juill 2012;30(20):2483-2491.
591. Cahill N, Bergh A-C, Kanduri M, Göransson-Kultima H, Mansouri L, Isaksson A, Ryan F, Smedby KE, Juliusson G, Sundström C, Rosén A, Rosenquist R. 450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments. *Leukemia*. janv 2013;27(1):150-158.
592. Moreno P, Abreu C, Borge M, Palacios F, Morande P, Pegazzano M, Bianchi S, Landoni AI, Agrelo R, Giordano M, Dighiero G, Gamberale R, Oppezzo P. Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment. *Leukemia*. mars 2013;27(3):721-725.
593. Bam R, Ling W, Khan S, Pennisi A, Venkateshaiah SU, Li X, van Rhee F, Usmani S, Barlogie B, Shaughnessy J, Epstein J, Yaccoby S. Role of Bruton's tyrosine kinase in myeloma cell migration and induction of bone disease. *Am J Hematol*. juin 2013;88(6):463-471.
594. Roccaro AM, Sacco A, Jimenez C, Maiso P, Moschetta M, Mishima Y, Aljawai Y, Sahin I, Kuhne M, Cardarelli P, Cohen L, San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Ghobrial IM. C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. *Blood*. 7 avr 2014;
595. Mustelin T, Taskén K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J*. 1 avr 2003;371(Pt 1):15-27.
596. Alarcón B, van Santen HM. Two receptors, two kinases, and T cell lineage determination. *Sci Signal*. 2010;3(114):pe11.
597. Correia RP, Matos E Silva FA, Bacal NS, Campregher PV, Hamerschlak N, Amarante-Mendes GP. Involvement of memory T-cells in the pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Bras Hematol E Hemoter*. 2014;36(1):60-64.
598. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med*. mai 2007;13(5):543-551.