



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Min CHEN**

**Effets de la stimulation des cellules
de leucémie lymphoïde chronique via TLR-7 et TLR-9**

Soutenance le 8 Avril 2013

Membres du jury :

Rapporteurs : Docteur Claude BOUCHEIX, Inserm, UMR-S 1004 & Université Paris-Sud 11, Villejuif

**Docteur Guy BERCHEM, Centre Hospitalier de Luxembourg & Laboratoire d'Hemato-
Cancérologie Expérimentale, CRP-Santé, Luxembourg**

Examineurs : Professeur Marc MAYNADIE, CHU de Dijon & Université de Bourgogne

Docteur Claude CAPRON, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne & Université de Versailles

Professeur Pierre FEUGIER, CHU de Nancy & Université de Lorraine

Professeur Gilbert FAURE, CHU de Nancy & Université de Lorraine

Directeur de thèse : Professeur Marie Christine BENE, CHU de Nancy & Université de Lorraine

Laboratoire d'Immunologie - EA4369, Faculté de Médecine de Nancy.

9 Avenue de la Forêt de Haye - BP 184 - 54505 Vandoeuvre - lès - Nancy cedex

Remerciements

Au professeur Marie-Christine Béné, ma directrice de thèse, pour m'avoir encadré et soutenu tout au long de ces années d'étude, pour m'avoir fait confiance et encouragé. Merci pour la qualité de votre encadrement ainsi que pour vos corrections de ce mémoire. Je tiens à vous exprimer mon admiration pour votre enthousiasme et votre dynamisme sans faille. Soyez assurée de mon plus profond respect et de ma profonde gratitude.

Au professeur Gilbert C Faure, le directeur de laboratoire et co-encadrant de ce travail de thèse, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire, pour votre sympathie, votre disponibilité, vos idées et conseils, ainsi que pour votre aide précieuse de tous les jours. Soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

Au Docteur Claude Boucheix et au Docteur Guy Berchem pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur.

Au Professeur Marc Maynadié et au Docteur Claude Capron, pour avoir accepté de juger ce travail.

Au Professeur Pierre Feugier, pour nous avoir fourni les prélèvements de patients indispensables à la réalisation de ce travail, pour l'intérêt que vous avez toujours porté à ce travail et pour votre présence dans ce jury de thèse.

Au professeur Ali Dalloul, pour l'intérêt que vous avez toujours porté à ce travail et pour votre gentillesse et vos conseils précieux.

Au Docteur Marcelo de Carvalho, pour ta gentillesse, les conseils que tu m'as prodigués, et ton aide technique, surtout en cytométrie en flux.

Au Docteur Christophe Ferrand, pour ta collaboration sur le statut mutationnel des patients. A David Schwartz, pour m'avoir aidée à suivre les patients, afin de récupérer leurs cellules pour le test du statut mutationnel.

Merci à toute l'équipe d'immunologie, les enseignants-chercheurs, les techniciens et mes collègues doctorants pour tous les échanges techniques, scientifiques et pour leur sympathie, leur accueil chaleureux pendant ces trois ans de thèse. Je pense entre autres à Christelle, Catherine, Martine, Chantal, Christine, Christian, Fabian, Ghislaine, Armelle, Fred, Nassima, Marie Josèphe, Patricia, Nader, Tala, Huili Cai, Qian Tu, Marc Muller, Aurore mais plus particulièrement à Marc Derive, pour sa gentillesse et son aide technique ainsi que pour toutes nos conversations.

Merci à vous tous pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble depuis mon arrivée dans ce laboratoire !

Merci à mes amis chinois, plus particulièrement à Siwei Dong, Huili Cai, Qian Tu et Yingying Wang, pour votre amitié, pour tout ce que nous avons partagé.

À tous les autres que je ne peux citer tant la liste est longue, mais que je n'oublie pas...

Merci à mes parents pour leur soutien et leur amour inestimable. Et merci en particulier à mon mari, pour m'avoir permis de réaliser mes projets dans les meilleures conditions possibles et pour ton soutien qui a été essentiel tout au long de mes études et tout particulièrement au cours de ce travail. Merci pour ta patience et ton amour.

Mes derniers remerciements iront vers le gouvernement chinois, pour m'avoir octroyé une bourse et permis d'effectuer cette thèse.

PREAMBULE

La leucémie lymphoïde chronique (LLC), qui consiste en une accumulation de lymphocytes B clonaux malins, est la leucémie la plus fréquente dans les pays occidentaux. D'importants progrès thérapeutiques ont été réalisés pour la prise en charge des malades, en particulier en chimiothérapie, complétée par la prescription d'anticorps anti-CD20 et/ou anti-CD52. Cependant, la LLC reste toujours une maladie incurable, en partie à cause de la résistance des cellules à l'apoptose et de la faible immunogénicité des cellules leucémiques in vivo.

Des stratégies susceptibles de réactiver l'apoptose, d'augmenter l'immunogénicité des cellules leucémiques et d'accroître la sensibilité des traitements pourraient être très utiles dans le traitement de la LLC.

La LLC est caractérisée par une immunodéficiences concernant à la fois les réponses cellulaires et humorales. Cependant, son évolution est lente, ce qui suggère l'existence d'un certain contrôle de la maladie exercé par une réaction immunitaire contre les cellules de la tumeur. Ceci est corroboré par des observations cliniques de rémissions spontanées associées à une activité immunologique intensive suite à une infection virale, de réponses observées après traitement avec des cytokines immunomodulatrices, ou encore par une survie sans maladie de longue durée après allogreffe de moelle osseuse. Dans ce dernier cas, on peut évoquer probablement un effet "Graft-Versus-Leukemia" dépendant des lymphocytes T du greffon. Ces différents éléments permettent d'envisager l'utilisation d'approches d'immunothérapie dans la LLC.

Dans ce contexte, l'utilisation des Toll-Like Récepteurs (TLRs), qui sont des récepteurs de l'immunité innée impliqués dans l'activation des lymphocytes B normaux, pourrait constituer une approche originale dans le traitement de la LLC. En effet, des travaux précédents de notre équipe ont déjà montré une expression importante de TLR-7 et TLR-9 au niveau des cellules B tumorales de LLC, et la capacité de ces récepteurs à répondre à leurs ligands respectifs, Imiquimod R837 et ODN CpG M362. Ceci se traduit par l'induction de l'activation des cellules B tumorales de LLC, objectivée par une augmentation de l'expression des molécules de costimulation et de présentation.

Dans ce cadre, l'objectif de cette étude était d'évaluer plus finement les effets de la stimulation de cellules de LLC par l'Imiquimod et l'ODN CpG M362. Ce travail a par ailleurs été conduit chez des patients stratifiés en plusieurs groupes d'une part selon l'évolution clinique (LLC stable ou agressive), et d'autre part en fonction du statut mutationnel (IgVH muté ou non muté). Les conséquences de l'activation des TLR ont été étudiées par mesure de l'apoptose, de la prolifération, des modifications immunophénotypiques (CD20, CD52, CD19 et CD5) et de la production de cytokines des cellules tumorales. Les différentes voies de signalisation impliquées par ces phénomènes d'activation ont également été explorées.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS	10
LISTE DES TABLEAUX	13
SITUATION DU SUJET	14
I - LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE B OU LLC	15
I.1 - Définition.....	15
I.2 - Epidémiologie.....	15
I.2.1 - Fréquence.....	15
I.2.2 - Sex ratio	15
I.2.3 - Age.....	15
I.3 - Etiologie.....	16
I.4 - Signes cliniques	16
I.5 - Evolution	17
I.5.1 - Complications infectieuses	17
I.5.2 - L'insuffisance médullaire.....	17
I.5.3 - Les complications auto-immunes	17
I.5.4 - Les transformations	18
I.5.5 - Cancers associés	19
I.6 - Diagnostic	19
I.6.1 - Sang	19
I.6.2 - Immunophénotypage	19
I.7 - Facteurs pronostiques	21
I.7.1 - Les facteurs pronostiques classiques	21
I.7.1.1 - Classifications de Rai et de Binet	21
I.7.1.2 - Le temps de doublement lymphocytaire (LDT)	22
I.7.1.3 - La β 2-microglobuline (β 2m)	23
I.7.1.4 - Thymidine kinase (TK).....	23
I.7.1.5 - CD23 soluble	23
I.7.2 - Autres facteurs de pronostic	24
I.7.2.1 - Statut mutationnel IgVH.....	24
I.7.2.2 - Cytogénétique	25

I.7.2.3 - Expression de CD38	27
I.7.2.4 - Expression de ZAP-70.....	28
I.8 - Traitement.....	29
I.8.1 - Indications thérapeutiques	29
I.8.2 - Traitements	30
I.8.2.1 - Traitement en première intention.....	31
I.8.2.2 - Traitement de la rechute et d'une maladie réfractaire	32
I.8.2.3 - Consolidation et entretien	33
I.9 - Physiopathologie de la LLC	33
I.9.1 - Diminution de l'apoptose	33
I.9.2 - La prolifération de la LLC	34
I.9.3 - Impact du microenvironnement.....	35
I.9.4 - Rôle de la stimulation antigénique du récepteur des cellules B (BCR).....	35
I.9.5 - Origine cellulaire de la LLC	36
I.9.5. 1 - Cellules B1 humaines	36
I.9.5.2 - Lymphocytes B de la zone marginale (B MZ).....	36
I.9.5.3 - Cellules B transitoires.....	37
I.9. 6 - L'immunodéficience de la LLC	37
I.9.7 - La faible immunogénicité des cellules tumorales.....	38
II - TLR-7 ET TLR-9	40
II.1 - Expression	40
II.1.1 - Localisation cellulaire	40
II.1.2 - Expression cellulaire et tissulaire	41
II.2 - Ligands	41
II.3 - Structure	43
II.3.1 - Domaine extracellulaire	44
II.3.2 - Domaine intracellulaire ou domaine TIR	45
II.4 - Signalisation	45
II.4.1 - Voies conduisant à l'activation de NF- κ B et des MAPKs.....	46
II.4.2 - Voies conduisant à l'activation des facteurs IRF.....	47
II.4.2.1 - Induction d'IFN de type I via IRF-7	47
II.4.2.2 - Induction de la production de cytokines inflammatoires et d'IFN de type I via IRF-8	47
II.4.2.3 - Induction d'IFN de type I via IRF-1	48

II.4.2.4 - Induction des cytokines inflammatoires via IRF-5	48
OBJECTIFS	50
MATERIEL ET METHODES	52
I - PATIENTS ET PRELEVEMENTS	53
I.1 - Patients	53
I.2 - Isolement des cellules	57
I.2.1 - Principe	57
I.2.2 - Matériel	57
I.2.3 - Réactifs	57
I.2.4 - Méthode	58
II - EXPLORATIONS IMMUNOPHENOTYPIQUES ET FONCTIONNELLES EN CYTOMETRIE EN FLUX	58
II.1 - Cytométrie en flux	58
II.1.1 - Principe	58
II.2 - Stimulation des cellules pathologiques via des ligands de TLR-7 et TLR-9	59
II.2.1 - Matériel	60
II.2.2 - Réactifs	60
II.2.3 - Méthode	60
II.3 - Evaluation de l'apoptose des cellules tumorales stimulées ou non	61
II.3.1 - Principe	61
II.3.1.1 - Evaluation de l'apoptose par les modifications de diffraction de la lumière	63
II.3.1.2 - Fragmentation de l'ADN nucléaire	63
II.3.2 - Matériel	63
II.3.3 - Réactifs	64
II.3.4 - Méthode	64
II.3.4.1 - TUNEL	64
II.4 - Evaluation de la prolifération des cellules tumorales stimulées ou non	67
II.4.1 - Principe	67
II.4.2 - Matériel	68
II.4.3 - Réactifs	68
II.4.4 - Méthode	68
II.5 - Analyse immunophénotypique des cellules B tumorales stimulées ou non	70

II.5.1 - Principe.....	70
II.5.2 - Matériel	70
II.5.3 - Réactifs.....	70
II.5.4 - Méthode.....	70
II.6 - Evaluation de la production de cytokines dans les suspensions cellulaires stimulées ou non.....	72
II.6.1 - Principe.....	72
II.6.2 - Matériel	73
II.6.3 - Réactifs.....	73
II.6.4 - Méthode.....	73
II. 7 - Etude des voies de signalisation.....	75
II.7.1 - Extraction des protéines	75
II.7.1.1 - Principe.....	75
II.7.1.2 - Matériel	76
II.7.1.3 - Réactif	76
II.7.1.4 - Méthode.....	76
II.7.2 - Dosage des protéines	76
II.7.2.1 - Principe.....	76
II.7.2.2 - Matériel	76
II.7.2.3 - Réactif	76
II.7.2.4 - Méthode.....	77
II.7.3 - Evaluation de l'expression des phosphoprotéines	77
II.7.3.1 - Timbres antibody-array	77
II.7.3.1 .1 - Principe.....	77
II.7.3.1.2 - Matériel	77
II.7.3.1.3 - Réactifs.....	77
II.7.3.1.4 - Méthode.....	78
II.7.3.2 - Western Blot	78
II.7.3.2 .1 - Principe.....	78
II.7.3.2.2 - Matériel	79
II.7.3.2.3 - Réactifs.....	79
II.7.3.2.4 - Méthode.....	80
II.8 - Analyse du statut mutationnel d'IgVH	81
II.9 - Evaluation de l'apoptose, de la prolifération et des modifications	

immunophénotypiques sur les cellules Daudi exprimant CD5	82
III - ANALYSES STATISTIQUES	82
RESULTATS	83
I - CARACTERISTIQUES DES DEUX GROUPE DE PATIENTS	84
II - ETUDE DE L' APOPTOSE	85
II.1 - Evaluation de l'apoptose par la méthode TUNEL	85
II.2 - Corrélation entre la mesure de l'apoptose par TUNEL et par les variations de diffraction de la lumière en cytométrie en flux	87
II.3 - Evaluation de l'apoptose par les modifications de diffraction de la lumière en cytométrie en flux.....	88
II.3.1 - Apoptose chez les patients stables.....	89
II.3.2 - Apoptose chez les patients avec une forme agressive	89
II.3.3 - Apoptose et statut mutationnel	90
II.3.4 - Apoptose, forme clinique et statut mutationnel.....	90
III - ETUDE DE LA PROLIFERATION	92
III.1 - Prolifération en fonction du statut clinique.....	92
III.2 - Prolifération chez les patients mutés et non mutés	93
IV - ETUDE IMMUNOPHENOTYPIQUE	95
IV.1 - Expression de CD20	95
IV.2 - Expression de CD52.....	97
IV.3 - Expression de CD19.....	99
IV.4 - Expression de CD5.....	101
V - EVALUATION DE LA SECRETION DE CYTOKINES	103
V.1 - IMQ et cytokines	103
V.1.1 - Dosages d'IL-12p70, IFN- γ , IFN- α , IL-10 et TNF- α chez les patients stables	103
V.1.2 - Production d'IL-6.....	104
V.1.3 - Production d'IL-8.....	106
V.2 - ODN et cytokines	108
VI - COMPARAISON DE L'EXPRESSION DE TLRs DANS LES DEUX GROUPE DE PATIENTS.....	110
VII - ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION	111
VII.1 - Voies de signalisation de l'apoptose	111

VII.1.1 - Caspase-3.....	111
VII.1.1.1 - Caspase-3 en antibody-array	111
VII.1.1.1.1 - Caspase-3 selon la forme clinique.....	111
VII.1.1.1.2 - Caspase-3 selon le statut mutationnel	112
VII.1.1.2 - Caspase-3 en Western Blot	114
VII.1.2 - La famille de Bcl-2.....	116
VII.1.3 - Cytochrome c et Catalase	118
VII.1.4 - Les autres protéines des voies de signalisation de l'apoptose	121
VII.1.5 - L'activité de p38 évaluée par Western blot.....	123
VII.2 - Les voies de signalisation de la prolifération	125
VIII - MANIPULATIONS SUR LES CELLULES DAUDI	131
VIII.1 - Apoptose.....	131
VIII.2 - Mesure de la prolifération par CFSE	131
VIII.3 - Modifications immunophénotypiques.....	132
DISCUSSION	134
CONCLUSIONS	160
PERSPECTIVES	163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	166
PUBLICATIONS	187

LISTE DES ABREVIATIONS

AIG	Autoimmune Granulocytopaenia
AIHA	Autoimmune Haemolytic Anaemia
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
APC	Antigen-presenting Cell
BCA	Bicinchoninic Acid
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2
BCR	B-Cell Receptor
BR	Bendamustine - Rituximab
Btk	Bruton's Tyrosine Kinase
CD	Clusters de Différenciation
CDK	Cyclin-Dependent Kinases
CFDA-SE	Carboxy-FluoresceinDiAcetate Succinimidyl Este
CFSE	Carboxy-Fluorescein Succinimidyl Ester
cIAP	Cellular Inhibitor of Apoptosis
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CXCR	C-X-C Chemokine Receptor
DLBCL	Diffuse Large B-cell Lymphoma
DNAase	Deoxyribonuclease
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
ECD	Phycoerythrin-texas Red
EDTA	Ethyl Diamine Tétra Acétate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERIC	European Research Initiative on CLL
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
ESMO	European Society for Medical Oncology
FADD	Fas-Associated Death Domain
Fas-L	Fas Ligand
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FCR	Fludarabine- Cyclophosphamide - Rituximab
FR	Fludarabine - Rituximab
FS	Forward Scatter
GITMO	Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GWAS	Genome Wide Association Studies
HIF	Hypoxia-Inducible Factors
HO/HMOX	Heme Oxygenase
HRP	HorseRadish Peroxidase
HSP	Heat Shock Proteins
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN	Interferons
Ig	Immunoglobuline

IGVH ou IgVH	Immunoglobulin Variable Heavy-chain
IL	Interleukine
ILT	Immunoglobulin-Like Transcript
IRAK	IL-1 Receptor-Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
ITP	Idiopathic Thrombocytopenic Purpura
IWCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
IκB	Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B (NF-κB)
JAK	Janus Kinase
JNK	Jun N-terminal Kinase
LDH	Lactate DeHydrogenase
LDT	Lymphocyte Doubling Time
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LRFCLL4	Leukaemia Research Foundation ChronicLymphocyticLeukemia 4
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 (Bcl2-related)
MEK	MAP kinase kinase
MFI	Mean Fluoresence Intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
mi-ARN	Micro-ARN
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein 2
MSC	Mesenchymal Stem Cells
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1	mammalian Target of Rapamycin Complex 1
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
MZ	Marginal Zone
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NF-κB	Nuclear Factor-κB
NK	Natural Killer
NLC	Nurse Like Cells
ODN	OligoDéoxyNucléotide
OS	Overall Survival
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC5/7	Phycoerythrine Cyanin-5/7
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cell
PDK1	3'-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1
PE	Phycoérythrine
PFS	Progression-Free Survival
PHA	PhytoHaemAgglutinin
PI	Propidium Iodide
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Protein Kinase C
PMA/TPA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

PRCA	Pure Red Cell Aplasia
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
PWM	Pokeweed Mitogen
RasGRP	Ras Guanyl nucleotide-Releasing Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
RR	Risque Relatif
RS	Richter's Syndrome
RSK	90 kDa Ribosomal S6 Kinase
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SEM	Standard Error of the Mean
Ser/S	Serine
SIE	Societa Italiana di Ematologia
SIES	Societa Italiana di Ematologia Sperimentale
SIR	Standardized Incidence Ratio
SS	Side Scatter
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF	Sérum de Veau Fœtal
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
Tcl-1	T cell leukemia/Lymphoma 1
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TFS	Treatment-Free Survival
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
Thr/T	Threonine
TK	Thymidine Kinase
TLR	Toll-like Recepteur
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumor Protein p53
TRADD	TNFR1-associated Death Domain Protein
TRAF	TNF-Receptor Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Treg	regulatory T cells
TTT	Time To Treatment
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferasemediated-dUTP-digoxigenin Nick End Labelling
Tyr/Y	Tyrosine
VDJ	Variable/Diversité/Jonction
VH	Variable Heavy-Chain
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
ZAP70	Zeta-chain-associated Protein Kinase 70

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Lymphocytes de LLC sur un frottis sanguin.....	20
Figure 2 : Probabilité de survie à partir de la date du diagnostic parmi les patients répartis dans les cinq catégories cytogénétiques de LLC.....	26
Figure 3 : Structure des Imidazoquinolines, Loxoribine et Bropirimine.....	42
Figure 4 : Structure de TLR-7 et TLR-9.	44
Figure 5 : Voies de signalisation de TLR-7 et TLR-9.....	49
Figure 6 : Séparation des lymphocytes d'une suspension cellulaire par gradient de densité Ficoll-Hypaque	57
Figure 7 : Représentation schématique du banc optique d'un cytomètre en flux 4 couleurs..	59
Figure 8 : Représentation schématique des changements morphologiques des cellules apoptotiques	61
Figure 9 : Représentation schématique du principe de la méthode TUNEL.....	63
Figure 10 : Exemples d'histogrammes biparamétriques et monoparamétriques utilisés pour l'étude de l'apoptose des suspensions cellulaires de LLC stimulées ou non.....	66
Figure 11 : Représentation schématique des différentes étapes du marquage des cellules avec le CFSA-DE.....	67
Figure 12 : Exemples d'histogrammes biparamétriques et monoparamétriques utilisés pour l'étude de la prolifération après marquage par le CFSE des suspensions cellulaires stimulées ou non.....	69
Figure 13 : Exemple d'histogrammes biparamétriques et monoparamétriques utilisés pour l'immunophénotypage des cellules leucémiques.....	71
Figure 14 : Représentation schématique du principe de la technique d'évaluation des cytokines par la technologie FlowCytomix.....	73
Figure 15 : Exemple d'histogramme biparamétrique utilisé pour discriminer les deux populations de billes utilisées pour le dosage des cytokines dans les surnageants de culture des suspensions cellulaires stimulées ou non.....	75
Figure 16 : Principe du Western Blot.....	79
Figure 17 : Analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL dans les lymphocytes B tumoraux stimulés ou non avec du PMA ou avec l'Imiquimod R 837	86
Figure 18 : Apoptose évaluée par la méthode TUNEL au niveau des cellules	

leucémiques, des lymphocytes T normaux et des lymphocytes B normaux	87
Figure 19 : Corrélation entre les valeurs d'apoptose obtenues par méthode TUNEL ou en fonction des variations de diffraction	88
Figure 20 : Apoptose dans les différents groupes de patients.....	91
Figure 21 : Etude de la prolifération des cellules B tumorales stimulées ou non avec du PMA, de l'ODN ou avec l'Imiquimod R837 dans les différents groupes de patients	94
Figure 22 : Expression de CD20 sur des cellules B de LLC stimulées ou non par PMA, ODN ou IMQ	96
Figure 23 : Expression de CD52 sur des cellules B de LLC stimulées ou non par PMA, ODN ou IMQ	98
Figure 24 : Expression de CD19 sur des cellules B de LLC stimulées ou non par PMA, ODN ou IMQ	100
Figure 25 : Expression de CD5 sur des cellules B de LLC stimulées ou non par PMA, ODN ou IMQ	102
Figure 26 : Production d'IL-6 dans les surnageants de culture de cellules de LLC non stimulées ou stimulées avec le PMA ou l'IMQ.....	105
Figure 27 : Production d'IL-8 dans les surnageants de culture de cellules de LLC non stimulées ou stimulées avec le PMA ou l'IMQ.....	107
Figure 28 : Production d'IL-6 et IL-8 dans les surnageants de culture de cellules de LLC non stimulées ou stimulées avec le PMA ou l'ODN.....	109
Figure 29 : Profil d'expression des TLRs au niveau des cellules B CD19 ⁺ /CD5 ⁺	110
Figure 30 : Ratio caspase-3 clivée/pro-caspase-3 au sein des protéines extraites de lymphocytes B tumoraux de LLC	113
Figure 31 : Exemple de l'expression de la caspase-3 clivée chez un patient stable et un patient avec une forme agressive par la méthode de Western blot.....	114
Figure 32 : Activité caspase-3 chez les patients atteints de LLC avec une forme stable ou agressive.	115
Figure 33 : Activité caspase-3 chez les patients avec une forme agressive.....	115
Figure 34 : Ratios des protéines de la famille de Bcl-2 dans les différents groupes de patients	117
Figure 35 : Ratios des protéines de la famille de Bcl-2 après stimulation par ODN chez les deux types de patients	118
Figure 36 : Expression du Cytochrome c et de la Catalase dans les différents groupes de patients	120

Figure 37 : Protéines des voies de l'apoptose dans les différents groupes de patients..	122
Figure 38 : Expression normalisée de l'expression des protéines des voies de l'apoptose entre les deux types de patients	123
Figure 39 : Exemple de l'expression de p38 chez un patient avec une forme agressive et un patient stable par la méthode de Western blot	124
Figure 40 : Activité de p38 chez les patients stables ou avec une forme agressive.....	124
Figure 41 : Phosphoprotéines majeures après stimulation avec l'ODN	126
Figure 42 : Comparaison des principales phosphoprotéines chez les deux types de patients	128
Figure 43 : Exemple de l'expression d'ERK chez un patient stable et un patient avec une forme agressive par la méthode de Western blot.....	129
Figure 44 : Activité d'ERK1/2 chez les patients stables ou avec une forme agressive.	129
Figure 45 : Exemple de l'expression d'AKT par la méthode de Western blot.....	130
Figure 46 : Apoptose évaluée par SSC ^{hi} FSC ^{lo}	131
Figure 47 : Etude de la prolifération des cellules Daudi stimulées ou non avec du PMA, de l'ODN ou avec l'Imiquimod R837	132
Figure 48 : Expression de CD19, CD5 et CD20 sur des cellules Daudi CD5 ⁺ et PNT stimulées ou non par du PMA, ODN ou d'IMQ	133
Figure 49 : Voies de signalisation de l'apoptose	148
Figure 50 : Voies de signalisation d'AKT/mTOR	152
Figure 51 : Voie de signalisation JAK-STAT	153
Figure 52 : Voie de signalisation MAPKp38.....	155

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Score de Matutes.....	20
Tableau 2 Classification de Rai	22
Tableau 3 Classification de Binet.....	22
Tableau 4 Caractéristiques des différents types d'ODN CpG.....	43
Tableau 5 Caractéristiques cliniques des patients	55
Tableau 6 Caractéristiques biologiques des patients	56
Tableau 7 Modifications morphologiques et événements moléculaires de l'apoptose ..	62
Tableau 8 Caractéristiques des patients.....	84
Tableau 9 Variations des pourcentages de cellules apoptotiques par rapport au puits témoin en fonction des stimuli et du statut des patients	92
Tableau 10 Modifications de l'expression des phosphoprotéines induites par l'ODN..	127

SITUATION DU SUJET

I - LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE B OU LLC

I.1 - Définition

La LLC est une hémopathie chronique caractérisée par l'accumulation lente et progressive de petits lymphocytes B matures CD5⁺ au niveau des tissus lymphoïdes primaires et secondaires, tels que la moelle osseuse, le sang, la rate, le foie et les ganglions (Herishanu and Polliack 2005).

I.2 - Épidémiologie

I.2.1 - Fréquence

La fréquence de la LLC est variable selon les régions. Elle est surtout observée en Australie, en Amérique du Nord et en Europe. Elle est rare en Asie et en Amérique du Sud (Redaelli, Laskin et al. 2004).

C'est la plus fréquente des leucémies dans les pays occidentaux, où elle représente 22% à 30% de toutes les leucémies de l'adulte (Redaelli, Laskin et al. 2004). Une étude épidémiologique en France (Troussard, Duchenet et al. 2009) sur les hémopathies malignes en Basse-Normandie, montre sur plus de 5000 cas une fréquence de 11.7% pour la LLC, soit $2,84 \pm 0,24$ pour 100 000 habitants. Aux Etats-Unis en 2008, la LLC représentait environ 11% de toutes les néoplasies hématologiques et 34% de toutes les leucémies (Jemal, Siegel et al. 2008), avec une fréquence de 4.2 pour 100 000 habitants (Altekruse SF, Kosari CL. 2010).

I.2.2 - Sex ratio

La LLC est plus fréquente chez l'homme (environ 1.4 à 2.0 hommes pour une femme) (Belot, Grosclaude et al. 2008; Brenner, Gondos et al. 2008; Jemal, Siegel et al. 2008; Troussard, Duchenet et al. 2009). Les études épidémiologiques nationales françaises montrent par ailleurs une augmentation annuelle des taux de fréquence de la LLC chez l'homme et chez la femme entre 1980 et 2005, de 0.6% et 1.2% respectivement.

I.2.3 - Age

La LLC est essentiellement une maladie du sujet âgé, qui prédomine après 60 ans (83% des patients) (Troussard, Duchenet et al. 2009). L'âge moyen des patients au diagnostic est de 70 ans d'après une étude française (Troussard, Duchenet et al. 2009) et de 72 ans dans une étude américaine qui rapporte environ 10% de patients de moins de 55 ans (Altekruse SF, Kosari CL. 2010). Les données américaines montrent une augmentation du nombre de LLC

entre 1980-1984 et 2000-2004, significative dans le groupe d'âge 15-59 ans et dans le groupe d'âge égal ou supérieur à 80 ans (>40%), modérée dans le groupe d'âge 70-79 ans (19%) mais pas d'augmentation dans le groupe d'âge 60-69 ans (Brenner, Gondos et al. 2008).

I.3 - Etiologie

L'origine de la LLC reste obscure, mais divers facteurs étiologiques peuvent favoriser l'apparition de cette maladie.

La LLC a une tendance à présenter une agrégation familiale. Les proches des patients atteints de LLC ont un risque accru de développer également cette maladie (risque relatif RR = 8.5 ; 6.1 à 11.07) et d'autres lymphomes non hodgkiniens (RR = 1.9 ; 1.5 à 2.3) (Goldin, Bjorkholm et al. 2009). Comme mentionné plus haut, la LLC est plus fréquente dans les pays occidentaux qu'en Asie, et les populations asiatiques qui immigreront aux États-Unis maintiennent un faible risque de développer la maladie (Pan, Cook et al. 2002; Clarke, Glaser et al. 2011). Cette observation souligne l'influence des facteurs génétiques plutôt que des facteurs environnementaux dans l'étiologie de cette maladie. De nombreux facteurs génétiques ont été étudiés. (Goldin, Landgren et al. 2010). Parmi ces études, un travail récent du GWAS (Genome Wide Association Studies) sur 517 patients atteints de LLC et 1438 contrôles, suivie par une validation des associations les plus fortes dans une seconde cohorte de 1529 cas et 3115 contrôles, a rapporté 6 nouveaux gènes significativement associés à la LLC localisés en 6p25.3 (IRF4), 19q13.32 (PRKD2), 2q37.1 (SP140), 2q13, 11q24.1 et 15q23.46 (Di Bernardo, Crowther-Swanepoel et al. 2008).

Le rôle de l'environnement dans le développement de la LLC est difficile à préciser. Une étude a évalué diverses expositions environnementales et professionnelles aux pesticides, aux virus, aux rayonnements ionisants et non ionisants ou encore aux champs magnétiques, sans trouver d'association avec la LLC (Sgambati, Linet et al. 2001). L'observation mentionnée plus haut sur les populations asiatiques aux États-Unis corrobore le peu de rôle de l'environnement dans le développement de cette maladie (Pan, Cook et al. 2002), mais des résultats différents ont été rapportés récemment par Clarke et al. (Clarke, Glaser et al. 2011).

I.4 - Signes cliniques

Dans environ un tiers des cas, il n'existe aucun signe clinique de la maladie. Celle-ci est en effet souvent découverte au décours d'une prise de sang comportant un hémogramme demandé à titre systématique.

La forme clinique la plus fréquente est un syndrome tumoral caractérisé par des adénopathies superficielles, bilatérales et symétriques, ou une splénomégalie. Plus rarement,

le diagnostic est porté au décours d'une complication infectieuse ou d'une manifestation auto-immune. La présence d'une fièvre, de sueurs nocturnes ou d'une altération de l'état général doit faire rechercher une infection sous-jacente, une transformation de la LLC en lymphome de haut grade (syndrome de Richter) ou un cancer touchant d'autres organes.

I.5 - Evolution

L'évolution de la LLC est très hétérogène. Pour un certain nombre de patients, la maladie reste indolente pendant plusieurs dizaines d'années, alors que d'autres sont atteints de formes très agressives et subissent une aggravation rapide. Outre la progression de la masse tumorale, l'évolution peut être émaillée par plusieurs types de complications. Les complications les plus fréquemment observées sont les infections, une aggravation de l'insuffisance médullaire, les complications auto-immunes, les transformations et les cancers associés.

I.5.1 - Complications infectieuses

Les infections sont les complications les plus fréquentes et les premières causes de morbidité et de mortalité des patients atteints de LLC. Elles surviennent chez au moins un tiers et probablement environ la moitié de tous les patients atteints de LLC (Molica 1994). Ceci est probablement attribuable au déficit immunitaire lié à la maladie, incluant une hypogammaglobulinémie, une neutropénie, une hypocomplémentémie, un dysfonctionnement des lymphocytes T et les déficits immunitaires liés aux traitements (Molica 1994; Morrison 2010; Young 2011). Ces infections sont essentiellement bactériennes et affectent souvent l'appareil respiratoire (pneumonie), la peau et l'appareil urinaire (pyélonéphrite). Cependant, les infections iatrogènes, en particulier consécutives aux traitements par des analogues des purines ou des anticorps monoclonaux, tendent à augmenter, notamment les pneumocystoses, listérioses, tuberculoses, infections par les virus du groupe herpès, candidoses et aspergilloses (Molica 1994; Morrison 2010; Young 2011).

I.5.2 - L'insuffisance médullaire

L'infiltration massive de la moelle osseuse par des cellules leucémiques est généralement un événement tardif dans le cadre de la LLC, mais elle est responsable d'une anémie et d'une thrombopénie.

I.5.3 - Les complications auto-immunes

Les complications auto-immunes sont une autre cause importante des cytopénies observées dans la LLC. La plus fréquente est l'anémie hémolytique auto-immune (AIHA), suivie par la thrombocytopénie immunitaire (ITP) (Zent and Kay 2010; Strati and Caligaris-

Cappio 2011). Il peut également exister une érythroblastopénie (PRCA) et plus rarement une granulocytopénie auto-immune (AIG) (Zent and Kay 2010; Strati and Caligaris-Cappio 2011). Le risque de cytopénie auto-immune apparaît plus élevé dans les études plus anciennes rapportant une fréquence d'AIHA de plus de 26%. Dans des études ultérieures, cette fréquence était plutôt évaluée à 10-15%, et les études les plus récentes de populations moins biaisées utilisant des critères modernes de diagnostic suggèrent que le risque global de complications auto-immunes chez les patients atteints de LLC est probablement de l'ordre de 5 à 10% (Zent and Kay 2010).

I.5.4 - Les transformations

La LLC, longtemps indolente, peut évoluer vers des formes agressives, en particulier le développement d'un lymphome (syndrome de Richter, RS), la transformation en leucémie prolymphocytaire ou plus rarement en leucémie aiguë ou en myélome multiple (Andrieu.JM and Colonna.P 1997).

Le type le plus fréquent de RS est un lymphome diffus à grandes cellules (DLBCL) dont le diagnostic est confirmé par la biopsie. Le RS survient dans environ 2 à 10 % des LLC (Tsimberidou and Keating 2005; Fan, Wang et al. 2012), mais avec l'augmentation de la survie des patients et un suivi plus long, sa fréquence est maintenant de 16.2% à 10 ans du diagnostic de la LLC (Rossi, Cerri et al. 2008). Le temps médian entre le diagnostic de LLC et l'apparition d'un RS est de l'ordre de 3.7 ans (de 0.2 à 6.7 ans) d'après Rossi et al. (Rossi, Spina et al. 2011). Les mécanismes pathogéniques de cette transformation restent à clarifier, mais de très nombreux facteurs de risque ont été décrits : statut non muté, présence d'IGHV4-39 dans le BCR de la population clonale, absence de del13q14, taux de lymphocytes CD38 de 30% ou plus, présence de ZAP-70 dans 20% ou plus des cellules malignes, taille et nombre de ganglions lymphatiques, stade B ou C de Binet, LDH élevée, beta2-microglobuline élevée, présence de del(11q), anomalies de p53 (del(p17)), anomalies de c-MYC (Rossi, Cerri et al. 2008; Rossi, Spina et al. 2011; Fan, Wang et al. 2012). Les facteurs pronostiques indépendants rapportés dans une étude récente sont CD38, IGHV4-39, la taille des ganglions et le taux de LDH (Rossi, Cerri et al. 2008; Fan, Wang et al. 2012). La survie des patients développant un RS est plus courte que celle des autres patients atteints de LLC. De nombreux patients atteints de RS sont résistants à une chimio-immunothérapie intensive, et leur médiane de survie est de 5 à 19 mois (Tsimberidou and Keating 2005; Rossi, Spina et al. 2011; Fan, Wang et al. 2012). Les RS peuvent être subdivisés en deux types, après séquençage IGVH, selon que le clone de RS est ou non lié à celui de la LLC. L'étude de Rossi et al. a montré que la survie des RS non

liés à la LLC était plus longue (médianes 62.5 mois vs 14.2 mois; $p = 0,017$) (Rossi, Spina et al. 2011).

I.5.5 - Cancers associés

Le risque de développer un second cancer est accru chez les personnes présentant une LLC (Wiernik 2004). Deux études ont rapporté que les cancers associés les plus fréquents étaient les mélanomes, les autres cancers de la peau, les cancers du poumon, des voies respiratoires, de la cavité buccale et du pharynx, de la prostate, du rein et les lymphomes (Wiernik 2004; Molica 2005). Une étude australienne récente montre que, globalement, le risque de développement d'un cancer associé est double par rapport à la population générale (ratios de fréquence standardisés (SIR) = 2.17, de 2.07 à 2.27) et encore plus élevé pour le mélanome (SIR = 7.74, de 6.85 à 8.72) (Royle, Baade et al. 2011). Plusieurs mécanismes ont été discutés pour l'association entre les deuxièmes cancers et la LLC, notamment le rôle de l'immunosuppression liée à la maladie et aux traitements (Molica 2005; Morton, Curtis et al. 2010).

I.6 - Diagnostic

Les critères de diagnostic les plus récents pour la LLC sont ceux de l'“International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia” (IWCLL) et reposent sur des caractéristiques cytologiques et immunophénotypiques (Hallek, Cheson et al. 2008).

I.6.1 - Sang

Le diagnostic de la LLC peut être posé en présence de ≥ 5 G/L de lymphocytes B monoclonaux dans le sang périphérique, persistant depuis au moins 3 mois. La clonotypie (restriction d'expression d'une chaîne légère kappa ou lambda) des lymphocytes B circulants doit être confirmée par cytométrie en flux. Les cellules leucémiques observées sur les frottis sanguins ont les caractéristiques morphologiques de petits lymphocytes matures avec un cytoplasme mince et un noyau dense, sans nucléole, et ayant une chromatine partiellement agrégée. La présence d'ombres de Gümprécht ou noyaux nus est caractéristique de la LLC (figure 1).

I.6.2 - Immunophénotypage

Les cellules leucémiques de LLC coexpriment des marqueurs lymphocytaires B, notamment CD19, et l'antigène CD5, plutôt caractéristique de la lignée T. CD20 est présent de façon modérée sur ces cellules qui expriment par contre l'antigène CD23. Les niveaux d'expression des immunoglobulines de surface, de CD22 et de CD79b sont typiquement nuls ou très faibles par rapport à des cellules B normales.

L'expression de CD23 est un élément diagnostique important, permettant de différencier les LLC d'autres syndromes lymphoprolifératifs B. L'épitope particulier de CD20 reconnu par l'anticorps FMC7 est absent alors qu'il est positif dans les leucémies à tricholeucocytes, les leucémies prolymphocytaires ou certains lymphomes.

L'immunophénotypage permet de calculer le score de Matutes, qui varie de 0 à 5 selon l'expression ou non de divers antigènes. Un score supérieur ou égal à 4 affirme le diagnostic de LLC et élimine les autres causes d'hyperlymphocytose (tableau 1) (Matutes, Owusu-Ankomah et al. 1994; Moreau, Matutes et al. 1997).

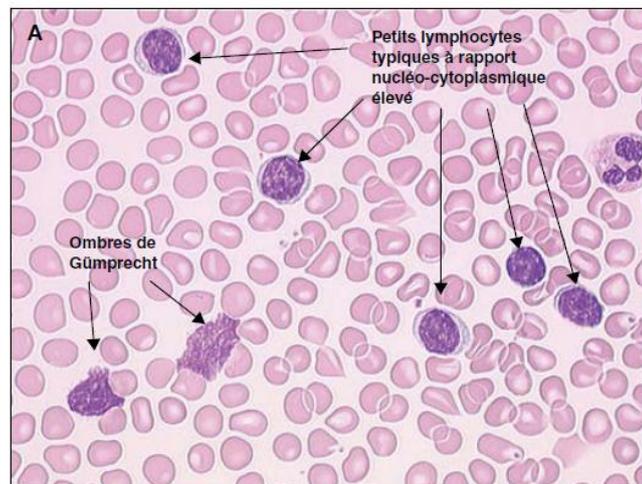


Figure 1 : Lymphocytes de LLC sur un frottis sanguin

A : petits lymphocytes typiques de la LLC et présence d'ombres de Gümprecht (adapté de (Evrard, Gaussem et al. 2005))

Tableau 1 Score de Matutes (d'après (Matutes, Owusu-Ankomah et al. 1994; Moreau, Matutes et al. 1997))

Antigène	1 point	0 point
Ig de surface monotypique	Faible/négatif	Expression forte/modérée
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
CD 22/ CD 79b	Faible/négatif	Expression forte/modérée
FMC7	Négatif	Positif

I.7 - Facteurs pronostiques

L'évolution très variable de la LLC a justifié, depuis des décennies, la recherche de marqueurs de pronostic.

I.7.1 - Les facteurs pronostiques classiques

I.7.1.1 - Classifications de Rai et de Binet

L'évaluation clinique standard repose sur les classifications introduites par Rai en 1975, très utilisée aux Etats-Unis (Rai, Sawitsky et al. 1975) (table 2), et Binet en 1981 largement utilisée en Europe (Binet, Auquier et al. 1981) (table 3).

Ces classifications sont basées sur les caractéristiques cliniques déterminables qui semblent être en corrélation avec la charge tumorale et ses effets sur les fonctions de la moelle osseuse. Ces systèmes de classification ont fourni une base pour la prise en charge des patients et les décisions thérapeutiques dans la LLC. Elles permettent également de réaliser une stratification homogène des groupes de patients pour les essais cliniques.

Ces deux systèmes distinguent trois grands groupes de patients ayant des pronostics différents:

- des stades précoces : Rai 0 et Binet A
- des stades intermédiaires : Rai I/II, Binet B
- des stades avancés : Rai III/IV, Binet C

Pour ces trois groupes, la moyenne de survie est estimée respectivement à: supérieure à 150 mois, comprise entre 71 et 101 mois et comprise entre 19 et 24 mois. Cependant ces classifications n'ont pas la capacité d'identifier, parmi les patients à un stade précoce avec un bon pronostic, ceux qui pourtant auront une évolution rapide. A l'inverse, pour les patients avec une maladie plus avancée, ces systèmes ne distinguent pas les patients qui resteront stables. En effet, une étude française a montré qu'au cours de l'évolution de la maladie, environ 27% de patients en stade A décèdent de causes liées à la LLC, que 40% des patients en stade A progressent aux stades B et C, et que 50% ont besoin de traitement (Dighiero, Maloum et al. 1998). Il est donc devenu indispensable d'identifier des marqueurs qui peuvent permettre de prévoir l'évolution de chacun de ces patients afin d'envisager une thérapeutique adaptée.

Tableau 2 Classification de Rai (d'après (Rai, Sawitsky et al. 1975)

Stade	Définition	Survie médiane (mois)
0	Lymphocytose sanguine et médullaire isolée	>150
I	Lymphocytose et adénopathies	101
II	Lymphocytose et splénomégalie et/ou hépatomégalie	71
III	Lymphocytose et anémie (Hb< 11 g/dL)	19
IV	Lymphocytose et thrombopénie (Plaquettes<10 ⁹ /L)	19

Tableau 3 Classification de Binet (d'après (Binet, Auquier et al. 1981)

Stade	Adénopathies*	Formule sanguine	% dans la LLC	Survie médiane (ans)
A	<3 aires	Hb≥10g/dL et plaquettes ≥10 ⁹ /L	55	Comparable à des témoins du même âge et du même sexe
B	≥3 aires	Hb≥10g/dL et plaquettes ≥10 ⁹ /L	30	7
C	Indifférent	Hb<10g/dL et/ou plaquettes <10 ⁹ /L	15	2

* les adénopathies peuvent concerner les aires cervicales, axillaires, inguinales (qu'elles soient unilatérales ou bilatérales), le syndrome tumoral peut concerner la rate ou le foie.

1.7.1.2 - Le temps de doublement lymphocytaire (LDT)

Le LDT est défini comme la période de temps nécessaire pour que le nombre de lymphocytes observé au moment du diagnostic double. Un LDT de 12 mois ou moins est un facteur de mauvais pronostic, tandis qu'un LDT de plus de 12 mois est de bon pronostic. Par contre, un LDT court prédit une progression rapide de la maladie (Montserrat, Sanchez-Bisono et al. 1986; Molica and Alberti 1987; Vinolas, Reverter et al. 1987; Molica, Reverter et al. 1990).

1.7.1.3 - La β 2-microglobuline (β 2m)

La β 2m est un composant des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, qui sont exprimées par toutes les cellules nucléées. Une élévation des taux sériques de β 2m libre est observée chez les patients présentant une LLC. Le taux de β 2m est corrélé avec la charge tumorale et le stade clinique et un taux élevé est associé à une survie sans traitement (TFS) courte (Simonsson, Wibell et al. 1980; Delgado, Pratt et al. 2009; Gentile, Cutrona et al. 2009). L'augmentation du taux sérique de la β 2m est un indicateur pronostique assez parallèle à celui de la thymidine kinase mais semble indépendant de cette dernière (Hallek, Wanders et al. 1996). Le taux de β 2m peut prédire l'échec d'un traitement par l'association Rituximab Fludarabine Cyclophosphamide (RFC), le traitement standard pour la LLC (Wierda, O'Brien et al. 2005). Même si la β 2m est un bon facteur pronostique, elle n'a pas été étudiée aussi largement que d'autres marqueurs à cause de ses limitations. La première est la différence entre les valeurs normales observées entre les différents laboratoires qui utilisent des techniques différentes. La deuxième limitation est que la valeur seuil permettant de répartir les patients dans différents groupes à risque n'est pas définie. La troisième limitation est que sa valeur pronostique n'a jamais été validée dans des études prospectives (Delgado, Pratt et al. 2009).

1.7.1.4 - Thymidine kinase (TK)

La TK est une enzyme impliquée dans le contrôle de la synthèse de l'ADN dans les cellules en division. Un taux sérique de TK élevé est de mauvais pronostic, associé à un stade clinique avancé, une survie sans progression diminuée et souvent un statut IgVH non muté (Di Raimondo, Giustolisi et al. 2001; Matthews, Catherwood et al. 2006). Il peut également être un facteur prédictif de la mauvaise réponse au traitement (Di Raimondo, Giustolisi et al. 2001).

1.7.1.5 - CD23 soluble

CD23, une glycoprotéine transmembranaire de 45 kDa, est un récepteur de faible affinité pour les IgE, exprimé notamment sur les cellules B de LLC. La forme soluble de CD23 se comporte comme un facteur de croissance, induisant la prolifération des lymphocytes B normaux et leucémiques. Sarfati et al. ont rapporté que le niveau de CD23 soluble (sCD23) des patients atteints de LLC était 3 à 500 fois plus élevé que chez des patients atteints d'autres syndromes lymphoprolifératifs et chez des sujets sains (Sarfati, Bron et al. 1988). De nombreuses études ont montré que sCD23 était un marqueur de la charge tumorale, associé inversement à la survie sans progression et à la survie globale, corrélé avec

le stade clinique, l'expression de CD38 et de ZAP-70 (Sarfati, Chevret et al. 1996; Knauf, Langenmayer et al. 1997; Schwarzmeier, Shehata et al. 2002; Saka, Aktan et al. 2006). Le temps de doublement du taux de sCD23 (sCD23-DT) a également été rapporté comme un paramètre supplémentaire important dans la prédiction de la progression de la maladie et de la survie globale (Schwarzmeier, Shehata et al. 2002; Meuleman, Stamatopoulos et al. 2008)

I.7.2 - Autres facteurs de pronostic

I.7.2.1 - Statut mutationnel IgVH

Les immunoglobulines (Igs) sont des glycoprotéines constituées de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères comportant chacune une région variable et une région constante. A la surface des lymphocytes B, elles constituent le BCR (B-cell receptor), récepteur pour l'antigène. Elles sont également sécrétées par les plasmocytes. Dans la biologie normale des lymphocytes B, leur rencontre avec l'antigène au niveau des centres germinatifs en présence de lymphocytes T se traduit par l'apparition de mutations ponctuelles au niveau des régions variables des Igs. Ce processus conduit à la sélection des mutants présentant la meilleure affinité pour l'antigène. La recherche de mutations somatiques au sein des régions variables des gènes IGVH dans la LLC permet de définir deux groupes de patients avec une évolution bien distincte. Une homologie de plus de 98% avec le gène germinale définit le statut «non muté» et une homologie inférieure à 98% définit le statut «muté» (Damle, Wasil et al. 1999; Hamblin, Davis et al. 1999).

Les patients avec un profil non muté (environ 50% des patients) ont une évolution clinique plus agressive et une espérance de survie inférieure par rapport aux patients dont l'Ig des cellules de LLC est mutée (Damle, Wasil et al. 1999; Hamblin, Davis et al. 1999). Dans l'étude de Hamblin et al, les patients non mutés ont une médiane de survie globale de 117 mois contre 293 pour les patients mutés. Chez les patients diagnostiqués avec un stade A de Binet, l'étude du statut mutationnel des Ig a également une forte valeur pronostique (médiane de survie de 95 mois pour les patients non mutés, 293 mois pour les patients mutés) (Hamblin, Davis et al. 1999). Ces résultats ont été confirmés par plusieurs autres études (Oscier, Gardiner et al. 2002; Vasconcelos, Davi et al. 2003). Par ailleurs, le profil non muté est associé de façon significative avec les autres facteurs pronostiques défavorables, comme les délétions des chromosomes 11q23 ou 17p, une morphologie lymphocytaire atypique ou la positivité de l'expression de CD38 ($\geq 30\%$) (Damle, Wasil et al. 1999; Hamblin, Davis et al. 1999; Krober, Seiler et al. 2002; Oscier, Gardiner et al. 2002).

Au sein de la population de patient mutés, cependant, une sous-population, identifiée

par l'utilisation dans le domaine variable des chaînes lourdes de VH3-21, présente un risque plus élevé (Tobin, Thunberg et al. 2003; Thorselius, Krober et al. 2006).

Le statut mutationnel est le facteur pronostic le plus stable au cours de la progression tumorale mais cet examen est relativement lourd à réaliser sur le plan technique et n'est habituellement pas demandé en routine en dehors d'essais cliniques.

1.7.2.2 - Cytogénétique

De nombreuses données de la littérature démontrent une implication d'anomalies cytogénétiques dans l'apparition de la LLC. Les gènes les plus étudiés sont la délétion 13q14, la délétion 11q, la trisomie 12 et la délétion 17p13.

Une étude importante dans la LLC a été réalisée par Döhner et al. Ces auteurs ont montré qu'environ 82% des patients atteints de LLC ont des anomalies cytogénétiques avec par ordre de fréquence la délétion 13q (55%), suivie par la délétion 11q (18%), la trisomie 12q (16%), la délétion 17p (7%) et la délétion 6q (6%) et la survie des patients varie selon ces anomalies cytogénétiques (Dohner, Stilgenbauer et al. 2000) (figure 2). Ce système de classification hiérarchique, comme indiqué ci-dessous, est largement utilisé dans la pratique clinique et les travaux de recherche. Ces résultats ont été vérifiés de façon indépendante par plusieurs groupes (Dewald, Brockman et al. 2003; Shanafelt, Witzig et al. 2006).

La délétion 17p, ou del(17p), aboutit à la délétion du gène p53 qui code pour une protéine suppresseur de tumeur importante dans la prévention des cancers. Cette anomalie peut être détectée en FISH (Fluorescence in situ hybridization) sur mitoses ou dans des cellules interphasiques. Elle est rare au moment du diagnostic initial (5-10%), mais assez fréquente chez les patients atteints de LLC réfractaire ou en rechute (45%) (Zenz, Benner et al. 2008). Cette évolution clonale apparaît presque exclusivement chez les patients avec un statut IgVH non muté (Shanafelt, Witzig et al. 2006).

Les patients présentant une del(17p) ont une médiane de survie plus courte (32 mois), et un médiane de survie sans traitement de 9 mois (Dohner, Stilgenbauer et al. 2000). Le dysfonctionnement de la voie p53 peut être un facteur important dans la résistance à la chimiothérapie. En effet, plusieurs études ont montré que les patients del(17p) semblent relativement résistants à la chimiothérapie standard, utilisant des alkylants et/ou des analogues de purine (Dohner, Fischer et al. 1995; Grever, Lucas et al. 2007). Par contre, ces patients peuvent répondre à un traitement par l'alemtuzumab, seul ou en combinaison avec d'autres agents anti-leucémiques (Stilgenbauer and Dohner 2002; Lozanski, Heerema et al. 2004).

La délétion 11q induit une mutation du gène suppresseur de tumeur ATM. Les patients

dont les cellules tumorales présentent cette mutation ont une médiane de survie de 79 mois, et une médiane de survie sans traitement de 13 mois (Dohner, Stilgenbauer et al. 2000). Les patients del(11q) répondent bien à une chimio-immunothérapie avec RFC (Hallek, Fischer et al. 2010).

La trisomie 12 n'affecte pas significativement la survie, par rapport à des patients ayant un caryotype normal (114 mois contre 111 mois). Une médiane de survie sans traitement de 33 mois a été rapportée (Dohner, Stilgenbauer et al. 2000).

Un caryotype normal (absence d'anomalie des chromosomes testés, incluant 17p, 11q, 13q, 12q, 6q, 3q26, 8q24 et 14q32 par un panel de FISH) est associé à une médiane de survie de 111 mois, et une médiane de survie sans traitement de 49 mois (Dohner, Stilgenbauer et al. 2000).

La délétion 13q est la seule anomalie de bon pronostic. La médiane de survie globale de ces patients est de 133 mois et la médiane de survie sans traitement de 92 mois (Dohner, Stilgenbauer et al. 2000).

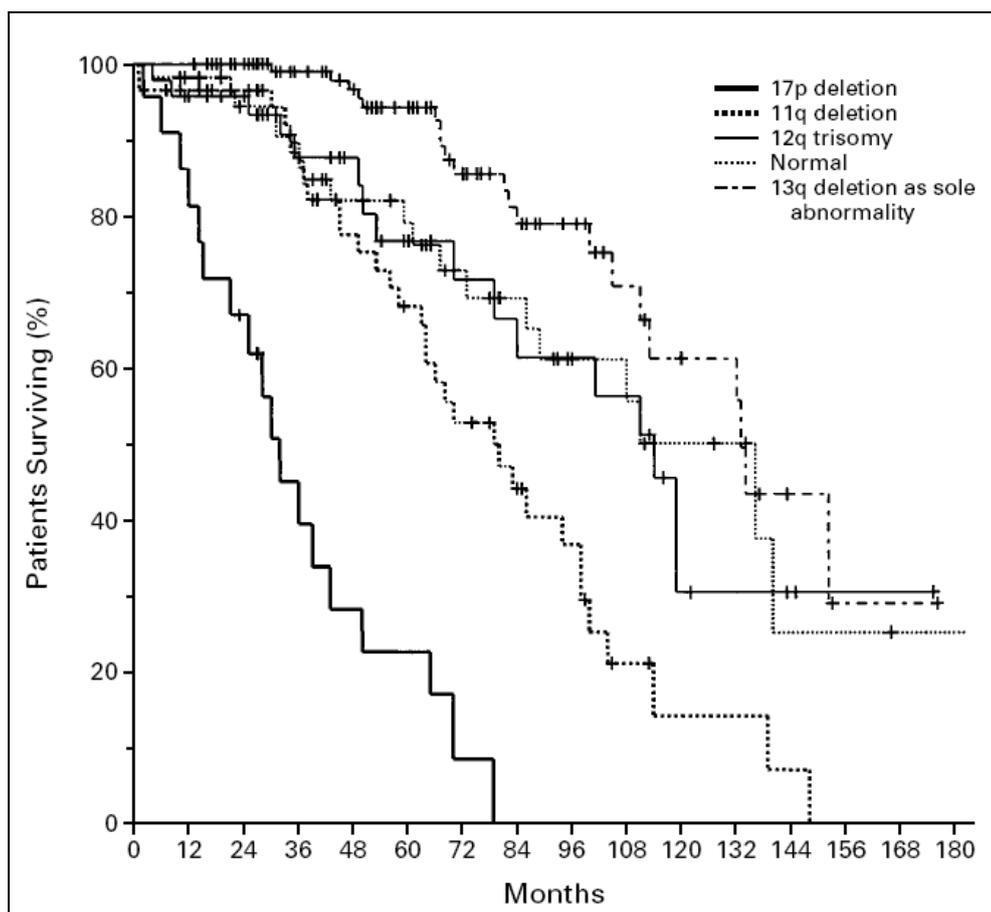


Figure 2 : Probabilité de survie à partir de la date du diagnostic parmi les patients répartis dans les cinq catégories cytogénétiques de LLC (d'après (Dohner, Stilgenbauer et al. 2000)

A côté de ces anomalies, l'importance des mutations de TP53 fait l'objet de beaucoup d'attention. Bien que les données cliniques concernant les mutations de TP53 ne soient pas aussi matures que celles concernant del(17p) dans la LLC, les études actuelles suggèrent que l'effet des mutations de TP53 est au moins aussi mauvais que sa délétion. Une étude anglaise récente, incluant 529 patients atteints de LLC de l'essai LRF-CLL4 a montré des mutations de TP53 chez 7.6% des patients. De plus 25/33 (76 %) patients del(17p) avaient une mutation de TP53 sur l'allèle résiduel ($p < 0.001$). La présence de mutations de TP53 était associée de façon significative à un moindre taux de réponse globale (27% v 83%; $p < 0.001$), une survie sans progression plus courte (PFS) et une survie globale plus courte (PFS à 5 ans: 5% v 17%; OS à 5 ans: 20% v 59%; $p < 0,001$ pour les deux) (Gonzalez, Martinez et al. 2011). La détermination du statut mutationnel de TP53 n'est pas encore utilisée dans la pratique courante.

1.7.2.3 - Expression de CD38

CD38 est une glycoprotéine transmembranaire de type 2, exprimée par certains lymphocytes T, par les progéniteurs de la lignée B dans la moelle osseuse, par les lymphocytes B des centres germinatifs et par les plasmocytes en différenciation terminale (Malavasi, Deaglio et al. 2008). Au contraire, les cellules B matures et mémoire expriment des niveaux faibles de CD38. CD38 est également exprimé en dehors des cellules lymphoïdes, sur les monocytes et dans les cellules acineuses pancréatiques, les cellules musculaires lisses, les ostéoclastes, et différentes zones du cerveau (Malavasi, Deaglio et al. 2008).

Une fonction initiale attribuée à CD38 a été la régulation de l'activation / prolifération des lymphocytes T humains de par son activité ADP ribose hydrolase (Funaro, Spagnoli et al. 1990). Ses propriétés fonctionnelles sur les lymphocytes B humains semblent être strictement liées à la phase de maturation. Par exemple l'engagement de CD38 sur les lymphocytes B circulants matures et des centres germinatifs induit l'activation cellulaire, une inhibition de l'apoptose, la prolifération et la sécrétion de cytokines (Zupo, Rugari et al. 1994; Funaro, Morra et al. 1997; Deaglio, Capobianco et al. 2003).

La mesure de l'expression de CD38 par les cellules de LLC a été proposée comme un marqueur de substitution pour le statut mutationnel IgVH, en raison de la forte corrélation entre ces deux paramètres (Damle, Wasil et al. 1999). La médiane de survie pour les patients en stade Rai intermédiaire avec 30% ou plus de cellules CD38⁺ était de 10 ans, alors qu'aucun des patients avec moins de 30% de cellules CD38⁺ n'était décédé au cours de la période de suivi dans l'étude de Damle et al. (Damle, Wasil et al. 1999). D'autres études ont confirmé

que les LLC CD38⁺ présentaient une augmentation du risque de progression et une survie globale inférieure (Ibrahim, Keating et al. 2001; Ghia, Guida et al. 2003). La combinaison de CD38 avec d'autres marqueurs pronostiques tels que le statut mutationnel IgVH fournit un complément d'information pronostique. Hamblin et al. ont montré que la durée médiane de survie chez des patients non mutés et CD38⁺ était de 8 ans, alors que pour les patients mutés n'exprimant pas CD38, la survie médiane était de 26 ans et que pour ceux qui avaient des résultats discordants (28.3%), une durée de survie médiane de 15 ans était observée (Hamblin, Orchard et al. 2002).

La valeur pronostique de CD38 est actuellement moins prise en considération, d'une part parce que le niveau d'expression de CD38 peut varier au cours de l'évolution de la LLC (Hamblin, Orchard et al. 2002), mais surtout parce qu'il n'y a pas de consensus pour définir la valeur seuil de ce marqueur (Ibrahim, Keating et al. 2001; Damle, Wasil et al. 1999; Hamblin, Orchard et al. 2002).

1.7.2.4 - Expression de ZAP-70

La protéine Zap-70 (Zeta-Associated Protein 70kDa), qui est une tyrosine kinase de la famille *syk*, intervient dans la signalisation des lymphocytes T et des cellules NK (Mustelin and Tasken 2003). Elle est très fortement exprimée dans ces deux types cellulaires (Wiestner, Rosenwald et al. 2003). Elle est absente dans les lymphocytes B normaux matures, mais a été retrouvée dans les cellules B de certains patients atteints de LLC.

De nombreuses études ont montré que la présence de ZAP70 dans les cellules de LLC est corrélée à un pronostic défavorable, une progression rapide de la maladie et une moindre survie (Crespo, Bosch et al. 2003; Durig, Nuckel et al. 2003; Wiestner, Rosenwald et al. 2003; Orchard, Ibbotson et al. 2004). La présence de ZAP70 est corrélée aux autres facteurs pronostiques défavorables tels que le statut mutationnel (90%), l'expression de CD38 (83%) et le taux de TK (Crespo, Bosch et al. 2003; Durig, Nuckel et al. 2003; Wiestner, Rosenwald et al. 2003; Orchard, Ibbotson et al. 2004). Il a été proposé que ZAP-70 pourrait même s'avérer être un marqueur supérieur au statut mutationnel et à CD38 dans la prédiction d'évolutions défavorables (Rassenti, Jain et al. 2008). Par exemple, dans l'étude menée par le CLL Research Consortium sur plus de mille patients, l'analyse multivariée a montré que parmi les trois marqueurs pronostiques examinés (ZAP70, statut mutationnel, CD38), ZAP-70 était le plus fortement associée à une durée courte entre le diagnostic et le traitement (Rassenti, Jain et al. 2008). L'expression de ZAP70 dans les cellules leucémiques peut être testée en cytométrie en flux, par RT-PCR (mRNA), en Western blot ou en

immunohistochimie. Aucune technique standard internationale n'a été validée pour la mesure de l'expression de ZAP70, ce qui a limité son application clinique et conduit à son quasi abandon en pratique.

Tous ces marqueurs pronostiques définis sur des cohortes de malades fournissent beaucoup d'informations difficiles à intégrer sur l'évolution possible de chaque patient. Ces facteurs de risque interagissent les uns avec les autres, et doivent être interprétés ensemble. Leur rôle dans la définition des patients à risque de progression dans le sous-groupe de malades de bas risque et à l'inverse dans l'identification des patients à haut risque qui resteront stables ou résisteront à la chimiothérapie n'est pas encore clairement défini.

I.8 - Traitement

I.8.1 - Indications thérapeutiques

Selon les recommandations de l'IWCLL, les patients nouvellement diagnostiqués, asymptomatiques et à un stade précoce (Rai 0, Binet A) doivent être surveillés sans traitement sauf s'il existe une preuve de progression de la maladie (Hallek, Cheson et al. 2008). En effet, des grandes études Européennes et Canadiennes chez des patients atteints de LLC à un stade précoce confirment que l'utilisation d'agents alkylants ne prolonge pas la survie (Shustik, Mick et al. 1988; Montserrat, Fontanillas et al. 1991; Dighiero, Maloum et al. 1998). Ce résultat a été confirmé par une méta-analyse (CLL Trialists' Collaborative Group. 1999). De plus, il a été rapporté que les patients à un stade précoce ayant reçu un traitement pour leur LLC avaient une fréquence accrue de cancers épithéliaux mortels par rapport à des patients non traités (Dighiero, Maloum et al. 1998).

Les patients de risque intermédiaire (stades I et II) ou élevé (stades III et IV) selon la classification modifiée de Rai, ou de stades Binet B ou C, bénéficient généralement de l'initiation d'un traitement, bien que certains de ces patients (en particulier de stade Rai intermédiaire ou B de Binet) soient suivis sans traitement jusqu'à l'obtention d'une preuve que la maladie devient progressive ou symptomatique.

L'activité de la maladie doit être clairement documentée avant d'initier un traitement, avec au moins un des critères suivants:

- preuve d'une insuffisance médullaire progressive (anémie et/ou thrombopénie)
- splénomégalie massive (au moins 6 cm au-dessous du rebord costal gauche) ou progressive ou symptomatique
- adénopathies massives (au moins 10 cm de plus grand diamètre) ou lymphadénopathie progressive ou symptomatique

-lymphocytose progressive avec une augmentation de plus de 50% sur 2 mois ou LDT de moins de 6 mois. Pour les patients dont le taux de lymphocytes sanguins initial est inférieur à 30 G/L, le LDT ne doit pas être utilisé comme seul paramètre pour définir une indication de traitement. En outre, les facteurs contribuant à une lymphocytose ou une adénopathie autres que la LLC (par exemple, les infections) doivent être exclus

-anémie et/ou thrombopénie auto-immune résistante à la corticothérapie ou à une autre thérapie standard

-symptômes constitutionnels : perte de poids involontaire de 10% ou plus au cours des 6 derniers mois; fatigue importante; fièvre supérieure à 38,0°C pendant 2 semaines ou plus sans autre signe d'infection; sueurs nocturnes depuis plus de 1 mois sans infection prouvée

I.8.2 - Traitements

Les médicaments utilisés dans la LLC incluent les agents alkylants, les analogues de purines et les anticorps monoclonaux. On peut également traiter la LLC par greffe de cellules souches hématopoïétiques.

-Agents alkylants :

Les agents alkylants agissent en établissant des liaisons covalentes avec l'ADN, ce qui empêche la réplication et la transcription. De plus, ces lésions induisent souvent des cassures simple- ou double-brins de l'ADN qui conduisent à l'apoptose de la cellule ou à la mise en œuvre des systèmes de réparation pour le maintien de la prolifération des cellules tumorales. Les plus utilisés sont le chlorambucil, en monothérapie (ou parfois associé à une corticothérapie) et le cyclophosphamide, essentiellement en association avec les analogues des purines tels que la fludarabine (Lepretre and van de Neste 2006).

-Les analogues de purines

Les analogues des purines sont des médicaments qui ressemblent aux purines, mais quand les cellules essayent de les utiliser pour fabriquer leur ADN, ces analogues bloquent le processus et empêchent la cellule de se diviser (Lepretre and van de Neste 2006).

Les plus utilisés sont la fludarabine et la cladribine, en monothérapie ou essentiellement associés avec des agents alkylants et/ou des anticorps monoclonaux (Hallek and Pflug 2011). L'inconvénient de ces médicaments est qu'ils sont également toxiques pour tous les lymphocytes et rendent les sujets particulièrement immunodéficients, les exposant à des complications infectieuses.

- Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps tous identiques, reconnaissant le même épitope, obtenus par génie génétique. Dans la LLC, les antigènes CD19, CD5, CD20, CD52, CD23, CD37 et les antigènes idiotypiques sont exprimés à des degrés divers à la surface des cellules tumorales et certains d'entre eux peuvent constituer des cibles thérapeutiques pour les anticorps monoclonaux. Les plus utilisés sont les anticorps anti-CD20 (rituximab, Mabthera®) et anti-CD52 (alemtuzumab, Campath®). Ces deux anticorps monoclonaux ont fait l'objet de nombreuses études dans la LLC, en monothérapie ou en association à diverses chimiothérapies, en première ligne ou chez des patients en rechute ou réfractaires à la chimiothérapie (Cheson 2010).

-La greffe de cellules souches hématopoïétiques

La greffe de cellules souches hématopoïétiques inclut l'autogreffe et l'allogreffe. L'autogreffe n'a pas d'indication en première intention. Elle est recommandée chez des patients en rechute ou réfractaires non éligibles pour une allogreffe, sous réserve d'une sensibilité au traitement de rattrapage. Les indications de l'allogreffe sont : l'absence de réponse ou la rechute précoce (dans les 12 mois) suivant un traitement par les analogues des purines ; une rechute dans les 24 mois après l'obtention d'une réponse par l'association FCR ; une rechute après autogreffe; une LLC évolutive avec del(17p) après un traitement par alemtuzumab (Dreger, Corradini et al. 2007).

Comme il y a plusieurs stratégies thérapeutiques dans le traitement de la LLC, on doit choisir la meilleure façon de traiter un patient donné. Le choix du traitement dépend de plusieurs paramètres : caractéristiques moléculaires de la maladie du patient (anomalies cytogénétiques, statut IgVH), caractéristiques cliniques de la maladie ("disease bulk", cytopénies auto-immunes), caractéristiques du patient (âge, insuffisances fonctionnelles, comorbidités). Pour l'évaluation de la comorbidité, l'échelle de prévalence cumulée ("the cumulative illness rating scale") constitue un outil utile (Extermann, Overcash et al. 1998).

1.8.2.1 - Traitement en première intention

Comme décrit ci-dessus, il faut envisager un traitement pour les patients de stade Binet A ou B ayant une maladie active, les patients de stade Binet C ou Rai 0-II présentant des symptômes cliniques, et les patients en stade Rai III-IV. Trois recommandations récentes publiées par l'ESMO (European Society for Medical Oncology) (Eichhorst, Dreyling et al. 2011), le NCCN (National Comprehensive Cancer Network) (Zelenetz, Abramson et al. 2010) et le SIE (Società Italiana di Ematologia), le SIES (Società Italiana di Ematologia

Sperimentale) et le GITMO (Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo) (Mauro, Bandini et al. 2012) résument bien les essais cliniques. Les recommandations sont les suivantes :

a) Patients sans del(17p)

Chez les patients sans co-morbidité associée, le traitement vise à obtenir une réponse maximale qui est par ailleurs corrélée à la durée de la réponse, à la survie sans progression et à une survie globale la plus longue possible. L'immunochimiothérapie de l'association FCR est la thérapie standard de première ligne, recommandée par ces trois guides. Mais des associations alternatives comme l'association FR, PCR (Pentostatine/Cyclophosphamide/Rituximab) ou BR (Bendamustine/Rituximab) sont également proposées par la recommandation du NCCN.

Chez les patients présentant des co-morbidités sévères et chez les patients âgés, à qui on ne peut pas proposer un FCR, le traitement doit viser à obtenir la meilleure qualité de vie possible, elle-même dépendante de la qualité de la réponse obtenue par le traitement. Le chlorambucil avec ou sans prednisone est le traitement standard, recommandé par deux protocoles. Mais de nombreuses approches alternatives associant diverses molécules sont proposées.

b) Patients avec del(17p)

En raison d'un faible taux de réponse et d'une réponse de courte durée après un traitement comprenant de la fludarabine et des agents alkylants (Hallek, Fischer et al. 2010), le traitement par alemtuzumab (Campath®) est recommandé. Chez le sujet jeune sans co-morbidité associée, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est à envisager rapidement.

1.8.2.2 - Traitement de la rechute et d'une maladie réfractaire

La mise en route d'une nouvelle ligne thérapeutique repose sur les mêmes critères que ceux utilisés en première ligne. Le choix du traitement dépend de plusieurs paramètres : l'âge du patient, l'émergence d'une del(17p) qu'il faut identifier par un nouvel examen cytogénétique par FISH, la nature du ou des traitements précédents et la durée de la dernière réponse. Différentes alternatives ont été indiquées dans les diverses recommandations.

Selon la recommandation de l'ESMO, le traitement de première ligne peut être répété, si la rechute ou la progression surviennent au moins 12-24 mois après une monothérapie ou 24-36 mois après chimio-immunothérapie. Si une rechute survient dans les 12-24 mois après monothérapie ou 24-36 mois après chimio-immunothérapie, ou si la maladie ne répond pas au traitement de première ligne, le schéma thérapeutique doit être changé.

I.8.2.3 - Consolidation et entretien

En l'absence d'études randomisées permettant de retenir l'indication d'un traitement d'entretien quel qu'il soit, ces traitements ne sont pas à envisager dans l'immédiat en dehors des essais thérapeutiques.

I.9 – Physiopathologie de la LLC

I.9.1 - Diminution de l'apoptose

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée), est un programme de suicide cellulaire essentiel pour le développement et l'homéostasie tissulaire des organismes. La dérégulation de l'apoptose est impliquée dans de nombreuses pathologies comme des maladies dégénératives, auto-immunes et certains cancers notamment la LLC.

Le mécanisme principal d'évolution de la LLC est un défaut dans l'apoptose de lymphocytes B matures qui s'accumulent dans le sang, la moelle et les organes lymphoïdes secondaires. Les raisons de ce défaut d'apoptose ne sont pas encore complètement élucidées.

L'apoptose est régulée par deux voies majeures (Burz, Berindan-Neagoe et al. 2009). La première, appelée voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, implique l'activation des récepteurs du ligand FAS (FAS/APO-1/CD95), de TNF- α ou des récepteurs TRAIL qui appartiennent à la superfamille des gènes du récepteur au TNF. La seconde, appelée voie intrinsèque ou voie mitochondriale, est dépendante du cytochrome c mitochondrial. Ces deux voies sont dérégulées dans la LLC.

Les cellules de la LLC expriment faiblement CD95 (FAS), et sont résistantes à l'engagement de CD95 (Tinhofer and al. 1998; Romano, De Fanis et al. 2005), ainsi que de TRAIL (Inoue, MacFarlane et al. 2004). A l'inverse, elle surexprime in vivo de nombreux inhibiteurs d'apoptose, tels que Bcl-2, Mcl-1, IAP1, IAP2 et la survivin (Schattner 2002).

Les miARN-15a et miARN-16-1, situés au niveau du chromosome 13q14, sont délétés ou sous-régulés dans environ 65% des LLC (Cimmino, Calin et al. 2005). L'expression de ces deux miARNs serait inversement corrélée à l'expression de bcl-2 par une régulation négative de bcl-2 à un niveau post-transcriptionnel. Par conséquent, la perte de ces miARN conduit à une surexpression de bcl-2. L'expression des miARN-29b et miARN-181b, sous-régulés dans les formes agressives de LLC, est inversement corrélée à celle de Tcl-1 (Pekarsky, Santanam et al. 2006). Ce dernier est un oncogène activateur de la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT et sa surexpression interagit avec cette voie.

En termes de régulation de l'apoptose cellulaire, il a été montré, dans des ganglions de LLC, que la signalisation par CD40 déclenche la voie de Bcl-2, se traduisant par une

uprégulation de protéines antiapoptotiques, telles que Mcl-1, A1 et Bcl-x1, et une downrégulation de Noxa et Bim (Smit, Hallaert et al. 2007; Hallaert, Jaspers et al. 2008). De plus, il a été montré que les cellules de la LLC peuvent également exprimer CD40L, ce qui peut les dispenser de l'aide de cellules T suite à l'engagement du BCR par un antigène (Schattner 2002).

La signalisation du BCR est un autre inhibiteur puissant de l'apoptose dans la LLC. Elle active les voies de signalisation PI3K/AKT, MAPK et NF- κ B, qui peuvent favoriser la survie des cellules de LLC par une activité anti-apoptotique (Schattner 2002).

I.9.2 - La prolifération de la LLC

La LLC a longtemps été considérée comme une maladie dans laquelle l'accumulation cellulaire résulte seulement d'une diminution de l'apoptose, en raison d'un défaut génétique. Cette hypothèse est confortée par le fait que la grande majorité (> 98 %) des cellules périphériques de LLC sont arrêtées en phase G0 ou G1 du cycle cellulaire et surexpriment des protéines antiapoptotiques telles que Bcl-2 (Lanasa 2010). Cependant, des études récentes utilisant des mesures plus sophistiquées suggèrent que les cellules de LLC ont des capacités de prolifération significatives. Dans le travail de Messmer et al, bien que la quantité de cellules leucémiques produites par jour représente 0,1% à 1,76% de la population tumorale totale, ceci conduit à au moins 10^9 nouvelles cellules leucémiques quotidiennement (Messmer, Messmer et al. 2005). Cette étude a également observé une corrélation entre un taux de génération de cellules leucémiques supérieur à 0,35% et la présence d'une maladie progressive. La fraction proliférative leucémique est par ailleurs préférentiellement CD38⁺ (Calissano, Damle et al. 2009). De plus, ces cellules expriment de façon significative des facteurs de prolifération tels que ZAP70, Ki67 ou la télomérase (Damle, Temburni et al. 2007).

Dans un rapport plus récent, Calissano et al. ont montré que les cellules leucémiques nouvellement générées avaient un immunophénotype CD5^{fort}/CXCR4⁺, alors que les cellules leucémiques quiescentes étaient CD5^{faible}/CXCR4^{fort}. De plus, ces cellules surexprimaient plus de gènes favorisant la division cellulaire, inhibant l'apoptose, induisant l'activation et la migration et induisant/réparant des dégâts oxydants que les cellules au repos. Ces dernières exprimaient plutôt des gènes inhibant la division cellulaire et la survie (Calissano, Damle et al. 2011). Ceci a conduit à émettre l'hypothèse que les cellules leucémiques du compartiment sanguin finissent par entrer dans une phase de sénescence cellulaire. A ce moment, l'augmentation d'expression de CXCR4 pourrait promouvoir une réentrée dans le

microenvironnement tumoral au niveau des ganglions et de la moelle osseuse, où les cellules recevraient à nouveau des signaux de survie. Plutôt que de subir l'apoptose, cette sous-population de cellules quiescentes serait alors activée et proliférerait. Les cellules-filles, qui ont une expression moindre de CXCR4, retourneraient alors dans le sang périphérique (Calissano, Damle et al. 2011).

I.9.3 - Impact du microenvironnement

De nombreuses études ont montré que le microenvironnement tumoral qui existe dans les ganglions et la moelle osseuse peut promouvoir la survie et la prolifération des cellules de LLC. Ce microenvironnement contient des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) dans les niches vasculaires de la moelle osseuse, des cellules "nurse-like" (NLCs), des lymphocytes T et des cellules dendritiques folliculaires dans les organes lymphoïdes secondaires (Lanasa 2010). Les interactions entre les cellules accessoires et les cellules de la LLC renforcent la survie des cellules de LLC par l'intermédiaire de cytokines, de chémokines et d'autres facteurs qui promeuvent le homing, l'adhérence et la prolifération (Munk Pedersen and Reed 2004; Pleyer, Egle et al. 2009; Lanasa 2010; Fecteau and Kipps 2012). De plus, une étude a montré que le microenvironnement tumoral peut promouvoir la chimiorésistance des cellules de CLL en particulier via l'expression de Mcl-1, un membre de la famille de Bcl-2 très impliqué dans la régulation de l'apoptose et la résistance à la mort cellulaire (Kurtova, Balakrishnan et al. 2009; Lanasa 2010).

I.9.4 - Rôle de la stimulation antigénique du récepteur des cellules

B (BCR)

Les récepteurs pour l'antigène des cellules B (BCR) jouent un rôle très important dans le développement de la LLC. Le BCR des cellules de LLC de divers patients sont souvent structurellement très proches, on parle de stéréotype. Il existe en effet une homologie presque complète des séquences CDR3 (complementarity determining region) de la chaîne lourde (par exemple, IGHV3-21, IGHV4-34, IGHV1-69 et IGHV3-23) (Messmer, Albesiano et al. 2004; Tobin, Thunberg et al. 2004; Stamatopoulos, Belessi et al. 2007; Murray, Darzentas et al. 2008; Agathangelidis, Darzentas et al. 2012) entre différents patients. L'utilisation stéréotypique du BCR se retrouve chez environ 20-30% des patients et est logiquement plus fréquente dans les LLC non mutées. Ceci suggère que les antigènes qui ont engagé ces récepteurs sont semblables et déterminants dans la pathogenèse de la maladie. De plus, les mutations somatiques observées dans les séquences BCR et ZAP70 ou CD38 qui peuvent modifier la signalisation de BCR sont des facteurs pronostiques importants dans la LLC.

La signalisation BCR est différente dans les cellules de LLC et dans les lymphocytes B normaux. En effet, les cellules de LLC sont caractérisées par une expression faible des immunoglobulines de surface et de CD79b. Elles ont une réponse variable à la stimulation antigénique, et présentent une phosphorylation constitutive de certaines kinases comme Syk (Spleen tyrosine kinase), Lyn (protéine tyrosine kinase de la famille Src) et Btk (Bruton's tyrosine kinase). Ceci conduit à une activation aberrante des voies PI3K/AKT, NF-κB et MAPK (Woyach, Johnson et al. 2012). La réactivité de la stimulation par le BCR est également fortement associée au statut mutationnel. L'engagement du BCR dans les LLC non mutées conduit de façon prédominante à une activation et une prolifération, alors que dans les LLC mutées, cet engagement induit des réponses anergiques et anti-apoptotiques (Lanasa 2010). En outre, la stimulation par l'IgM de surface des cellules de LLC peut entraîner ou prévenir l'apoptose tandis que la stimulation par l'IgD de surface empêche toujours l'apoptose (Zupo, Massara et al. 2000; Bernal, Pastore et al. 2001).

I.9.5 - Origine cellulaire de la LLC

L'origine cellulaire de la LLC reste inconnue mais il y a quelques hypothèses.

I.9.5.1 - Cellules B1 humaines

En raison de l'expression caractéristique du marqueur CD5 au niveau des cellules tumorales de LLC, il a été suggéré que la contrepartie normale de ces cellules pourrait être les cellules B1 humaines (Griffin, Holodick et al. 2011). Il y a plusieurs similitudes entre les cellules B1 normales de l'homme et les cellules B malignes de LLC. Elles partagent l'immunophénotype CD20⁺CD27⁺ CD43⁺ CD70⁻, l'expression de ZAP-70, d'ILT3 et un statut IgVH non muté (Griffin, Holodick et al. 2011). Les cellules B1 pourraient ainsi être à l'origine au moins des LLC non mutées. C'est surtout l'absence de mutation des cellules B1 humaines qui est en défaveur de leur relation avec les cellules de LLC. Certaines données suggèrent en effet que l'expression de CD5 pourrait être induite sur les cellules B2 in vitro (Wortis, Teutsch et al. 1995) ou in vivo sur des cellules B activées et anergiques (Youinou, Jamin et al. 1999; Raman 2002). Au moins chez l'homme, la conclusion actuelle est que l'expression CD5 est associée à une variation des seuils de réponse suite à l'activation du BCR plutôt qu'à une expression constitutive par une sous-population particulière de cellules B.

I.9.5.2 - Lymphocytes B de la zone marginale (B MZ)

La présence de mutations IgVH conduit à l'hypothèse que les cellules B de LLC non mutées pourraient représenter des cellules n'ayant pas transité par un centre germinatif, tandis

que les cellules mutées auraient une origine post-centre germinatif. Néanmoins, les analyses d'expression génique montrent que la LLC est une maladie homogène en termes de profils d'expression, les formes mutées et non mutées différant seulement par l'expression de quelques gènes mineurs (Klein, Tu et al. 2001; Rosenwald, Alizadeh et al. 2001). Ces travaux montrent également que les cellules leucémiques ressemblent plus à des cellules mémoire qu'à des cellules B CD5⁺ normales, avec un phénotype membranaire activé (Rosenwald, Alizadeh et al. 2001). Cela a contribué à émettre l'hypothèse que les cellules B de la zone marginale pourraient être à l'origine des cellules B de LLC (Chiorazzi and Ferrarini 2011). Les cellules B MZ répondent à la fois à des antigènes T-indépendants ou T-dépendants et expriment des marqueurs d'activation après engagement de leur BCR avec des antigènes (Chiorazzi and Ferrarini 2011). Par contre, à l'inverse des cellules de LLC, elles expriment un BCR naïf IgM^{fort}IgD^{faible}. Ce BCR, codé par des gènes IgVH non mutés ou mutés, est polyréactif aussi bien qu'auto-réactif et capable de fournir une protection innée contre les microorganismes (Chiorazzi and Ferrarini 2011). Les arguments à l'encontre d'une origine B MZ pour les cellules de LLC sont leurs différences immunophénotypiques puisqu'à l'inverse des cellules de LLC, les B MZ sont dépourvues de CD5 et de CD23 mais expriment CD22 (Chiorazzi and Ferrarini 2011).

1.9.5.3 - Cellules B transitoires

Les cellules B1 et B MZ sont des cellules de l'immunité innée. Une autre sous-population de lymphocytes B, les cellules B dites «transitoires» pourraient représenter une autre contrepartie physiologique des cellules de LLC. Chez la souris, elles sont supposées dériver de cellules B folliculaires naïves ou de cellules B MZ (Pillai and Cariappa 2009). Leur immunophénotype est cependant très différent de celui des cellules de LLC : CD10+, CD20+, CD21+, CD23+ et IgM, bien qu'elles puissent exprimer CD5 chez l'homme (Sims, Ettinger et al. 2005). Elles peuvent être auto-réactives, et expriment des BCRs mutés ou non mutés (Chiorazzi and Ferrarini 2011). Par contre, elles ne répondent pas aux signaux BAFF/BLYS/TALL-1, nécessaires à la survie des cellules de LLC (Chiorazzi and Ferrarini 2011).

1.9.6 - L'immunodéficience de la LLC

Les patients atteints de LLC développent progressivement une immunodéficience et décèdent le plus souvent d'infection. Les cellules effectrices présentent des défauts quantitatifs et qualitatifs, qui se traduisent par des anomalies des réponses immunitaires cellulaires et humorales.

L'anomalie la plus évidente et la mieux connue est l'hypogammaglobulinémie, qui est présente chez près de 85% des patients (Hamblin 1987). Elle ne se limite pas aux patients qui ont été traités. Dans une étude de patients en stade B de Binet, non traités, sans pic détectable d'immunoglobulines, l'hypogammaglobulinémie était si profonde que plus de 90% des immunoglobulines détectables dans le sérum étaient idiotypiques, dérivées des cellules leucémiques, toutes les autres ayant disparu (Stevenson, Hamblin et al. 1980).

La proportion, mais aussi et surtout le nombre absolu de cellules B non-malignes sont, en parallèle, souvent significativement diminués, et leur fonction est altérée. La production d'immunoglobulines est diminuée et les patients répondent mal aux vaccinations.

Le nombre absolu de lymphocytes T est par contre augmenté dans la LLC non traitée, de 2,5 à 4 fois par rapport à la normale (Markey, Alexander et al. 1986). Cette augmentation affecte principalement les lymphocytes à potentiel cytotoxique CD8⁺, et semble liée à la présence de cytomégalovirus. L'index d'immunorégulation CD4/CD8 est inversé (Mackus, Frakking et al. 2003). Les fonctions des lymphocytes T sont altérées, avec une diminution de la réponse aux mitogènes (PHA et PWM), et une expression anormale du TCR et de nombreux antigènes de surface comme LFA-1, ICAM-1, CD28, CD152, CD25 (Scrivener, Goddard et al. 2003). Ces cellules présentent également un défaut de formation des synapses immunologiques avec les cellules présentatrices d'antigènes (Ramsay, Johnson et al. 2008). Il existe une déficience fonctionnelle des lymphocytes T auxiliaires, avec des réponses Th2 prédominantes, et une augmentation de l'activité des T-suppresseurs et des cellules T régulatrices (Treg) (Beyer, Kochanek et al. 2005). Enfin ces lymphocytes T présentent une déficience réversible acquise de l'expression de CD40-ligand (Cantwell, Hua et al. 1997). Ces altérations contribuent à l'incapacité des lymphocytes T à initier, entretenir et compléter une réponse immunitaire chez les patients atteints de LLC. (Gorgun, Holderried et al. 2005).

L'immunité innée est également altérée dans la LLC. Plusieurs compartiments sont touchés puisqu'ont été rapportées des anomalies de l'activité phagocytaire et cytotoxique des neutrophiles, des monocytes et des cellules NK (Ravandi and O'Brien 2006; Wadhwa and Morrison 2006). Il existe même un déficit en fractions du complément C1 et C4 (Schlesinger, Broman et al. 1996) chez les patients.

I.9.7 - La faible immunogénicité des cellules tumorales

L'immunogénicité résulte de conditions complexes qui incluent l'expression de molécules de costimulation, la production de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines et la capacité de stimuler la prolifération et la différenciation de lymphocytes T.

Bien que les cellules tumorales de LLC expriment un certain nombre d'antigènes tumeur-spécifiques, en particulier l'idiotype de leur BCR, et de hauts niveaux de molécules MHC de classe I et II, ce sont de piètres cellules présentatrices d'antigène (APCs). En effet, elles sont dépourvues de molécules de costimulation et d'adhésion telles que CD80, CD86 et CD54, essentielles dans la mise en place d'une réponse T efficace (Carballido, Veliz et al. 2012). De plus, il y a peu d'uprégulation de l'expression des molécules MHC de classe I par des cellules de LLC en réponse à l'interféron gamma (IFN- γ), ce qui peut réduire leur sensibilité à la lyse par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) en réponse aux approches d'immunothérapie (Carballido, Veliz et al. 2012).

Au total, la LLC est caractérisée par une immunodéficiência concernant à la fois les réponses cellulaires et humorales. Cependant, son évolution est lente ce qui suggère qu'il existe tout de même une réaction immunitaire contre les cellules de la tumeur. Ceci est fortement suggéré par des observations cliniques de rémissions spontanées associées à une activité immunologique intensive suite à une infection virale (Ribera, Vinolas et al. 1987), de réponses observées après traitement par des cytokines immunomodulatrices comme l'interféron-alpha (Ziegler-Heitbrock, Schlag et al. 1989) ou encore par la survie sans maladie à long terme après allogreffe de moelle osseuse (Pavletic, Arrowsmith et al. 2000). Dans ce dernier cas, on peut évoquer un probable effet Graft Versus Leukemia dépendant des lymphocytes T du greffon (Horowitz, Gale et al. 1990).

Il est donc possible d'envisager d'utiliser des approches d'immunothérapie dans la LLC.

Parmi les autres cibles possibles d'immunothérapie, l'expression de Toll-like récepteurs (TLR)-7 et TLR-9, rapportée antérieurement (Spaner, Shi et al. 2006; Grandjette, Kennel et al. 2007; Rozkova, Novotna et al. 2010), peut être intéressante car les ligands de ces molécules sont connus.

II - TLR-7 ET TLR-9

Les Toll-like récepteurs (TLR) sont les protéines transmembranaires de type I, très conservées au cours de l'évolution, depuis les insectes jusqu'aux humains. Ce sont des récepteurs de reconnaissance de la famille des PRRs (Pattern-Recognition Receptors), capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns) (Janeway and Medzhitov 2002).

Toll a été identifié comme une molécule essentielle pour le développement de la *Drosophile*, puis comme un élément important de la protection immunitaire antifongique de cet insecte (Lemaitre, Nicolas et al. 1996).

On connaît actuellement 13 membres de la famille TLR, dont 10 sont formellement identifiés chez l'homme (TLR-1 à -10) (Browne 2012).

La reconnaissance de leurs ligands par les TLRs conduit à une série de signalisations se traduisant par l'induction de la transcription de gènes antimicrobiens, de cytokines inflammatoires et de chémokines. Ces signaux se combinent pour assurer le recrutement de neutrophiles et l'activation de macrophages en vue de l'élimination du pathogène identifié (Pasare and Medzhitov 2004). Les TLRs engagés activent aussi la maturation des cellules dendritiques, se traduisant par une up-régulation de l'expression des molécules MHC et de costimulation et par la production de cytokines et chémokines. Cette étape est nécessaire pour l'initiation de réponses immunitaires adaptatives (Pasare and Medzhitov 2004). Les TLRs sont impliqués dans l'immunité protectrice engagée dans de nombreuses maladies infectieuses, dans l'allergie, la pathogénèse du sepsis et de des maladies auto-immunes, l'athérosclérose et les cancers (Ishii, Uematsu et al. 2006; Hedayat, Takeda et al. 2012).

Les agonistes et antagonistes des TLRs ainsi que des inhibiteurs de la signalisation par les TLRs sont exploités pour une variété d'applications thérapeutiques (Hedayat, Takeda et al. 2012). Ces dernières concernent des vaccins adjuvants, l'immunothérapie anti-tumorale ou anti-infectieuse, le domaine des allergies ou encore celui des maladies auto-immunes.

TLR-7 et TLR-9, exprimés par les cellules B tumorales de la LLC (Spaner, Shi et al. 2006; Grandjennette, Kennel et al. 2007; Rozkova, Novotna et al. 2010), sont plus précisément décrits ci-dessous.

II.1 - Expression

II.1.1 - Localisation cellulaire

Les membres de la famille des TLRs sont localisés soit à la surface des cellules, soit dans des compartiments intracellulaires. Ainsi, TLR-7 et TLR-9 sont présents dans les

compartiments intracellulaires du réticulum endoplasmique (ER), les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes (Blasius and Beutler 2010). Cette localisation est essentielle afin d'empêcher une stimulation inappropriée par les acides nucléiques du soi dans l'espace extracellulaire (Fukui, Saitoh et al. 2011). Les pathogènes (bactéries et virus) qui activent cette voie doivent préalablement être internalisés par phagocytose, macropinocytose ou endocytose (Blasius and Beutler 2010).

II.1.2 - Expression cellulaire et tissulaire

Les TLRs sont exprimés par une variété de types cellulaires incluant des cellules immunitaires (cellules dendritiques, macrophages, monocytes, neutrophiles, lymphocytes B et T) et des cellules non-immunitaires (cellules endothéliales et épithéliales, fibroblastes) (Akira, Uematsu et al. 2006; Gomariz, Arranz et al. 2007).

TLR-7 et TLR-9 sont exprimés à un niveau modéré par les cellules B naïves ($CD19^+CD27^-CD38^-IgD^+$), puis de façon plus importante après activation cellulaire, au niveau des cellules des centres germinatifs ($CD19^+CD27^-CD38^+IgD^-$) ou des cellules mémoire ($CD19^+CD27^+CD38^-IgD^-$) (Bernasconi, Onai et al. 2003). Ces TLRs sont également exprimés dans les lymphocytes B circulants et amygdaliens (Dasari, Nicholson et al. 2005; Mansson, Adner et al. 2006).

TLR-7 et TLR-9 sont également exprimés de façon très importante dans les cellules plasmacytoïdes dendritiques (pDC) (Akira, Uematsu et al. 2006).

L'expression de TLR-7 et -9 a été étudiée par quelques groupes dont le nôtre, tant au niveau des mARN que des protéines dans la LLC. TLR-7 et TLR-9 sont exprimés dans les lymphocytes B tumoraux de la LLC (Spaner, Shi et al. 2006; Grandjenette, Kennel et al. 2007; Rozkova, Novotna et al. 2010), avec toutefois une expression plus importante de TLR-9 dans les cellules tumorales par rapport aux lymphocytes B normaux (Grandjenette, Kennel et al. 2007).

II.2 - Ligands

Chaque TLR détecte des PAMPs distincts originaires des virus, des bactéries, des mycobactéries, des champignons ou des parasites (Hedayat, Takeda et al. 2012).

Les ligands de TLR-7 sont des ARN simple brin d'origine virale ou endogène. Des oligonucléotides ou de petites molécules synthétiques analogues telles que les Imidazoquinolines (Imiquimod, Resiquimod), les guanosine nucleotides (Loxoribine, Isatoribine) et/ou la Bropirimine sont également des ligands de TLR-7 (Hedayat, Takeda et al. 2012). La figure 3 représente la structure des Imidazoquinolines, de la Loxoribine et de la

Bropirimine (Akira 2003)

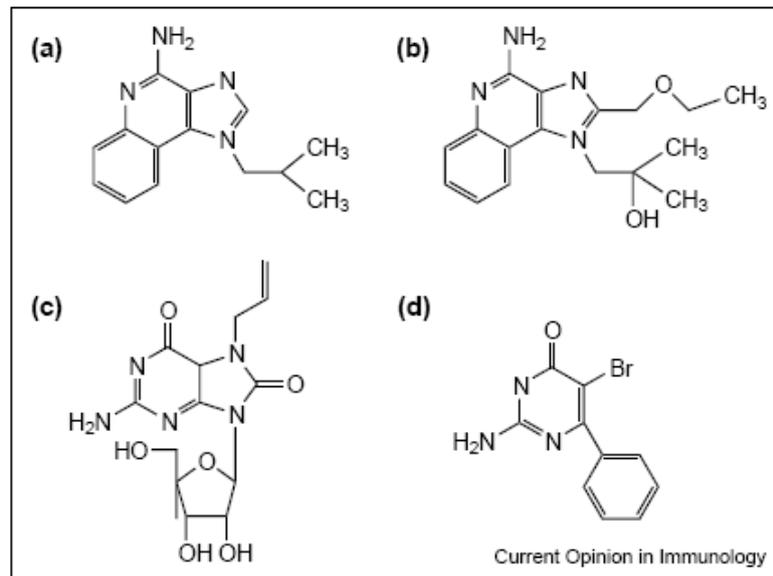


Figure 3 : Structure des Imidazoquinolines, de la Loxoribine et de la Bropirimine

(a) Imiquimod et (b) R-848 sont des imidazoquinolinamines. Ils ont une activité antivirale et antitumorale et induisent la production d'IFN- α et d'autres cytokines in vivo. L'Imiquimod-crème à 5 % (Aldara) est actuellement utilisée pour traiter des verrues génitales. (c) La Loxoribine (7-allyl-8-oxoguanosine) augmente l'activité des cellules NK et induit la prolifération des lymphocytes B, la production d'IFN- γ et de cytokines. (d) La Bropirimine (2-amin-5-bromo-6-phenyl-4(3H)-pyrimidinone) est un immunomodulateur actif oral qui augmente les quantités endogènes d'IFN- α et d'autres cytokines et est utilisé cliniquement contre les carcinomes vésicaux in situ (Akira 2003).

Les ligands de TLR-9 sont des ADN non méthylés d'origine bactérienne, virale, parasitaire (hématozoaires du paludisme) ou endogène. Des analogues synthétiques comme les oligodéoxynucléotides (ODNs) à motifs répétitifs cytidine-phosphate-guanosine (CpG) non méthylés sont aussi des ligands de TLR-9 (Hedayat, Takeda et al. 2012). Au moins quatre classes distinctes d'ODN CpG synthétiques ont été décrites (Hanagata 2012) (tableau 4).

Les ODN CpG de type A ou D, tels que les ODN 2216 et ODN 2336, contiennent un ou plusieurs motifs CpG, et leur activité requiert un squelette composé d'un mélange phosphodiester-phosphorothioate. Cette classe de CpG ODN active le TLR-9 des pDCs et induit la production d'IFN- α . Cependant, il n'induit presque jamais la prolifération de cellules B (Hanagata 2012).

Les ODN CpG de type B ou K, tels que l'ODN2006, consistent en un squelette composé de phosphorothioate. Cette classe de CpG ODN a la capacité d'activer et d'induire la prolifération des lymphocytes B. Par contre, leur capacité à induire la production d'IFN- α par les pDCs est faible (Hanagata 2012).

Les ODN CpG de type "C", tels que ODN M362, contiennent un squelette phosphorothioate avec un ou deux motifs CpG en 5' et un motif palindromique dans un

squelette phosphorothioate en 3'. Cette classe de CpG ODN combine les effets des ODN de type "B" et "A". Ils ont la capacité d'induire à la fois la prolifération de lymphocytes B et la production d'IFN- α par les pDC (Hanagata 2012).

Les ODN CpG de type P ont deux motifs palindromiques avec un squelette phosphorothioate. Ils ont une forte capacité à induire la production d' IFN- α et à activer NF- κ B (Hanagata 2012).

Tableau 4 Caractéristiques des différents types d'ODN CpG (Hanagata 2012)

	Type A (D)	Type B (K)	Type C	Type P
Structure	Région phosphodiester centrale contenant des motifs CpG en palindrome, Extrémités 5' et/ou 3' avec motifs poly (G) et squelette phosphorothioate	Squelette phosphorothioate complet.	Motifs CpG en 5' et palindrome en 3'.	Deux palindromes avec un squelette phosphorothioate.
Exemples	ODN2216 (humain) ODN2336 (humain) ODN1585 (souris)	ODN2006 (humain) ODN1668 (souris) ODN1826 (souris)	ODN2395 (humain et souris) ODN M362 (humain et souris)	ODN21798
Types de cellules principalement stimulés	pDCs	lymphocytes B	pDCs et lymphocytes B	pDCs
Actions	Réponses immunitaires innées : sécrétion d'IFN- α , TNF- α et IL-12. Réponses immunitaires adaptatives : sécrétion d'IL-12 et IP10.	Réponses immunitaires innées : sécrétion d'IL-6, IL-10 et IL-12. Réponses immunitaires adaptatives : sécrétion d'IL-6 et IL-12.	Intermédiaire entre type A et B	Induction de sécrétion d'IFN- α plus forte que celle des CpG ODN de type C.

Abréviations : IFN- α , interféron alpha ; IL, interleukine; IP10, protéine de 10 kDa induit par interféron-gamma; pDC, cellule dendritique plasmacytoïde; TNF- α , facteur de nécrose tumorale alpha.

II.3 - Structure

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires de type I avec des masses moléculaires de 90 à 115 kD (Bell, Mullen et al. 2003). Ils sont constitués d'un domaine N-terminal extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal intracellulaire (Bell, Mullen et al. 2003).

II.3.1 - Domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire des TLRs contient 19 à 25 copies en tandem de motifs répétitifs riches en leucines, appelés Leucin-Rich Repeats ou LRR (Bell, Mullen et al. 2003). Chaque motif comporte 24 à 29 acides aminés et contient une séquence riche en leucine : XLXXLXLXX et une autre séquence conservée : XØXXØX4FXXLX, où X représente n'importe quel acide aminé et Ø indique un acide aminé hydrophobe (Bell, Mullen et al. 2003).

Les domaines LRR des TLRs forment une structure en forme de sabot de cheval et il est estimé que la surface concave des domaines LRR est impliquée directement dans la reconnaissance des pathogènes (Bell, Mullen et al. 2003). La distribution et le nombre de motifs LRR ainsi que l'organisation et le nombre d'insertions entre ces LRR est propre à chacun des TLRs ce qui leur confère une certaine spécificité dans la reconnaissance des pathogènes, bien qu'il existe une forte homologie entre TLR-7 et TLR-9 (figure 4) (Bell, Mullen et al. 2003).

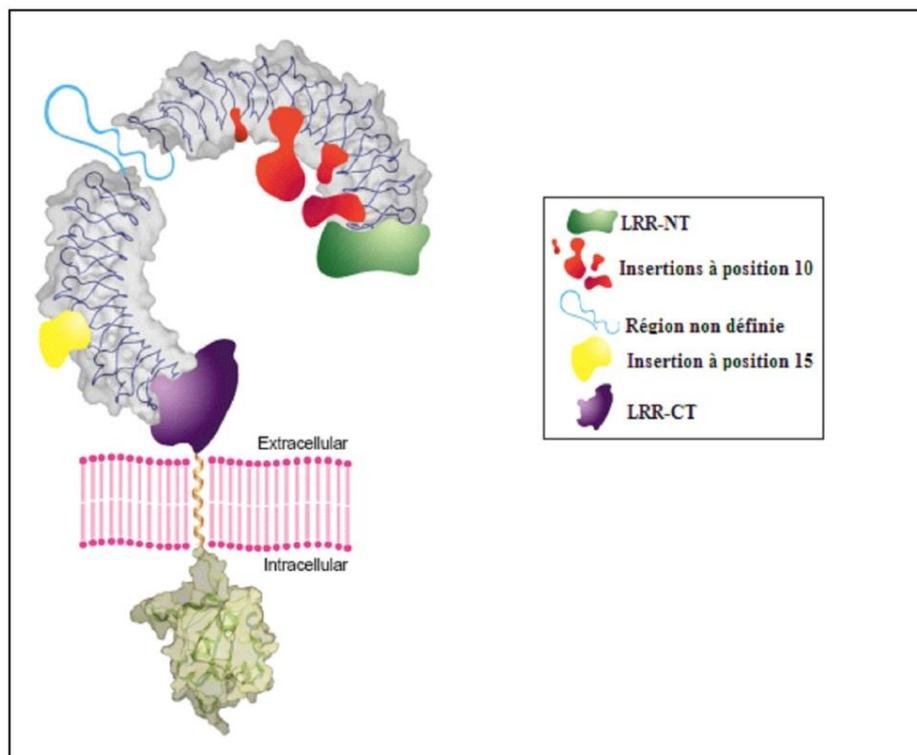


Figure 4 : Structure de TLR-7 et TLR-9 (Bell, Mullen et al. 2003)

Le solénoïde LRR est montré en gris et les régions flanquantes N- et C- terminales en vert et en violet, respectivement. Une région non définie dans TLR-7, TLR-8 et TLR-9, mais pas dans les autres TLRs, est indiquée en bleu clair. Les insertions dans LRR en position 10 sont indiquées en rouge et pourraient contribuer à la formation du site de liaison du PAMP. Une insertion en position 15 est indiquée en jaune. On note également un domaine transmembranaire (présumé être une seule hélice α) suivi par un domaine Toll/IL-1 récepteur (TIR) intracellulaire impliqué dans la signalisation.

II.3.2 - Domaine intracellulaire ou domaine TIR

Les TLRs et les membres de la famille du récepteur de l'Interleukine-1 (IL-1Rs) ont une région conservée d'environ 200 acides aminés dans leur portion intracytoplasmique. Celle-ci est appelé domaine Toll/IL-1R (TIR) (Slack, Schooley et al. 2000). Dans le domaine TIR, les régions d'homologie comprennent trois domaines conservés, qui sont cruciaux pour la signalisation (Akira and Takeda 2004). Le nombre d'acides aminés conservés entre ces domaines est généralement de 20 à 30% et varie en fonction du récepteur (Xu, Tao et al. 2000).

Les structures cristallines des domaines TIR des TLR-1 et TLR-2 humains ont été obtenues et analysées. Elles contiennent un brin central de cinq feuilletts β parallèles, entouré par cinq hélices α de chaque côté (Xu, Tao et al. 2000). Le domaine 1 pourrait être impliqué dans l'oligomérisation du récepteur avec un autre récepteur, le domaine 2 est impliqué dans l'oligomérisation des molécules adaptatrices contenant un domaine TIR qui interviennent dans la signalisation des TLRs. Le domaine 3 pourrait être impliqué dans l'association de domaines TIR entre les récepteurs et des molécules adaptatrices, et la formation de ce domaine TIR complexe est critique pour la signalisation du récepteur (Xu, Tao et al. 2000).

II.4 - Signalisation

Après la stimulation des différents TLRs par leurs ligands respectifs, suivie par leur homodimérisation ou hétérodimérisation, les domaines TIR recrutent et interagissent avec des molécules adaptatrices cytoplasmiques qui initialisent la signalisation des TLRs et induisent une voie de transduction qui conduit à l'activation de NF- κ B, des MAP kinases ou MAPKs (mitogen-activated protein kinases), incluant ERK, JNK et p38, et des facteurs IRF (interferon regulatory factors) (Akira and Takeda 2004; Ishii, Uematsu et al. 2006). Cette signalisation induit la transcription de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans l'immunité, l'inflammation, la prolifération et l'apoptose.

La production de cytokines inflammatoires telles que TNF- α , IL-6, IL-12 ainsi que de molécules de costimulation, est induite par l'activation de NF- κ B et des MAP kinases, tandis que la production des IFNs de type I est induite via des facteurs IRF (Akira and Takeda 2004; Ishii, Uematsu et al. 2006; Kawai and Akira 2007).

Les molécules adaptatrices contenant elles-mêmes un domaine TIR incluent MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), TIRAP (TIR-domain -containing protein adaptor) également connu comme MAL (MyD88-adaptor-like protein), TRIF (TIR-domain-containing adaptor inducing interferon-beta) ou TICAM-1 (TIR containing adaptor

molecule 1) , TRAM (TRIF- related adaptor molecule) ou TICAM-2 (TIR-containing adaptor molecule 2) ou TIRP (TIR-containing protein) (Akira and Takeda 2004; Ishii, Uematsu et al. 2006; Kawai and Akira 2007). Plus récemment, un autre adaptateur, SARM (sterile and HEAT-Armadillo motifs), a été identifié, capable d'inhiber la voie TRIF-dépendante dans des lignées cellulaires humaines (Carty, Goodbody et al. 2006).

Différents adaptateurs sont impliqués dans la signalisation des TLRs.

MyD88 est un adaptateur universel qui active les voies inflammatoires, partagé par tous les TLRs à l'exception de TLR-3.

TIRAP régule l'activation de la voie MyD88-dépendante en aval de TLR-2 et TLR-4.

TRIF régule la voie MyD88 indépendante (TRIF-dépendante) via TLR-3 et TLR-4.

TRAM participe sélectivement à l'activation de la voie TRIF-dépendante en aval de TLR-4, mais pas de TLR-3. (Akira and Takeda 2004; Ishii, Uematsu et al. 2006; Kawai and Akira 2007).

Les voies de signalisation de TLR-7 et TLR-9 ont été étudiées de façon intensive dans les pDC qui les expriment de façon très importante. TLR-7 et TLR-9 utilisent MyD88 comme un adaptateur principal pour l'activation de NF- κ B, des MAPKs et des IRFs (Kawai and Akira 2008) (figure 5).

II.4.1 - Voies conduisant à l'activation de NF- κ B et des MAPK (figure 5)

MyD88 contient un domaine de mort (DD pour death domain) qui lui permet d'interagir avec les domaines DD de la famille IRAK (IL-1R-associated kinase), incluant IRAK1, IRAK2, IRAK4 et IRAK-M. IRAK4 est activé en premier, puis active à son tour IRAK1 et IRAK2. Par la suite, les IRAKs se dissocient de MyD88 et interagissent avec TRAF6. TRAF6 active alors le complexe formé par TAK1 (TGF-activated kinase) et TABs (TAK1-binding protein 1, 2 et 3), qui active deux voies incluant le complexe IKK et la famille MAPK (ERK, p38 et JNK) (Kawai and Akira 2008).

Le complexe IKK, composé de sous-unités catalytiques de IKK α , IKK β et d'une sous-unité régulatrice de IKK /NEMO, phosphoryle alors I κ B, l'inhibiteur cytoplasmique de NF- κ B, ce qui provoque sa dégradation et par conséquent la translocation nucléaire des sous-unités p50/p65 du facteur de transcription NF- κ B (Kawai and Akira 2007).

Les membres de la famille MAPK phosphorylent et activent le facteur de transcription AP-1 (Activator Protein-1). Il s'agit d'homodimères ou d'hétérodimères composés de membres de la famille des facteurs de transcription à domaine bZIP (Basic Leucine Zipper

Domain). Cette famille regroupe c-jun, c-Fos, ATF (Activation Transcription Factor) et la sous-famille de Maf (Kawai and Akira 2007).

Ces deux voies contrôlent l'induction de cytokines inflammatoires (Kawai and Akira 2007). IRAK-M, dépourvu d'activité kinase intrinsèque, pourrait réguler négativement la signalisation des TLR en empêchant la dissociation d'IRAK4 et IRAK1 de MyD88 (Kawai and Akira 2008). Parmi les IRAKS, IRAK4 est une molécule indispensable au contrôle de l'activation de NF- κ B (Kawai and Akira 2008).

II.4.2 - Voies conduisant à l'activation des facteurs IRF (figure 5)

Il y a neuf membres dans la famille IRF (IRF1 à IRF9) et plusieurs IRFS sont impliqués dans la signalisation de TLR-7 et TLR-9, pour la production des IFN de type 1 et de cytokines inflammatoires.

II.4.2.1 - Induction d'IFN de type I via IRF-7

IRF-7 est constitutivement exprimé dans les pDC qui, en particulier, peuvent produire des quantités importantes d'IFN de type I en réponse à une infection virale et après une activation de TLR-7 et TLR-9 (Kawai and Akira 2007). Un travail de Honda et al. a montré que les pDC de souris déficientes en IRF-7 sont incapables de produire de l'IFN- α après activation via TLR-9 et TLR-7. Ce travail a également montré qu'IRF-7 est essentiel pour l'induction des gènes des IFN α/β par la voie MyD88-dépendante, après activation de la famille de TLR-9 (TLR-9, TLR-7 et TLR-8) (Honda, Yanai et al. 2005).

En effet, IRF7 se lie avec MyD88 et forme un complexe de signalisation avec IRAK4 et TRAF6 (Kawai and Akira 2008). Dans ce complexe, IRF-7 est phosphorylé, se dissocie du complexe et transloque dans le noyau (Kawai and Akira 2008). Des modèles de souris déficientes en gènes IRAK1, IKK- α , TRAF3 et OPN-i (un précurseur d'Osteopontin) ont permis de montrer l'implication de ces molécules dans l'activation d'IRF-7 dans les pDCs (Kawai and Akira 2007; Kawai and Akira 2008).

II.4.2.2 - Induction de la production de cytokines inflammatoires et d'IFN de type I via IRF-8

IRF-8 est une protéine nucléaire exprimée fortement par les pDCs et d'autres populations de DC (Kawai and Akira 2008). Les DCs de souris déficientes en IRF-8 sont incapables d'activer NF- κ B et de produire des cytokines inflammatoires (TNF- α et IL-6) et d'IFN de type I, après stimulation via TLR-9. Ceci suggère que TLR-9 active NF- κ B via IRF-8 dans les DCs (Tsuji-mura, Tamura et al. 2004; Kawai and Akira 2008).

D'autre part, Taylor et al. ont montré que l'IRF-8 est nécessaire pour l'amplification de

la phase d'induction de la production d'IFN en réponse à une infection virale dans les pDCs et les cDCs (Tailor, Tamura et al. 2007).

II.4.2.3 - Induction d'IFN de type I via IRF-1

Dans les cDCs de souris déficientes en IRF-1, l'induction d'IFN- β en réponse aux ligands de TLR-9 est diminuée, tandis que les pDCs de ces souris produisent des quantités normales d'IFN- β et IFN- α (Negishi, Fujita et al. 2006; Schmitz, Heit et al. 2007). Ce travail a également montré que IRF-1, induit par l'IFN- γ de façon autocrine ou paracrine, se lie à MyD88 et est modifié par des molécules de signalisation, encore non identifiées, migre dans le noyau et active les gènes de production d'IFN β , iNOS, et IL-12p35. IRF-1 coopère probablement avec NF- κ B.(Negishi, Fujita et al. 2006).

II.4.2.4 - Induction des cytokines inflammatoires via IRF-5

L'implication d'IRF-5 a également été décrite dans la signalisation de TLR-7 et TLR-9 aboutissant à la production de cytokines inflammatoires, incluant IL-6, IL-12 et TNF- α , en réponse aux ligands de TLRs, en dépit d'une sécrétion normale des IFN de type I par les pDCs. Ceci suggère que IRF-5 participe à l'induction de cytokines inflammatoires mais pas à celle des IFN de type 1 (Takaoka, Yanai et al. 2005). Cette étude a également montré que IRF-5 interagit avec et est activé par MyD88 et TRAF6 et que l'activation des TLR aboutit à la translocation nucléaire d'IRF-5 pour activer la transcription de gènes de cytokines (Takaoka, Yanai et al. 2005). Toutefois, il a été rapporté dans deux autres études qu'IRF-5 induit la transcription des gènes d'IFN- β et IFN- α après l'engagement de TLR-7 et la production d'IFN- α après stimulation par des ligands de TLR-9 (Schoenemeyer, Barnes et al. 2005).

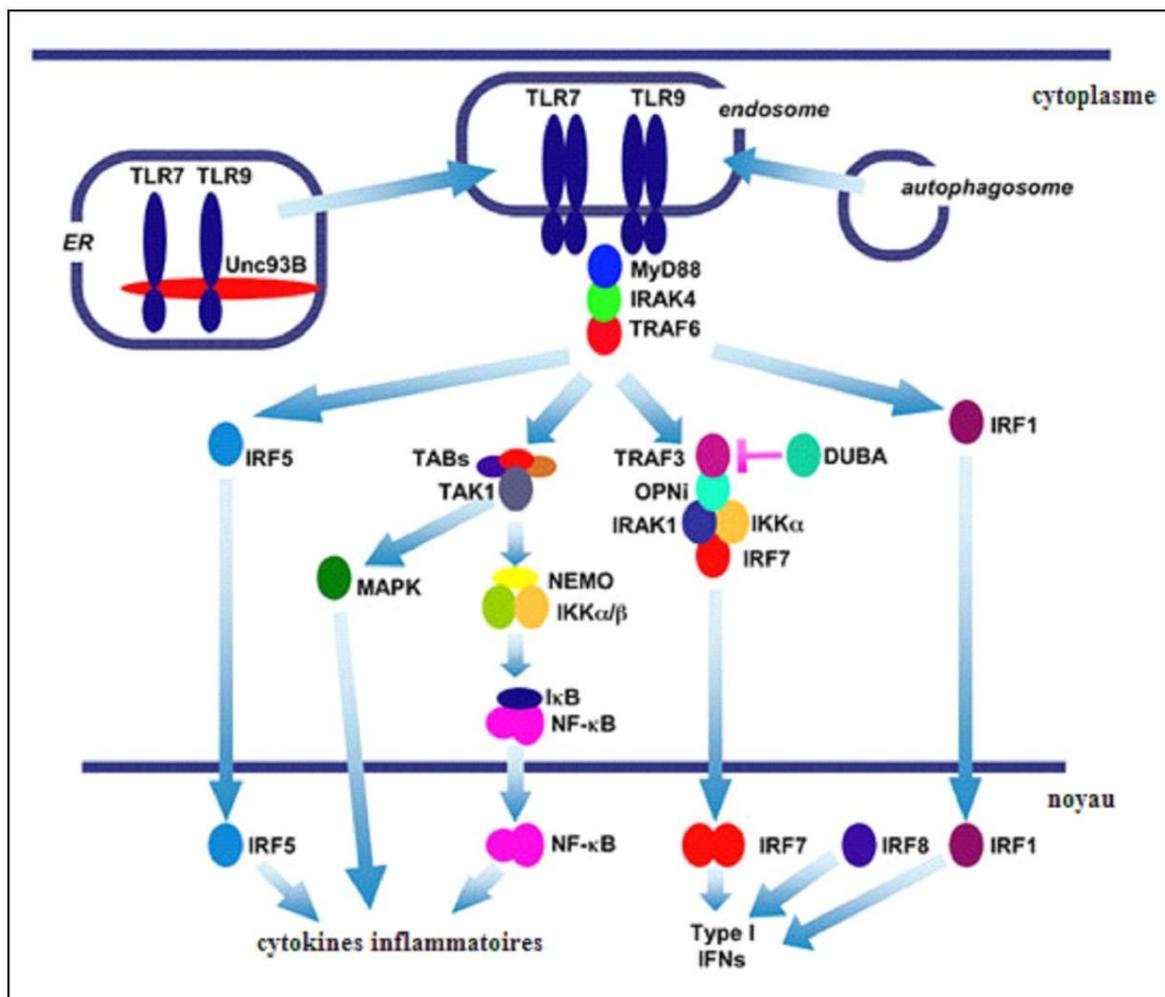


Figure 5 : Voies de signalisation de TLR-7 et TLR-9 (Kawai and Akira 2008)

TLR-7 et TLR-9 résident dans l'ER et interagissent avec UNC-93B (une protéine du réticulum endoplasmique avec 12 domaines transmembranaires impliquée dans l'activation de TLR-3, TLR-7 et TLR-9). Après stimulation par des acides nucléiques viraux, ces TLRs se localisent dans les endosomes pour rencontrer des acides nucléiques et recrutent un complexe de signalisation consistant en MyD88, IRAK4 et TRAF6. TRAF6 active alors TAK1 en conjonction avec les TABs (TAB1, TAB2, TAB3). Ceci conduit à l'activation du complexe IKK (IKK, IKKβ et NEMO) pour catalyser la phosphorylation d'IκB. IκB est dégradée par la voie du protéasome, ce qui permet à NF-κB de transloquer dans le noyau. Le complexe TAK1 et TABs active simultanément la voie MAPK. Les voies NF-κβ et MAPK contrôlent des réponses inflammatoires par l'induction de la production de cytokines inflammatoires. MyD88 forme un complexe de signalisation avec IRAK1, IKK, TRAF3, OPN-i et IRF7 dans les pDCs. IRF7 est phosphorylé de façon IRAK1-et IKKα-dépendante et transloque dans le noyau pour régler l'expression des gènes des IFN de type 1. IRF8 participe à l'induction secondaire d'IFN de type 1. IRF5 et IRF1 interagissent avec MyD88 et participent à l'induction de cytokines inflammatoires et d'IFN de type 1, respectivement, dans les cDCs.

OBJECTIFS

La LLC reste une pathologie incurable, caractérisée par un défaut d'apoptose des cellules tumorales, une immunodéficience concernant à la fois les réponses cellulaires et humorales et la faible immunogénicité des cellules leucémiques. Les observations cliniques de rémissions spontanées associées à une activité immunologique intensive suite à une infection virale, de réponses observées après traitement avec des cytokines immunomodulatrices et l'effet Graft Versus Leukemia observé après allogreffe suggèrent cependant qu'il est possible d'envisager l'utilisation d'approches d'immunothérapie dans la LLC.

L'expression de TLR-7 et la surexpression de TLR-9 sur les cellules de LLC font de ces molécules des cibles potentielles d'immunomanipulation. Des travaux précédents de notre équipe ont montré que la stimulation des cellules de LLC par les ligands de TLR-7 (Imiquimod R837) ou TLR-9 (ODN M362) augmente l'expression des marqueurs de costimulation et de présentation des cellules B tumorales.

Dans ce cadre, l'objectif principal de cette étude était de compléter l'étude de **l'effet de l'engagement de TLR-7 et TLR-9** sur cellules tumorales de LLC par leurs ligands, l'Imiquimod R837 et ODN M362 et d'approfondir les voies de signalisation mises en jeu. Par ailleurs, en raison de l'hétérogénéité de la LLC en terme d'évolutivité clinique et/ou de statut mutationnel, plusieurs groupes de patients ont été comparés pour ces différents effets. Cinq approches ont ainsi été utilisées :

- la méthode TUNEL et les modifications de diffraction de la lumière pour évaluer l'apoptose cellulaire
- un marquage au CFSE pour mesurer la prolifération cellulaire
- une analyse en cytométrie en flux de la modulation des niveaux d'expression de CD20, CD52, CD19 et CD5 à la surface des cellules tumorales
- un dosage en cytométrie en flux sur billes des cytokines produites dans les surnageants de culture
- une technique d'antibody-array et des Western blots pour étudier les voies de signalisation.

MATERIEL ET METHODES

I - PATIENTS ET PRELEVEMENTS

I.1 - Patients

Quarante patients, 19 femmes et 21 hommes, âgés de 47 à 88 ans (moyenne d'âge de 68 ± 2 ans) ont été inclus dans ce projet. Ils étaient tous suivis en consultation par le Professeur Pierre Feugier dans le service d'Hématologie Adultes (Centre Hospitalier Universitaire de Nancy). Tous les patients ont été informés verbalement de l'étude et leur consentement éclairé écrit et signé a été recueilli. Leur participation à ce travail avait été approuvée par le Comité Local d'Ethique de Nancy.

Le diagnostic de LLC avait été établi sur la base des définitions actuelles. Tous les patients présentaient un score de Matutes de 4 ou 5 et l'expression de CD38 par leurs cellules tumorales a été relevée.

Le statut mutationnel a été testé en PCR suivie d'un séquençage des amplicons par le Dr Christophe FERRAND, au Laboratoire d'Onco-Hématologie moléculaire à Besançon.

Tous les stades de Binet, d'évolution clinique et de statut mutationnel ont été considérés afin d'évaluer de possibles différences entre les patients. Les prélèvements étaient constitués de 2 tubes de 6 mL de sang total prélevé sur EDTA.

Les patients ont été divisés en plusieurs groupes, d'une part en sujets stables ($n=22$) ou progressifs/agressifs ($n=18$), selon l'évolution clinique des 40 patients, et d'autre part en fonction du statut mutationnel déterminé pour 35 patients, dont 18 patients avec IgVH muté et 17 patients avec IgVH non muté. Aucun des patients stables ne recevait de traitement. Par contre, trois des patients progressifs étaient traités au moment de l'étude, 1 par alemtuzumab (Campath®), 2 par corticoïdes, et les autres étaient en instance d'initiation thérapeutique. Les tableaux 5 et 6 regroupent les caractéristiques des patients.

Les modifications immunophénotypiques ont été analysées chez respectivement 11 et 10 patients stables et mutés et chez respectivement 10 et 9 patients avec une forme agressive et non mutée. L'apoptose évaluée par TUNEL a été faite chez 8 patients stables, dont 2 patients avec un statut non muté et 4 patients avec un statut muté et le statut mutationnel d'autres deux patients inconnu. L'apoptose évaluée par les modifications de diffraction de la lumière a été faite chez les patients pour lesquels l'expression des marqueurs membranaires a été effectuée avec le même protocole de cytométrie. La prolifération a été évaluée chez 14 patients stables et 18 patients avec une forme agressive et chez 14 patients mutés et 16 patients non mutés. La production des cytokines a été analysée dans les surnageants de suspensions cellulaires stimulées ou non provenant de 16 patients stables et 10 patients avec

une forme agressive et chez 12 patients mutés et 12 patients non mutés. Enfin, une analyse des signaux intracellulaires des lymphocytes B de patients atteints de LLC stimulés ou non a été réalisée chez 8 patients stables dont 5 avaient un statut muté, 1 non muté et 2 non déterminé et 7 patients avec une forme agressive dont 6 avaient un statut non muté et 1 muté. Une confirmation par Western-blot a été de plus effectuée pour certaines protéines chez les autres patients. Enfin, l'apoptose, la prolifération et les modifications immunophénotypiques ont été analysées sur des cellules Daudi transfectées pour exprimer ou non CD5 (Gary-Gouy, Sainz-Perez et al. 2007).

Tableau 5 Caractéristiques cliniques des patients

No	Sexe	Age	Stade Binet	A/S	GB (G/L)	Durée d'évolution (années)	Traitement
1	F	60	C	A	12	9	en instance
2	M	63	C	A	188	10	alemtuzumab
3	M	74	C	A	73	4	corticoïdes
4	F	88	C	A	480	8	en instance
5	M	69	C	A	65	1	corticoïdes
6	M	58	B	A	110	8	en instance
7	M	63	C	A	20	8	en instance
8	F	78	C	A	10	2	en instance
9	F	79	B	A	28	1	en instance
10	M	78	C	A	55	6	en instance
11	M	51	C	A	48	2	en instance
12	M	68	C	A	519	5	en instance
13	F	60	C	A	118	18	en instance
14	M	73	C	A	237	6	en instance
15	M	73	C	A	25	7	non
16	M	80	C	A	150	4	en instance
17	M	67	B	A	182	3	en instance
18	M	60	C	A	130	10	en instance
19	F	64	A	S	211	9	non
20	M	50	A	S	27	3	non
21	M	78	A	S	15	7	non
22	F	75	B	S	28	7	non
23	M	56	A	S	29	3	non
24	F	71	A	S	31	10	non
25	M	83	A	S	165	5	non
26	M	53	A	S	64	6	non
27	F	79	A	S	125	4	non
28	F	82	C	S	60	1	non
29	F	75	A	S	65	18	non
30	F	77	A	S	56	10	non
31	F	75	A	S	19	2	non
32	F	47	A	S	34	5	non
33	F	64	A	S	57	3	non
34	F	79	A	S	12	diagnostic	non
35	M	81	A	S	23	diagnostic	non
36	M	62	A	S	19	9	non
37	M	60	A	S	41	8	non
38	F	51	A	S	18	3	non
39	F	47	A	S	30	1	non
40	F	70	A	S	48	4	non

S/A : évolution clinique stable ou agressif ; GB : globules blancs ;

Tableau 6 Caractéristiques biologiques des patients

No	CD38%	Statut Mutationnel	Temps de Doublement (années)	Cytogénétique			
				del(11q)	del(13q)	del(17p)	Trisomie12
1	1%	UM	>1	non fait	non fait	oui	oui
2	non fait	UM Borderline	<1	non	non	non	non
3	94%	UM	<1	non fait	non fait	non	non fait
4	0%	M Borderline	>1	non fait	non fait	non fait	non fait
5	5%	UM	<1	non fait	oui	oui	oui
6	3%	UM	<1	oui	non fait	non	non fait
7	4%	UM	<1	non	non	non	oui
8	76%	UM	<1	non	non	non	non
9	35%	UM	>1	non fait	non fait	non	non fait
10	53%	UM	<1	oui	non fait	non	non fait
11	1%	M Borderline	>1	non	non fait	non	non fait
12	2%	UM	<1	non fait	non fait	non	non fait
13	60%	UM	<1	oui	non fait	non	non fait
14	99%	UM	<1	non fait	non fait	non	non fait
15	0%	M	>1	non	oui	non	non
16	0%	M	>1	non fait	oui	non	non fait
17	97%	UM	<1	non	non	non	oui
18	3%	M	<1	non	non	non	non
19	0%	Non fait	>1	non	oui	non	non
20	29%	M	>1	non fait	non fait	non fait	non fait
21	2%	M	>1	non fait	non fait	non fait	non fait
22	5%	M	>1	non	non	non	non
23	1%	M	>1	non	non	non	non
24	0%	M	>1	non fait	non fait	non fait	non fait
25	69%	M	<1	non fait	non fait	non fait	non fait
26	0%	M Borderline	>1	non fait	non fait	non fait	non fait
27	0%	UM	>1	non fait	non fait	non	non fait
28	0%	UM	>1	non fait	non fait	non fait	non fait
29	non fait	M	<1	non fait	non fait	non	non
30	1%	Non fait	>1	non fait	non fait	non	non fait
31	3%	Non fait	>1	non	non fait	non	non fait
32	4%	M	>1	non	non	non	non
33	5%	UM	>1	non	non	non	non
34	28%	M	diagnostic	non fait	non fait	non fait	non fait
35	8%	M	<1	non fait	non fait	non	non fait
36	1%	Non fait	>1	non fait	non fait	non fait	non fait
37	0%	M	>1	non fait	non fait	non fait	non fait
38	78%	UM	>1	non	non	non	non
39	0%	Non fait	>1	non	oui	non	non
40	1%	M	>1	non	non	non	non

M : muté ; UM : non muté, del : délétion

I.2 - Isolement des cellules

La séparation des lymphocytes à partir du sang périphérique a été réalisée par centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque.

I.2.1 - Principe

Cette technique est basée sur les différences de densité entre les globules rouges, les polynucléaires, les lymphocytes et les monocytes. Le sang périphérique dilué est déposé sur un milieu Ficoll-Hypaque de densité 1.077, correspondant à la celle des lymphocytes. Après centrifugation, les globules rouges et les polynucléaires (plus denses que le Ficoll) sédimentent au fond du tube, alors que les lymphocytes restent à l'interface et se rassemblent en un tapis opaque surnageant au-dessus du Ficoll-Hypaque. Les monocytes se retrouvent dans la phase supérieure qui contient également le plasma riche en plaquettes (figure 6) (Boyum 1976).

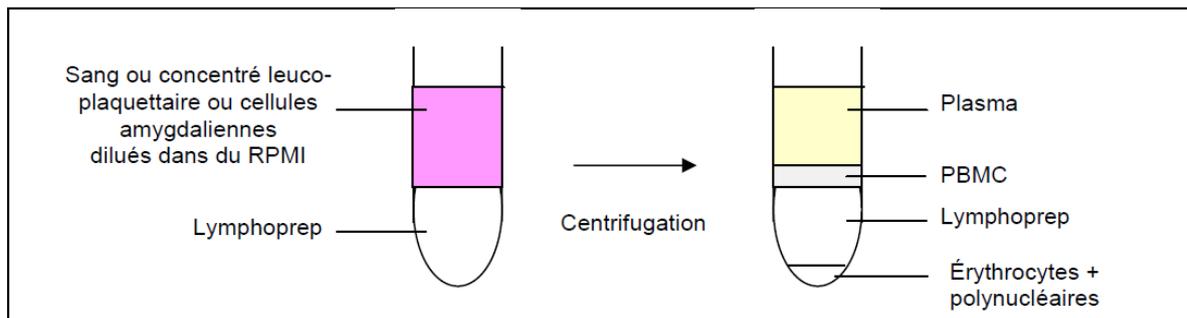


Figure 6 : Séparation des lymphocytes d'une suspension cellulaire par gradient de densité Ficoll-Hypaque

I.2.2 - Matériel

-Centrifugeuse (Thermo Fisher Scientific, Osterode, Allemagne)

I.2.3 - Réactifs

-Ficoll-Hypaque (Lymphocytes separation medium, Eurobio, Les Ulis Courtaboeuf, France)

-PBS 1x (Eurobio)

-RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine et en bicarbonate de sodium (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)

-Ultrosor (PALL, Life Sciences, New York, USA)

-Hepes (Sigma)

-Mélange d'antibiotiques (pénicilline (10000 U/mL), streptomycine (10000 µg/mL),

fungizone (25 µg/mL) (Gibco-BRL-Life Technologies, Rockville, Maryland, USA)

I.2.4 - Méthode

Environ 12 mL de sang total périphérique dilué au demi dans du PBS1X sont déposés doucement sur 12 mL de Ficoll-Hypaque sans mélanger les 2 phases. L'ensemble est centrifugé à 2500 rpm pendant 20 minutes à 20°C. Les lymphocytes sont ensuite recueillis en prélevant le tapis cellulaire formé à l'interface et lavés trois fois dans du PBS1X.

Une numération des cellules contenues dans la suspension finale est réalisée. Pour les cultures cellulaires, les suspensions cellulaires ont été ajustées à 5×10^6 cellules/mL dans du RPMI 1640 supplémenté avec 2% d'Ultrosor, en présence d'1% d'Hepes et d'1% d'antibiotiques.

II - EXPLORATIONS IMMUNOPHENOTYPIQUES ET FONCTIONNELLES EN CYTOMETRIE EN FLUX

II.1 - Cytométrie en flux

L'immunophénotypage des cellules de LLC stimulées ou non, l'analyse de l'apoptose et de la prolifération de ces cellules, le dosage des cytokines dans les surnageants de culture des suspensions cellulaires stimulées ou non ont été réalisés par cytométrie en flux.

II.1.1 - Principe

Cette technique permet une analyse qualitative et quantitative précise de cellules marquées de manière directe ou indirecte par des anticorps conjugués à un ou plusieurs fluorochromes.

Le cytomètre de flux se compose de trois parties :

- un réseau fluide constitué d'une veine liquide s'écoulant à vitesse constante qui entraîne et focalise un deuxième flux liquide contenant l'échantillon. Il permet de faire passer les cellules l'une après l'autre devant le rayonnement laser

- un banc optique avec une ou plusieurs sources lumineuses et des détecteurs du signal lumineux. Des photodiodes recueillent la diffusion de la lumière en avant du faisceau laser (FSC, Forward Scatter, proportionnel à la taille de la cellule) ou sur le côté (SSC, Side Scatter, proportionnel à la granularité de la cellule). Des photomultiplicateurs et des filtres optiques permettent de quantifier les diverses fluorescences émises par chaque événement (figure 7)

- un microprocesseur qui convertit les signaux électriques en signaux numériques, coordonne les données, prépare les représentations graphiques et les analyses statistiques.

L'affichage simultané des paramètres FSC et SSC traités par le logiciel, permet de

visualiser chaque cellule sur l'écran sous forme d'un point correspondant respectivement à sa taille et à sa granularité. La formation d'un nuage de points plus dense permet de placer une fenêtre d'intérêt englobant la population cellulaire à étudier.

Pour une même cellule, plusieurs paramètres de morphologie et de fluorescence sont enregistrés simultanément. L'analyse peut donc se faire selon un paramètre donné (analyse monoparamétrique) ou en associant deux paramètres (analyse biparamétrique) accompagnés pour chacun d'une liste des statistiques afférentes. Cette dernière peut contenir pour chaque sous-population cellulaire sélectionnée le nombre de cellules, le pourcentage par rapport au nombre total d'événements ou à un fenêtrage spécifique, la valeur moyenne de chacun des paramètres analysés, le pic de fluorescence ou encore les coefficients de variation.

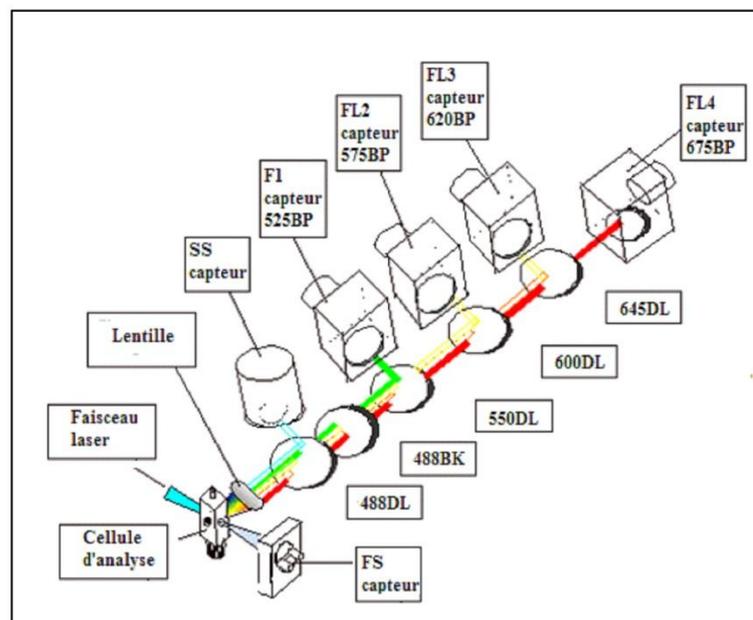


Figure 7 : Représentation schématique du banc optique d'un cytomètre en flux 4 couleurs
 (Adapté de http://biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html)
 BP: filtre band-passe-bande; DL: filter/miroir dichroïque longue-passe ; BK: filtre band-block

II.2 - Stimulation des cellules pathologiques via des ligands de TLR-7 et TLR-9

Suite à des travaux précédents mis au point au laboratoire, nous avons choisi d'évaluer les effets de la stimulation par les ligands spécifiques de TLR-7 et de TLR-9 sur des cellules B de LLC pendant 3 jours avec trois concentrations différentes de ces ligands. Nous avons utilisé le phorbol myristate-acétate (PMA) comme contrôle positif.

Les cellules sont manipulées dans des conditions limitant les risques de contamination, sous hotte à flux laminaire. Les suspensions cellulaires sont placées dans un milieu de culture

contenant les nutriments et les facteurs de croissance nécessaires à leur survie et dans des conditions optimales (atmosphère humide, enrichie en CO₂, à 37°C) en présence ou non d'agent de stimulation.

II.2.1 - Matériel

- Hotte stérile à flux laminaire (SSVAM 19, ESI, Cachan, France)
- Etuve à CO₂ (SANYO CO₂ incubator, Moriguchi, Japon)

II.2.2 - Réactifs

- Plaques de culture à 96 puits (Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France)
- RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine et en bicarbonate de sodium (Sigma)
- Antibiotiques (Pénicilline 10 000 U/mL, Streptomycine 10 000 mg/mL, Fungizone 25mg/mL) (Gibco)
- Hepes (Sigma)
- Ultroser (PALL, Life Science)
- Imiquimod R837 (Invivogen, San Diego, Californie, USA), ligand de TLR-7.
- ODN CpG M362 (5'-TCGTCGTCGTTTCGAACGACGTTGAT-3, Invivogen); ligand de TLR-9
- Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA ≥99%, Sigma)
- PBS 1X (Eurobio)

II.2.3 - Méthode

Des aliquotes de 1x10⁶ PBMC dans un volume de 200µL ont été cultivés en milieu RPMI1640 supplémenté avec 2% d'Ultroser, 1% de tampon Hepes, 1% d'antibiotiques avec ou sans stimulation, dans des plaques de 96 puits pendant 3 jours dans une étuve à saturation de vapeur d'eau, 37°C et 5.0% de CO₂. Les conditions de stimulation appliquées étaient les suivantes :

- témoin négatif : sans stimulation, milieu seul
- témoin positif : 5 µg/L de PMA
- stimulation par TLR-7 : trois concentrations croissantes d'imiquimod R837, respectivement 5 µg/mL, 10 µg/mL et 20 µg/mL
- stimulation par TLR-9 : trois concentrations croissantes d'ODN CpG M362, respectivement 0.25 µM, 0.5 µM et 1 µM

II.3 - Evaluation de l'apoptose des cellules tumorales stimulées ou non

II.3.1 - Principe

Au cours de l'apoptose, les cellules mettent en place un "mécanisme de suicide" qui se traduit par des modifications morphologiques et des événements moléculaires (tableau 7 et figure 8).

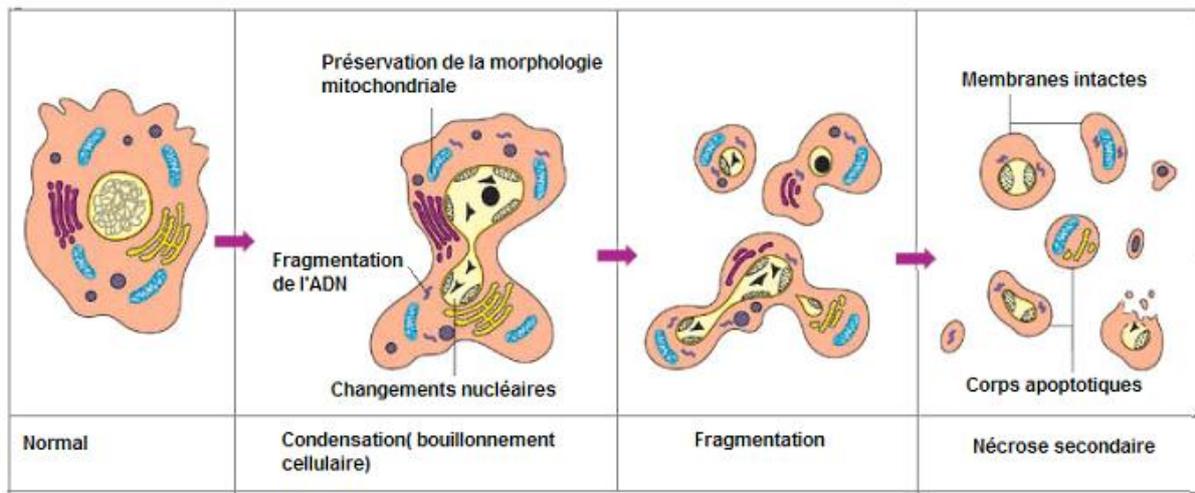


Figure 8 : Représentation schématique des changements morphologiques des cellules apoptotiques (adapté de (Rode, Eisel et al. 2008))

Tableau 7 Modifications morphologiques et événements moléculaires de l'apoptose (adapté de (Darzynkiewicz and Traganos 1998))

A .Modifications morphologiques
Contraction cellulaire
Changement de la forme de la cellule
Condensation de la chromatine nucléaire - Perte de la structure nucléaire visuellement reconnaissable (structure) - ADN hyperchromicité
Dissolution de l'enveloppe nucléaire
Fragmentation nucléaire
Condensation du cytoplasme
Perte des structures de surface cellulaire (pseudopodes, microvillosités)
Formation de corps apoptotiques (bourgeonnement)
Détachement des cellules en culture
Phagocytose possible de la cellule apoptotique
B. Evénements biochimiques et moléculaires de l'apoptose
Augmentation du ratio de promoteurs de l'apoptose vs inhibiteurs de la famille Bcl-2
Changements mitochondriaux -Diminution du potentiel transmembranaire -Fuite du cytochrome c -Stress oxydatif (formation de ROI)
Augmentation de Ca ⁺⁺ intracellulaire
Déshydratation cellulaire
Perte de l'asymétrie des phospholipides membranaires
Activation de la sérine protéase (s)
Cascade d'activation des caspases -Protéolyse des "substrats de mort "
Dégradation de la F actine et des protéines autres que les "substrats de mort"
Perte de la stabilité de l'ADN à la dénaturation
Présence de sections d'ADN simple brin
Dégradation endonucléaire de l'ADN -Fragmentation en portions de 50-300 kb -Clivage de l'ADN internucléosomal
Activation de la transglutaminase

II.3.1.1 - Evaluation de l'apoptose par les modifications de diffraction de la lumière

Les modifications morphologiques des cellules apoptotiques peuvent être révélées par l'analyse en cytométrie de flux. Lors de l'apoptose précoce, la condensation nucléaire induit une augmentation de la diffraction que se traduit par une augmentation du SSC et la réduction de la taille de la cellule se traduit par une diminution du FSC. Lors des phases tardives de l'apoptose, à la fois la granularité et la taille diminuent, ce qui se traduit par une diminution des signaux FSC et SSC (figure10, graphe E).

II.3.1.2 - Fragmentation de l'ADN nucléaire

La méthode TUNEL permet de mettre en évidence in situ la fragmentation de l'ADN nucléaire qui signe l'engagement définitif de la cellule dans la mort cellulaire programmée. Elle est basée sur le marquage des extrémités 3'OH libres des fragments d'ADN par la TdT (terminal déoxynucléotidyl transférase). Cette enzyme catalyse l'accrochage de nucléotides marqués au niveau des extrémités 3'-OH libres générées au cours de l'apoptose (figure 9).

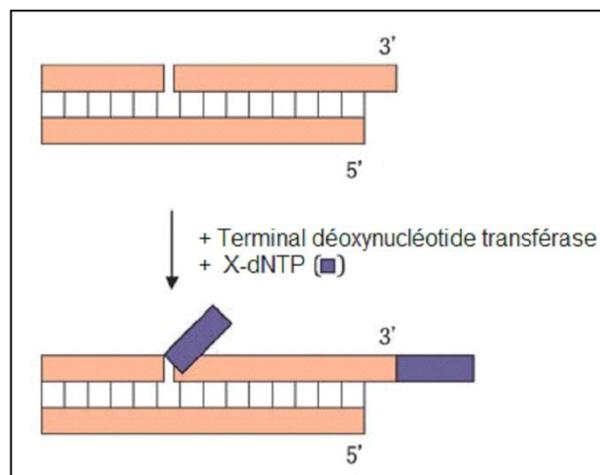


Figure 9 : Représentation schématique du principe de la méthode de TUNEL (adapté de https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/CELL_MAN/apoptosis_033_035.pdf)

II.3.2 - Matériel

- Centrifugeuse (Thermo Fisher Scientific)
- Cytomètre en flux (FC 500, Beckman Coulter, Fullerton, Etats-Unis)

II.3.3 - Réactifs

-Roche Molecular Biochemicals In Situ Cell Death Detection kit, Fluorescein (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne)

-DNase I recombinante, grade I (Roche Diagnostics GmbH)

-PBS 1x (Eurobio)

-Paraformaldéhyde (Sigma) dilué à 4% dans du PBS

-Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué à 0,1% dans une solution de citrate de sodium (Sigma) à 0.1%

-Anticorps monoclonaux anti-CD45-ECD, anti-CD5-PC5 et anti-CD19-PC7 (Beckman Coulter, Marseille, France)

II.3.4 - Méthode

L'apoptose a été évaluée à la fois par la méthode TUNEL et en fonction des changements de la taille et de la structure des cellules tumorales en cytométrie en flux.

II.3.4.1 - TUNEL

L'apoptose a été étudiée par la méthode TUNEL pour les cellules de 8 patients stables stimulés ou non avec trois concentrations croissantes d'Imiquimod et avec la PMA. A J1, J2 et J3. Les suspensions cellulaires stimulées ou non ont été recueillies et lavées une fois en PBS. Des aliquotes de 100 μ L de chaque culture cellulaire ont été incubés avec les anticorps monoclonaux anti-CD45-ECD, anti-CD5-PC5 et anti-CD19-PC7 pendant 20 minutes à 4°C, puis lavés en PBS. Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde dilué à 4% dans du PBS pendant une heure à température ambiante, lavées en PBS puis perméabilisées avec du Triton X-100 dilué à 0,1% dans une solution de citrate de sodium à 0.1% pendant 2 minutes sur glace. Les cellules ont ensuite été une nouvelle fois lavées avec du PBS, puis remises en suspension dans 25 μ L d'un mélange contenant des dUTP conjugués à la fluorescéine et de la TdT, et incubées pendant une heure à 37°C. Après ce marquage, les cellules ont été lavées en PBS, puis fixées avec du paraformaldéhyde à 1% et analysées par cytométrie en flux.

Pour chaque test, un contrôle négatif a été réalisé en appliquant le même protocole à l'exception de l'ajout de TdT. Un contrôle positif a également été préparé en utilisant des cellules préalablement incubées avec 200U/mL de DNase I recombinante (pour générer des cassures d'ADN) pendant 10 minutes à température ambiante et lavées en PBS. A J0, l'apoptose a été évaluée pour les cellules non stimulées. Chacune des suspensions cellulaires stimulées ou non a été analysée selon les histogrammes suivants (figure 10) :

- **un histogramme biparamétrique CD45-ECD/Structure (graphe A)** permettant d'éliminer les hématies résiduelles éventuelles et les débris et de placer la fenêtre "PBMC" (en bleu)
- **un histogramme biparamétrique CD5-PC5/CD19-PC7 (graphe B)** permettant d'identifier les cellules tumorales et de placer la fenêtre "cellules leucémiques" (en rose) au niveau de la Bitmap " PBMC"
- **un histogramme monoparamétrique TUNEL/count (graphe C)** conditionné sur la Bitmap "cellules leucémiques" permettant de calculer le pourcentage de cellules tumorales marquées positivement en TUNEL
- **un histogramme biparamétrique TUNEL/Structure (graphe D)**, conditionné sur la fenêtre "cellules leucémiques" permettant de mettre en évidence que les cellules marquées positivement en TUNEL(en vert) sont les cellules avec le plus fort SSC.
- **un histogramme biparamétrique Structure/Taille (graphe E)**, conditionné sur la fenêtre "cellules leucémiques" permettant d'identifier les nuages de cellules apoptotiques (en vert) et d'analyser le pourcentage de cellules apoptotiques selon les modifications de taille et de structure cellulaire
- **un histogramme biparamétrique Structure/Taille (graphe F)**, conditionné sur la fenêtre "cellules marquées positivement en TUNEL" présentées sur la figure D, permettant de montrer que les cellules marquées positivement en TUNEL tombent bien dans la fenêtre où les cellules ont le plus fort SSC (95.4%).

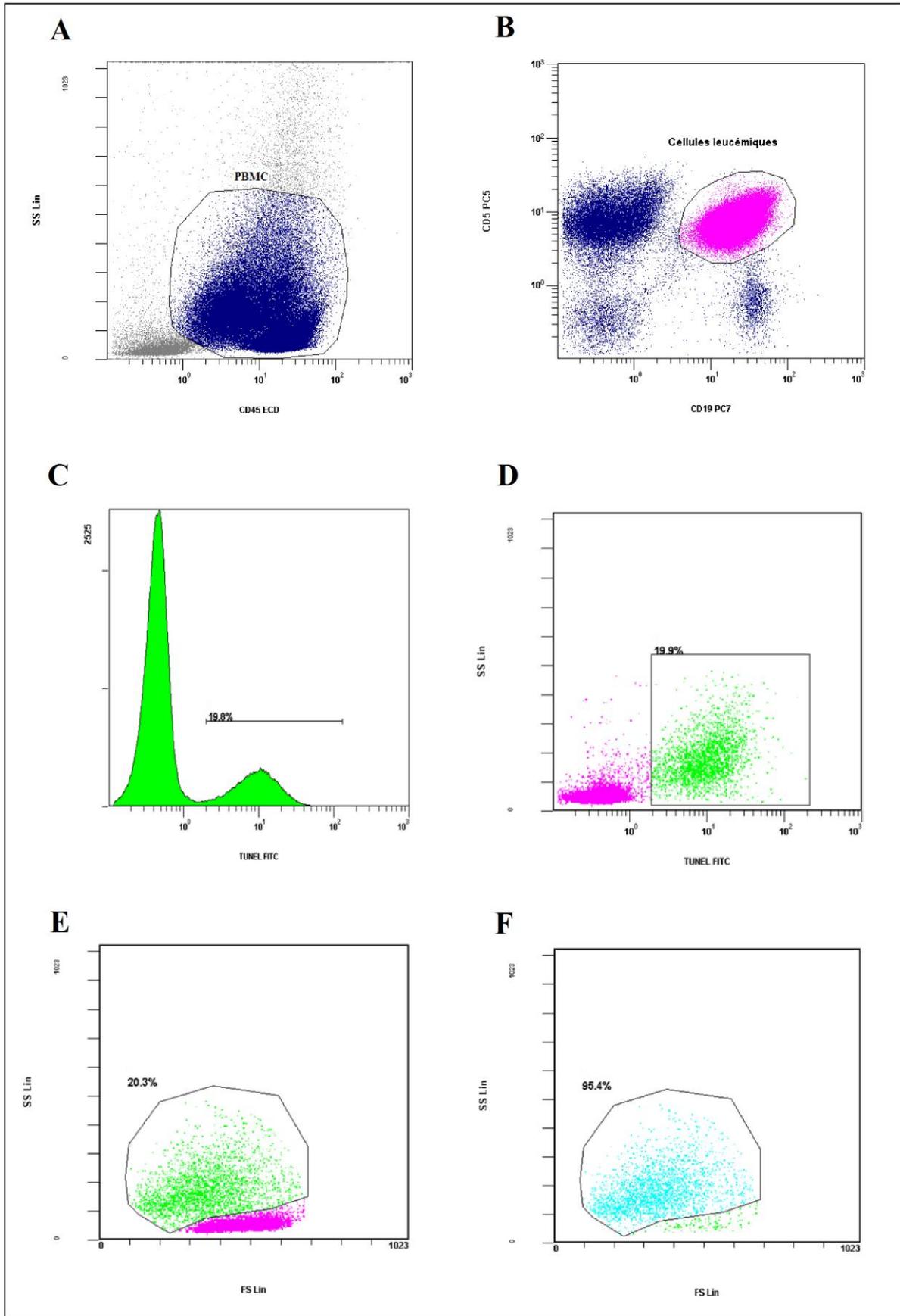


Figure 10 : Exemples d’histogrammes biparamétriques et monoparamétriques utilisés pour l’étude de l’apoptose des suspensions cellulaires de LLC stimulées ou non

II.4 - Evaluation de la prolifération des cellules tumorales stimulées ou non

La prolifération des cellules tumorales a été étudiée par marquage avec du CFSE.

II.4.1 - Principe

Le CFDA-SE (carboxy-fluoresceindiacetate succinimidyl ester), qui est le précurseur du CFSE (carboxy-fluorescein succinimidyl ester), est capable de diffuser dans les cellules et possède deux groupements acétate qui le rendent non fluorescent. Une fois ce précurseur internalisé, des estérases intracellulaires hydrolysent ses groupements acétate et le CFDA-SE devient alors de la CFSE qui est fortement fluorescente et moins lipophile que son précurseur. Son groupement succinimidyl lui permet d'interagir avec les groupements amines des protéines intracellulaires via des liaisons amide très stables. Les molécules fluorescentes ainsi obtenues peuvent, dans certains cas, être rapidement dégradées ou encore sortir de la cellule (CFR1). Dans les autres cas, les conjugués sont incapables de sortir de la cellule (CFR2) et le marquage covalent obtenu sur ces protéines est très stable à long terme (figure 11).

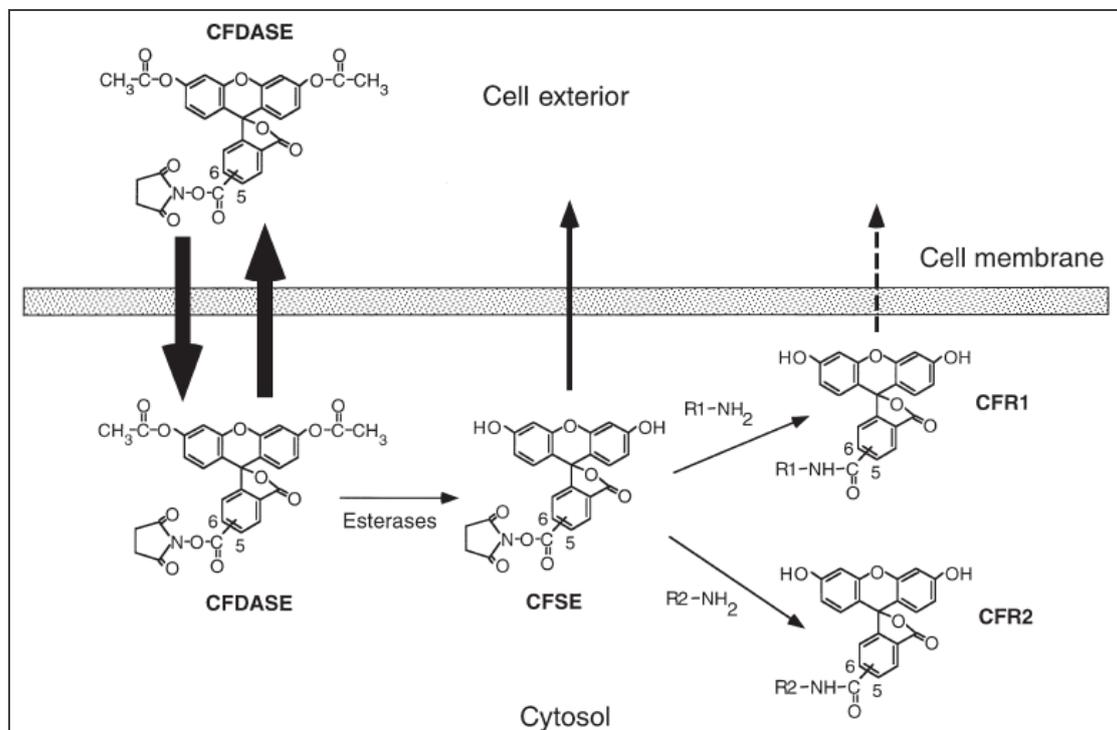


Figure 11 : Représentation schématique des différentes étapes du marquage des cellules avec le CFSA-DE (adapté de (Parish 1999))

Le groupement carbonyle situé entre les positions 5 et 6 du cycle benzène indique que le colorant est un mélange des isomères 5 et 6-carbonyle. Ce marquage durable permet d'utiliser cette molécule pour suivre la prolifération des cellules *in vivo* ou *in vitro* (Parish, 1999). La fluorescence des protéines marquées se distribue de façon égale entre les cellules filles, ce qui permet de suivre la prolifération cellulaire, par la décroissance progressive du signal fluorescent à chaque cycle de division, en cytométrie en flux.

II.4.2 - Matériel

- Centrifugeuse (Thermo Fisher Scientific)
- Cytomètre en flux (FC 500, Beckman Coulter)

II.4.3 - Réactifs

- CFSE (Molecular Probes, invitrogen, Eugene, Oregon, Etats-Unis)
- PBS 1x (Eurobio)
- RPMI 1640 (Sigma)
- Sérum de veau fœtal (SVF, PAA laboratories GmbH, Strasse, Pasching, Autriche)
- Anticorps monoclonaux : anti-CD5-PC5, anti -CD19-PC7 (Beckman Coulter)

II.4.4 - Méthode

A J0, les suspensions cellulaires sont incubées à une concentration de 5×10^6 cellules/mL avec $1 \mu\text{M}$ de CFDA-SE pendant 10 minutes à température ambiante. Un même volume de SVF froid est alors ajouté de manière à "absorber" le CFSE libre et le mélange est incubé 5 minutes à 4°C . Les suspensions cellulaires marquées sont ensuite lavées 3 fois avec du RPMI 10% SVF, remises en suspension à une concentration de 5×10^6 cellules/mL dans du RPMI 1640 supplémenté avec 2% d'Ultroser, 1% de tampon HEPES, et 1% d'antibiotiques, en présence ou non de facteurs de stimulation, à raison de $200 \mu\text{L}$ par puits.

Les suspensions cellulaires ont été cultivées dans des plaques de culture de 96 puits pendant 1, 2 ou 3 jours à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO_2 et saturée en eau.

Les cellules ont été recueillies après culture, lavées en PBS, marquées avec des anticorps monoclonaux anti-CD5 PC5 et anti-CD19 PC7 à 4°C pendant 20 minutes, lavées en PBS et fixées avec du paraformaldéhyde à 1% dans du PBS puis analysées par cytométrie en flux. L'évaluation des cellules en prolifération a été estimée par la mesure de la décroissance de la MFI (Moyenne d'Intensité de Fluorescence) du CFSE.

Pour chaque prélèvement étudié, les données ont été analysées à l'aide des histogrammes suivants (figure 12) :

●un histogramme biparamétrique Structure/Taille (graphe A) permettant d'identifier les populations cellulaires analysées et de placer la fenêtre d'intérêt englobant la population lymphocytaire.

●un histogramme biparamétrique CD5-PC5/CD19-PC7 (graphe B) permettant d'identifier les cellules tumorales au niveau de la population lymphocytaire

●un histogramme monoparamétrique CFSE/Count (graphe C) conditionné sur les cellules tumorales permettant d'analyser la répartition de l'intensité de fluorescence du CFSE au sein de la fenêtre d'intérêt.

●un histogramme biparamétrique CFSE/Structure (graphe D) conditionné sur les cellules tumorales permettant de visualiser les nuages des populations cellulaires ayant proliféré (signal CFSE diminué) ou non au sein de la fenêtre d'intérêt.

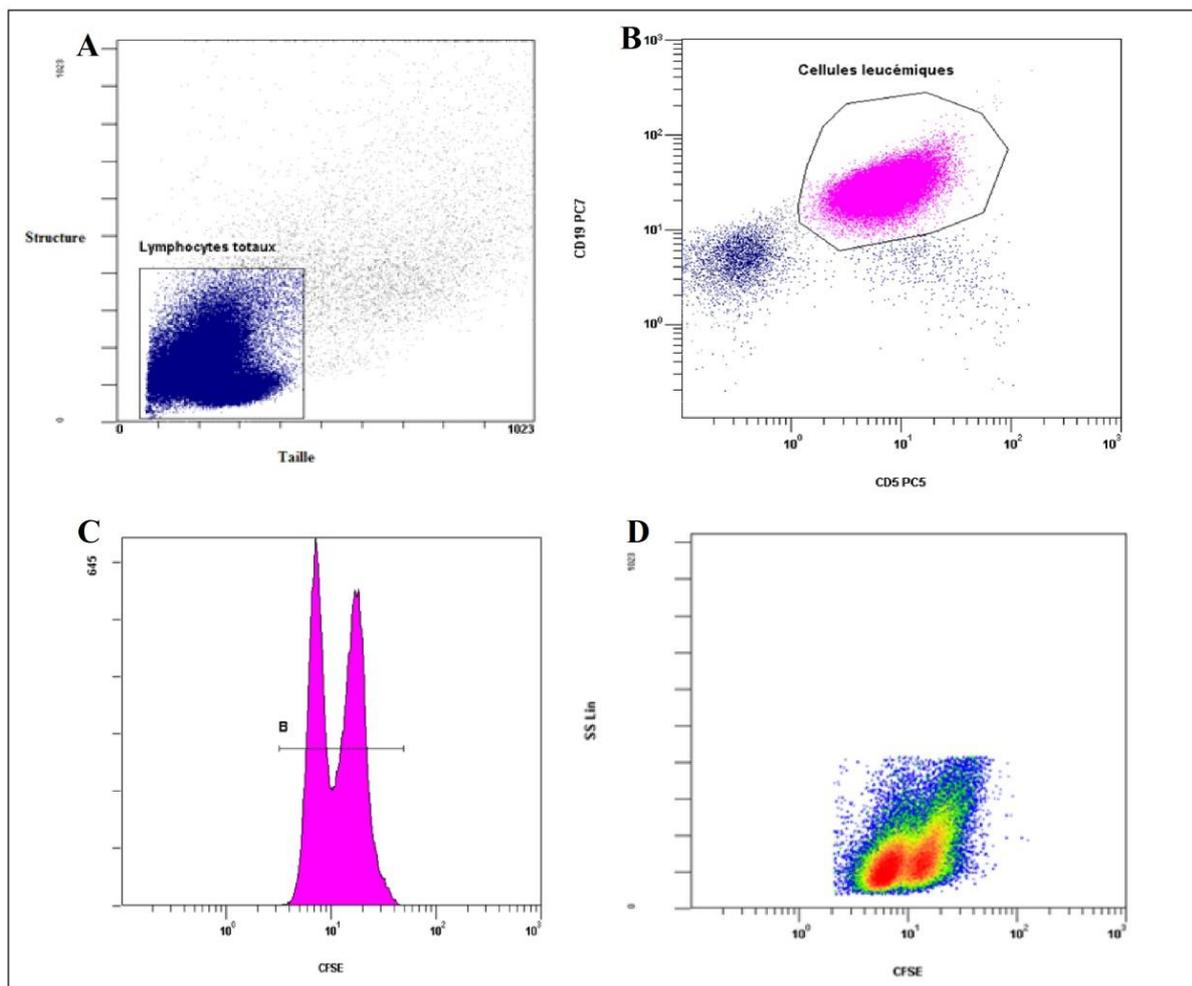


Figure 12 : Exemples d'histogrammes biparamétriques et monoparamétriques utilisés pour l'étude de la prolifération après marquage par le CFSE de suspensions cellulaires stimulées ou non

II.5 - Analyse immunophénotypique des cellules B tumorales stimulées ou non

II.5.1 - Principe

Pour chaque suspension cellulaire tumorale et chaque condition de stimulation, l'expression de CD20, CD52, CD5 et CD19 a été analysée par un quadruple marquage (CD52-PE/CD19-ECD/CD5-PC5/CD20-PC7).

II.5.2 - Matériel

- Centrifugeuse (Thermo Fisher Scientific)
- Cytomètre en flux (FC500, Beckman Coulter)
- Coulter CXP software tetraCXP System

II.5.3 - Réactifs

- PBS1x (Eurobio)
- Paraformaldéhyde (Sigma) 1% en PBS
- Anticorps monoclonaux anti-CD52-PE (Biolegend, San Diego, USA), anti-CD19-ECD, anti-CD5-PC5 et anti-CD20-PC7 (Beckman Coulter).

II.5.4 - Méthode

Après 24h, 48h et 72h de culture, les cellules stimulées ou non avec le PMA, l'Imiquimod R837 ou l'ODN CpG M362 ont été recueillies et lavées une fois avec 2 mL de PBS1X. Ensuite les cellules lavées ont été incubées avec un mélange constitué de 5 µL de chaque anticorps monoclonal pendant 20 minutes à 4°C. Après l'incubation, les cellules ont été lavées une fois en PBS1X. Le surnageant a été éliminé et 500 µL de paraformaldéhyde 1% en PBS ont été ajoutés afin de fixer les cellules. Les cellules marquées ont été analysées en cytométrie en flux.

Les données ont été analysées à l'aide des histogrammes suivants (figure 13) :

- un histogramme biparamétrique Structure/Taille (graphe A) permettant d'identifier les lymphocytes vivants
- un histogramme biparamétrique CD5-PC5/CD19-ECD (graphe B) permettant d'identifier les cellules tumorales au niveau de la population lymphocytaire vivante
- un histogramme monoparamétrique PC7/Count (graphe C) permettant d'analyser l'intensité de fluorescence moyenne du marquage d'intérêt au niveau des cellules leucémiques vivantes

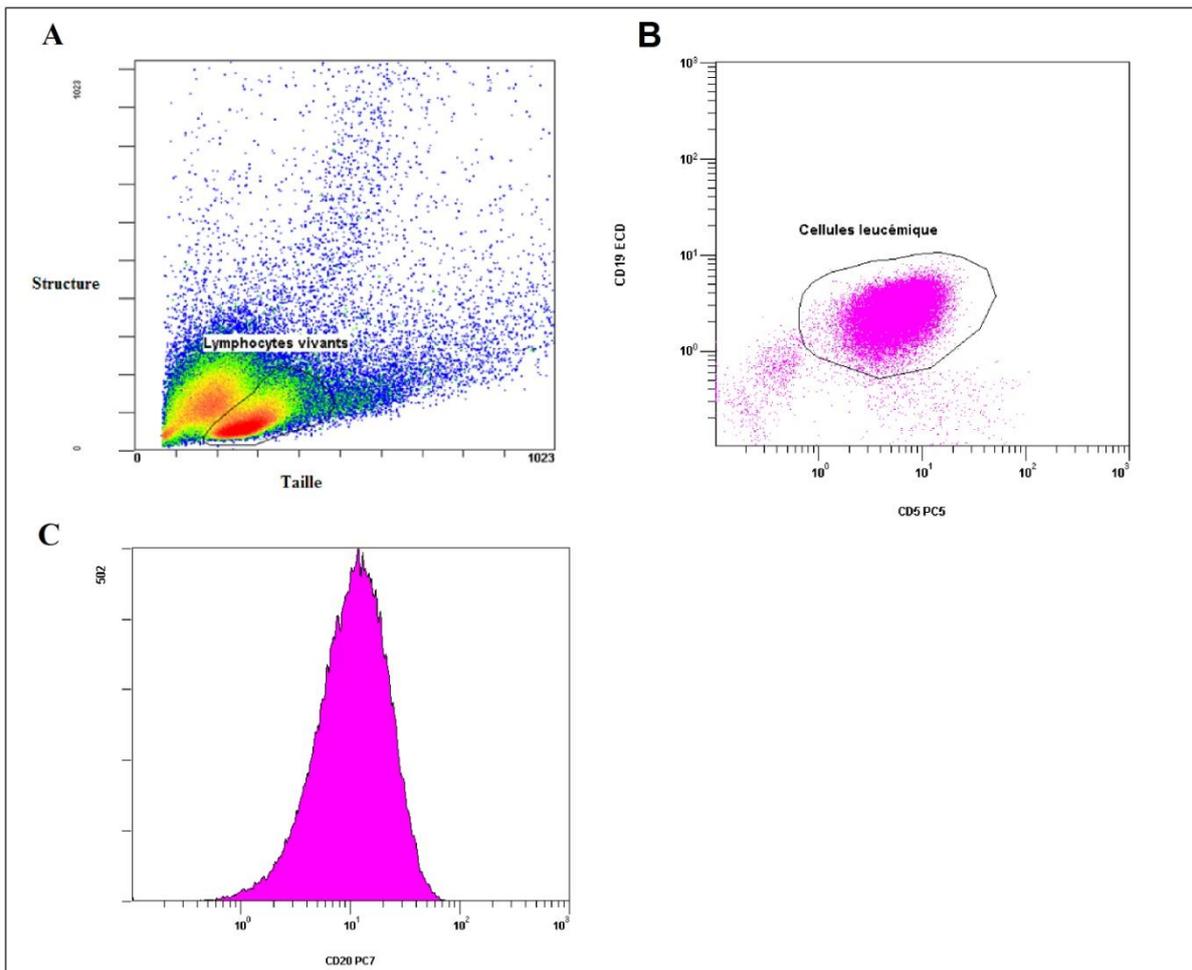


Figure 13 : Exemple d'histogrammes biparamétriques et monoparamétriques utilisés pour l'immunophénotypage des cellules leucémiques

II.6 - Evaluation de la production de cytokines dans les suspensions cellulaires stimulées ou non

II.6.1 - Principe

Le dosage des cytokines IFN- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 et TNF- α dans les surnageants de culture a été réalisé en cytométrie en flux à l'aide de la technique "Flow Cytomix human simplex Kit". Cette méthode permet la quantification des cytokines dans un faible volume d'échantillon (25 μ L) par une technique apparentée à un ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Elle est basée sur l'utilisation de deux types de microbilles de diamètres 4 et 5 μ m comprenant respectivement deux et cinq microbilles d'intensités de fluorescence rouge distinctes : elles sont marquées par le StarfireRedTM dont l'émission est mesurée à 612 nm. Ces microbilles sont recouvertes chacune d'un anticorps de capture dirigé contre une interleukine spécifique, différente pour chaque bille. Ces anticorps capturent les cytokines éventuellement présentes dans le liquide testé. Cette fixation est proportionnelle à la concentration de cytokines et est révélée par un mélange d'anticorps également dirigés contre chacune des cytokines recherchées. Ces anticorps sont couplés à la biotine et sont enfin marqués par la fixation de streptavidine conjuguée à la phycoérythrine (figure 14). Les interleukines mises en évidence peuvent alors être quantifiées grâce à une gamme de titration réalisée avec une série de standards.

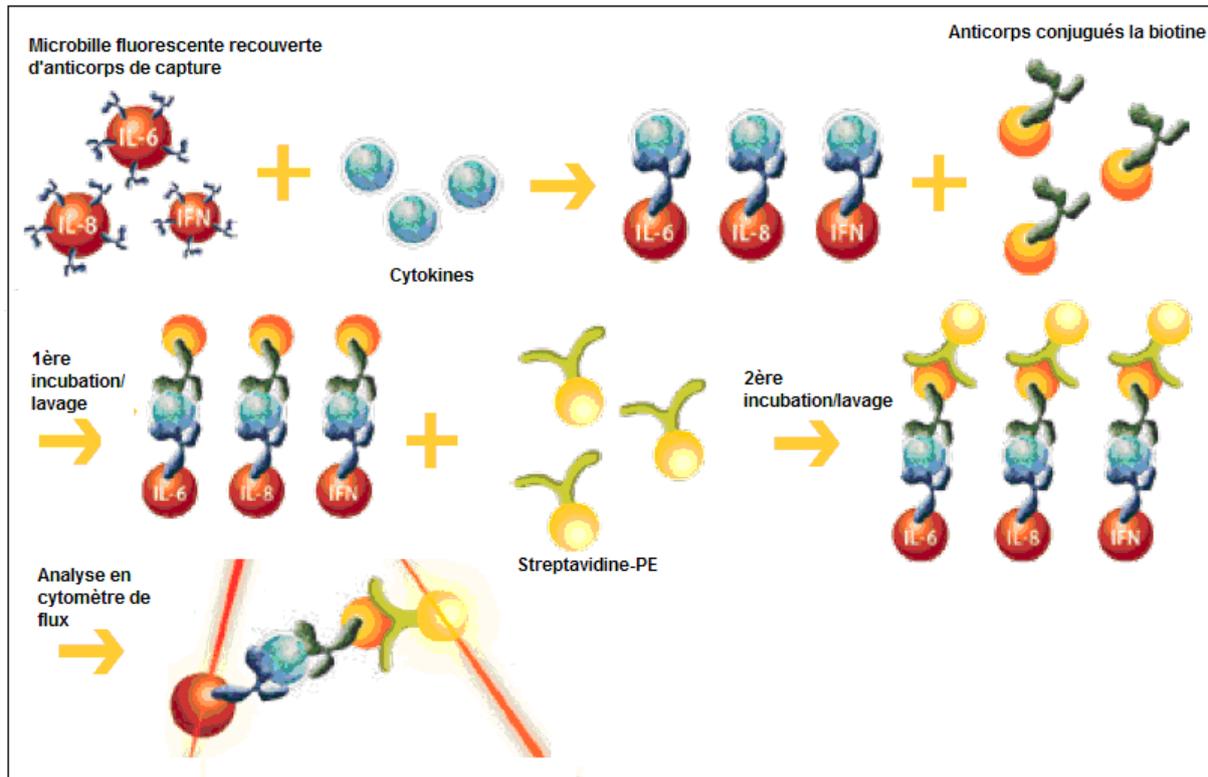


Figure 14 : Représentation schématique du principe de la technique d'évaluation des cytokines par la technologie FlowCytomix (adapté d'eBioscience, <http://www.ebioscience.com/media/pdf/literature/flowcytomix-multiple-analyte-detection-user-guide.pdf>)

II.6.2 - Matériel

- Centrifugeuse (Thermo Fisher Scientific)
- Cytomètre en flux (FC 500, Beckman Coulter)
- Logiciel d'analyse "FlowCytometrix Pro 2.4 Software"

II.6.3 - Réactifs

-Trousse de dosage "FlowCytomix simplex et basic kits" (eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Vienne, Autriche)

II.6.4 - Méthode

Une gamme standard de dilutions est réalisée pour chaque cytokine étudiée. Les gammes de dilutions des cytokines IFN- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12p70 et TNF- α comprenaient 8 points de gamme : 20000 pg/mL, 6666.7 pg/mL, 2222.2 pg/mL, 740.7 pg/mL, 246.9 pg/mL, 82.3 pg/mL, 27.44 pg/mL et 0 pg/mL. La gamme de dilution du standard IL-8 s'étendait de 10000 pg/mL à 0 pg/mL (10000 pg/mL, 3333 pg/mL, 1111.1 pg/mL, 370.4 pg/mL, 123.5 pg/mL, 41.15 pg/mL, 13.7 pg/mL et 0 pg/mL).

Vingt-cinq μ L du mélange de toutes les billes ainsi que 50 μ L du mélange des

conjugués biotine spécifiques de chacune des billes ont été ajoutés à 25 µL de surnageants de culture à doser ou à 25 µL de chaque point de gamme. Ces mélanges ont été incubés deux heures à température ambiante et à l'obscurité avant d'être lavés 2 fois avec 1 mL de tampon 1x et centrifugés à 200 g pendant 5 minutes. Cinquante µL de streptavidine-PE ont ensuite été ajoutés au culot. Le mélange a été incubé une heure à température ambiante puis rincé à nouveau 2 fois avec 1 mL de tampon 1x. Après élimination du surnageant, 500 µL de tampon 1x ont été ajoutés et les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à l'analyse par cytométrie en flux.

Un exemple des histogrammes générés par cytométrie en flux est présenté sur la figure15.

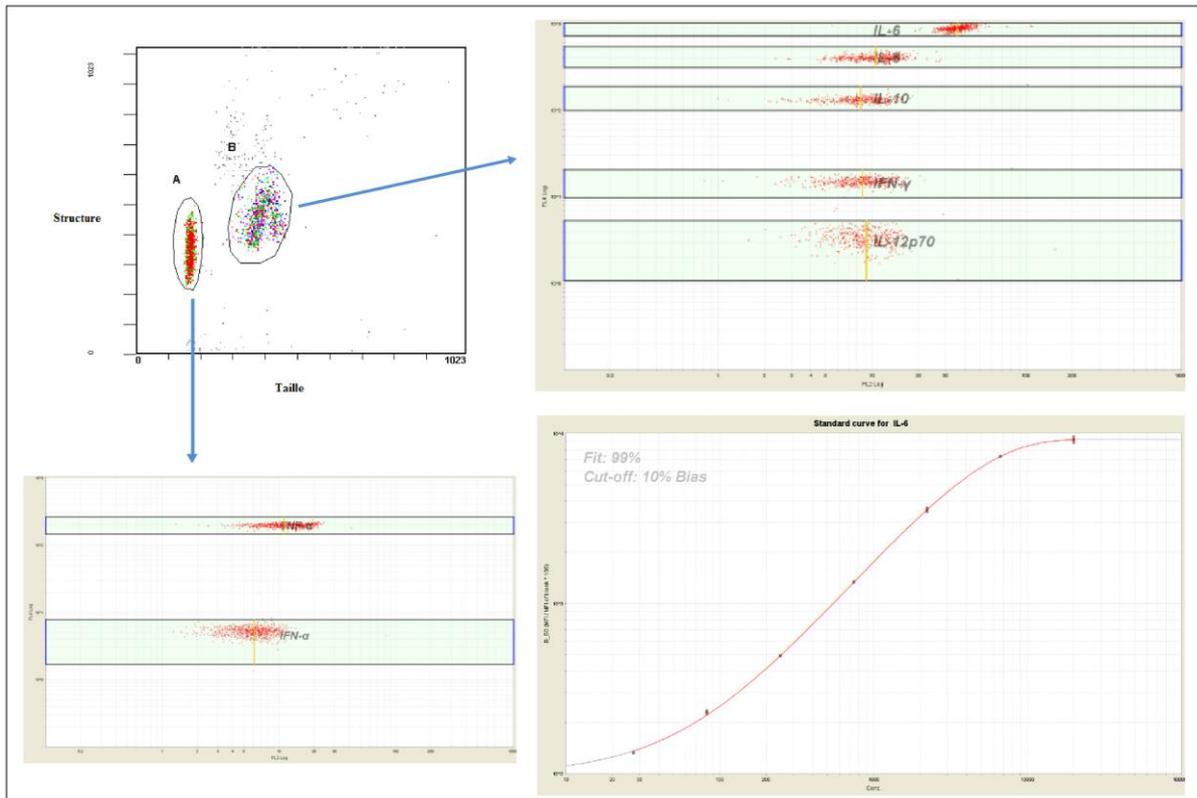


Figure 15 : Exemple d'histogramme biparamétrique utilisé pour discriminer les deux populations de billes utilisées pour le dosage des cytokines dans les surnageants de culture des suspensions cellulaires stimulées ou non
 Les fenêtres A et B englobent respectivement les microbilles de diamètres 5 et 4 μm . Les microbilles B permettent de doser 5 cytokines, et les microbilles A, 2 cytokines. La dernière image montre une courbe standard de dosage de l'IL-6.

II. 7 - Etude des voies de signalisation

Pour étudier les voies de signalisation impliquées lors de la stimulation de TLR-7 via l'Imiquimod et de TLR-9 via ODN CpG M362, les protéines des cellules cultivées dans chaque condition ont été extraites, dosées et analysées en dot-antibody-array.

II.7.1 - Extraction des protéines

L'extraction des protéines a été réalisée à l'aide du réactif d'extraction "PhosphosafeTM extraction reagent" (Novagen, Nottingham, UK).

II.7.1.1 - Principe

Ce réactif peut extraire efficacement les protéines solubles de cellules de mammifères et d'insectes en préservant leur état de phosphorylation. Il comprend quatre inhibiteurs de phosphatases: fluorure de sodium, vanadate de sodium, β -glycérophosphate et pyrophosphate de sodium. Il est compatible avec les dosages de phosphokinases ou l'analyse d'interactions protéiques.

II.7.1.2 - Matériel

- Minicentrifugeuse (Eppendorf AG, Allemagne)
- Eppendorff (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne)

II.7.1.3 - Réactif

-Réactif d'extraction "Phosphosafe™ extraction reagent" (Novagen, EMD Chemicals Inc, San Diego, Etats-Unis)

II.7.1.4 - Méthode

A J1, J2 et J3, les suspensions cellulaires ont été recueillies dans des eppendorfs, puis centrifugées à 300g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé, puis les cellules ont été incubées avec 100 µL de réactif d'extraction à température ambiante pendant 5 minutes. Après une seconde centrifugation à 16000g à 4°C pendant 5 minutes, les surnageants ont été recueillis et placés au congélateur à -80°C.

II.7.2 - Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Bradford (acide bicinchonique (BCA) protein assay kit, Thermo Scientific).

II.7.2.1 - Principe

La méthode BCA est un dosage colorimétrique et quantitatif des protéines, basé sur l'acide bicinchonique. Les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu⁺⁺ en Cu⁺ en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique et sensible pour le Cu⁺, qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562nm, pouvant être mesurée entre 540 et 590nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration en protéines. Les concentrations protéiques sont généralement rapportées par référence à des protéines classiques comme la sérumalbumine bovine (BSA). Une gamme de BSA a ainsi été réalisée, avec une gamme de concentrations de 0µg/mL à 2000µg/mL permettant de réaliser une courbe standard. Le kit utilisé contient deux réactifs. Le réactif A contient le BCA en milieu alcalin et le réactif B contient du sulfate de cuivre à 4% et la BSA standard.

II.7.2.2 - Matériel

- Plaques de 96 puits (Nunc-Immuno™ plate, Danemark)
- Lecteur Elisa (Multiskan EX, Labsystems, Finlande)
- Incubateur 37°C (Sanyo)

II.7.2.3 - Réactif

- Pierce BCA Protein assay kit (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, USA)

II.7.2.4 - Méthode

La manipulation a été réalisée selon les instructions du fournisseur. Dans un premier temps, la gamme de BSA a été préparée, puis 10µL de chaque échantillon et de chaque point de gamme ont été déposés en duplicate dans des plaques de 96 puits. Ensuite 200µL du mélange des réactifs A et B a été ajoutés dans chaque puits, et les plaques incubées à 37°C pendant 30 minutes. Après retour à température ambiante, les plaques sont été lues au spectrophotomètre à 550nm.

II.7.3 - Evaluation de l'expression des phosphoprotéines

Les phosphoprotéines impliquées dans les signaux de prolifération et l'apoptose ont été quantifiées par une technique d'antibody-array (kits chez RD Systems). Une confirmation par Western-blot a été de plus effectuée pour certaines d'entre elles.

II.7.3.1 - Timbres antibody-array

II.7.3.1.1 - Principe

Cette technique est également apparentée à un ELISA. Des anticorps de capture dirigés chacun contre une phosphoprotéine spécifique et un contrôle positif sont déposés en duplicate par le fabricant sur des membranes de nitrocellulose. Ces anticorps capturent les phosphoprotéines éventuellement présentes dans les extraits protéiques testés. Cette fixation est proportionnelle à la concentration de phosphoprotéines et est révélée par un cocktail d'anticorps, conjugués à la biotine, également dirigés contre chacune des phosphoprotéines recherchées puis par un marquage avec de la streptavidine. Enfin le réactif de détection de chimioluminescence est appliqué. Les phosphoprotéines mises en évidence peuvent alors être quantifiées en densitométrie.

II.7.3.1.2 - Matériel

- Agitateur (HeidolphPolymax, Allemagne)
- LAS-4000 Imager (FSVT, Courbevoie, France)
- Logiciel d'analyse (Multi Gauge, LifeScienceFujiFilm, France)
- Boîte d'incubation de volume 8x11cm (MultiGuard, BioScience, Inc)

II.7.3.1.3 - Réactifs

- Kit "Human Phospho-Kinase Array Kit" (RD Systems, Minneapolis, USA)
- Kit "Human Apoptosis Array Kit" (RD Systems)
- PBS (Eurobio)
- Eau distillée

-Substrat “SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate” (Thermo Scientific)

II.7.3.1.4 - Méthode

Les membranes sur lesquelles sont déposés les anticorps de capture et le contrôle positif sont tout d’abord saturées avec un tampon de blocage. Les membranes sont ensuite incubées dans les extraits protéiques repris dans un volume de 1 ou 1.5 mL sur un agitateur à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, ces membranes sont lavées avec le tampon de lavage sur un agitateur, puis incubées avec le cocktail d'anticorps conjugués à la biotine dilués au 1/50 ou 1/100 à température ambiante pendant une ou deux heures. Après lavage, les membranes sont incubées avec 1 ou 2 mL de Streptavidine-HRP diluée au 1/2000, à température ambiante et à l’obscurité pendant 30 minutes. Enfin, après lavage, la fixation de la HRP est révélée par l’addition du substrat « Super Signal », dégradé lorsque l’enzyme est présente de manière à générer une chimioluminescence mesurée dans un LAS-4000 Imager. L’acquisition et l’analyse quantitative des signaux ont été réalisées à l’aide du LAS-4000 Imager et du logiciel Multi-Gauge.

II.7.3.2 - Western Blot

II.7.3.2.1 - Principe

Les protéines dénaturées sont séparées selon leur masse par l’électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis ces protéines sont transférées sur une membrane de PVDF. Les membranes sont ensuite incubées avec un anticorps primaire, dirigé contre une protéine spécifique. La fixation de cet anticorps est proportionnelle à la concentration des protéines reconnues et est révélée par un deuxième anticorps, conjugué à de la peroxydase de raifort (horse radish peroxidase, HRP), dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire. Enfin, les réactifs de détection de chimioluminescence sont appliqués pour la révélation (figure 16). Les protéines mises en évidence peuvent alors être quantifiées en densitométrie.

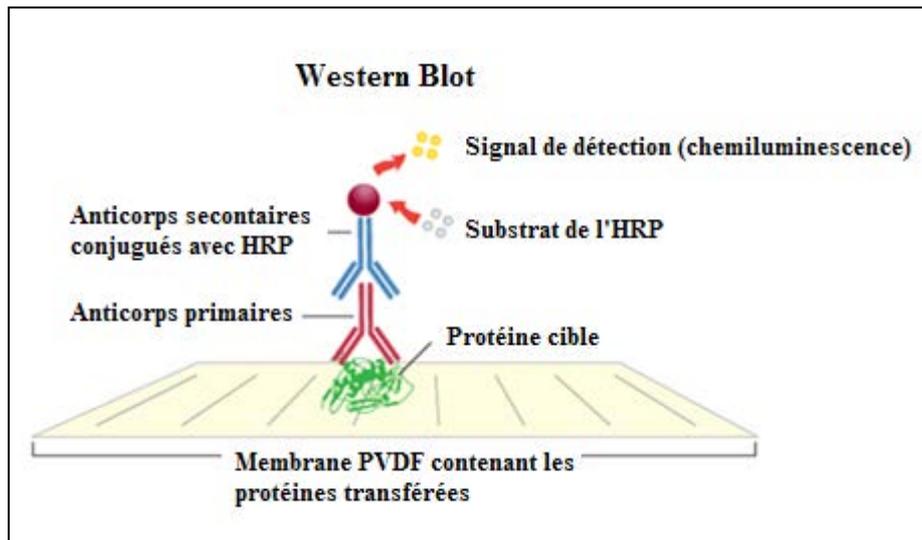


Figure 16 : Principe du Western Blot (adapté de http://www.leinco.com/general_wb)

II.7.3.2.2 - Matériel

- Criterion XT Bis-Tris Gel 4-12% (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Membrane PVDF (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France)
- Cuve d'électrophorèse (Bio-Rad)
- Bain marie (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Allemagne)
- Réchauffeur de blocs (Stuart Barloworld Scientific Ltd, Stone, Staffs, Angleterre)

II.7.3.2.3 - Réactifs

- Tampon d'échantillon (Bio-Rad)
- MOPS 20X (Bio-rad)
- Marqueur de masse moléculaire (Precision plus protein Dual color Standard, Bio-Rad)
- Tampon de transfert 10X (Bio-Rad)
- TBS 10X (Bio-Rad)
- Tween-20 (Bio-Rad)
- Lait écrémé (Bio-Rad)
- Anticorps primaires : anticorps anti-phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204), anticorps anti-ERK totale, anticorps anti-phosphoAKT(Ser473), anticorps anti-AKT totale, anticorps anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), anticorps anti-caspase 3, anticorps anti- β actine (Cell Signaling, Danvers, USA)
- Anticorps secondaires: anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin, anticorps de cheval anti-immunoglobulines de rat (Cell Signaling)
- Substrat "SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate" (Thermo

Scientific)

-Tampon de Stripping: 38g Tris+ 100g SDS + 35 mL beta mercaptoethanol qsp 1L d'eau distillée

II.7.3.2.4 - Méthode

-Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés de manière à ajuster leur concentration par dilution dans le réactif d'extraction des protéines, puis un volume de bleu de bromophénol 5x pour quatre volumes d'échantillons a été ajouté avant de dénaturer les protéines par chauffage 5 minutes à 95°C.

-Électrophorèse sur gel

Quarante μL de chaque échantillon et 10 μL de marqueurs de masse moléculaire ont été déposés au sommet des gels, dans les cupules réservées à cet effet. La migration électrophorétique a été réalisée dans 1L de tampon de migration pendant 1h30 à 110V.

-Transfert sur membrane

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par les anticorps, elles sont transférées depuis le gel sur une membrane de PVDF. Les membranes de PVDF sont activées dans un volume de 30mL de méthanol avant utilisation. Chaque membrane est ensuite placée face-à-face avec le gel correspondant et l'électrotransfert est effectué à 90V pendant une heure dans 1.5 L de tampon de transfert. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane et s'y fixent de manière permanente.

-Blocage

Pour éliminer la fixation non spécifique des protéines que constituent les anticorps sur la membrane, il est nécessaire de bloquer les sites de fixation protéique non occupés par les protéines transférées. Après le transfert, les membranes sont ainsi lavées 3 fois en tampon TBST, puis bloquées dans un volume de 40mL de lait à 5% en TBST pendant deux heures à température ambiante.

-Anticorps primaires

Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps primaires anti-phosphoprotéines dilués au 1/1000 dans 5% de lait en TBST pendant une nuit à +4°C.

-Anticorps secondaires

Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois afin d'enlever les anticorps primaires non fixés, puis incubées avec le deuxième anticorps dilué au 1/2000 dans 5% de lait en TBST pendant une heure à température ambiante.

-Détection par chimioluminescence

Les membranes sont lavées pour éliminer les anticorps secondaires non fixés, et incubées avec les réactifs de détection de chimioluminescence pour la révélation. Une évaluation quantitative est réalisée par densitométrie. L'acquisition et l'analyse quantitative des signaux ont été réalisées à l'aide du LAS-4000 Imager et du logiciel Multi-Gauge.

-Réutilisation des membranes

Après la révélation, les membranes sont lavées 3 fois pour enlever le révélateur et déshydratées dans un tampon de stripping à 65°C pendant 20 minutes au bain-marie pour éliminer les anticorps fixés. Ceci permet la réutilisation des membranes pour une révélation avec d'autres anticorps car les protéines transférées restent sur la membrane. Ainsi, des incubations complémentaires ont été réalisées avec les anticorps anti-protéine totale ou avec le contrôle anti- β actine.

II.8 - Analyse du statut mutationnel d'IgVH (manipulations réalisées par le laboratoire de C Ferrand)

L'ADN génomique a été isolé de PBMC purifiés. Une amplification génique de la région "framework" (FR) I du segment VDJ (variable/diversité/jonction) de gènes des chaînes lourdes d'immunoglobuline a été réalisée avec des primers VH et des primers consensus de JH selon le protocole Biomed-2 et les guides de recommandation d'ERIC (Langerak, Davi et al. 2011). Les produits de PCR, identifiés après analyse en GeneMapper et électrophorèse hétéroduplex en gel d'acrylamide ont été purifiés sur colonne Qiagen puis directement séquencés ou clonés (TA cloning pGEMT-easy vector, Promega, Charbonnières, France). Pour les amplicons clonés, l'ADN plasmique a été extrait d'au moins 3 colonies bactériennes. Un séquençage bidirectionnel a été exécuté avec les primers universels M13 en utilisant le kit Big Dye terminator Cycle v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf). Les séquences ont été alignées sur les séquences germline publiées en utilisant la base VBASE2 (Retter, Althaus et al. 2005) et/ou les bases de données International ImMunoGenetics (IMGT/GeneInfo) (Baum, Pasqual et al. 2004).

Le statut mutationnel a été calculé comme étant le pourcentage de déviation de la séquence de l'échantillon par rapport au segment VH germline le plus proche. Les séquences présentant 98 % ou plus d'homologie avec le segment germline le plus proche ont été considérées comme non mutées.

II.9 - Evaluation de l'apoptose, de la prolifération et des modifications immunophénotypiques sur les cellules Daudi exprimant CD5

La lignée cellulaire DAUDI est une lignée lymphoblastoïde B originaire d'un lymphome de Burkitt exprimant CD19⁺. Nous avons traité des cellules DAUDI transfectées pour exprimer le gène CD5 comme les cellules de LLC. Ces cellules ne partagent cependant avec les cellules de LLC que cette expression de CD5 et leur caractère lymphoïde B dont la présence de TLR-7 et TLR-9. Leur sensibilité aux ligands de ces TLR a donc été explorée.

III - ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les études statistiques de ce travail ont été réalisées à l'aide du logiciel SigmaPlot11 software (Systat Software, San Jose, CA, USA). La normalité de la distribution des résultats a été testée par le test de Shapiro-Wilk.

Les résultats de l'apoptose et de la sécrétion de cytokines sont présentés en moyenne±ES. Les résultats de CFSE (prolifération) et d'immunophénotypage ont été normalisés en fonction des puits-témoin négatif du premier jour de mesure puis présentés en moyenne±ES. Les résultats de l'expression de TLRs sont présentés en moyenne±ES des ratios de MFI des TLRs par rapport au contrôle isotypique.

Les résultats de l'analyse des phosphoprotéines des voies de prolifération et de l'apoptose en antibody-array ont été normalisés sur le témoin négatif de chaque membrane et rapportés à la quantité de protéines testée, puis présentés en médiane et range. Les résultats de l'analyse des phosphoprotéines en Western Blot ont été ajustés à la quantité de protéines totales testées ou normalisés sur le signal de β -actine de l'échantillon correspondant, puis présentés en médiane et range.

La corrélation entre les deux façons d'évaluer l'apoptose (TUNEL et changement morphologique évalué en cytométrie) a été réalisée par le test de Pearson.

Les autres comparaisons ont été réalisées par des tests T de Student appariés ou non ($p < 0.05$) ou, en l'absence de distribution normale, par un test de Wilcoxon ($p < 0.05$) ou de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Tous les graphes ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism5 (San Diego, Californie, USA).

RESULTATS

I - CARACTERISTIQUES DES DEUX GROUPES DE PATIENTS

Ce travail a porté sur un total de 40 patients atteints de LLC (cf. tableaux 5 et 6). Les caractéristiques cliniques au moment du prélèvement étaient celles d'une LLC stable pour 22 patients, celles d'une forme agressive pour 18 patients. Les caractéristiques de chaque groupe sont présentées dans le tableau 8. L'âge des patients, et les pourcentages de lymphocytes B normaux n'étaient pas différents entre les deux groupes. Comme attendu, le temps de doublement était essentiellement supérieur à un an chez les patients stables et inférieur à un an pour les LLC agressives. Les patients avec une forme agressive avaient plus de cellules leucémiques et les patients stables avaient plus de lymphocytes T normaux.

Tableau 8 Caractéristiques des patients

	LLC Stable (n=22)	LLC Agressive (n=18)
Sex (M/F)	8/14	13/5
Age (an)	47-83 (67.2±2.6)	51-88 (69.0±2.3)
Muté/Non muté (n=35)	13/4 (5 inconnu)	5/13
Binet Stade	A	20
	B	1
	C	1
Durée de la maladie (années)	1-18 (5.9±0.9)	1-18 (6.2±1.0)
CD38 [±] (n=38)	4/17	7/10
TD </> 1 an (n=39)	3/18	12/6
% de B tumoraux	64.4-99.2 (86.9±1.8)	72.9-99.9 (92.2±2.0)
% de T normaux	0.8-21.2 (8.1±1.2)	0.1-23.8 (4.6±1.6)
% de B normaux	0-11.7 (2.6±0.7)	0-13.8 (2.8±0.8)

“Durée”, “Age” et “ % de cellules leucémiques, T et B ” sont représentées par le range (moyenne ±erreur standard(ES)), CD38⁺ : CD38% ≥ 20%, TD : temps de doublement, M : masculin, F : féminin.

II - ETUDE DE L' APOPTOSE

L'apoptose des lymphocytes B tumoraux stimulés ou non a été étudiée par la méthode TUNEL et par les modifications de diffraction de la lumière en cytométrie en flux.

II.1 - Evaluation de l'apoptose par la méthode TUNEL

La méthode TUNEL a été appliquée à 8 patients stables dont deux présentaient une forme non mutée. La stimulation par Imiquimod (IMQ) a été étudiée chez ces patients.

Les résultats présentés sur la figure 17 montrent que la culture des cellules en milieu seul est suivie d'une augmentation progressive de la proportion de cellules apoptotiques ($30.2 \pm 6.9\%$, $54.7 \pm 9.4\%$ et $63.7 \pm 8.9\%$ à J1, J2 et J3).

A l'inverse, la stimulation avec $5 \mu\text{g/L}$ de PMA induit une protection significative ($p \leq 0.005$) contre l'apoptose. Les cellules des puits PMA présentent des taux stables et bas d'apoptose respectivement de $10.0 \pm 2.9\%$, $11.6 \pm 2.7\%$ et $16.0 \pm 3.9\%$ à J1, J2 et J3.

L'IMQ $5 \mu\text{g/mL}$, qui correspond à la dose la plus faible d'IMQ, induit une légère protection contre l'apoptose dès J2 par rapport au contrôle négatif, avec des différences respectives de 2.8% et 1.4% après 2 et 3 jours de culture.

Par contre, la stimulation par l'IMQ à 10 et $20 \mu\text{g/mL}$ induit une apoptose rapide et importante, avec une différence significative par rapport au contrôle négatif pour l'IMQ $20 \mu\text{g/mL}$ ($p \leq 0.004$), la dose plus forte. Cette induction d'apoptose est temps- et dose-dépendante. La stimulation avec $20 \mu\text{g/mL}$ d'IMQ conduit à des taux de cellules apoptotiques de $61.1 \pm 11.0\%$ à J1 et $86.9 \pm 4.7\%$ à J3.

Le statut mutationnel entraîne par ailleurs une meilleure résistance à l'apoptose des cellules non mutées stimulées par IMQ chez les deux patients cliniquement stables présentant ce statut mutationnel.

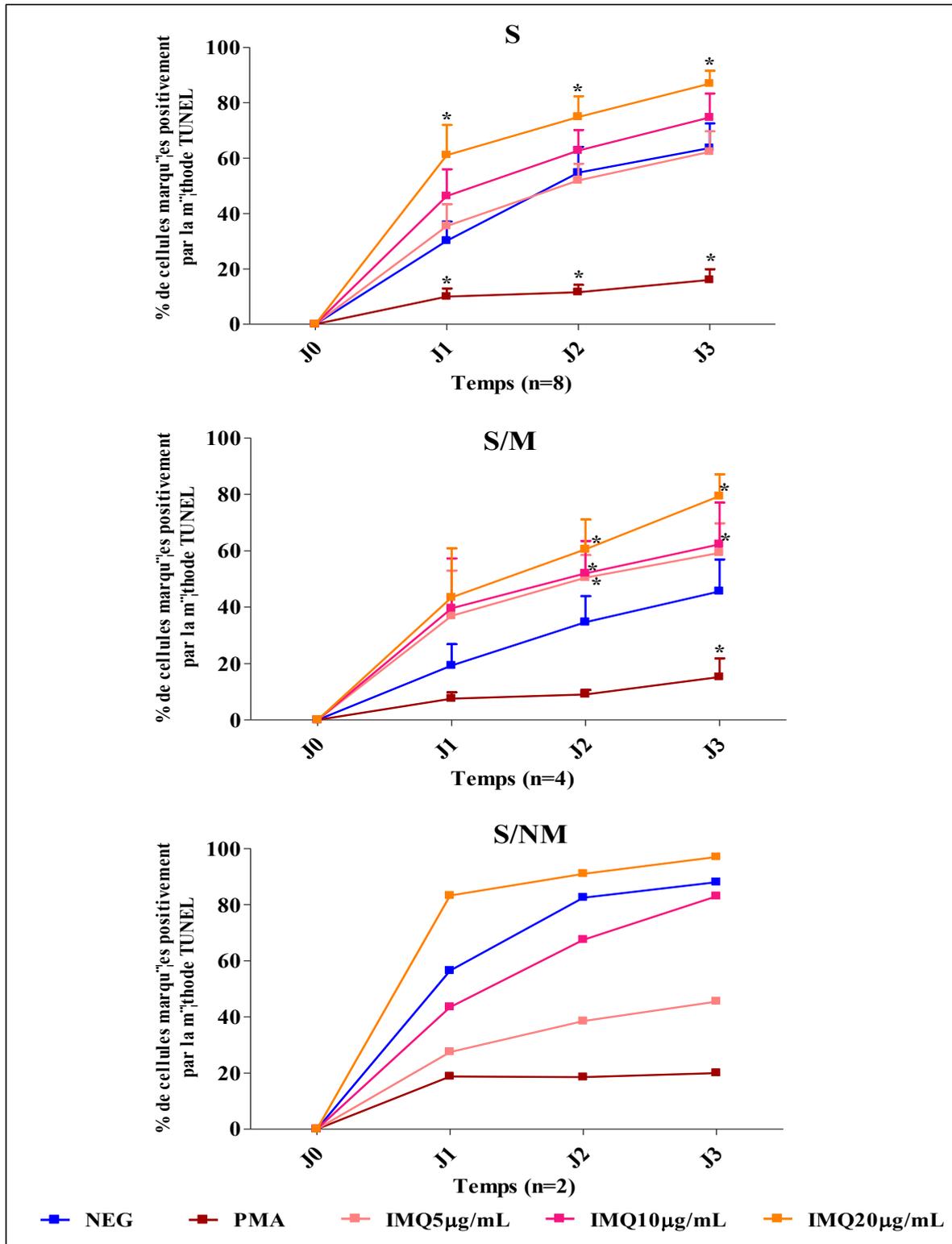


Figure 17 : Analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL dans les lymphocytes B tumoraux stimulés ou non avec du PMA ou avec l'Imiquimod R 837

Les cellules B de LLC stimulées ou non pendant 24, 48, et 72 heures avec 5 µg/L de PMA ou avec 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837 ont été incubées avec des anticorps CD45-ECD, CD5-PC5 et CD19-PC7 avant d'être marquées par la méthode TUNEL. Elles ont ensuite été analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne (±ES) de pourcentage de cellules leucémiques TUNEL positives (TUNEL⁺CD45⁺CD5⁺CD19⁺).

"S" : Stable, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressif/Non muté.

* p < 0.05 versus témoin du même jour.

A titre de contrôle de la technique, il a été vérifié que l'IMQ n'induit pas l'apoptose des lymphocytes T et B normaux également présents dans ces échantillons. Ces cellules sont respectivement $CD5^+/CD19^-$ et $CD5^-/CD19^+$ (figure 18, graphes B et C).

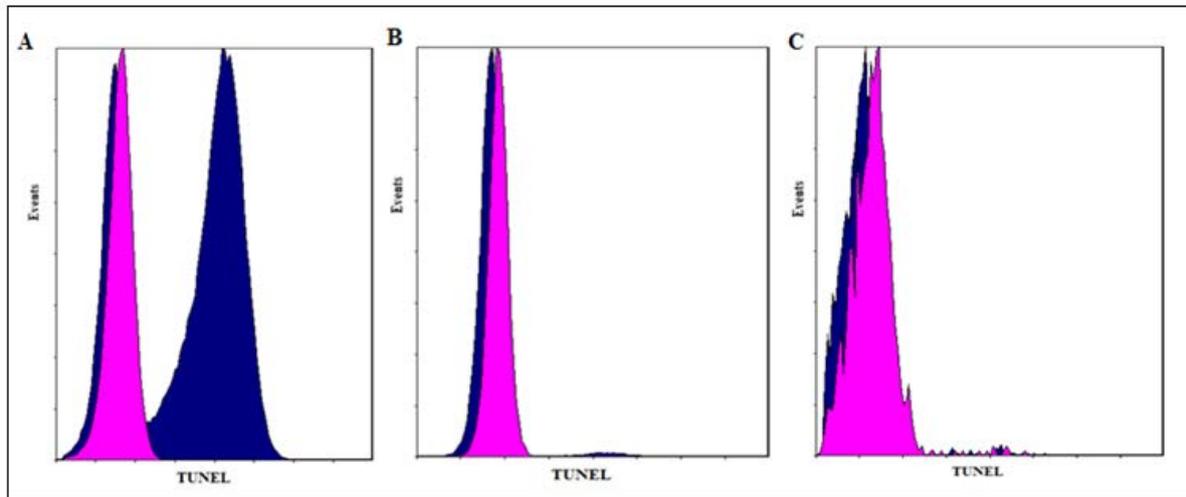


Figure 18 : Apoptose (pics bleu foncé) évaluée par la méthode TUNEL au niveau des cellules leucémiques (A), des lymphocytes T normaux (B) et des lymphocytes B normaux (C)

Les lymphocytes B tumoraux stimulés avec l'IMQ $20\mu\text{g/mL}$ après 24 heures de culture ont été incubés avec des anticorps CD45-ECD, CD5-PC5 et CD19-PC7 avant d'être marqués par la méthode TUNEL. Le contrôle négatif de la méthode TUNEL est représenté en rose et les cellules marquées pour l'antigène membranaire et la fluorescence nucléaire TUNEL sont représentées en bleu. (A) : cellules leucémiques ($CD45^+CD5^+CD19^-$); (B) : lymphocytes T normaux ($CD45^+CD5^-CD19^+$); (C) : lymphocytes B normaux ($CD45^-CD5^+CD19^+$).

II.2 - Corrélation entre la mesure de l'apoptose par TUNEL et par les variations de diffraction de la lumière en cytométrie en flux

Lors des phases précoces de l'apoptose, la condensation nucléaire induit une augmentation de la granularité que se traduit par une augmentation du Side Scatter (SSC). Parallèlement, on observe une réduction de la taille de la cellule qui se traduit par une diminution du Forward Scatter (FSC). Sur les listmodes de cytométrie des 8 patients inclus dans l'étude de TUNEL, les modifications de diffraction de la lumière ont été relevées sur un scattergramme SSC/FSC en isolant la population présentant des critères d'apoptose. Ceci a été effectué pour tous les points et toutes les conditions (120 points de mesure). Les valeurs obtenues ont été comparées aux pourcentages de cellules marquées par méthode TUNEL. La figure 19 montre que ces deux méthodes d'évaluation de l'apoptose sont fortement corrélées.

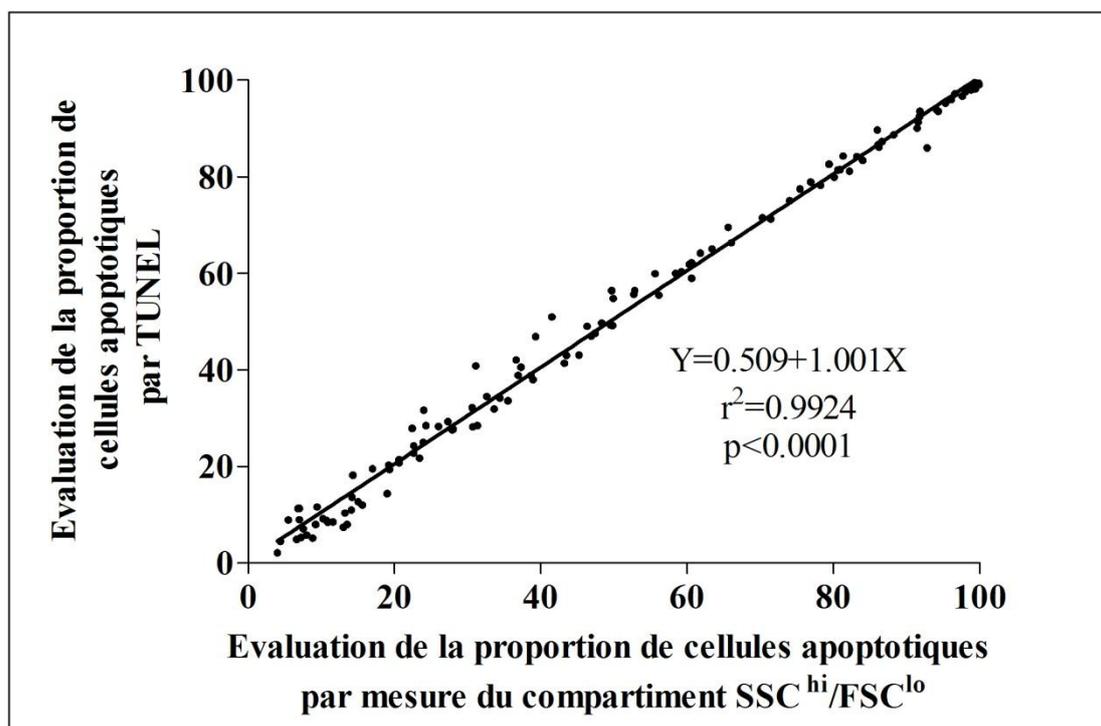


Figure 19 : Corrélation entre les valeurs d'apoptose obtenues par méthode TUNEL ou en fonction des variations de diffraction

Les cellules B de LLC-B stimulées ou non pendant 24, 48, et 72 heures avec 5 µg/L de PMA ou avec 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'Imiquimod R837 ont été marquées par la méthode TUNEL et analysées par cytométrie en flux. L'évaluation de l'apoptose est mesurée par le pourcentage de cellules TUNEL⁺ ou de cellules SSC^{hi}/FSC^{lo} parmi les cellules leucémiques (CD45⁺CD5⁺CD19⁺).

II.3 - Evaluation de l'apoptose par les modifications de diffraction de la lumière en cytométrie en flux

La démonstration d'une excellente corrélation entre la méthode TUNEL et l'évaluation de la population SSC^{hi}/FSC^{lo} a permis de réaliser une analyse comparative de l'apoptose induite par stimulation PMA, ODN ou IMQ pour 21 patients testés en cytométrie en flux pour ces trois types de stimulation avec trois doses de chaque ligand de TLR sur trois jours selon le même protocole de cytométrie. Les listmodes des différentes conditions de stimulation ont été repris pour mesurer la proportion de cellules en apoptose. Les résultats ont été analysés en tenant compte de la forme clinique et/ou du statut mutationnel des patients. La subdivision des patients selon l'évolution clinique et le statut mutationnel retrouve 11 patients avec une forme stable, 10 patients avec une forme agressive, 10 patients avec un statut IGVH muté et 9 patients avec un statut IGVH non muté. Ces patients ont été divisés en quatre sous-populations supplémentaires : "Stable/Muté" (S/M) (n=6), "Stable/Non muté"(S/NM) (n=3), "Agressif/Muté" (A/M) (n=4) et "Agressif/ Non muté" (A/NM) (n=6).

Les résultats sont présentés sur la figure 20.

II.3.1 - Apoptose chez les patients stables

Les taux d'apoptose pour les cellules des puits-témoin de ces 11 patients sont respectivement de $35.5 \pm 5.2\%$, $46.9 \pm 6.3\%$ et $53.5 \pm 7.3\%$ à J1, J2 et J3.

La stimulation avec $5 \mu\text{g/L}$ de PMA induit une protection contre l'apoptose chez les 11 patients, avec une différence significative par rapport au contrôle négatif ($p \leq 0.001$). Les cellules des puits PMA présentent des taux d'apoptose respectivement de $14.4 \pm 2.5\%$, $14.5 \pm 2.7\%$ et $19.9 \pm 3.1\%$ à J1, J2 et J3.

L'ODN protège contre l'apoptose, avec une différence significative par rapport au contrôle négatif à J1 pour l'ODN $1.0 \mu\text{M}$ ($p=0.03$), de façon dose-dépendante. Chez 7 patients, il existait une diminution de l'apoptose alors qu'elle était identique au contrôle négatif chez deux patients et supérieure chez les deux derniers.

L'IMQ induit une apoptose importante, de façon dose- et temps-dépendante, avec une différence significative à J3 pour IMQ $10 \mu\text{g/mL}$ ($p=0.036$) et IMQ $20 \mu\text{g/mL}$ ($p=0.022$) par rapport au puits contrôle. L'IMQ induisait une augmentation de l'apoptose chez 9 patients. Une protection contre l'apoptose a été observée pour un patient, dont le statut mutationnel est non muté. Le taux d'apoptose était presque identique à celui observé pour le contrôle négatif pour un patient dont le temps de doublement était inférieur à un an et dont les cellules tumorales exprimaient CD38.

II.3.2 - Apoptose chez les patients avec une forme agressive

Les taux d'apoptose pour les cellules des puits-témoin de ces 10 patients sont respectivement de $32.0 \pm 5.5\%$, $42.5 \pm 5.5\%$ et $47.5 \pm 5.9\%$ à J1, J2 et J3, légèrement plus faible que pour les patients stables.

La stimulation avec $5 \mu\text{g/L}$ de PMA induit une protection contre l'apoptose chez tous les patients, de façon significative par rapport au contrôle négatif ($p \leq 0.001$). Les cellules des puits PMA présentent des taux d'apoptose respectivement de $14.6 \pm 2.8\%$, $20.5 \pm 3.4\%$ et $25.6 \pm 4.6\%$ à J1, J2 et J3.

L'ODN induit une protection contre l'apoptose chez tous les patients, de façon dose dépendante, avec une différence significative par rapport au contrôle négatif aux trois jours de culture et pour les trois doses d'ODN ($p \leq 0.002$). L'ODN induit chez ces patients une inhibition d'apoptose pratiquement aussi importante que le PMA.

La stimulation par IMQ modifie peu le taux d'apoptose par rapport au contrôle négatif chez ces patients.

La comparaison entre les patients stables et agressifs montre des taux d'apoptose

similaires dans les puits-contrôle sans stimulation. La protection contre l'apoptose conférée par l'ODN est significativement plus importante chez les patients avec une forme agressive ($p < 0.04$). A l'inverse, l'IMQ induit une apoptose plus importante chez les patients stables mais la différence n'est pas significative.

II.3.3 - Apoptose et statut mutationnel

Bien que ces deux groupes ne soient pas strictement superposables, l'analyse des résultats de la mesure l'apoptose en fonction du statut mutationnel donne des résultats quasiment identiques à ceux des patients stables pour les patients mutés. De même, les observations sont similaires en regroupant les patients non mutés ou agressifs.

Le PMA protège contre l'apoptose chez tous les patients.

L'ODN protège contre l'apoptose, de façon dose-dépendante, et de manière plus importante chez les patients non mutés. Cet effet est observé chez les 9 patients non mutés ($p \leq 0.002$), mais seulement chez 7 patients mutés.

L'IMQ induit une apoptose significativement plus importante que dans le puits témoin chez les patients mutés dès J2 ($p < 0.05$), et de façon dose- et temps-dépendante. Cet effet est surtout marqué chez 7 des 10 patients. Chez les patients non mutés, l'IMQ n'induit aucune différence significative d'apoptose par rapport au puits témoin.

La comparaison entre les patients mutés et non mutés montre des taux d'apoptose similaires dans les puits-contrôle sans stimulation. La protection contre l'apoptose conférée par l'ODN est significativement plus importante chez les patients non mutés à J3 ($p < 0.04$). A l'inverse, l'IMQ induit une apoptose plus importante chez les patients mutés mais la différence n'est pas significative.

Les variations des pourcentages de cellules apoptotiques par rapport au puits témoin (sans stimulation) en fonction des stimuli et du statut des patients sont montrées dans le tableau 9.

II.3.4 - Apoptose, forme clinique et statut mutationnel

L'apoptose induite par l'IMQ était la plus nette chez les patients "S/M", pour lesquels la protection contre l'apoptose induite par l'ODN n'était pas visible. A l'inverse, chez les patients "A/NM", l'IMQ n'a presque pas d'effet alors que l'ODN protège efficacement contre l'apoptose.

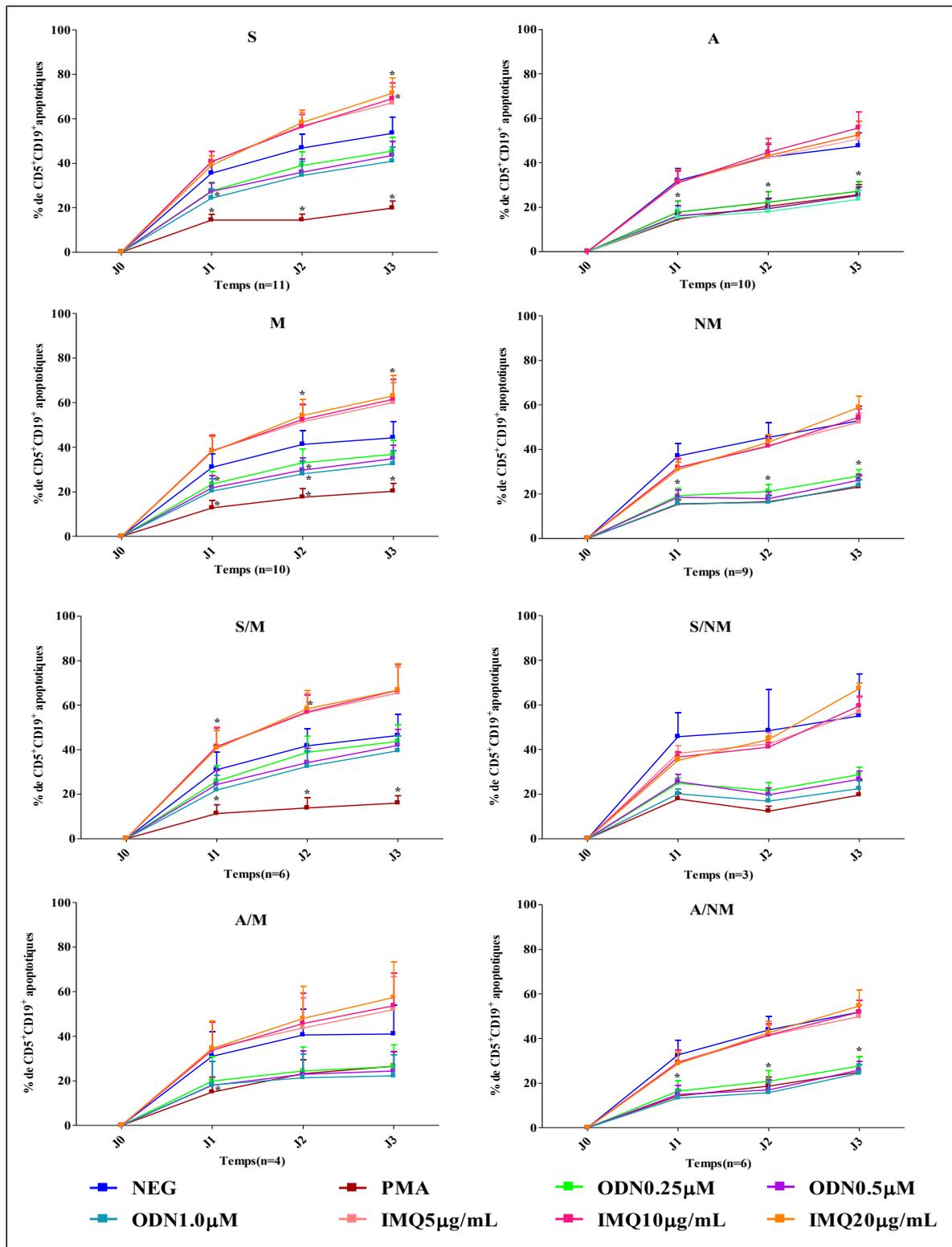


Figure 20 : Apoptose dans les différents groupes de patients

Les lymphocytes B tumoraux de LLC stimulés ou non pendant 24, 48, et 72 heures avec 5 µg/L de PMA, 0.25µM, 0.5µM ou 1.0µM d'ODNM362 ou avec 5 µg/mL, 10 µg/mL ou 20 µg/mL d'Imiquimod R837 ont été marqués par des anticorps CD52-PE, CD5-PC5, CD19-ECD et CD20-PC7. L'apoptose a été évaluée par mesure de la population SSC^{hi}FSC^{lo} dans la population leucémique (CD5⁺CD19⁺) dans les différents groupes de patients.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "/M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

*p < 0.05 versus témoin non stimulé du même jour.

Tableau 9 Variations des pourcentages de cellules apoptotiques par rapport au puits témoin (sans stimulation) en fonction des stimuli et du statut des patients

	LLC stable	LLC agressive	LLC mutée	LLC non mutée
PMA				
J1	-21.1%	-17.4%	-18.3%	-21.6%
J2	-32.4%	-22.1%	-23.7%	-28.9%
J3	-33.6%	-21.9%	-24.0%	-29.8%
ODN 0,25µM				
J1	-7.9%	-14.2%	-7.6%	-17.8%
J2	-7.8%	-20.3%	-8.2%	-24.3%
J3	-8.0%	-20.3%	-7.4%	-24.8%
ODN 0,5µM				
J1	-8.2%	-15.8%	-9.2%	-18.5%
J2	-10.9%	-23.2%	-11.6%	-27.5%
J3	-10.0%	-22.2%	-9.4%	-26.8%
ODN 1µM				
J1	-11.2%	-16.7%	-10.6%	-21.4%
J2	-12.4%	-24.5%	-13.2%	-29.2%
J3	-12.6%	-24.0%	-11.7%	-29.1%
IMQ 5µg/mL				
J1	+5.2%	-0.9%	+7.5%	-5.1%
J2	+10.0%	-0.2%	+10.2%	-3.6%
J3	+13.7%	+3.2%	+15.8%	-0.7%
IMQ 10µg/mL				
J1	+5.2%	-0.9%	+7.3%	-5.2%
J2	+9.5%	+0.7%	+11.2%	-4.0%
J3	+15.6%	+5.0%	+17.2%	+1.5%
IMQ 20µg/mL				
J1	+3.5%	-1.1%	+7.1%	-6.2%
J2	+11.5%	+2.2%	+12.9%	-2.1%
J3	+18.0%	+8.2%	+18.8%	+5.9%

III - ETUDE DE LA PROLIFERATION

La prolifération des lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par le PMA, ODN ou IMQ a été évaluée en mesurant l'évolution de la moyenne de fluorescence (MFI) du marquage CFSE des cellules à J0. Cette étude a inclus 32 patients, dont 30 pour lesquels le statut mutationnel a été testé. La subdivision des patients selon l'évolution clinique et le statut mutationnel retrouve 14 patients avec une forme stable, 18 patients avec une forme agressive, 14 patients avec un statut IGVH muté et 16 patients avec un statut IGVH non muté. Ces patients ont été divisés en quatre sous-populations supplémentaires : "S/M" (n=9), "S/NM" (n=3), "A/M" (n=5) et "A/NM" (n=13). Les résultats des analyses sont présentés sur la figure 21.

III.1 - Prolifération en fonction du statut clinique

Chez les patients stables, après 2 et 3 jours de culture, on peut observer une diminution significative de la MFI du CFSE des lymphocytes B tumoraux stimulés avec le PMA

($p \leq 0.001$), par rapport au témoin sans stimulation, ce qui indique une prolifération de ces cellules. Cette diminution est temps-dépendante. De la même façon, les ODN induisent une légère prolifération des lymphocytes B tumoraux après 72 heures de culture ($p < 0.02$ pour l'ODN 0.5 et 1.0 μM par rapport au témoin sans stimulation), de façon dose- et temps-dépendante. La MFI du CFSE des lymphocytes B tumoraux après stimulation par l'IMQ était à l'inverse plus importante que les témoins.

Chez les patients avec une forme agressive, on observe une légère diminution de la MFI du CFSE dans les témoins avec le temps, ce qui suggère une prolifération spontanée des lymphocytes B tumoraux non stimulés. Le PMA induit une prolifération significative dès J2 ($p \leq 0.005$), par rapport au témoin sans stimulation, de façon temps-dépendante. De la même façon, les ODN induisent une légère prolifération dès J2, la différence étant significative à J3 ($p < 0.02$). Cet effet est dose- et temps-dépendant. La MFI du CFSE des lymphocytes B tumoraux après stimulation par l'IMQ était également plus importante que dans les puits témoins pour ces patients.

La comparaison entre les deux sous-populations de patients indique que l'ODN induit une prolifération plus importante chez les patients ayant une forme agressive bien que la différence ne soit pas statistiquement significative.

III.2 - Prolifération chez les patients mutés et non mutés

Comme pour l'apoptose, les résultats de la prolifération pour les patients mutés et non mutés sont assez superposables à ceux des patients avec une forme stable ou agressive respectivement.

Le PMA induit une prolifération significative pour les deux types de patients après 2 et 3 jours de culture, par rapport au témoin sans stimulation ($p < 0.007$), de façon temps-dépendante.

Les ODN induisent une légère prolifération des lymphocytes B tumoraux après 72 heures de culture ($p = 0.02$ pour l'ODN 1.0 μM) de façon dose- et temps-dépendante, chez les patients mutés.

Chez les patients non mutés, on observe une prolifération spontanée et les ODN induisent une prolifération statistiquement significative à J3 ($p < 0.008$), de façon dose- et temps-dépendante.

La MFI du CFSE des lymphocytes B tumoraux après stimulation par l'IMQ était plus importante que dans les puits témoins pour les deux types de patients.

La prolifération induite par l'ODN était plus nette chez les patients "A/NM".

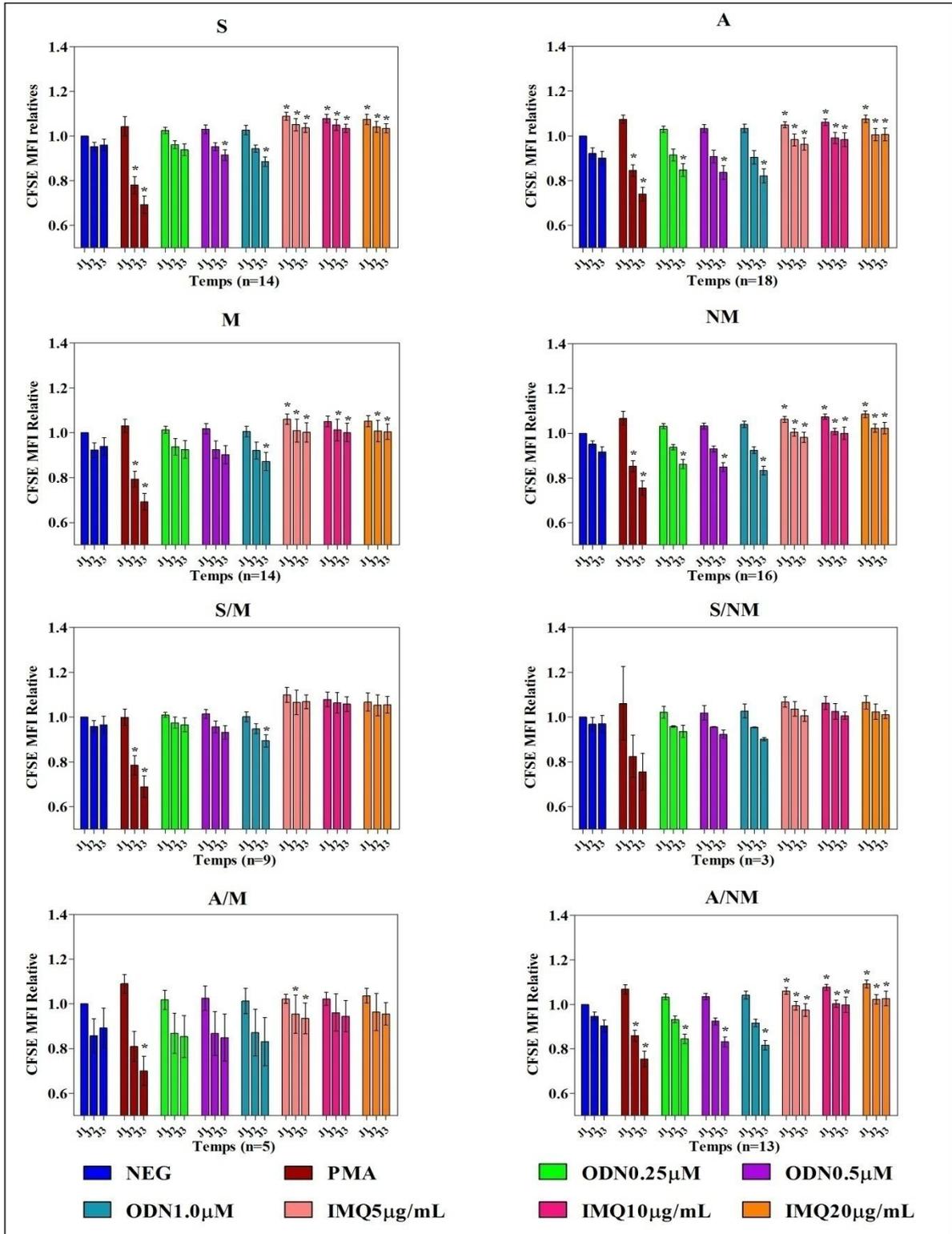


Figure 21 : Etude de la prolifération des cellules B tumorales stimulées ou non avec du PMA, de l'ODN ou avec l'imiquimod R837 dans les différents groupes de patients

Les cellules de LLC-B marquées par le CFSE ont été incubées avec du milieu de culture seul (NEG), avec 5 μg/L de PMA, avec 0.25μM, 0.5μM ou 1.0μM d'ODN ou avec 5 μg/mL, 10 μg/mL, 20 μg/mL d'Imiquimod R837. La fluorescence du CFSE a été mesurée par cytométrie en flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en ratios des moyennes de MFI du CFSE (±ES) par rapport à l'expression basale de NEGJ1.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

*p < 0.05 versus témoin.

IV - ETUDE IMMUNOPHENOTYPIQUE

Les marqueurs CD20, CD52, CD19 et CD5 ont été étudiés par cytométrie en flux sur les cellules B tumorales stimulées ou non. Cette partie de l'étude a porté sur 21 patients dont le statut mutationnel IgVH était connu pour 19. Il y avait ainsi 11 patients avec une forme stable, 10 patients avec une forme agressive, 10 patients avec un statut muté et 9 patients avec un statut non muté. Ces patients ont été divisés en quatre sous-populations supplémentaires : "S/M" (n=6), "S/NM" (n=3), "A/M" (n=4) et "A/NM" (n=6). Les résultats des analyses immunophénotypiques sont présentés sur les figures 22, 23, 24 et 25.

IV.1 - Expression de CD20 (figure 22)

L'expression de CD20 des cellules cultivées sans stimulation (puits témoin) diminue avec le temps, surtout chez les patients avec une forme agressive et non mutés. L'IMQ et l'ODN évitent la down-modulation de CD20. L'ODN induit une augmentation visible de l'expression de CD20 après 48 heures de culture, surtout chez les patients stables et mutés, de façon temps-dépendante. A J3, l'expression de CD20 présente une augmentation significative après stimulation avec 0.25 μ M d'ODN, environ 2.77 et 2.47 fois de la valeur du témoin chez les patients stables et mutés, respectivement ($p \leq 0.001$ et $p = 0.0011$), et environ 2.0 et 2.2 fois chez les patients avec une forme agressive et non mutés, respectivement ($p = 0.002$ et $p = 0.0022$). L'IMQ induit une légère augmentation de l'expression de CD20 après 72 heures de culture, d'environ 1.5 fois la valeur du témoin pour les cellules stimulées avec 5 μ g/mL d'IMQ par rapport au témoin dans les quatre groupes de patients ($p \leq 0.001$, stable ; $p = 0.012$, agressif ; $p = 0.0081$, muté ; $p = 0.0094$, non muté).

Au sein des quatre sous-populations, l'ODN et l'IMQ induisent l'augmentation de CD20 la plus forte dans les formes de type "S/M".

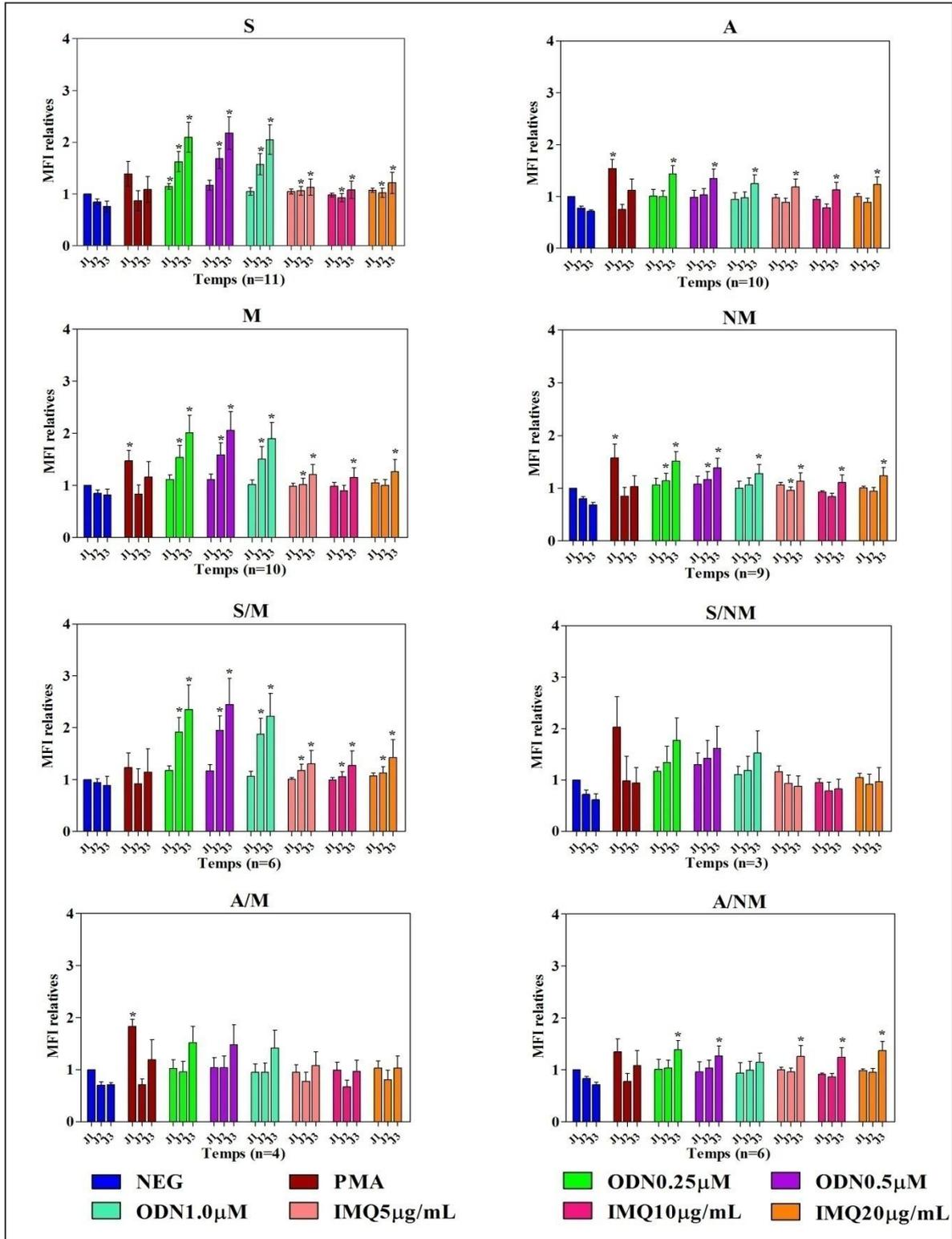


Figure 22 : Expression de CD20 sur des cellules B de LLC stimulées ou non par PMA, ODN ou IMQ

Les cellules de LLC ont été incubées avec du milieu de culture seul (NEG), avec 5 µg/L de PMA, avec 0.25µM, 0.5µM, 1.0µM d'ODN M362(ODN), ou avec 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'Imiquimod R837(IMQ). L'expression de CD20 a été mesurée par cytométrie en flux à J1, J2 et J3 dans les différents groupes de patients. Les résultats sont exprimés en moyennes (±ES) des ratios de MFI par rapport à l'expression basale de NEGJ1.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

*p < 0.05 versus témoin du même jour.

IV.2 - Expression de CD52 (figure 23)

L'expression de CD52 sur les cellules du puits témoin diminue avec le temps chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutée. La stimulation avec le PMA induit une diminution de l'expression de CD52 dans tous les groupes de patients sauf à J3. L'ODN et l'IMQ induisent une diminution significative de l'expression de CD52 dans tous les groupes de patients dès J1, de façon plus importante chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutés. A J1, l'expression de CD52 présente une diminution significative après stimulation avec 0.25 μ M d'ODN, d'environ 0.75 fois de la valeur du témoin chez les patients stables ($p \leq 0.001$) et mutés ($p = 0.007$), et d'environ 0.50 fois chez les patients avec une forme agressive ($p \leq 0.001$) et/ou non mutées ($p < 0.001$).

Après stimulation par l'IMQ, l'expression de CD52 diminue à environ 0.80 fois la valeur du témoin pour les cellules stimulées avec 5 μ g/mL d'IMQ chez les patients stables et/ou mutés, et environ 0.70 fois la valeur du témoin chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutée.

Cette diminution induite par l'ODN et l'IMQ est plus importante chez les patients ayant une forme "A/NM". A l'inverse, pour les patients avec une forme "S/M", l'expression de CD52 augmente avec le temps et est quasiment identique à celle des cellules du puits témoin après 72 heures de culture en présence d'ODN.

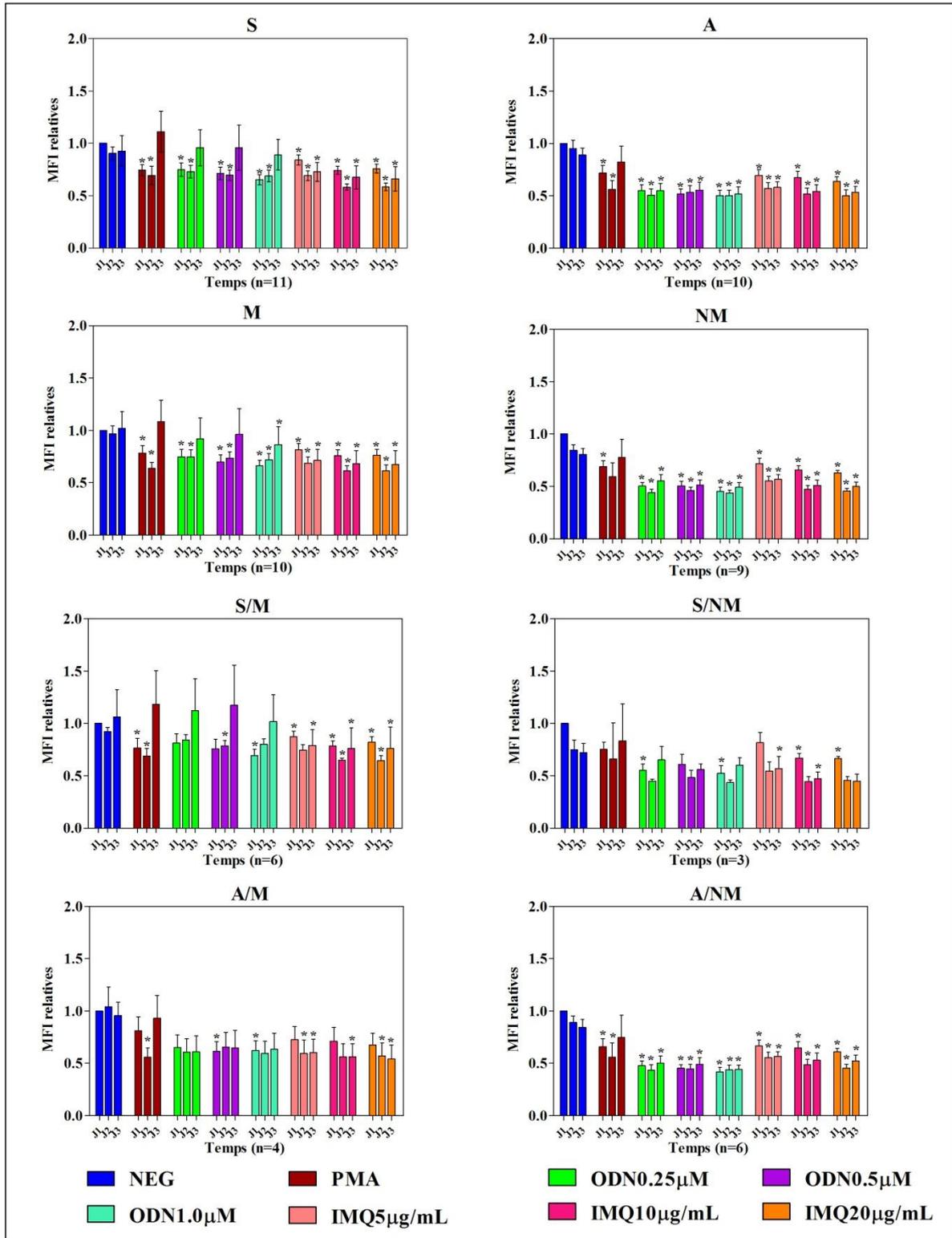


Figure 23 : Expression de CD52 sur des cellules B de LLC stimulées ou non par PMA, ODN ou IMQ

Les cellules de LLC-B ont été incubées avec du milieu de culture seul (NEG), avec 5 µg/L de PMA, avec 0.25µM, 0.5µM, 1.0µM d'ODN M362(ODN) ou avec 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'Imiquimod R837(IMQ). L'expression de CD52 a été mesurée par cytométrie en flux à J1, J2 et J3 dans les différents groupes de patients. Les résultats sont exprimés en moyennes (±ES) des ratios de MFI par rapport à l'expression basale de NEGJ1.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

* p < 0.05 versus témoin du même jour.

IV.3 - Expression de CD19 (figure 24)

L'expression de CD19 sur les cellules du puits témoin diminue chez les patients stables et/ou mutés, mais est presque inchangée chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutée en fonction du temps. Cette expression est augmentée significativement par le PMA dans tous les groupes de patients, jusqu'à environ 3 fois la valeur du témoin chez les patients stables et/ou mutés et 2.3 fois la valeur du témoin chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutée, à J3. Cette variation est progressive au cours du temps. Il existe également une augmentation significative de l'expression de CD19 après stimulation par l'ODN, aux trois doses, de façon temps-dépendante dans tous les groupes de patients. L'ODN augmente l'expression de CD19 significativement dès J1 chez les patients avec une forme stable et/ou mutée, jusqu'à environ 1.60 fois la valeur du témoin à J3. Par contre l'ODN augmente significativement l'expression de CD19 à partir de J2 seulement chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutée, jusqu'à environ 1.50 fois la valeur du témoin à J3. L'IMQ n'a pas cet effet et induit plutôt une diminution de l'expression de CD19 chez les patients stables et/ou mutés, de façon temps-dépendante. Cette diminution induite par l'IMQ était la plus nette chez les patients de statut "S/M".

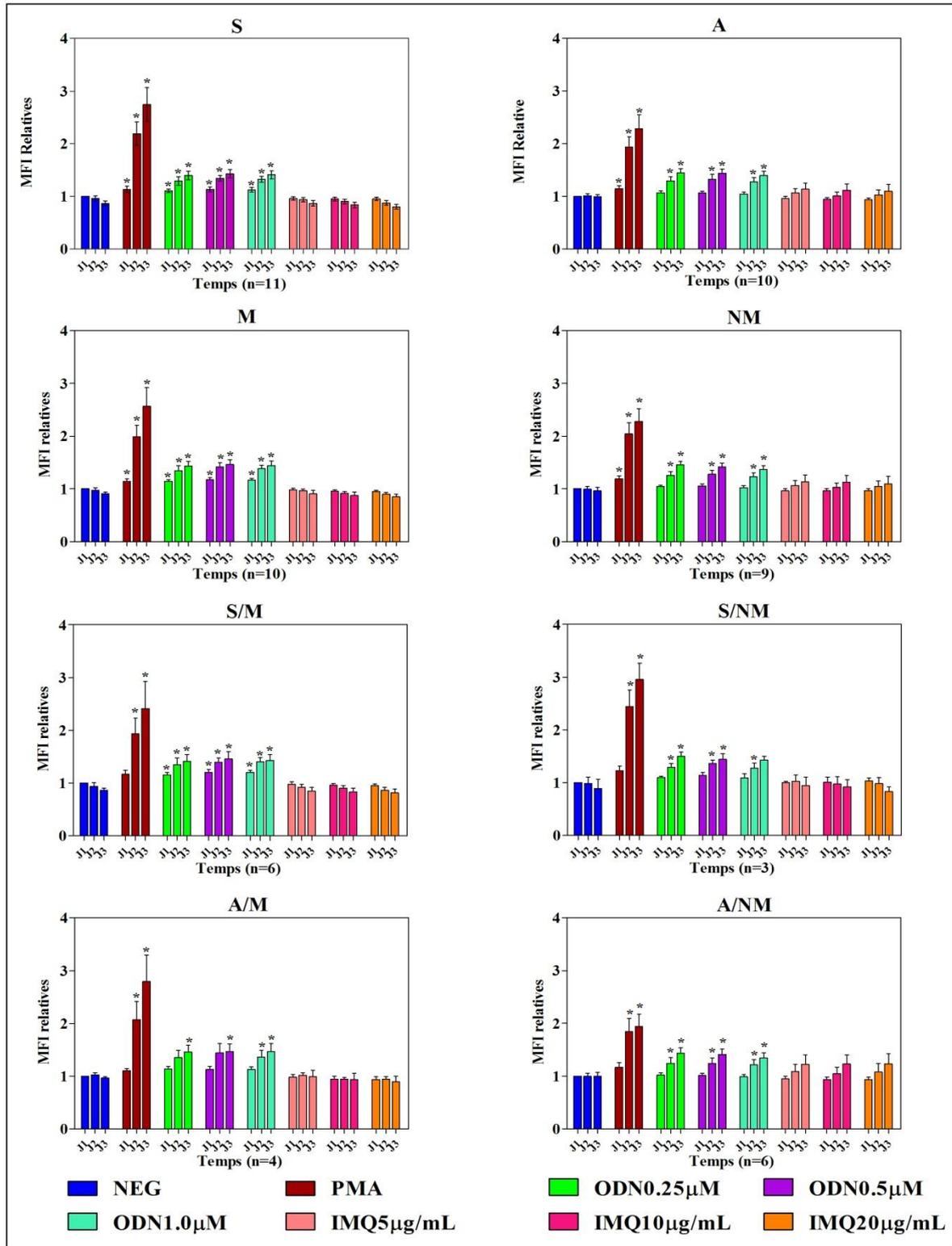


Figure 24 : Expression de CD19 sur des cellules B de LLC stimulées ou non par PMA, ODN ou IMQ

Les cellules de LLC-B ont été incubées avec du milieu de culture seul (NEG), avec 5 µg/L de PMA, avec 0.25µM, 0.5µM, 1.0µM d'ODN M362(ODN), ou avec 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'Imiquimod R837(IMQ). L'expression de CD19 a été mesurée par cytométrie en flux à J1, J2 et J3 dans les différents groupes de patients. Les résultats sont exprimés en moyennes (±ES) des ratios de MFI par rapport à l'expression basale de NEGJ1.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

*p < 0.05 versus témoin du même jour.

IV.4 - Expression de CD5 (figure 25)

La stimulation avec le PMA induit une augmentation significative de l'expression de CD5 dans tous les groupes de patients dès J1, jusqu'à respectivement environ 3.8 et 3.3 fois la valeur du témoin chez les patients avec une forme stable ou agressive à J3, et 2.8 et 4.2 fois la valeur du témoin chez les patients mutés ou non mutés à J3. Cette augmentation est temps-dépendante. L'ODN induit à l'inverse une diminution de l'expression CD5, de façon temps-dépendante, plus importante chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutée. Son expression après la stimulation avec l'ODN 1.0µM pendant 3 jours était d'environ 0.85 fois la valeur du témoin chez les patients stables et/ou mutés, et de 0.66 fois de la valeur du témoin chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutée. L'IMQ induit également une diminution significative de l'expression de CD5, de façon temps-dépendante. La diminution induite par l'ODN et l'IMQ était la plus nette chez les patients avec un statut "A/NM".

En conclusion, l'ODN et l'IMQ induisent plutôt une augmentation de l'expression de CD20, surtout chez les patients stables et/ou mutés, et en particulier chez ceux combinant ces deux statuts. Il en va de même pour CD19 mais seulement avec l'ODN. A l'inverse, la stimulation par ODN ou IMQ induit une diminution de l'expression de CD52 et CD5, surtout chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutée, et essentiellement lorsqu'ils combinent ces deux statuts.

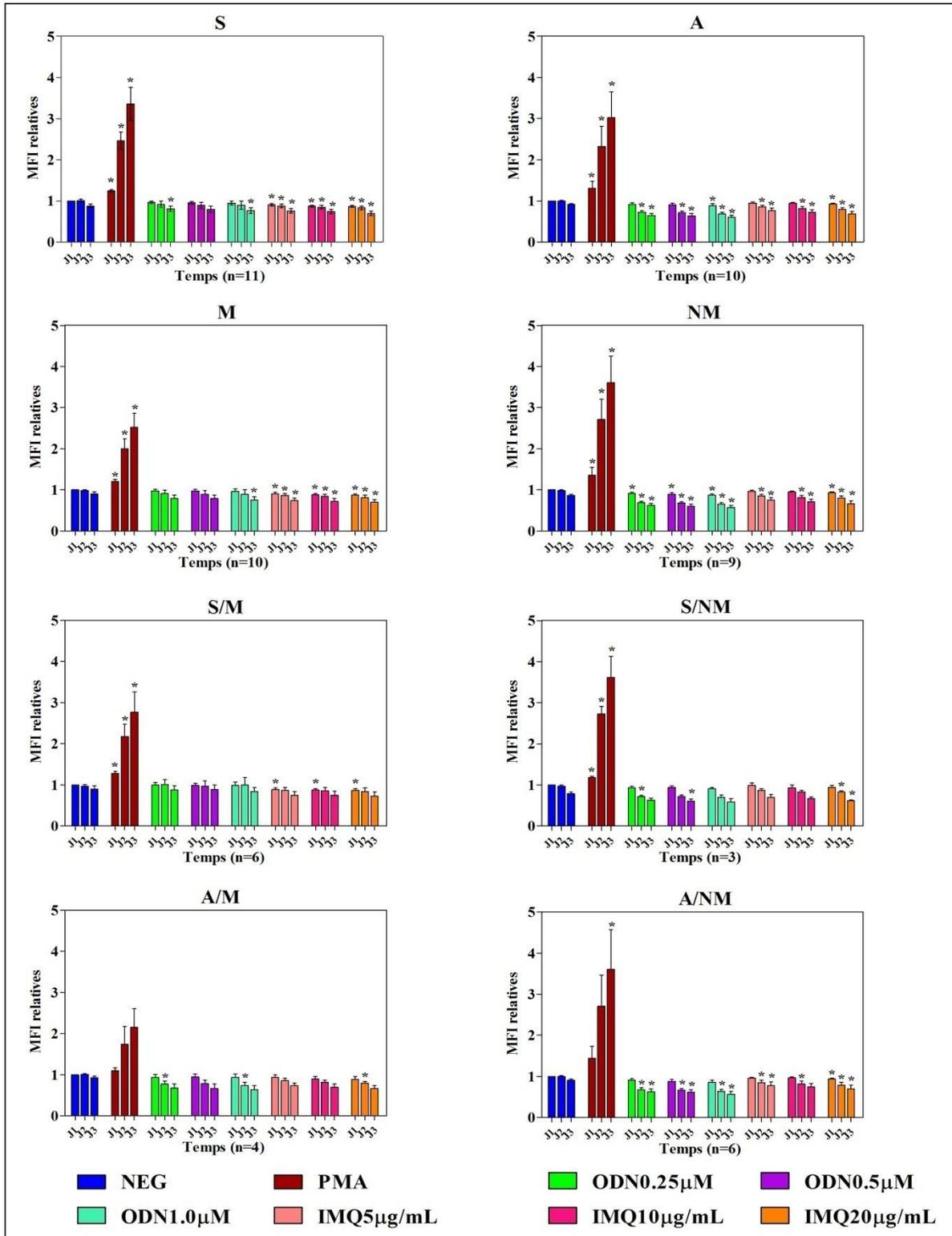


Figure 25 : Expression de CD5 sur des cellules B de LLC stimulées ou non par PMA, ODN ou IMQ

Les cellules de LLC-B ont été incubées avec du milieu de culture seul (NEG), avec 5 μg/L de PMA, avec 0.25μM, 0.5μM, 1.0μM d'ODN M362(ODN) ou avec 5 μg/mL, 10μg/mL, 20 μg/mL d'Imiquimod R837(IMQ). L'expression de CD5 a été mesurée par cytométrie en flux à J1, J2 et J3 dans les différents types de patients. Les résultats sont exprimés en moyennes (±ES) des ratios de MFI par rapport à l'expression basale de NEGJ1.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

* p < 0.05 versus témoin du même jour.

V - EVALUATION DE LA SECRETION DE CYTOKINES

La mesure de la production de cytokines a été réalisée dans les surnageants de lymphocytes B tumoraux non stimulés ou incubés avec PMA, ODN ou IMQ.

V.1 - IMQ et cytokines

La production de cytokines, incluant IL-12p70, IFN- γ , IFN- α , IL-10, IL-8, IL-6 et TNF- α a été évaluée chez 8 patients stables ayant également bénéficié de l'étude TUNEL.

Les résultats montrent une production très importante d'IL-6 et d'IL-8, qui a fait l'objet de publication. Par comparaison, le dosage de ces deux cytokines a ensuite été réalisé chez 8 patients avec une forme agressive dont 7 patients non mutés et 1 patient muté.

V.1.1 - Dosages d'IL-12p70, IFN- γ , IFN- α , IL-10 et TNF- α chez les patients stables

Aucune sécrétion d'IL-12 ou d'IFN- γ n'a été observée, quelles que soient les conditions testées.

La production d'IFN- α , absente à l'état de base, était détectable après stimulation par IMQ chez un patient non muté, avec respectivement 175.86 pg/mL, 178.95 pg/mL et 197.45 pg/mL après stimulation par IMQ20 μ g/mL à J1, d'IMQ5 μ g/mL à J2 et d'IMQ10 μ g/mL à J2.

Le TNF- α , quasi absent à l'état de base et après stimulation avec l'IMQ, était détectable après stimulation par le PMA chez respectivement 7, 6 et 5 patients à J1, J2 et J3. La production moyenne était respectivement de 846.9 pg/mL, 394.8 pg/mL et 228.9 pg/mL, et montrait une diminution avec le temps.

L'IL-10, absente à l'état de base, a été détectée après stimulation par le PMA chez 4 patients, avec un taux moyen de 456.2 pg/mL, 340.06 pg/mL et 220.2 pg/mL à J1, J2 et J3 respectivement. Cette production diminue de façon temps-dépendante. Chez ces 4 patients l'IMQ induisait aussi une faible production d'IL-10 (135.07 pg/mL, 81.06 pg/mL et 108 pg/mL pour l'IMQ20 μ g/mL à J1, J2 et J3).

V.1.2 - Production d'IL-6 (figure 26)

L'IL-6 était absente à l'état de base chez tous les patients sauf deux de forme "A/NM", avec un taux très faible d'environ 11pg/mL.

Le PMA induisait une production d'IL-6 dans tous les groupes mais surtout chez les patients stables et/ou non mutés. Corrélativement, la production la plus importante en réponse au PMA est observée chez les patients "S/NM".

La production d'IL-6 induite par l'IMQ était hétérogène et surtout nette pour la dose de 20µg/mL chez les patients stables ou non mutés. Les taux les plus élevés étaient observés à cette dose chez les patients de statut "S/NM". Cette réponse est par ailleurs dose- et temps-dépendante.

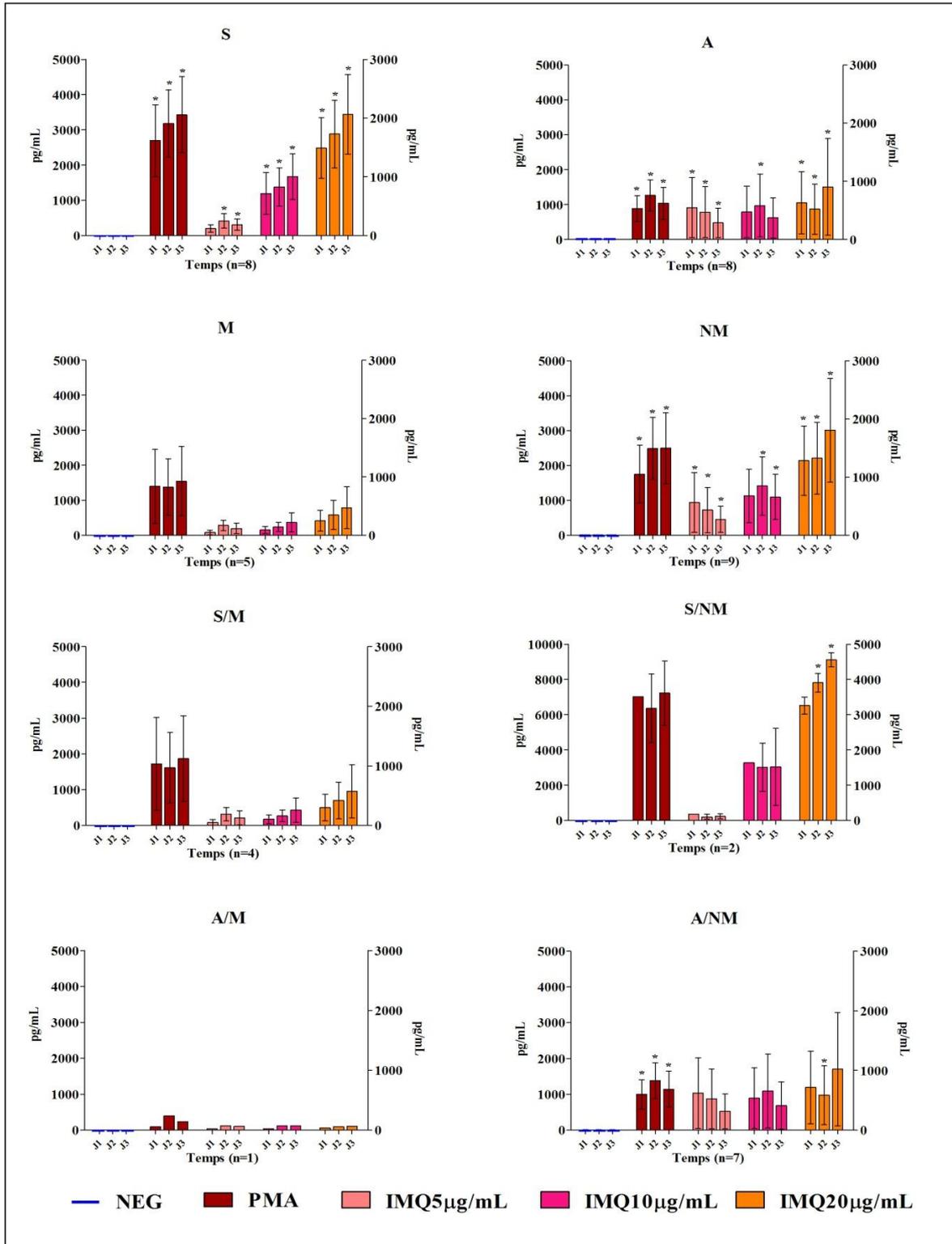


Figure 26 : Production d'IL-6 dans les surnageants de culture de cellules de LLC non stimulées ou stimulées avec le PMA ou l'IMQ

Les résultats sont exprimés en moyennes±ES des concentrations de cytokines dosées dans les surnageants de culture de cellules B de LLC stimulées ou non pendant 24, 48, et 72 heures avec 5 µg/L de PMA ou 5 µg/mL, 10 µg/mL ou 20 µg/mL d'Imiquimod R837 dans différents groupes de patients. La production induite par le PMA est indiquée sur l'axe Y de gauche, la production spontanée et celle induite par l'IMQ est indiquée sur l'axe Y de droite.

"S" : Stable, "A " : Agressive, " M" : Muté, " NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

* p < 0.05 versus témoin du même jour.

V.1.3 - Production d'IL-8 (figure 27)

Il existe une synthèse spontanée d'IL-8 chez tous les patients sauf un de statut "A/NM". Cette synthèse semble être temps-dépendante chez les patients stables ou mutés.

La production d'IL-8 chez tous les patients sauf un était induite de façon significative et importante après stimulation avec le PMA et l'IMQ.

La concentration d'IL-8 après stimulation par le PMA pendant 24 heures de culture était environ 7 fois supérieure à celle du témoin chez les patients stables, avec une forme agressive ou non mutés et d'environ 14 fois chez les patients mutés. Cette production induite par le PMA diminue de façon temps-dépendante.

L'IMQ20µg/mL induit une augmentation d'IL-8 respectivement d'environ 9 fois et 10 fois la valeur du témoin après 24 heures de culture chez les patients stables et/ou mutés et cette augmentation était de 3 fois et 6 fois après 72 heures de culture.

Chez les patients avec une forme agressive et non mutés, la production d'IL-8 induite par l'IMQ20µg/mL était bien moindre, d'environ 4 fois celle de la valeur du témoin après 24 et 72 heures de culture.

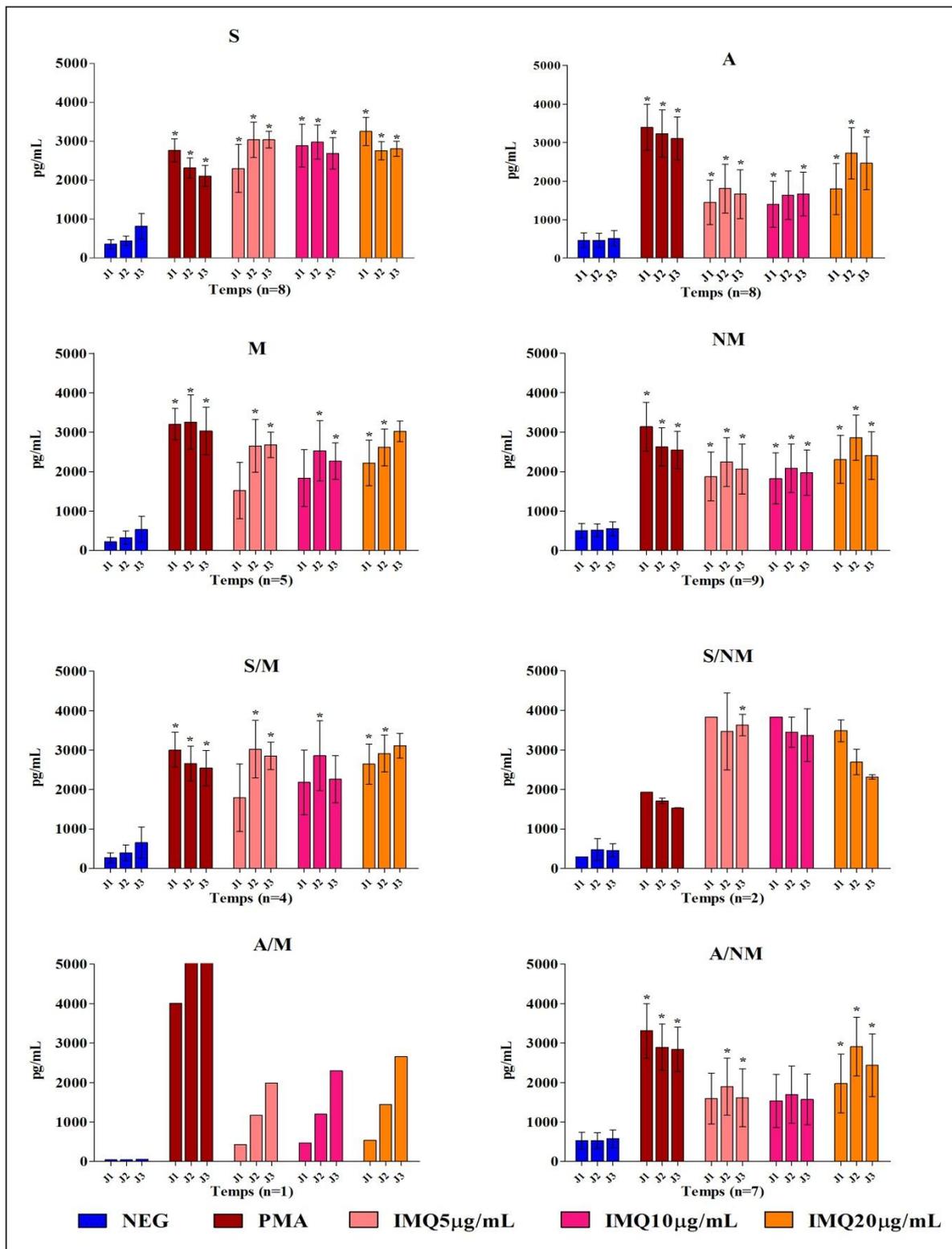


Figure 27 : Production d'IL-8 dans les surnageants de culture de cellules de LLC non stimulées ou stimulées avec le PMA ou l'IMQ

Les résultats sont exprimés en moyennes±ES des concentrations de cytokines dosées dans les surnageants de culture de cellules B de LLC stimulées ou non pendant 24, 48, et 72 heures avec 5 µg/L de PMA ou 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'Imiquimod R837 dans différents groupes de patients.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

*p < 0.05 versus témoin au même jour.

V.2 - ODN et cytokines

La production de quatre cytokines, IL-8, IL-6, IFN- α et TNF- α a été évaluée dans un second temps dans les surnageants de culture à J3 après stimulation par PMA ou à deux doses d'ODN (0.25 et 1 $\mu\text{mol/L}$) chez 16 patients de statut mutationnel connu. Huit patients avaient une forme stable et 8 une forme agressive, 8 avaient un statut muté et 8 un statut non muté. Ces patients ont été divisés en quatre sous-populations supplémentaires : "S/M" (n=6), "S/NM" (n=2), "A/M" (n=2) et "A/NM" (n=6).

La sécrétion d'IFN- α était absente quelles que soient les conditions.

Le TNF- α , absent à l'état de base, était induit par la stimulation avec le PMA chez 2 patients "S/M" et deux patients "A/NM". L'ODN induisait aussi une production de TNF- α chez 4 patients avec une forme agressive, dont 2 non mutés alors qu'il n'y avait pratiquement pas de production de cette cytokine chez les patients stables.

Une production importante d'IL-6 et d'IL-8 a été observée après stimulation par le PMA et l'ODN 0.25 et 1.0 μM (figure 28).

L'IL-6 était absente à l'état de base chez tous les patients sauf trois de forme "A/NM", avec une production faible. La stimulation avec le PMA a induit une augmentation significative de la production d'IL-6 chez tous les patients sauf un. Cette augmentation était significativement plus importante que celle induite par l'ODN 0.25 et 1.0 μM ($p < 0.04$) dans les quatre groupes de patients.

L'ODN a induit une augmentation significative d'IL-6 ($p < 0.05$) dans les quatre groupes de patients par rapport aux puits témoins, sans différence significative entre les deux doses d'ODN. Cette production d'IL-6 était significativement plus importante chez les patients avec une forme agressive que chez les patients stables ($p < 0.03$). Par contre, il n'y avait pas de différence significative entre les patients non mutés et mutés.

La combinaison de ces critères montre que la production la plus importante d'IL-6 induite par stimulation de TLR-9 était observée chez les patients "A/NM".

Une synthèse spontanée d'IL-8 a été observée chez tous les patients sauf un.

La stimulation par le PMA entraînait une augmentation significative de la production d'IL-8, de même que l'ODN à 0.25 et 1.0 μM chez tous les patients sauf un. La stimulation avec le PMA induisait plus d'IL-8 que l'ODN ($p < 0.04$) chez les patients avec une forme stable et un statut muté mais pas chez les patients avec une forme agressive et un statut non muté.

L'ODN induisait la production la plus importante d'IL-8 chez les patients "A/NM".

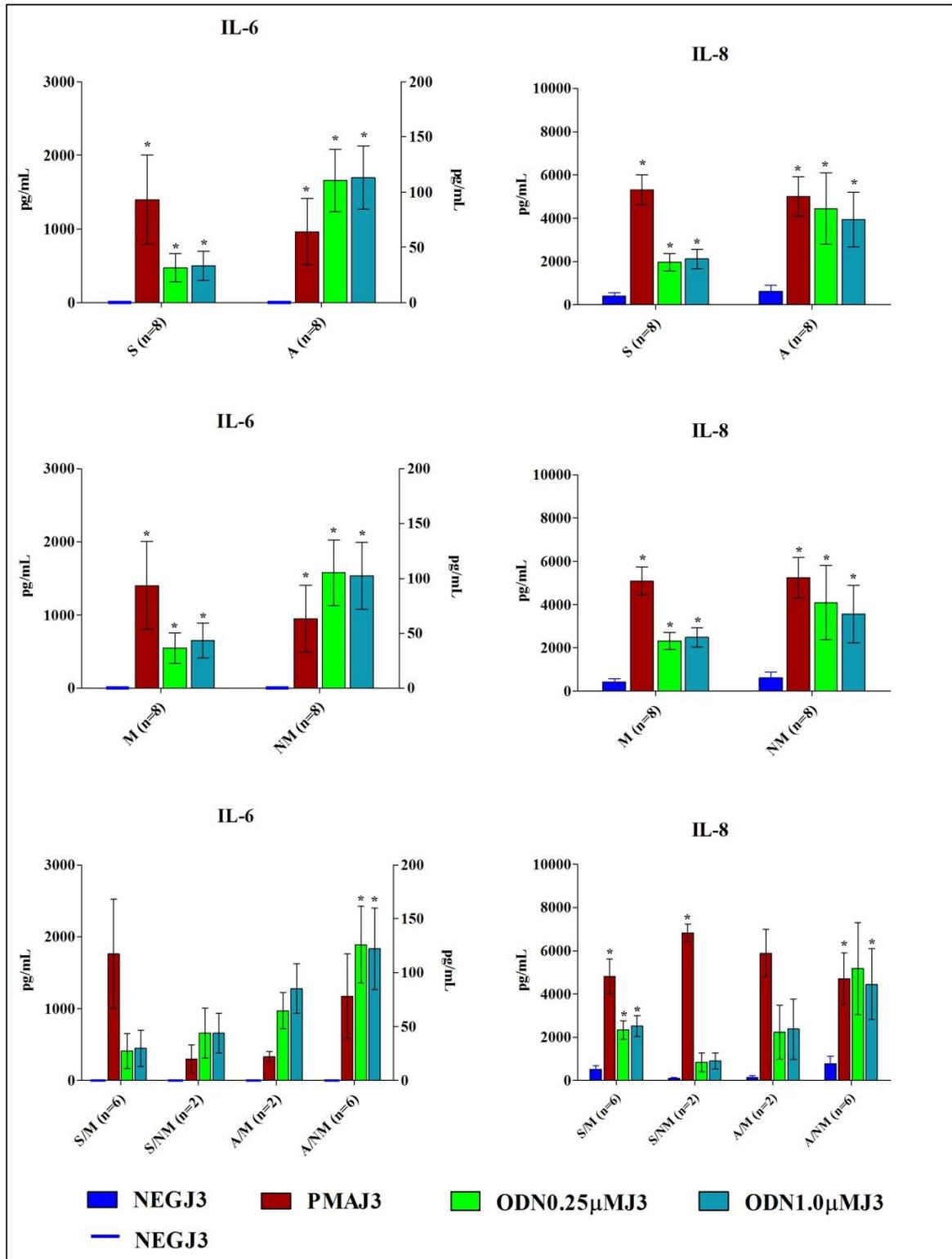


Figure 28 : Production d'IL-6 et IL-8 dans les surnageants de culture de cellules de LLC non stimulées ou stimulées avec le PMA ou l'ODN

Les résultats sont exprimés en moyennes±ES des concentrations de cytokines dosées dans les surnageants de culture de cellules B de LLC stimulées ou non pendant 72 heures avec 5 μg/L de PMA ou 0.25μM ou 1.0μM d'ODN M362. Pour l'IL-6, la production induite par le PMA est indiquée sur l'axe Y de gauche, la production spontanée et celle induite par l'ODN est indiquée sur l'axe Y de droite.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

*p < 0.05 versus témoin du même jour dans chaque groupe de patients.

VI - COMPARAISON DE L'EXPRESSION DE TLRs DANS LES DEUX GROUPES DE PATIENTS

Les travaux précédents de notre groupe n'avaient pas différencié les patients ayant une forme stable ou agressive, mais l'expression des TLR avait été analysée en cytométrie en flux sur une cohorte de 23 patients. L'interprétation des travaux réalisés ici auraient pu dépendre d'une différence d'expression de TLR-7 ou TLR-9 en fonction de la forme clinique. Les résultats des listmodes d'analyse de l'expression des TLR ont donc été repris et classés en fonction du statut clinique.

L'expression des TLR sur les cellules de LLC a été recherchée chez 11 patients stables (43 à 79 ans, moyenne 61.0 ± 3.7 ans) et 12 patients avec une forme agressive (46 à 76 ans, moyenne 60.2 ± 3.3 ans).

Les résultats (figure 29), montrent qu'il y a une expression très importante de TLR-7 et TLR-9 dans les deux groupes de patients. L'expression relative de TLR-7 et de TLR-9 (MFI) était respectivement de 8.6 ± 1.0 et 8.7 ± 2.0 chez les patients stables et de 8.3 ± 0.8 et 7.3 ± 1.4 chez les patients avec une forme agressive. Il n'y a pas donc pas de différence significative de l'expression de TLR-7 ni de TLR-9 en fonction du stade clinique de la maladie.

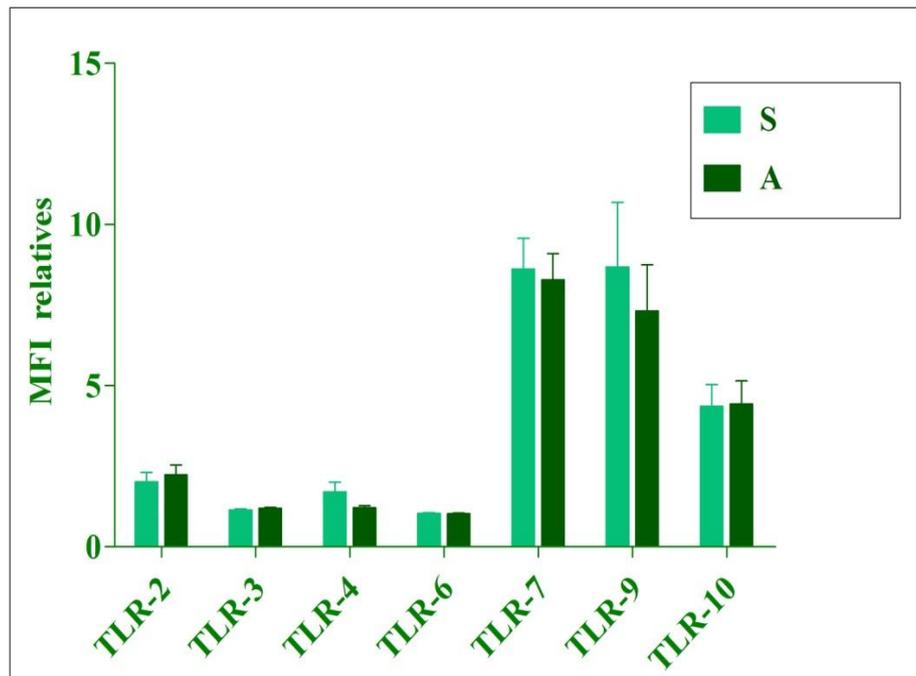


Figure 29 : Profil d'expression des TLRs au niveau des cellules B $CD19^+/CD5^+$
Les résultats sont exprimés en moyennes (+ ES) des ratios de MFI des TLRs par rapport au contrôle isotypique.
"S" : Stable, "A" : Agressive.

VII - ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION

VII.1 - Voies de signalisation de l'apoptose

Les voies de signalisation de l'apoptose de lymphocytes B tumoraux de LLC stimulés ou non avec de l'ODN à 0.25 μ M (n=10) ou de l'IMQ à 10 μ g/mL (n=11) pendant 24 heures de culture ont été étudiés en antibody-array chez 5 patients stables et 6 patients avec une forme agressive. Ces patients étaient également inclus dans l'étude immunophénotypique et dans la détection de la prolifération par CFSE. Parmi les 5 patients stables, trois avaient un statut muté et un avait un statut non muté (statut non déterminé pour le cinquième patient). Parmi les 6 patients avec une forme agressive, 5 avaient un statut non muté et un avait un statut muté.

Le timbre d'antibody-array permet la détection de 35 protéines impliquées dans l'apoptose. Comme indiqué dans le chapitre matériel et méthodes, les résultats sont exprimés en ratio normalisé sur le témoin négatif de chaque membrane et rapporté à la quantité de protéines testée. Pour les 11 patients testés, les signaux les plus forts observés étaient la Catalase, la pro-caspase-3, la caspase-3 clivée, p53S15, SMAC/Diablo, Ho-1/HMOX1, Ho-2/HMOX2, Bax, p27/kip1, le cytochrome c et HSP60. Les signaux observés pour presque toutes les protéines étaient plus forts pour les patients avec une forme clinique stable pour chaque condition.

VII.1.1 - Caspase-3

La caspase-3 joue un rôle prédominant dans la cascade de signalisation de la famille des caspases qui conduit à l'apoptose. La caspase-3 est active après clivage. L'activité de la caspase-3 a été analysée en calculant le ratio [caspase-3 clivée/ pro - caspase-3].

VII.1.1.1 - Caspase-3 en antibody-array (figure 30)

VII.1.1.1.1 - Caspase-3 selon la forme clinique

L'activité de la caspase-3 à l'état de base était respectivement de 0.49 (0.42 à 0.83) et de 0.335 (0.15 à 0.51) chez 5 patients stables et 6 patients avec une forme agressive, ce qui correspond à l'apoptose spontanée chez ces deux types de patients, plus importante chez les patients stables (p=0.036). L'ODN induit plutôt une protection contre l'apoptose dans les deux types de patients, de façon plus importante chez les patients avec une forme agressive (p=0.004). Chez ces derniers, la différence est également significative entre l'ODN 0.25 μ M et le témoin milieu seul (p=0.016). L'IMQ induit plutôt une apoptose, plus importante chez les patients stables (p=0.014).

L'ODN 0.25 μ M induit une activation faible des voies de signalisation l'apoptose chez 4/5 patients stables et tous les patients avec une forme agressive. L'IMQ 10 μ g/ mL induit au contraire une activation forte des voies de signalisation de l'apoptose chez 4/5 patients stables et 3/6 patients avec une forme agressive.

Les ratios de caspase-3 normalisé par les témoins sont significativement plus bas après stimulation par ODN chez les patients avec une forme agressive ($p=0.043$),

VII.1.1.1.2 - Caspase-3 selon le statut mutationnel

Les résultats de la mesure de l'activité caspase-3 pour les patients mutés et non mutés sont assez superposables à ceux des patients avec une forme stable ou agressive respectivement.

L'apoptose spontanée était plus importante chez les patients mutés. Chez ces derniers, l'apoptose induite par l'IMQ était également plus importante. A l'inverse, la protection contre l'apoptose induite par l'ODN était plus importante chez les patients non mutés et chez ces derniers, la différence était également significative entre l'ODN 0.25 μ M et le témoin milieu seul ($p=0.016$).

Ces résultats étaient quasiment identiques pour les patients S/M et A/NM.

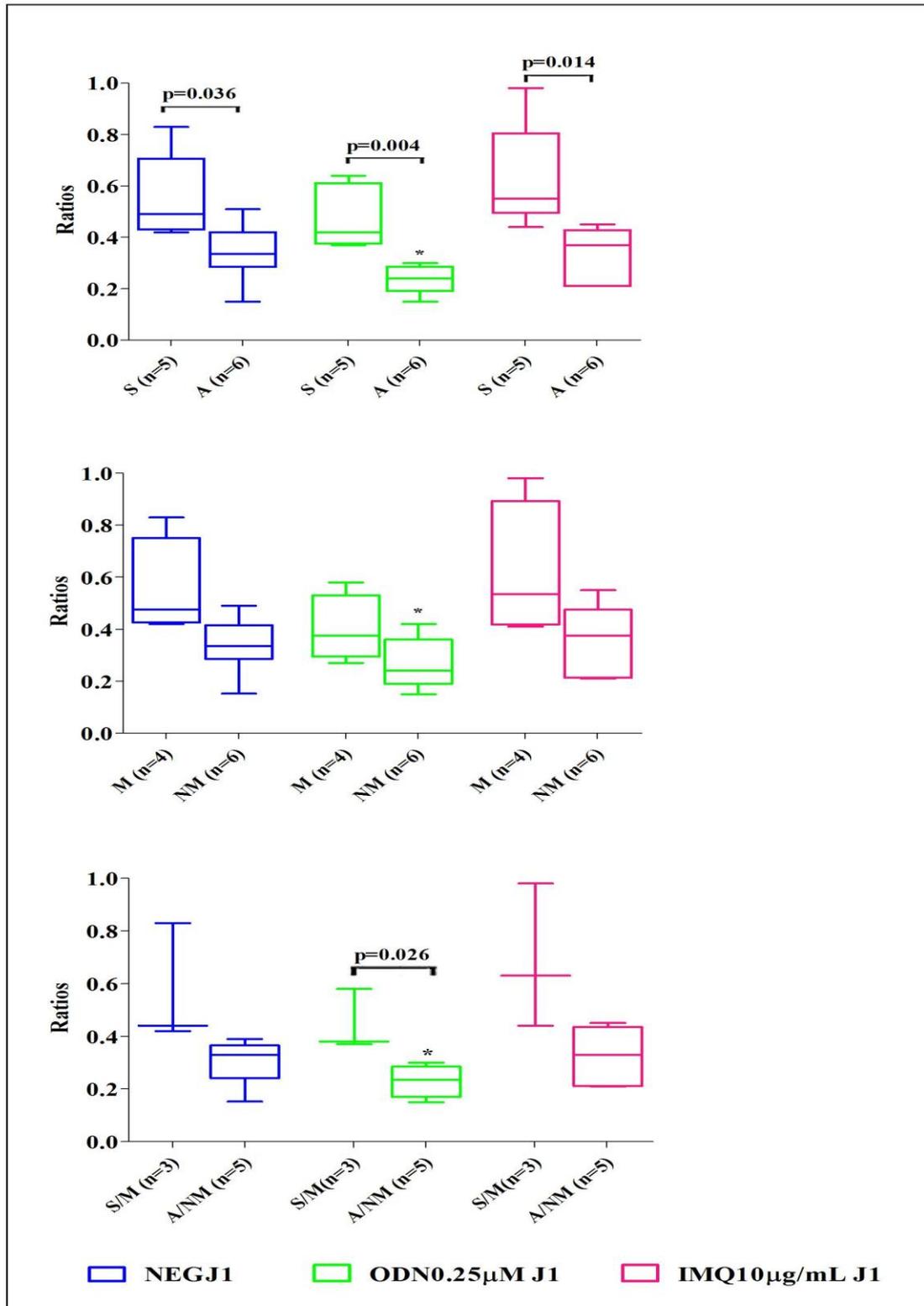


Figure 30 : Ratio caspase-3 clivée/pro-caspase-3 au sein des protéines extraites de lymphocytes B tumoraux de LLC

L'antibody-array a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25µM ou l'IMQ10µg/mL pendant 24 heures. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

* p =0.016 versus témoin pour les patients avec une forme agressive.

VII.1.1.2 - Caspase-3 en Western Blot

L'activité de la caspase-3 a été vérifiée par Western Blot avec les extraits protéiques de 6 autres patients stables (dont 4 avec un statut muté et 2 un statut mutationnel non déterminé) et 8 patients avec une forme agressive (dont 5 avec un statut non muté et 3 mutés), à J1 de stimulation. Par comparaison, les cellules de 3 patients stables/mutés et 8 patients avec une forme agressive dont 6 avec un statut non muté ont été testées à J3 de stimulation (figures 31 et 32).

Les résultats confirment que l'ODN0.25 μ M induit plutôt une diminution de l'apoptose, surtout chez les patients avec une forme agressive, avec une différence significative à J1 ($p=0.046$) par rapport aux témoins, alors que l'IMQ10 μ g/mL n'a pas d'effet significatif sur l'apoptose par rapport aux témoins.

La comparaison de l'activité caspase-3 entre J1 et J3 a été réalisée chez les 6 patients avec une forme agressive (figure 33). L'activité de caspase-3 était plus forte à J1 et diminue avec le temps.

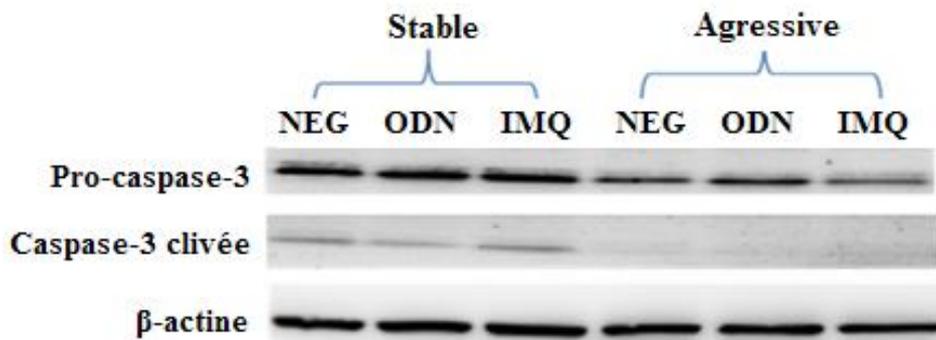


Figure 31 : Exemple de l'expression de la caspase-3 clivée chez un patient stable et un patient avec une forme agressive par la méthode de Western blot

Le Western Blot a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25 μ M ou l'IMQ10 μ g/mL pendant 24h et le ratio caspase-3 clivée /pro-caspase-3 a été analysé.

"S" : Stable, "A " : Agressive.

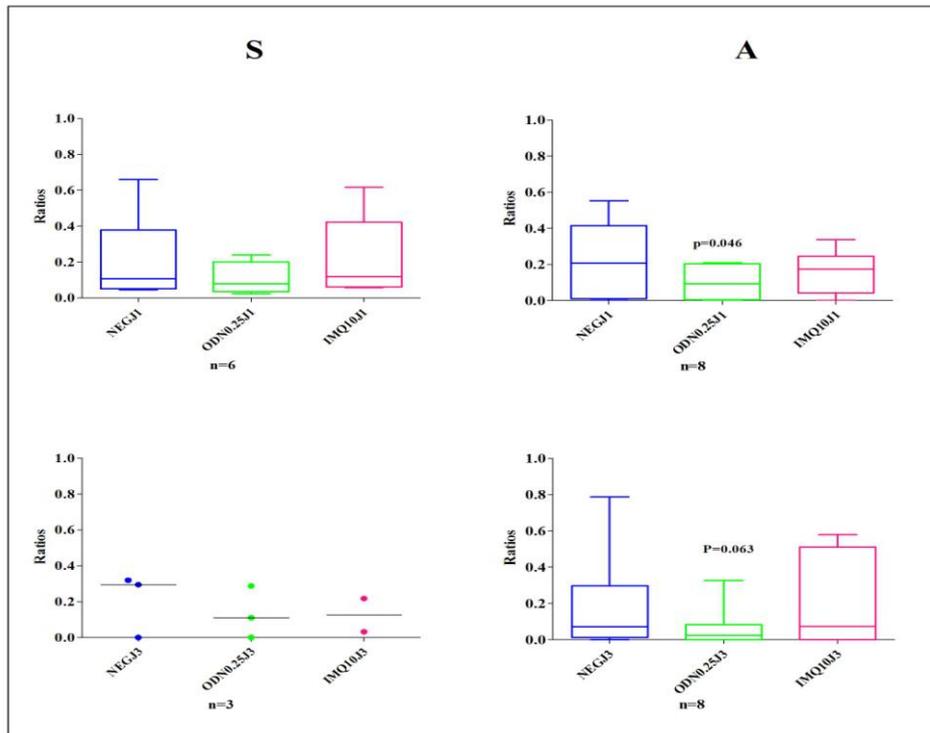


Figure 32 : Activité Caspase-3 chez les patients atteints de LLC avec une forme stable ou agressive

Le Western Blot a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25µM ou l'IMQ10µg/mL pendant 24 et 72 heures et le ratio caspase-3 clivée /pro-caspase-3 a été analysé. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales. p =0.046 et p=0.063 versus témoin du même jour chez les patients avec une forme agressive.

"S" : Stable, "A" : Agressive

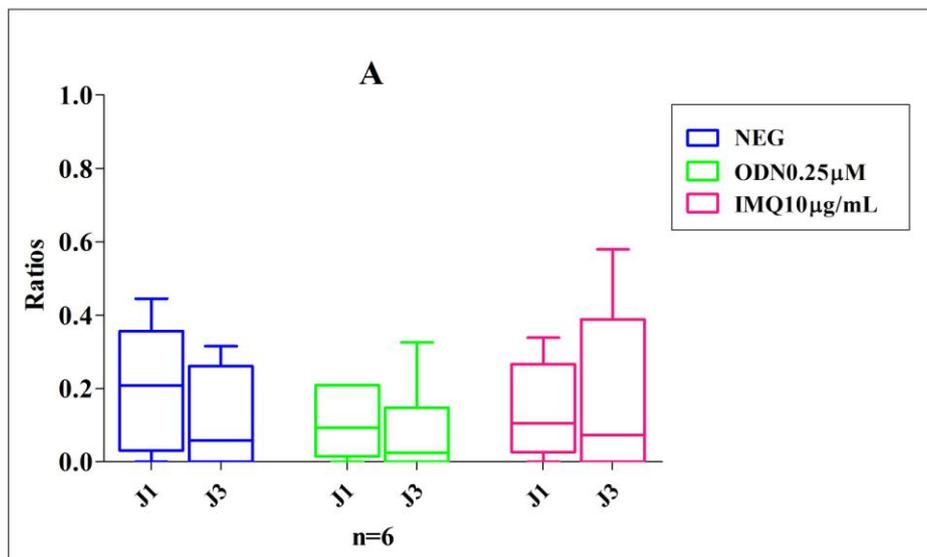


Figure 33 : Activité Caspase-3 chez les patients avec une forme agressive

Ratios caspase-3 clivée /pro-caspase-3) à J1 et J3 chez les patients avec une forme agressive a été analysée. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales.

"A" : Agressive.

VII.1.2 - La famille de Bcl-2

L'expression des molécules impliquées dans le contrôle de l'apoptose de la famille de Bcl-2, incluant Bad, Bax, Bcl-2 et Bcl-x a été recherchée dans cette analyse en antibody-array. Les protéines Bad et Bax sont des protéines proapoptotiques, alors que Bcl-2 et Bcl-x sont des protéines antiapoptotiques. Leurs ratios ont été analysés pour évaluer la balance entre ces molécules (figure 34).

Tous les ratios, à l'exception de Bad/Bcl-2, étaient supérieurs à 1 dans les deux types de patients (forme clinique) pour les trois conditions testées, ce qui suggère que les membres de la famille de Bcl-2 sont en faveur d'un équilibre pro-apoptotique dans les cellules de LLC. Après stimulation par l'ODN les ratios étaient plus bas que dans le puits témoin chez les patients avec une forme agressive, avec une différence significative pour Bax/Bcl-2 ($p=0.005$), Bad/Bcl-2 ($p=0.004$) et (Bad+Bax)/(Bcl-2+Bcl-x) ($p=0.022$). Par contre, les ratios après stimulation par l'ODN étaient plus élevés chez les patients stables, avec une différence significative pour Bax/Bcl-2 ($p=0.009$) par rapport au témoin non stimulé.

Les résultats de l'analyse des ratios de Bcl-2 pour les patients mutés et non mutés sont presque superposables à ceux des patients avec une forme stable ou agressive respectivement, mais sans différence significative par rapport aux témoins. Par contre, chez les patients A/NM, après stimulation par l'ODN, les ratios étaient plus bas que dans le puits témoin, avec une différence significative pour Bax/Bcl-2 ($p=0.022$), Bad/Bcl-2 ($p=0.005$) et (Bad+Bax)/(Bcl-2+Bcl-x) ($p=0.021$).

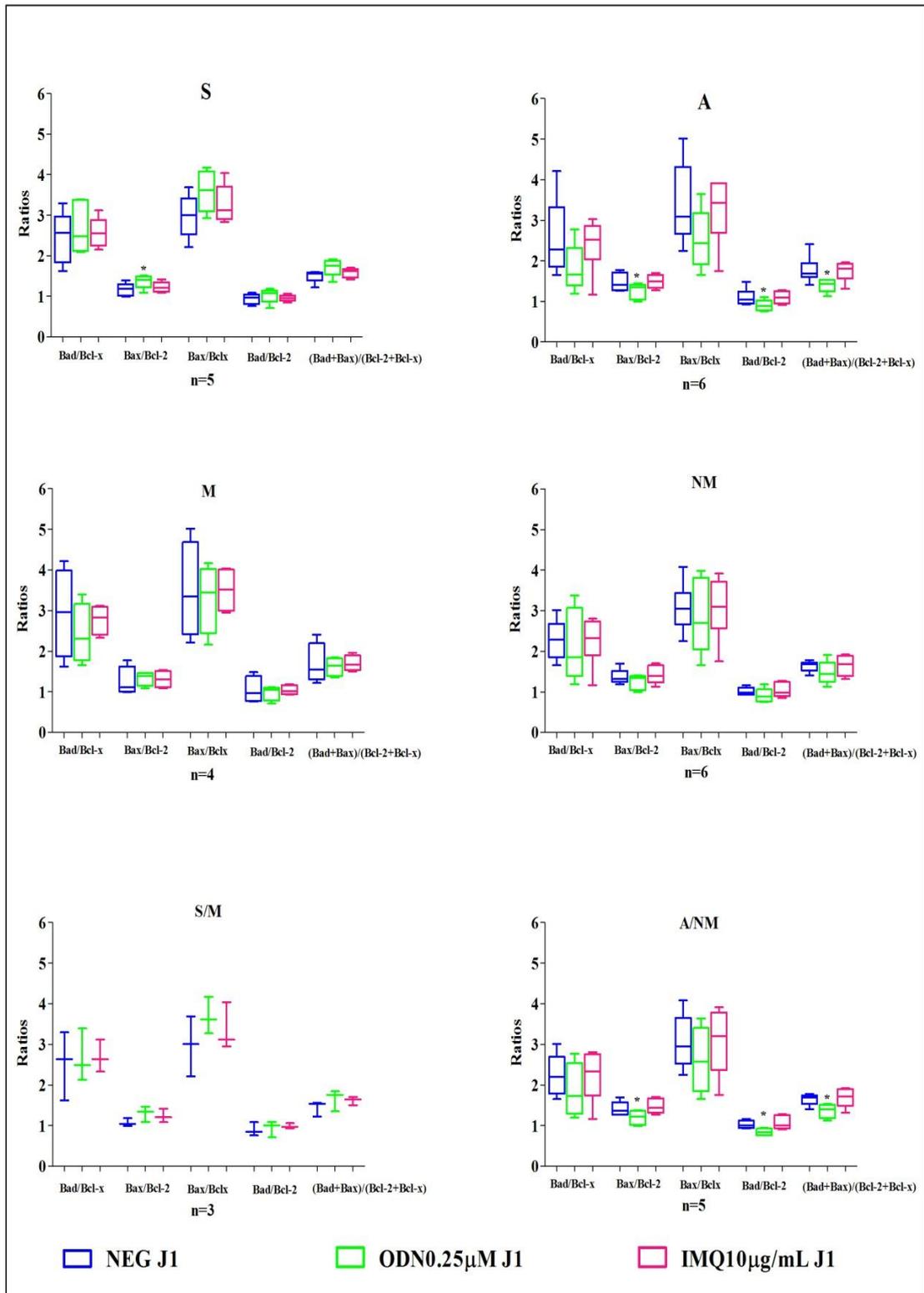


Figure 34 : Ratios des protéines de la famille de Bcl-2 dans les différents groupes de patients
 L'antibody-array a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25µM ou l'IMQ10µg/mL pendant 24 heures. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales.
 "S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.
 *P<0.05 versus témoin.

Les ratios des membres de la famille de Bcl-2, à l'état de base, étaient plus importants chez les patients avec une forme agressive par rapport aux patients stables, avec une différence significative pour le ratio Bax/Bcl-2 ($p=0.025$). Après stimulation par ODN ou IMQ, les ratios normalisés ont été comparés entre les deux types de patients. Aucune différence significative n'a été observée après stimulation par IMQ. Par contre, les ratios sont plus bas après stimulation par ODN chez les patients avec une forme agressive. La différence est significative par rapport aux patients stables pour les ratios Bax/Bcl-2 ($p\leq 0.001$), Bax/Bcl-x ($p=0.027$) et (Bad+Bax)/(Bcl-2+Bcl-x) ($p=0.010$) (figure 35).

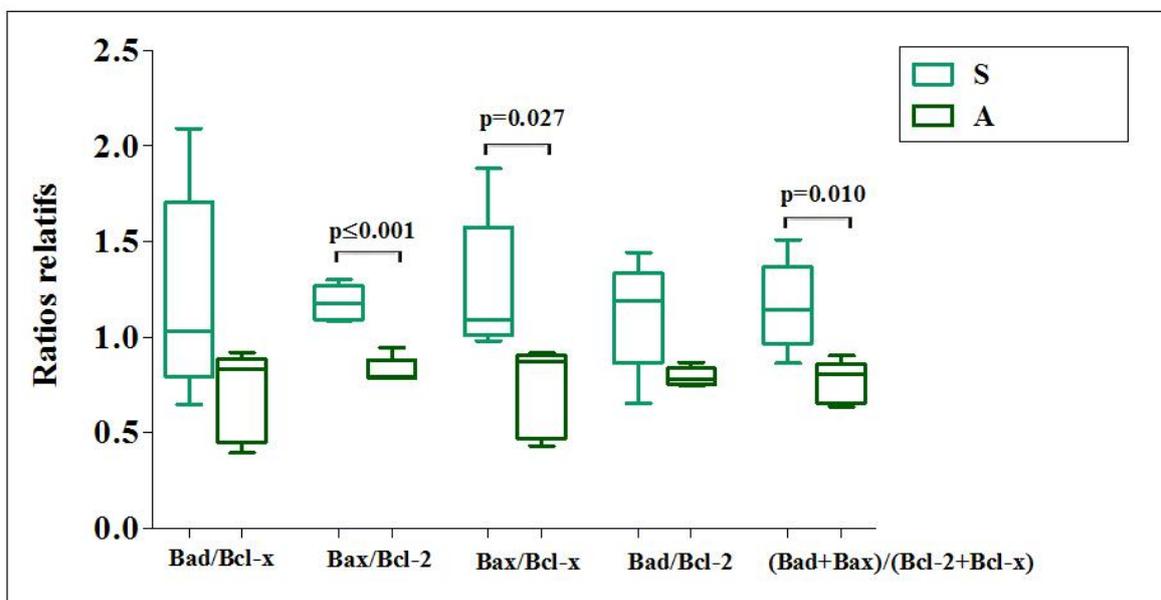


Figure 35 : Ratios des protéines de la famille de Bcl-2 après stimulation par ODN chez les deux types de patients

Comparaison des ratios de Bcl-2 normalisés par rapport au puits NEG. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales.

"S" : Stable, "A" : Agressive.

VII.1.3 - Cytochrome c et Catalase (figure 36)

L'expression du cytochrome c, qui joue un rôle très important dans la voie intrinsèque de l'apoptose, était très élevée chez tous les patients dans toutes les conditions testées. L'ODN induit une augmentation de l'expression du cytochrome c significativement quelle que soit la forme clinique ($p<0.05$). Ceci indique que la voie mitochondriale est activée par l'ODN. L'augmentation induite par l'IMQ est moindre et non significative par rapport au témoin non stimulé.

La catalase, détectée à un niveau très important dans tous les cas, reflète indirectement

le rôle des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO, ROS) sur l'apoptose. Son expression était respectivement environ 8 et 6 fois plus importante que celle du cytochrome c chez les patients stables et avec une forme agressive. L'ODN induit une augmentation significative de la catalase chez les patients stables ($p=0.027$) par rapport au témoin non stimulé.

L'ODN induit une augmentation significative de l'expression du cytochrome c pour les patients non mutés ($p=0.032$). L'IMQ induit une augmentation significative de la catalase chez les patients non mutés ($p=0.045$) et chez les patients A/NM ($p=0.039$) par rapport au témoin non stimulé.

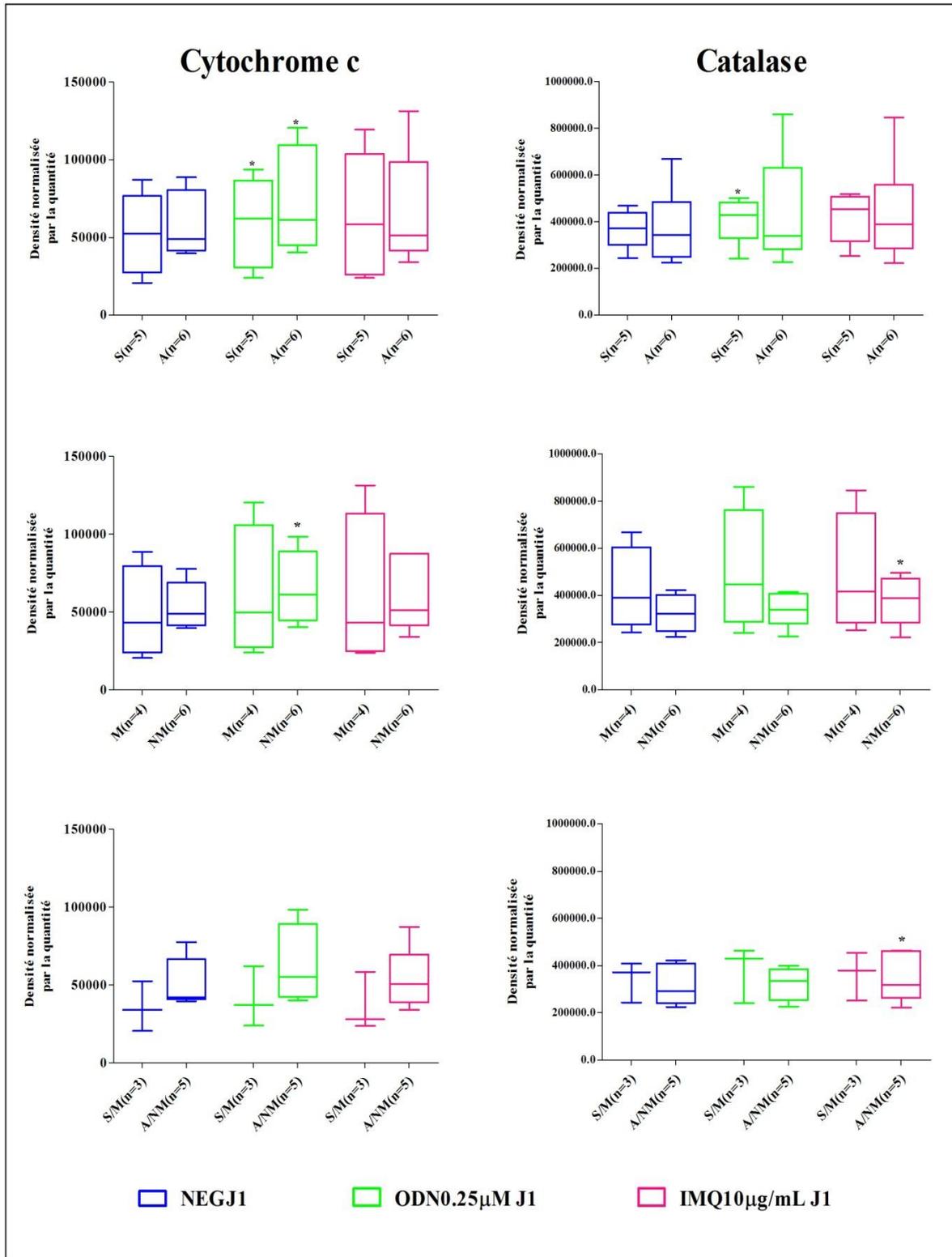


Figure 36 : Expression du Cytochrome c et de la Catalase dans les différents groupes des patients

L'antibody-array a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25µM ou l'IMQ10µg/mL pendant 24 heures. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

*= $p < 0.05$ versus témoin.

VII.1.4 - Les autres protéines des voies de signalisation de l'apoptose (figures 37, 38)

La comparaison de l'expression des autres protéines après stimulation par ODN ou IMQ a été réalisée par rapport au témoin non stimulé. L'ODN induit une augmentation significative de l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques et de trois protéines pro-apoptotiques (SMAC/Diablo, HTRA2/Omi et Rad17S635) chez les patients avec une forme agressive. Il induit aussi deux protéines anti-apoptotiques (XIAP, et livin) et deux protéines pro-apoptotiques (TRAILR2/DR5 et HTRA2/Omi) chez les patients stables.

Les résultats pour les patients mutés et non mutés sont presque superposables à ceux des patients avec une forme stable ou agressive respectivement. L'ODN induit une augmentation significative de l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques et d'une protéine pro-apoptotique (HTRA2/Omi) chez les patients non mutés. Il induit seulement une protéine pro-apoptotique TRAILR2/DR5 chez les patients mutés. L'IMQ induit une augmentation significative d'une protéine anti-apoptotique (XIAP) et d'une protéine pro-apoptotique (p53s46) chez les patients non mutés.

L'ODN induit une augmentation significative de l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques et de quelques protéines pro-apoptotiques (p53s46 et s392, SMAC/Diablo HTRA2/Omi et Rad17S635) chez les patients A/NM.

A l'état de base (témoin négatif) l'expression des autres protéines testées n'est pas différente entre les deux types de patients. Leur expression après stimulation par ODN ou IMQ a été normalisée par le témoin négatif et ces expressions normalisées ont été comparées entre les deux types de patients pour chaque condition. La stimulation par l'IMQ n'induit pas de différence significative, par contre l'ODN induit, chez les patients avec une forme agressive, une augmentation plus importante de plusieurs protéines anti-apoptotiques (10 protéines), et quatre protéines pro-apoptotiques (Rad17S635, SMAC/Diablo, TNFR1 et HTRA2/Omi) ($p < 0.05$) (figure 38).

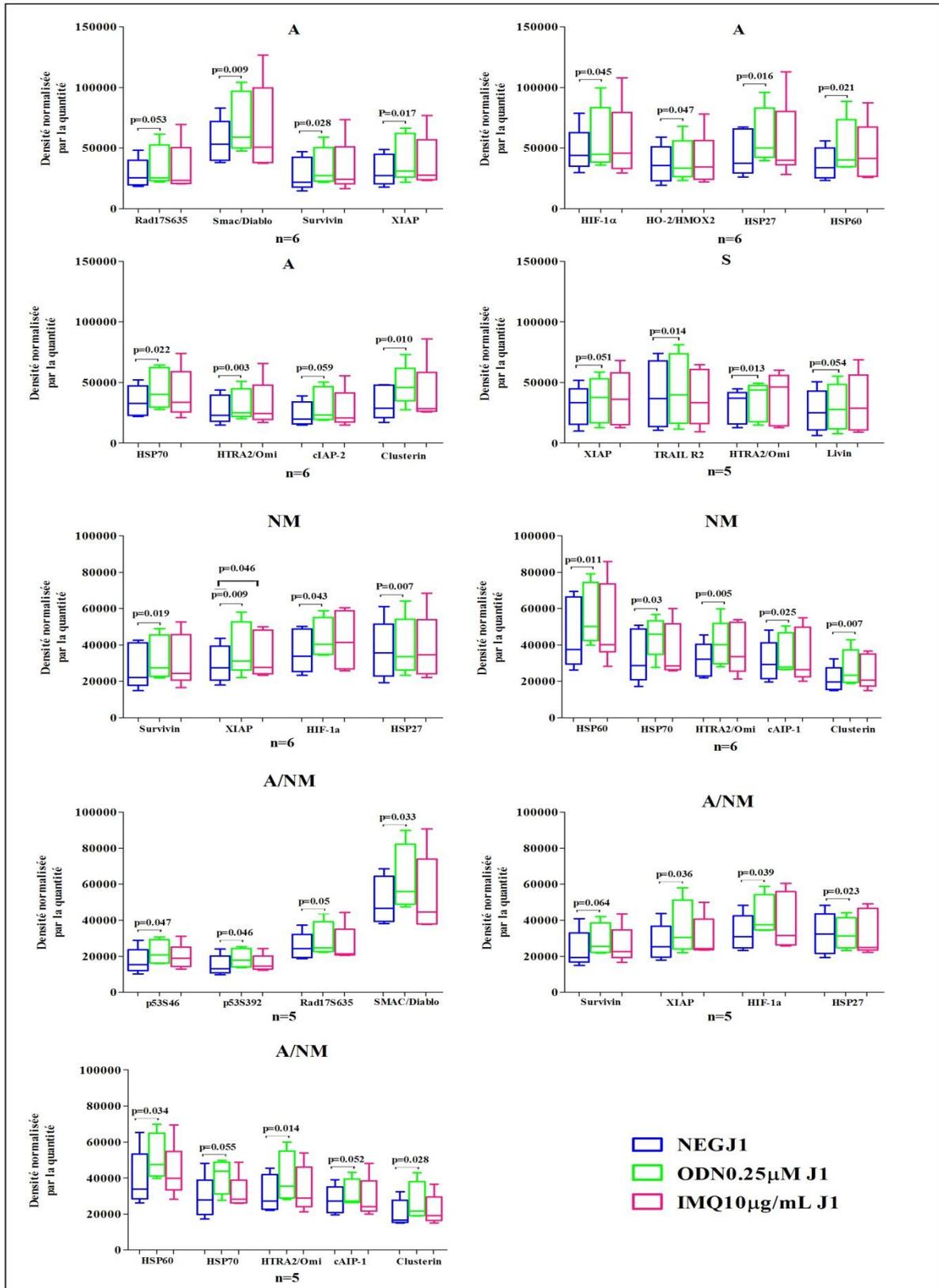


Figure 37 : Protéines des voies de l'apoptose dans les différents groupes de patients
 L'antibody-array a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25µM ou l'IMQ10µg/mL pendant 24 heures. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales
 "S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

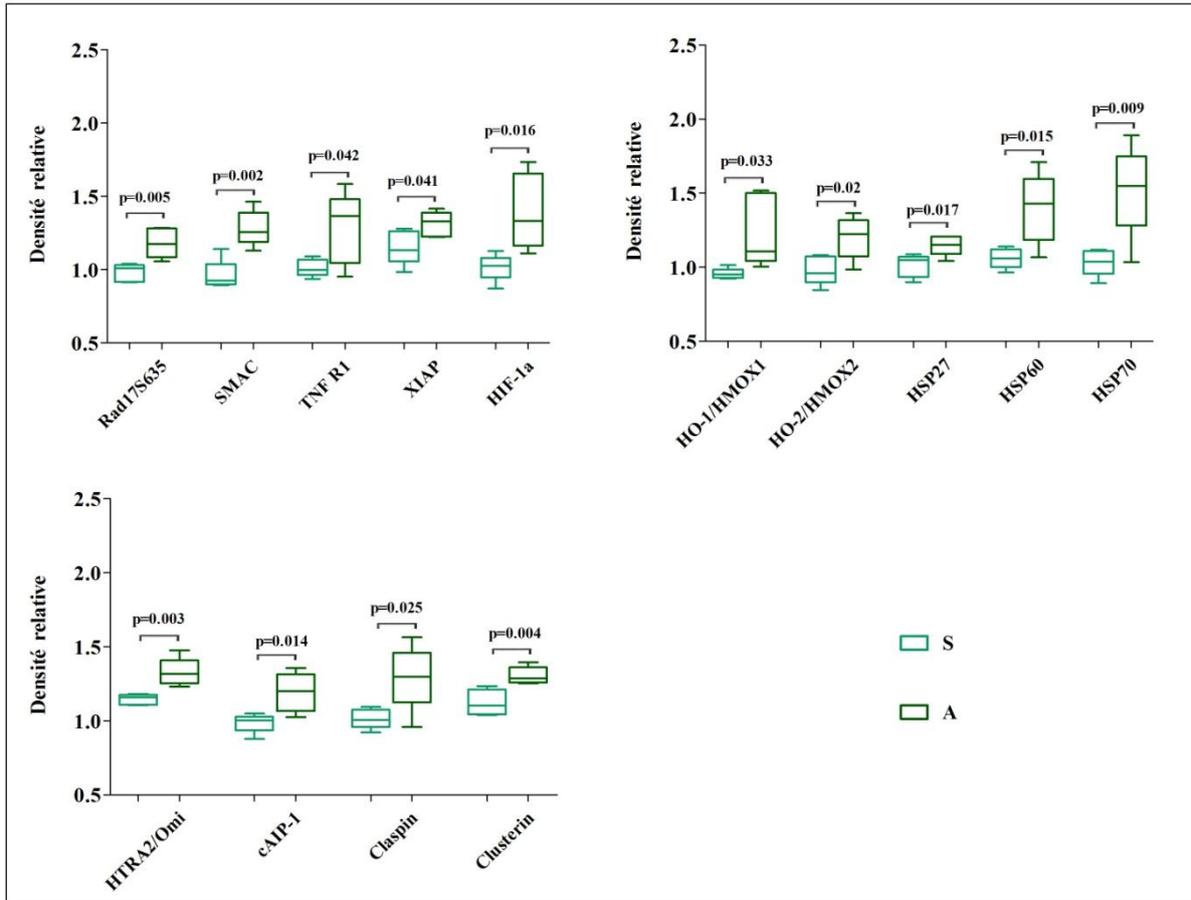


Figure 38 : Expression normalisée de l'expression des protéines des voies de l'apoptose entre les deux types de patients

Comparaison de l'expression des autres protéines normalisées par rapport au puits NEG. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales.

"S" : Stable, "A" : Agressive.

VII.1.5 - L'activité de p38 évaluée par Western blot

La protéine p38 peut être impliquée dans la voie de l'apoptose, et elle a été recherchée par Western Blot pour 5 patients stables (dont 3 avaient un statut muté et 2 un statut non déterminé) et 7 patients avec une forme agressive (dont 5 avaient un statut non muté et 2 un statut muté) à J1. De plus les cellules de 3 patients S/M et 5 patients avec une forme A/NM ont été testées à J3 (figures 39 et 40). L'ODN 0.25 μ M induit plutôt une diminution de phosphop38 (Thr180/Tyr182). Par contre, l'IMQ10 μ g/mL induit plutôt une augmentation de l'activité de p38, avec une différence significative à J1 chez les patients avec une forme agressive, par rapport au témoin non stimulé (p=0.031). Il n'y a pas de différence significative entre les patients stables et les patients avec une forme agressive.

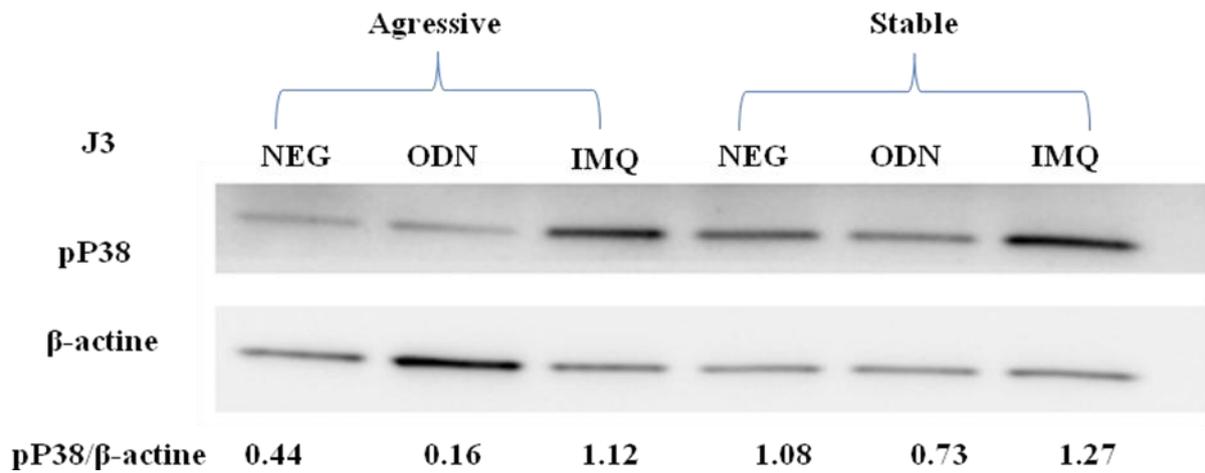


Figure 39 : Exemple de l'expression de p38 chez un patient avec une forme agressive et un patient stable par la méthode de Western blot

Le Western Blot a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25μM ou l'IMQ10μg/mL pendant 72 heures et l'activité de p38 (le ratio phosphop38 (Thr180/Tyr182)/β-actine) a été analysé.

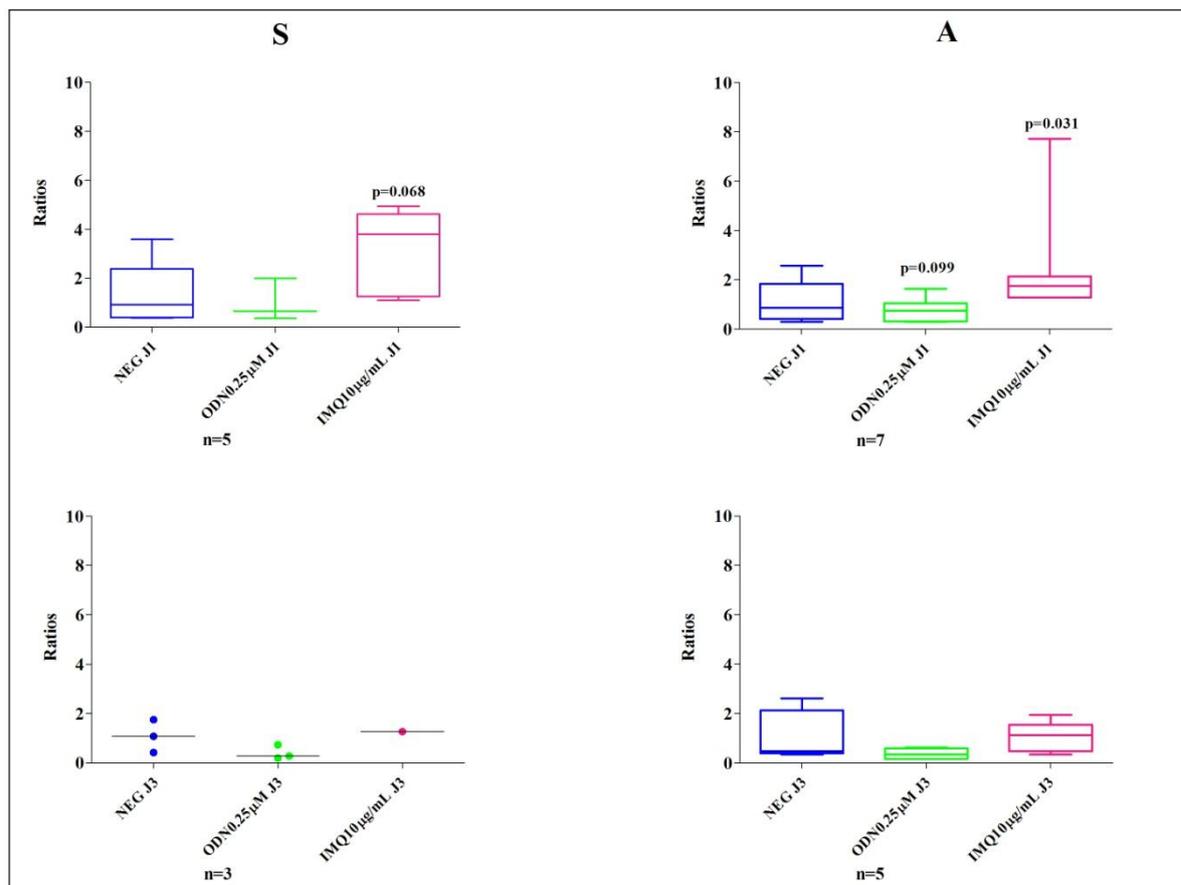


Figure 40 : Activité de p38 chez les patients stables ou avec une forme agressive

Le Western Blot a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25μM ou l'IMQ10μg/mL pendant 24 et 72 heures et l'activité de p38 (le ratio phosphop38 (Thr180/Tyr182)/β-actine) a été analysée. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales "S" : Stable, "A" : Agressive. "P" : versus témoin du même jour.

VII.2 - Les voies de signalisation de la prolifération

Les voies de signalisation de la prolifération ont été également étudiées par un antibody-array spécifique de phosphoprotéines. Les extraits protéiques de lymphocytes B tumoraux stimulés ou non avec l'ODN 0.25 μ M ou l'IMQ 10 μ g/mL pendant 72 heures provenant de 6 patients stables et 6 patients avec une forme agressive ont été utilisés. Parmi les 6 patients stables, 4 avaient un statut muté, un avait un statut non muté et le statut n'a pas pu être déterminé pour le dernier. Parmi les 6 patients avec une forme agressive, 5 avaient un statut non muté et un avait un statut muté. Comme indiqué dans le chapitre matériel et méthodes, les résultats de chemiluminescence de duplicates ont été normalisés par soustraction de la densité moyenne des puits contrôle vierges.

L'antibody-array permet l'étude concomitante de 46 phosphoprotéines. Les phosphoprotéines les plus exprimées dans les deux groupes de patients sont: pSTAT1 Y701, pSTAT2 Y689, pSTAT4 Y693, p53S15, p53S46, pAKT T308, pAMPK α 2 T172, p70S6Kinase T421/S424, p70S6Kinase T229, pRSK1/2 S221 et pRSK1/2/3 S380.

Chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutés, l'ODN induit une augmentation d'environ la moitié des phosphoprotéines, surtout les phosphoprotéines STAT5a/b Y699, STAT5a Y699, AKT S473, pERK1/2 T202/Y204, T185/Y187, JNKpan T183/Y185, T221/Y223 et GSK-3 α/β S21/S9 (figure 41).

Les résultats de l'expression des phosphoprotéines induites par l'ODN chez les patients avec une forme agressive sont regroupés dans le tableau 10.

L'ODN induit également une diminution des phosphokinases p70S6, dont la p70S6kinase T412/S424, la p70S6kinase T389 et la p70S6kinase T229 ($p=0.014$) chez les patients avec une forme agressive. Aucune différence significative n'a été observée par rapport au témoin non stimulé après activation par l'ODN chez les patients stables ni après activation par l'IMQ dans les patients stables ou avec une forme agressive.

Chez les 6 patients de statut non muté, l'ODN induit une diminution significative des phosphokinases p70S6 T229 et p27T157 ($p<0.02$), et l'IMQ induit une diminution significative de plusieurs phosphoprotéines, incluant Hck, Chk-2, FAK, Fyn, Yes, Fgr, Lyn, Lck, TOR, phosphokinases p70S6 T229, phosphokinases p70S6 T421, phosphokinases p70S6 T369, AKT T308 et p53S46 ($p<0.05$).

Chez les 5 patients A/NM, l'ODN induit aussi la diminution de p27T157 et de la phosphokinase p70S6 T229 ($p<0.04$), alors qu'il n'y a pas de différence entre le témoin et l'IMQ.

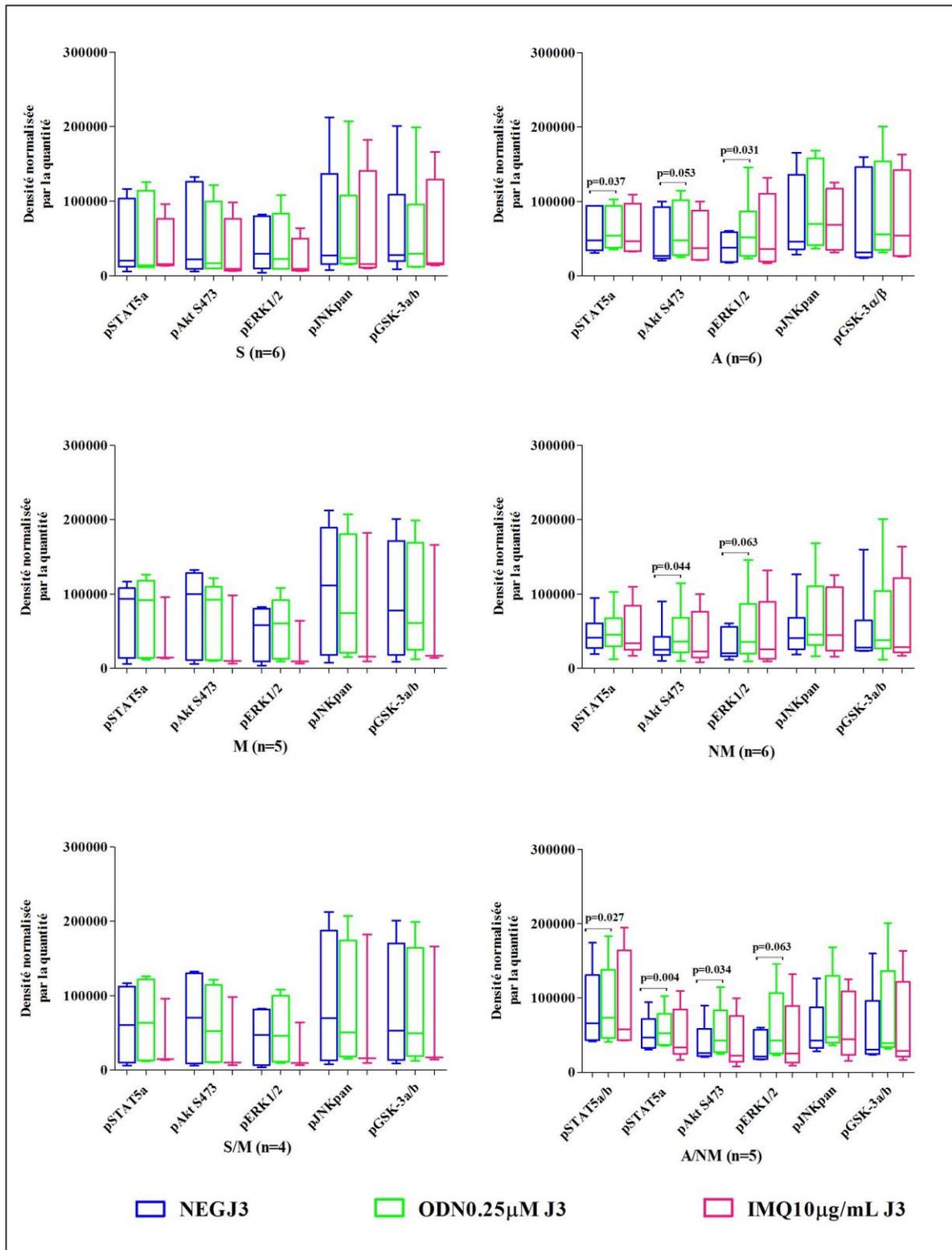


Figure 41 : Phosphoprotéines majeures après stimulation avec l'ODN

L'antibody-array a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25µM ou l'IMQ10µg/mL pendant 72 heures. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales.

"S" : Stable, "A" : Agressive, "M" : Muté, "NM" : Non muté, "S/M" : Stable/Muté, "A/NM" : Agressive/Non muté.

Tableau 10 Modifications de l'expression des phosphoprotéines induites par l'ODN
chez les patients avec une forme agressive

Phosphoprotéines	Site de phosphorylation	Changement (n/6)
STAT2	Y689	Augmente (5/6)
STAT3	Y705	Augmente (5/6)
STAT5b	Y699	Augmente (4/6)
STAT6	Y641	Augmente (5/6)
STAT5a/b	Y699	Augmente (4/6)
STAT1	Y701	Diminue (5/6)
STAT4	Y693	Diminue (5/6)
MEK1/2	S218/S222, S222/S226	Augmente (4/6)
MSK1/2	S376/S360	Augmente (4/6)
RSK1/2	S221	Diminue (5/6)
RSK1/2/3	S380	Diminue (5/6)
JNK pan	T183/Y185.T221/Y223	Augmente (5/6)
c-Jun	S63	Diminue (5/6)
P38 α	T180/Y182	Augmente (3/6)
AKT	T308	Augmente (3/6)
TOR	S2448	Diminue (3/6)
AMPK α 1	T174	Augmente (5/6)
AMPK α 2	T172	Augmente (4/6)
P27	T198	Diminue (5/6)
P27	T157	Diminue (5/6)
P53	S15	Diminue (5/6)
P70S6 Kinase	T389	Diminue (5/6)
P70S6 Kinase	T421/S424	Diminue (5/6)
P70S6 Kinase	T229	Diminue (6/6)
GSK-3 α/β	S21/S9	Augmente (5/6)
β -Catenin	non	Augmente (3/6)

Y : tyrosine ; S : sérine ; T : thréonine

L'activité de la plupart des phosphoprotéines est plus élevée chez les patients avec une forme agressive pour chaque condition. Une différence significative a été notée pour pAKT S473 normalisé par le témoin (P=0.026) après stimulation par l'ODN (figure 42).

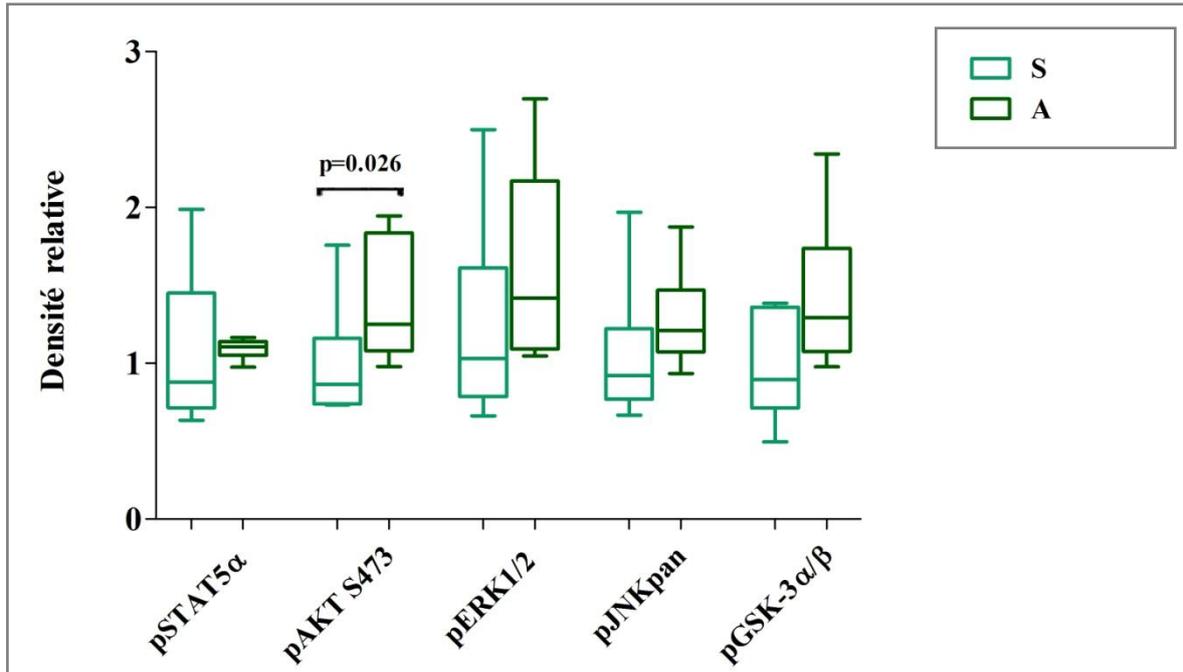


Figure 42 : Comparaison des principales phosphoprotéines chez les deux types de patients

L'antibody-array a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25μM ou l'IMQ10μg/mL pendant 72 heures. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales.

L'activité d'ERK après culture pendant 72 heures avec ou sans stimulation a été vérifiée par Western Blot chez 3 patients stables dont 2 avaient un statut muté et un non déterminé et 8 patients avec une forme agressive dont 5 avaient un statut non muté et 3 muté. Les résultats étaient concordants avec les résultats d'antibody-array. L'activité d'ERK était augmentée après stimulation par l'ODN0.25μM, surtout chez les patients avec une forme agressive, avec une différence significative par rapport au témoin ($p=0.008$) (figures 43 et 44). Par contre, l'IMQ n'avait pas d'effet significatif sur l'expression de pERK.

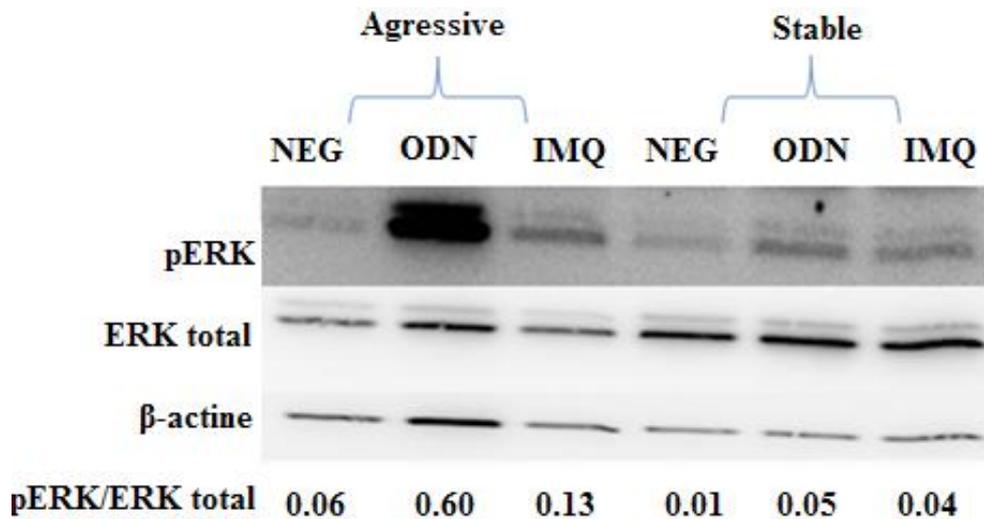


Figure 43 : Exemple de l'expression d'ERK chez un patient stable et un patient avec une forme agressive par la méthode de Western blot

Le Western Blot a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25 μ M ou l'IMQ10 μ g/mL pendant 72 heures et l'activité de ERK (le ratio phosphop-p44/42 MAPK (ERK1/2)(Thr 202/Tyr204)/ p44/42 MAPK (Erk1/2)) a été analysé.

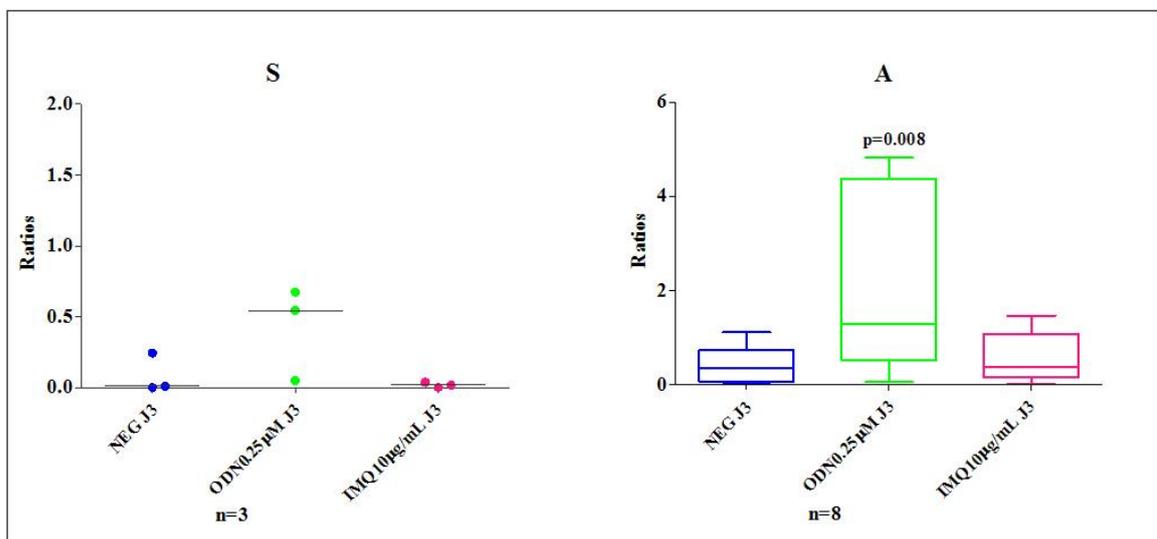


Figure 44 : Activité d'ERK1/2 chez les patients stables ou avec une forme agressive

Le Western Blot a été réalisé en utilisant les protéines extraites de lymphocytes B tumoraux avec ou sans stimulation par l'ODN0.25 μ M ou l'IMQ10 μ g/mL pendant 72 heures et l'activité de ERK (ratio phosphop44/42 MAPK (ERK1/2)(Thr 202/Tyr204)/ p44/42 MAPK (Erk1/2)) a été analysé. Les boîtes à moustaches représentent les médianes et les valeurs minimales et maximales.

"S" : Stable, "A" : Agressive.

L'activité d'AKT (phosphoAKT S473/AKTtotal) a été également vérifiée en Western Blot pour 2 patients S/M et 2 patients avec une forme A/NM. Les résultats montrent que l'ODN0.25 μ M induit plutôt une augmentation de l'activité d'AKT alors que l'IMQ induit plutôt une diminution de l'activité d'AKT (figure 45)

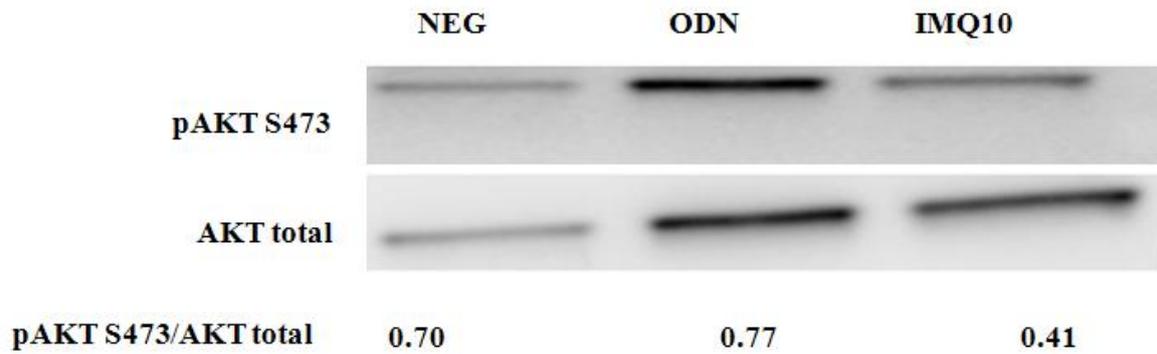


Figure 45 : Exemple de l'expression d'AKT par la méthode de Western blot

Les protéines extraites des lymphocytes B tumoraux sans ou avec stimulation avec l'ODN0.25 μ M ou l'IMQ10 μ g/mL pendant 72 heures, ont été utilisées pour évaluer l'activité d'AKT (phosphoAKTs473/AKT total) par la méthode Western blot.

VIII - MANIPULATIONS SUR LES CELLULES DAUDI

L'évaluation de la modification induite par l'activation de TLR-7 ou TLR-9 sur l'apoptose, la prolifération en CFSE et l'expression de CD5, CD19 et CD20 a été réalisée en cytométrie en flux sur des cellules Daudi, transfectées par le gène de CD5 (Daudi CD5⁺) ou par un vecteur vide (Daudi PNT).

VIII.1 - Apoptose (figure 46)

Pour les cellules de Daudi CD5⁺, les taux d'apoptose à l'état de base étaient respectivement de 24.9%, 5.65% et 29.1% à J1, J2 et J3. Le PMA induit une apoptose très importante de ces cellules, jusqu'à 67.2% en J3. La stimulation par ODN ou IMQ a les mêmes effets, avec une induction de l'apoptose plus marquée pour les Daudi PNT.

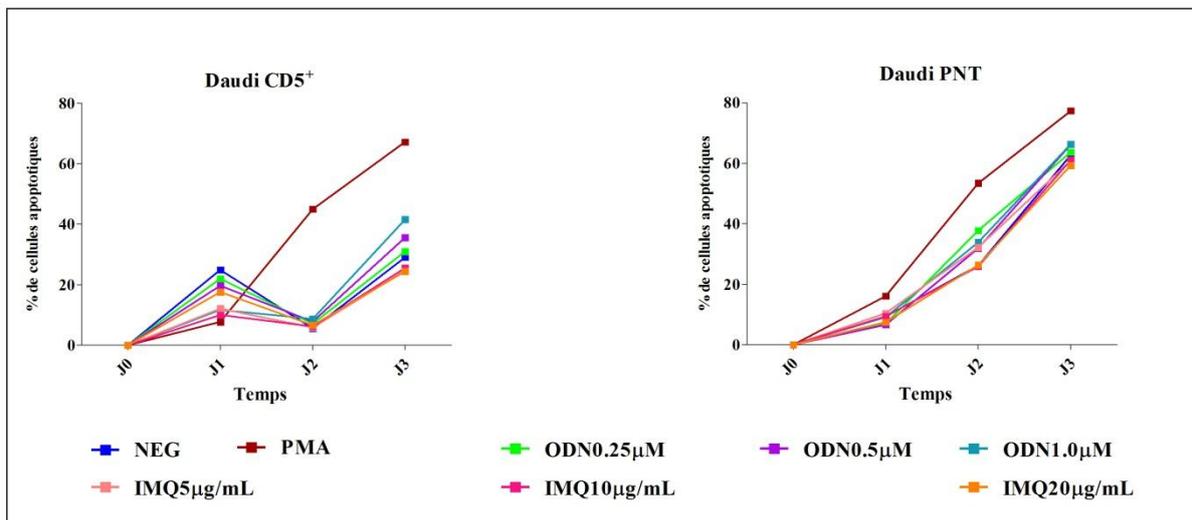


Figure 46 : Apoptose évaluée par SSC^{hi}FSC^{lo}

Les cellules Daudi stimulées ou non pendant 24, 48, et 72 heures avec 5 μg/L de PMA, 0.25μM, 0.5μM ou 1.0μM d'ODN M362 ou avec 5 μg/mL, 10 μg/mL, 20 μg/mL d'imiquimod R837 ou ont été marquées par des anticorps CD5-PC5, CD19-PC7 ou l'anticorps CD20-PC7. L'apoptose a été évaluée par mesure de la population SSC^{hi}FSC^{lo} des cellules Daudi CD5⁺ et PNT.

VIII.2 - Mesure de la prolifération par CFSE (figure 47)

Une diminution significative de la MFI du CFSE des cellules Daudi (CD5⁺ et PNT) est observée dans toutes les conditions, avec une prolifération paradoxalement moindre après stimulation par le PMA.

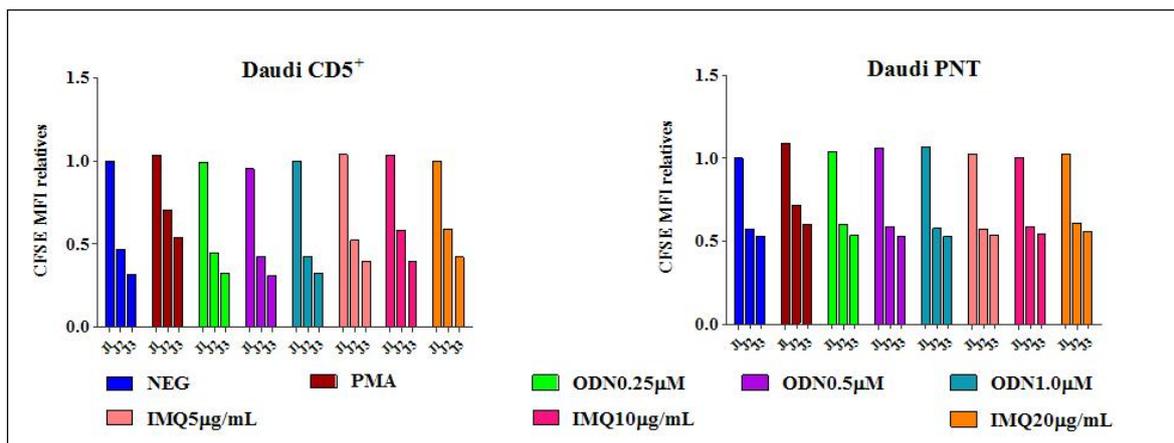


Figure 47 : Etude de la prolifération des cellules Daudi stimulées ou non avec du PMA, de l'ODN ou avec l'Imiquimod R837

Les cellules Daudi marquées par le CFSE ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 5 µg/L de PMA, avec 0.25µM, 0.5µM ou 1.0µM d'ODN ou avec 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837. La fluorescence du CFSE a été mesurée par cytométrie en flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en ratios de MFI du CFSE par rapport à son expression basale de NEGJ1.

VIII.3 - Modifications immunophénotypiques (figure 48)

L'expression de CD19, sur les cellules Daudi CD5⁺, diminue après tous les types de stimulation, surtout après activation par le PMA, après 24 et 48 heures de culture. L'expression de CD19 était légèrement augmentée à 72 heures de culture. Peu de modifications de l'expression de CD19 ont été observées sur les cellules Daudi PNT.

L'expression de CD5 dans le milieu seul et après stimulation avec le PMA, l'ODN ou l'IMQ diminue avec le temps sur les cellules Daudi CD5⁺. De plus, le PMA, l'ODN et l'IMQ induisent une diminution de l'expression de CD5 par rapport aux témoins, surtout à J1 et J2 sur ces cellules. Peu de modifications de l'expression de CD5 ont été observées sur les cellules Daudi PNT.

L'expression de CD20 était diminuée par rapport au témoin après la stimulation avec le PMA sur les deux types de cellules, ainsi qu'après stimulation par l'ODN sur les cellules DAUDI CD5⁺.

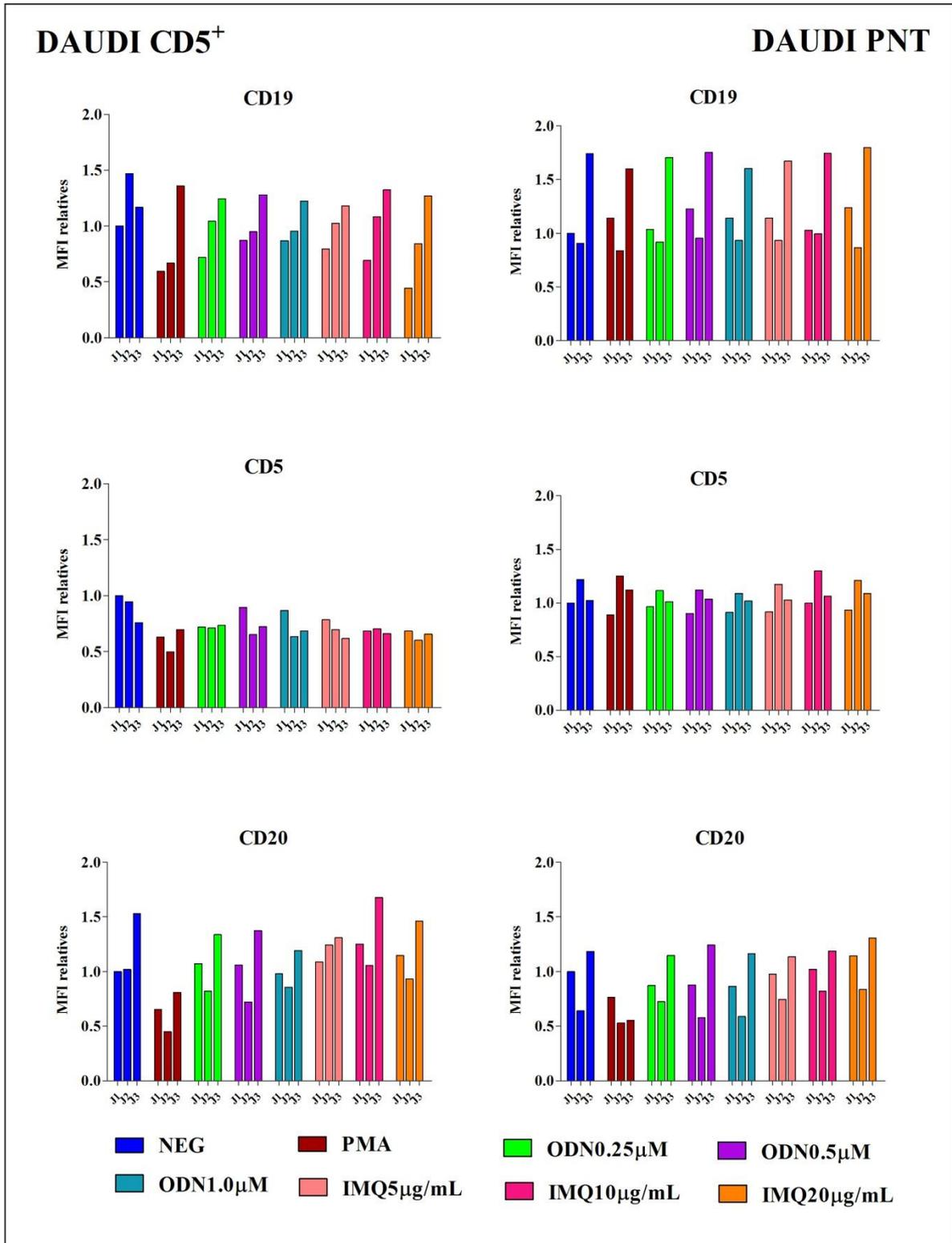


Figure 48 : Expression de CD19, CD5 et CD20 sur des cellules Daudi CD5⁺ et PNT stimulées ou non par PMA, ODN ou IMQ

Les cellules Daudi CD5⁺ et PNT ont été incubées avec du milieu de culture seul (NEG), avec 5 µg/L de PMA, avec 0.25µM, 0.5µM, 1.0µM d'ODN M362(ODN), ou avec 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837(IMQ). L'expression de CD19, CD5 et CD20 a été mesurée par cytométrie en flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en ratios de MFI par rapport à l'expression basale de NEGJ1. Les graphes à gauche et à droite représentent les résultats des cellules Daudi CD5⁺ et PNT, respectivement.

DISCUSSION

Les lymphocytes B tumoraux de la LLC expriment des formes fonctionnelles de TLR-7 et TLR-9, comme cela a été montré par des travaux antérieurs de notre laboratoire (Grandjenette, Kennel et al. 2007) et de l'équipe de Spaner (Spaner, Shi et al. 2006). Cependant, la LLC n'est pas une maladie homogène et le travail présenté ici a tenté de mettre en évidence les liens entre la réponse des cellules de LLC aux ligands de ces TLRs et les caractéristiques des patients. Deux types de critères ont été pris en compte : les caractéristiques cliniques et le statut mutationnel IGH des cellules clonales.

Dans ce cadre, les effets de la stimulation par les ligands de TLR-7 et TLR-9 ont été analysés, incluant l'apoptose, la prolifération, les modifications immunophénotypiques et la production de cytokines au niveau des cellules tumorales de LLC, en utilisant le PMA comme contrôle positif. En parallèle, les voies de signalisation de l'apoptose et des phosphoprotéines ont été étudiées en antibody-microarray et Western Blot.

Le PMA, contrôle positif d'activation, induit la survie et la prolifération des cellules B de LLC

Le PMA a été choisi dans ce travail comme contrôle de stimulation positive sur les cellules de patients porteurs d'une LLC. On peut d'emblée noter que les cellules Daudi, transfectées ou non, ont un comportement différent en présence de PMA par rapport aux cellules de LLC. D'une manière générale, le modèle de cellules Daudi transfectées pour exprimer CD5 n'a pas montré de réactivité comparable aux cellules de LLC de patients.

Le PMA, promoteur de tumeur (Yang and Kazanietz 2003) est une substance mitogène capable d'activer les cellules B sans l'aide de cellules T (Mond, Feuerstein et al. 1991).

Nous avons montré que cet ester de phorbol protège de l'apoptose et induit une prolifération des cellules tumorales de LLC. Ceci a confirmé, dans une série indépendante, les observations précédentes du laboratoire (Grandjenette, Kennel et al. 2007).

L'ester de phorbol PMA, également appelé TPA (12-O-tétradécanoylphorbol -13-ester), est capable d'activer la protéine kinase C (PKC) et d'autres molécules non PKC telles que les chimérines, les RhoGAPs (Rho GTPase-activating proteins) et MUNC13S. Il s'ensuit une activation des voies de signalisation des MAP-kinases, de NF- κ B, des STATs (Signal transducers and activators of transcription) ou d'AKT. Les esters de phorbol sont donc impliqués dans la prolifération, la survie et l'expression génique (Yang and Kazanietz 2003).

Le PMA a été décrit comme un inhibiteur de l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, y compris des cellules tumorales de LLC, impliquant l'activation de MAPK/ERK, NF- κ B,

AKT et l'induction de l'expression de gènes anti-apoptotiques ou l'inhibition de l'expression des gènes pro-apoptotiques (Busutil, Bottero et al. 2002; Barragan, de Frias et al. 2006).

Deux études ont également montré une prolifération des cellules tumorales de LLC en présence de PMA (Vilpo, Vilpo et al. 1999; Vilpo, Tobin et al. 2005), résultat également observé dans nos propres travaux. Cette prolifération peut être expliquée par l'activation d'AKT ou par l'activation de la voie Raf/MEK/ERK.

L'imiquimod R837 induit un effet pro-apoptotique rapide des cellules B de LLC, surtout chez des patients stables et/ou mutés, de façon temps- et dose-dépendante

L'induction d'une apoptose rapide des cellules B tumorales par l'engagement de TLR-7 par l'Imiquimod, de façon temps- et dose-dépendante, surtout chez les patients stables et/ou mutés, confirme également dans une série indépendante les observations précédentes du laboratoire (Grandjenette, Kennel et al. 2007). Nous l'avons démontrée sur une première série par méthode TUNEL, identifiant les cassures d'ADN, puis par la mesure des signaux morphologiques en cytométrie en flux. Nous avons pu ainsi démontrer que l'apoptose induite par l'Imiquimod est plus efficace chez les patients stables (83% des patients "S/M") que chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutée (environ 40%). Ceci suggère que si un traitement par Imiquimod était envisagé, il serait plus efficace chez des patients en phase stable de la maladie et/ou avec un statut IGH muté. Une autre conclusion à tirer de ces observations est que l'engagement de TLR-7 est moins efficace dans les formes agressives et/ou non mutées.

Les cellules B tumorales stimulées avec l'Imiquimod R837 ont de plus des ratios normalisés de MFI du CFSE plus importants que les témoins, en accord avec les résultats précédents de notre laboratoire. Ces résultats pourraient être en partie liés à l'effet pro-apoptotique rapide et important induit par cet agoniste de TLR-7. En effet, la condensation cytoplasmique liée à l'apoptose pourrait entraîner une concentration corpusculaire du CFSE augmentant corrélativement le signal de chaque événement cellulaire. En tout état de cause, ces résultats montrent que l'engagement de TLR-7 n'induit pas de prolifération avant l'apoptose des cellules puisque le signal CFSE ne diminue pas.

L'apoptose spontanée des cellules B de LLC in vitro (Collins, Verschuer et al. 1989) a été confirmée dans notre étude, avec cependant un taux inférieur à celui observé avec l'Imiquimod, suggérant une induction active d'apoptose après l'engagement de TLR-7.

L'activité pro-apoptotique de l'Imiquimod au niveau des cellules B de LLC-B a été peu

rapportée dans la littérature. Avec une dose très faible de 1 μ M (environ 0.2 μ g/mL), Hammadi et al. ont montré à l'inverse une augmentation de la viabilité de cellules B de LLC de patients stables sur 3 jours (Hammadi, Billard et al. 2008). Une activité pro-apoptotique de l'imiquimod a été par contre démontrée à des concentrations de 25 à 50 μ g/mL, beaucoup plus proches de celles que nous avons utilisé, in vivo aussi bien qu'in vitro, dans des tumeurs différentes (carcinome baso-cellulaire, carcinome épidermoïde, tumeurs vasculaires et métastases cutanées de mélanome)(Schon and Schon 2007).

Les techniques d'antibody array et de Western Blot ont mis en évidence l'implication de la voie d'activation de la Caspase-3 dans les cellules testées (cf. chapitre ad hoc infra). Ceci a tout d'abord confirmé l'implication de cette voie dans l'apoptose spontanée des puits témoins, en accord avec les observations de Rosati et al. (Rosati, Sabatini et al. 2010). Ces signaux étaient retrouvés après engagement de TLR-7, mais de façon plus importante chez les patients stables et/ou mutés que chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutés corroborant les résultats obtenus avec la méthode TUNEL ou l'analyse des signaux de taille/granularité. L'activité de la caspase-3 diminue en fonction du temps, probablement en raison du degré important d'apoptose observé à J3.

L'ODN CpG M362 protège contre l'apoptose et induit une légère prolifération des cellules B de LLC, surtout chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutés

Là encore, l'observation de l'effet protecteur de l'engagement de TLR-9 par les cellules de LLC confirme dans une série indépendante les travaux précédents du laboratoire (Grandjenette, Kennel et al. 2007). Cependant, cet effet est plus marqué sur les cellules provenant de patients ayant une forme agressive et/ou un statut mutationnel non muté.

La réponse des cellules B de LLC à une stimulation par des ODN CpG a déjà été publiée dans la littérature, avec des résultats hétérogènes. Decker et al. ont rapporté, après marquage à la thymidine tritiée, une prolifération des cellules tumorales de patients ayant une forme clinique stable, à 3 jours de culture avec l'ODN de type "B"(Decker, Schneller et al. 2000). Jahrsdörfer et al. ont également relevé, grâce à un marquage au CFSE, une prolifération des cellules B de LLC après 4 jours de stimulation avec l'ODN CpG 2006, suivie d'une apoptose (Jahrsdorfer, Hartmann et al. 2001; Jahrsdorfer, Muhlenhoff et al. 2005) qui comparaient surtout différents types de syndromes lymphoprolifératifs B. D'autres études ont rapporté que les ODNs induisaient une apoptose et diminuaient le nombre de cellules tumorales de LLC, quel soit le statut des patients (Castro, Prada et al. 2006; Liang,

Moseman et al. 2010) . Ces résultats indiquent que la stimulation des cellules tumorales de LLC via les ODN CpG a un effet pléiotropique sur la prolifération et l'apoptose.

Les différences observées entre les résultats obtenus dans la littérature peuvent avoir rapport avec la structure et la composition des différents types d'ODN testés, susceptibles d'activer des voies de signalisation différentes. Dans l'étude de Liang et al, la stimulation ce sont des ODN CpG de type B (CpG2006 et CpG 685) induit l'apoptose et diminution du nombre des cellules tumorales de LLC mais les ODN CpG de type A (CpG 2216 et CpG PB4) n'ont pas cet effet (Liang, Moseman et al. 2010).

Ces différences peuvent également refléter l'hétérogénéité de la LLC qui constitue une pathologie hétérogène sur les plans clinique et biologique. Bien que Jahrsdörfer et al. n'aient pas précisé le statut de leurs patients, ils ont rapporté que les CpG ODN, aussi bien que les ODN sans motifs CpG classiques, avaient un effet différent sur l'apoptose des cellules présentant une délétion sur les chromosomes 13 (del(13q)), 17 (del(17p)) ou 11 (del(11q)), ou une trisomie 12 (Jahrsdorfer, Wooldridge et al. 2005). Récemment, Longo et al, ont rapporté une prolifération plus importante des cellules B de patients avec une forme agressive, présentant des gènes IgVH non mutés et à l'inverse une apoptose des cellules B de patients stables présentant des gènes IgVH mutés (Longo, Laurenti et al. 2007). De plus, en accord avec nos propres observations, une prolifération plus importante a été rapportée par l'équipe de Tarnani après stimulation par des ODN CpG de type B (ODN CpG2006) de cellules B de LLC provenant de patients présentant des gènes IgVH non mutés, exprimant ZAP-70 et CD38 et portant des délétions 17p13 et 11q22 (Tarnani, Laurenti et al. 2010). Cette réponse était par ailleurs fortement prédictive de la PFS (progression-free survival), du TTT (time to treatment) et de l'OS (overall survival) dans une cohorte de 91 patients.

Toutes ces études ont plutôt utilisé des ODNs CpG de type B. Nous avons d'emblée choisi d'utiliser un ODN CpG de type C qui a la propriété de combiner les propriétés des ODN CpG de type A et de type B. Il est donc probable que nos résultats reflètent plus fidèlement les effets de l'engagement de TLR-9 sur les cellules de LLC par les ODN d'origine bactérienne du microenvironnement.

Les techniques d'antibody array et de Western blot ont également confirmé le moindre engagement de la voie de la Caspase-3 après l'engagement de TLR-9, confirmant la protection conférée à ces cellules contre l'apoptose spontanée.

Les cellules de LLC sont bloquées au stade du G0/G1 du cycle cellulaire, et l'utilisation de TLR-9 permet de les remettre en cycle. Cette propriété est utilisée au laboratoire pour la réalisation des caryotypes (Dicker, Schnittger et al. 2006). In vivo, il a été suggéré d'utiliser

des ODN pour rendre les cellules de LLC plus sensibles à la chimiothérapie cytotoxique conventionnelle (Meinhardt, Wendtner et al. 1999).

L'imiquimod et l'ODN CpG M362 induisent une modulation des antigènes membranaires des cellules de LLC

Les antigènes CD20 et CD52 sont des cibles thérapeutiques importantes pour les anticorps monoclonaux. La chimiothérapie, complétée par la prescription d'anticorps anti-CD20 (rituximab) et / ou anti-CD52 (alemtuzumab) a montré son efficacité dans le traitement de la LLC (Cheson 2010; Zelenetz, Abramson et al. 2010).

CD20 est une phosphoprotéine à quatre passages transmembranaires, non glycosylée, qui apparaît dans la moelle osseuse sur les précurseurs B juste avant le stade pré-B et disparaît sur les plasmocytes (Ernst, Li et al. 2005). Ce marqueur est présent sur la majorité des cellules des syndromes lymphoprolifératifs et des lymphomes B, bien que le niveau d'expression soit plus faible sur les cellules de LLC (Ernst, Li et al. 2005; Prevodnik, Lavrencak et al. 2011). Bien que son rôle physiologique soit mal connu, CD20 pourrait participer à la régulation des flux calciques, et contribuer à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (Tedder and Engel 1994).

CD52 est une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules hématopoïétiques, surtout les lymphocytes T et B, et à un moindre degré sur les monocytes, les macrophages et les éosinophiles (Alatrash, Albitar et al. 2010). CD52 est aussi exprimé sur les cellules néoplasiques d'origine lymphoïde, y compris la LLC (Alatrash, Albitar et al. 2010). Le rôle physiologique de CD52 sur les lymphocytes n'est pas clair.

Plusieurs travaux ont montré une corrélation entre la densité antigénique de CD20 et CD52 à la surface de cellules et les effets du traitement par les anticorps monoclonaux qui les reconnaissent (Ginaldi, De Martinis et al. 1998; Prevodnik, Lavrencak et al. 2011). Donc les stratégies qui peuvent augmenter l'expression antigénique de CD20 et de CD52 pourraient être intéressantes dans le traitement de la LLC. Ayant constaté une modulation de l'intensité d'expression de CD19 au cours de la culture lors des travaux de cytométrie précédents (apoptose et prolifération avec fenêtrage de la population tumorale CD19⁺/CD5⁺ cf. infra), nous avons recherché si ce phénomène impliquait aussi les cibles thérapeutiques des monoclonaux.

Nous avons ainsi observé que l'Imiquimod et l'ODN augmentent l'expression de CD20, de façon plus importante chez les patients stables et/ou mutés pour l'ODN. A l'inverse,

l'expression de CD52 diminue, après stimulation par Imiquimod ou ODN. Cette diminution est surtout nette chez les patients ayant une forme agressive et/ou non mutés. La spécificité de ces résultats est démontrée d'une part par ces variations différentes (augmentation ou diminution), par l'effet plus marqué observé selon les caractéristiques des patients et par la quasi absence d'effet du PMA sur l'expression de ces marqueurs. On peut également noter que même à l'état de base, l'expression de CD20 et CD52 diffère légèrement, bien que de manière non significative, selon les caractéristiques de la maladie. Plusieurs travaux dont les nôtres (Decker, Schneller et al. 2000; Jahrsdorfer, Hartmann et al. 2001; Spaner, Shi et al. 2006; Grandjennette, Kennel et al. 2007; Spaner and Masellis 2007) ont mis en évidence l'augmentation d'expression des molécules de costimulation sur les cellules de LLC stimulées via les TLR. Il a également été montré que l'ODN CpG 2006 peut augmenter l'expression de CD20 (Jahrsdorfer, Hartmann et al. 2001; Jahrsdorfer, Muhlenhoff et al. 2005). Cependant, la modulation de l'expression de CD52 induite par l'ODN et celle de CD20 et CD52 induites par l'Imiquimod n'ont pas été rapportées à notre connaissance.

CD19 est une glycoprotéine transmembranaire spécifique de la lignée B, qui en vertu de son domaine cytoplasmique établit le seuil de la signalisation intrinsèque des cellules B et règle les voies de transduction du signal dépendantes et indépendantes du BCR (Poe, Minard-Colin et al. 2012). CD19 est exprimé très précocement sur les cellules hématopoïétiques engagées dans la lignée B et persiste tout au long de la différenciation (Poe, Hasegawa et al. 2001; Poe, Minard-Colin et al. 2012). Les cellules B de souris déficientes en CD19 sont peu répondeuses aux signaux transmembranaires et produisent des réponses immunitaires humorales T-dépendantes faibles (Poe, Hasegawa et al. 2001; Poe, Minard-Colin et al. 2012). A l'inverse, les cellules B de souris surexprimant CD19 sont hypersensibles aux signaux transmembranaires, prolifèrent et produisent des réponses immunitaires humorales fortes (Sato, Steeber et al. 1997; Poe, Hasegawa et al. 2001). Une autre étude a rapporté que la ligation CD19 peut agir positivement ou négativement sur la prolifération des cellules B, selon les signaux de stimulation (Callard, Rigley et al. 1992). L'expression de CD19 est aussi conservée sur la majorité de tumeurs de la lignée B, incluant la LLC, bien que parfois à un niveau plus faible que sur des lymphocytes B normaux. Ces cellules peuvent donc utiliser CD19 pour amplifier des signaux transmembranaires et promouvoir leur expansion et leur survie comme cela a été démontré dans plusieurs modèles murins (Yazawa, Fujimoto et al. 2003; Yoshizaki, Iwata et al. 2008; Poe, Minard-Colin et al. 2012).

Dans notre étude, le PMA et l'ODN induisent une augmentation de l'expression de

CD19, de façon temps-dépendante, avec la même cinétique que la prolifération induite par ces deux stimulations. Ceci suggère que CD19 peut être impliqué dans la prolifération induite par le PMA et l'ODN. Par contre l'Imiquimod n'a pas d'effet sur la modulation de CD19 chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutés et induit plutôt une diminution de l'expression de CD19 chez les patients stables et/ou mutés. Ceci est concordant avec le faible effet de l'Imiquimod sur la prolifération.

CD5 est une protéine constitutivement exprimée à la surface des lymphocytes T ainsi que par une sous-classe de lymphocytes B (B1a). Elle peut être induite sur des lymphocytes B conventionnels par une stimulation chronique via le BCR in vivo et in vitro. Elle peut également apparaître après stimulation par un anti-IgM et du CD40-ligand soluble in vitro (Gary-Gouy, Harriague et al. 2002). CD5 régule négativement la signalisation du BCR, ce qui se traduit par une capacité réduite à proliférer et une inhibition du pic de Ca_2 intracellulaire après stimulation par le BCR (Gary-Gouy, Sainz-Perez et al. 2007). La coexpression de CD19 et de CD5 est un marqueur spécifique des cellules de LLC et des lymphomes du manteau. Dans la LLC, il a été proposé que cette expression est liée à une stimulation chronique des cellules, et qu'elle contribue à la survie et à l'anergie des cellules B tumorales de LLC (Gary-Gouy, Sainz-Perez et al. 2007).

Dans notre étude, nous avons observé une forte augmentation de l'expression de CD5 induite par le PMA. A l'inverse, l'ODN et l'Imiquimod, diminuent l'expression de cette molécule de façon temps-dépendante, surtout chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutés. L'ODN et l'Imiquimod peuvent entraîner une activation des cellules B tumorales de la LLC, se traduisant par une production de cytokines (Chen 2011 et cf. infra) et une augmentation de l'expression des marqueurs de costimulation et de présentation des cellules tumorales de la LLC (Grandjenette, Kennel et al. 2007). La prolifération ou l'apoptose active accompagnant cette activation pourraient être en partie liées à la diminution d'expression de CD5, conduisant à une diminution de l'anergie des cellules tumorales. Un mécanisme différent serait impliqué dans l'activation par le PMA qui agit plus directement sur les voies de la PKC. Il est d'ailleurs curieux d'observer l'effet sélectif de l'activation par le PMA sur la modulation des antigènes membranaires.

La stimulation avec l'Imiquimod, l'ODN CpG M362 et le PMA
induit la production de certaines cytokines

Les cytokines pro-inflammatoires sont une composante importante de l'immunogénicité et des microenvironnements impliqués dans la pathogenèse de la LLC. Leur dérégulation peut être responsable de l'apoptose inefficace et de l'accumulation des cellules malignes (Pleyer, Egle et al. 2009; Fecteau and Kipps 2012). La sécrétion de cytokines a été examinée au niveau des surnageants de culture des suspensions cellulaires tumorales stimulées ou non dans ce travail.

Il faut noter que le milieu de culture utilisé, supplémenté par de l'Ultrosor comme apport de facteurs trophiques complémentaires, est dépourvu de sérum donc de cytokines pouvant potentiellement interférer avec les dosages. Ceci renforce la significativité des résultats observés. Il faut toutefois noter que la séparation cellulaire permettant d'obtenir des suspensions lymphocytaires prive certainement les cellules B de LLC de facteurs micro-environnementaux qui les entourent *in vivo*. La significativité essentielle de ce travail réside donc dans la comparaison de la sécrétion cytokinique "de base" à celle observée après modulation des TLRs.

Une production faible d'IL-8 a été observée à l'état de base chez tous les patients, indiquant un rôle possible de cette cytokine dans la physiopathologie de la LLC. Même si la production de cytokines induite par le PMA, l'Imiquimod et l'ODN chez les patients est hétérogène, ces trois stimulations induisent essentiellement une production significative d'IL-6 et IL-8.

Globalement, ce sont les patients avec une forme stable qui présentent la production d'IL-6 et IL-8 la plus importante en réponse à la stimulation par l'Imiquimod. Ceci suggère que ces cytokines jouent un rôle dans le contrôle de la maladie, peut être en influant sur le microenvironnement immunitaire (réponse antileucémique). Cette hypothèse est corroborée par le cas paradoxal de deux patients testés dans ce travail qui présentaient une forme de LLC à IGH non muté mais une forme stable de la maladie. La production de cytokines était la plus importante chez ces patients en réponse à l'Imiquimod.

La stimulation par l'ODN, par contre, induit une production d'IL-6 significativement plus forte chez les patients présentant une forme agressive et/ou non mutée ($p < 0.05$ pour l'IL-6 entre les patients présentant une forme stable ou une forme agressive). Par ailleurs, l'ODN induit des taux d'IL-8 supérieurs à ceux observés après stimulation par l'Imiquimod chez les patients présentant une forme agressive et/ou non mutés.

Cette observation suggère que le niveau de réponse cytokinique peut également influencer dans le contrôle de la maladie.

Ces résultats sont en partie semblables à ceux de Liang X et al., qui ont rapporté que la stimulation avec un autre ligand de TLR-9, ODN CpG2006 5µg/mL induit la production d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10 et de TNF-α par des cellules B non purifiées de LLC cultivées pendant 72 heures (Liang, Moseman et al. 2010). Spaner et al, utilisant un autre ligand de TLR-7, S28690 à une concentration de 1µg/mL, ont montré que la production de TNF-α, IL-10, IL6 et IL8 était la plus significative par des cellules B purifiées de LLC cultivées pendant 48 heures (Spaner, Shi et al. 2006). Il est à noter que l'Imiquimod a conduit à une faible production d'IL-10 et pratiquement pas de TNF-α dans notre travail. Peu d'études ont rapporté la production de cytokines après activation par le PMA dans la LLC. Hulkkonen et al. ont cependant montré que le PMA peut induire une production d'IL-6 et TNF-α (Hulkkonen, Vilpo et al. 1998).

Contrairement aux macrophages ou aux pDCs, les cellules tumorales de LLC, activées par TLR-7, produisent généralement très peu d'IFN de type I ou d'IL-12 (Spaner and Masellis 2007).

Comme les IRF (Interferon (IFN) regulatory factor) sont des protéines très importantes pour réguler la transcription des gènes d'IFN, une production faible ou absente d'IFN-α pourrait être liée à une expression faible ou absente des protéines IRF. En effet, IRF-5 induit la transcription des gènes d'IFNβ et IFN-α après engagement de TLR-7 ou TLR-9 (Schoenemeyer, Barnes et al. 2005), or son expression est déficitaire dans un grand nombre d'hémopathies malignes primaires, y compris la LLC (Barnes, Kellum et al. 2003). Les raisons d'une production faible ou absente d'IL-12p70 dans la LLC ne sont pas claires, mais les IFN de type I contribuant à la synthèse d'IL-12 (Gautier, Humbert et al. 2005) il pourrait s'agir d'une conséquence de l'absence de production de ces cytokines.

L'IFN-γ peut augmenter l'expression des molécules MHC classe I et II et stimuler beaucoup de fonctions effectrices (Shaikh.z 2011). L'IL-12 et l'IFN-γ promeuvent de plus la différenciation Th1. Ainsi, l'IL-12 peut induire la production d'IFN-γ par les lymphocytes T et par les cellules NK (Yap, Pesin et al. 2000).

Aucune sécrétion d'IL-12p70 ou IFN-γ n'a été détectée ici, quelle que soit la condition de culture. Ceci indique que ces cellules B stimulées semblent incapables d'orienter une réponse lymphocytaire T vers un profil Th1. On peut aussi conclure de cette absence de production que les suspensions cellulaires étaient peu contaminées par des cellules monocytaires ou dendritiques qui pourraient produire ces cytokines après stimulation.

L'IL-10, une cytokine immunosuppressive produite par les lymphocytes Th2, les monocytes et les lymphocytes B, est capable d'inhiber la production de diverses cytokines Th1, telles que l'IL-2 et l'INF- γ (Shaikh 2011). Elle peut également inhiber la synthèse des cytokines proinflammatoires produites par les monocytes/ macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules NK (Shaikh 2011). Le TNF- α induit directement l'apoptose de diverses cellules tumorales et non-tumorales (Shaikh 2011). En outre, la production de TNF- α augmente l'efficacité de la réponse immune anti-tumorale des lymphocytes T (Calzascia, Pellegrini et al. 2007). Le TNF- α active également de nombreux types cellulaires tels que les monocytes, les lymphocytes et les macrophages (Akira, Taga et al. 1993). A côté de leurs effets dans l'immunité, l'IL-10 et le TNF- α pourraient jouer un rôle dans la survie des cellules de LLC, mais ceci est très controversé dans la littérature (Bianchi, Heslop et al. 1988; Fluckiger, Durand et al. 1994; Rosati, Sabatini et al. 2005; Djurdjevic, Zelen et al. 2009). Aucun profil spécifique de production de ces deux cytokines n'a été observé dans notre étude, l'induction la plus importante étant observée après stimulation par le PMA.

L'IL-6 est produite par beaucoup de cellules. Elle agit comme un facteur de croissance pour la maturation des cellules B et induit leur maturation finale en plasmocytes (Shaikh 2011). Elle est impliquée dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T et participe à l'induction de l'expression d'IL-2 et des récepteurs de l'IL-2 (Shaikh 2011). L'IL-6 inhibe la production du TNF- α , du GM-CSF, de l'IFN- γ et de MIP-2 et induit la synthèse de glucocorticoïdes. Elle a cependant peu d'effets sur la synthèse de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β (transforming growth factor- β)(Shaikh 2011).

L'IL-6 joue aussi un rôle important dans la prolifération et l'apoptose des cellules tumorales et contribue à un microenvironnement favorable à la progression tumorale (Ara and Declerck 2010). Dans la LLC, les taux d'IL-6 et de son récepteur soluble (sIL-6R) sont élevés et associés positivement avec le stade clinique et la masse tumorale (Reittie, Yong et al. 1996; Robak, Wierzbowska et al. 1999). Reittie et al. ont de plus montré que l'IL-6 peut protéger les cellules de LLC de l'apoptose (Reittie, Yong et al. 1996). Dans l'étude de Büssing et al., la production d'IL-6 in vitro était associée à une activation des cellules de LLC se traduisant par une augmentation de l'expression des marqueurs CD25 et CD71, suivie d'une apoptose (Büssing, Stein et al. 1999). Aderka et al. ont rapporté par ailleurs que l'IL-6 est un antagoniste du TNF capable d'inhiber la prolifération de cellules tumorales de LLC (Aderka, Maor et al. 1993).

Dans notre étude, le PMA, l'Imiquimod et l'ODN induisent une production très importante d'IL-6 chez tous les types de patients. Ceci corrobore l'effet potentiellement

pléiomorphe de l'IL-6, dont la production est associée ici à une induction ou à une protection contre l'apoptose. Mais de toute façon, la production d'IL-6 par ces stimulations indique que le PMA, l'Imiquimod et l'ODN peuvent induire une activation des cellules tumorales de LLC, donc augmenter potentiellement leur immunogénicité.

La production d'IL-8 était encore plus importante que celle d'IL-6 et est observée tout au long de la période de stimulation. L'IL-8 est un membre de la famille des chemokines CXC, responsable de la migration et de l'activation de neutrophiles et d'autres types cellulaires dont les lymphocytes au niveau des sites d'inflammation (Shaikh 2011). L'IL-8 possède aussi des propriétés tumorigènes et proangiogéniques (Brat, Bellail et al. 2005).

Une grande étude a rapporté une augmentation des taux d'IL-8 dans le plasma de patients atteints de LLC, corrélée avec d'autres facteurs pronostiques, comme le stade de Rai ou la β 2m (Wierda, Johnson et al. 2003). Francia di Celle et al. ont rapporté une production importante d'IL-8 dans le surnageant de culture de cellules B de LLC (di Celle, Carbone et al. 1994) et ils ont également montré que cette cytokine sécrétée constitutivement par les cellules de LLC peut prolonger la survie des cellules leucémiques de façon autocrine par une expression accrue de mRNA de Bcl-2 (Francia di Celle, Mariani et al. 1996). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études (Secchiero, Corallini et al. 2006; Binsky, Haran et al. 2007). De plus, Molica et al. ont par ailleurs rapporté une corrélation entre les taux d'IL-8 sérique et les taux de bcl-2 suggérant ainsi que l'effet anti-apoptotique de cette interleukine pourrait intervenir via bcl-2 (Molica, Vitelli et al. 1999). Enfin, l'IL-8 peut jouer un rôle dans la mobilité et la migration des cellules leucémiques et ainsi contribuer à la dissémination et à la progression de la LLC (Secchiero, Corallini et al. 2006).

La production d'IL-8, spontanée ou induite par le PMA et l'ODN pourrait donc prolonger la survie par une inhibition de l'apoptose des cellules de LLC. Il est plus difficile d'interpréter les effets de la production d'IL-8 induite par l'Imiquimod, qui précède une forte apoptose. De toute façon, la production importante d'IL-8 induite par toutes ces stimulations, indique, comme pour l'IL-6, que le PMA, l'Imiquimod et l'ODN peuvent induire l'activation des cellules leucémiques, donc potentiellement augmenter leur immunogénicité.

**Les réponses différentes des cellules en fonction du statut du patient
n'ont pas de rapport avec le niveau d'expression des TLRs**

Dans ce travail, nous avons montré que la stimulation des cellules de LLC par des agonistes de TLR-7 et TLR-9 était différente selon que les patients étaient dans une phase stable ou agressive de la maladie ou que le statut mutationnel des IGH du clone était muté ou non. Une des explications de ces effets variables pourrait être un niveau d'expression différent de ces deux récepteurs à la surface des cellules. La réanalyse des données de cytométrie concernant le niveau d'expression de TLR-7 et TLR-9 n'a en fait pas montré de corrélation avec le statut clinique. Deux autres études ont montré que l'expression de TLR-9 ne présente pas de corrélation avec la survie ou la prolifération induite par des ODN au niveau des cellules tumorales de LLC (Jahrsdorfer, Wooldridge et al. 2005; Longo, Laurenti et al. 2007). Les conclusions d'une étude de Spaner et al. étudiant les transcrits de TLR7 en rapport avec la réactivité à S28690 déterminée par les modifications d'expression des molécules de costimulation n'ont pas montré de corrélation (Spaner, Shi et al. 2006). Dans cette étude, d'autres composants de la voie de TLR-7, incluant MyD88, IRAK1, IRAK4 et TRAF6 étaient exprimés par tous les échantillons de LLC mais sans relation évidente avec l'expression de molécules costimulation induites par S28690 (Spaner, Shi et al. 2006). Ces données suggèrent que la réactivité différente des cellules tumorales de LLC en réponse à la stimulation avec l'Imiquimod et l'ODN CpG est déterminée par des molécules qui sont en aval de TLR-7 et TLR-9.

Une autre hypothèse serait que ces effets différents pourraient être liés à l'activation de voies de signalisation indépendantes de TLR-7 et TLR-9. En effet, deux études ont montré que l'activation des cellules induite par ODN CpG pourrait être régulée par des voies, indépendantes de TLR-9 (Dragoi, Fu et al. 2005; Sanjuan, Rao et al. 2006). Dans le travail de Dragoi et al. un modèle de souris KO démontre l'importance de la sous-unité catalytique de la DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs), activée directement par des DNA-CpG, même en l'absence de TLR-9 (Dragoi, Fu et al. 2005). L'équipe de Sanjuan et al. a montré un peu plus tard une activation directe par les ODN CpG de kinases de la famille Src capables à la fois d'induire directement une production de cytokines et un réarrangement du cytosquelette mais aussi d'amplifier la signalisation initiée par TLR-9 en phosphorylant la portion intracytoplasmique de ce récepteur complexé à son adaptateur MyD88 (Sanjuan, Rao et al. 2006).

En fait, de nombreuses interactions entre différentes voies de signalisation ont été mises

en évidence en réponse aux agents microbiens comme les ODN CpG ou les endotoxines de même qu'en aval de l'engagement de TLR-7 (Fan and Cook 2004).

La molécule co-adaptatrice MyD88, que nous n'avons pas étudié ici, pourrait être une de ces molécules partagées dont les niveaux d'expression conditionnent la signalisation TLR-7 ou TLR-9 dépendante. Il pourrait ainsi exister une fluctuation de l'expression de MyD88 en fonction du statut mutationnel et/ou de l'agressivité de la LLC. Ceci est suggéré par une étude récente de séquençage haut débit ayant montré des mutations de ce gène préférentiellement dans les formes IgVH mutées (Puente, Pinyol et al. 2011).

Rôles du stress oxydatif, de p53 et de la voie mitochondriale dans l'apoptose spontanée des cellules de LLC

L'apoptose est induite par deux voies majeures (figure 49).

La première, appelée voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, implique l'activation de récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF, y compris les récepteurs du ligand FAS (FAS/APO-1/CD95), de TNF- α (TNFR1) ou des récepteurs TRAIL-1 et-2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand) et leur protéines adaptatrices FADD (Fas-associated death domain) ou TRADD (TNFR1-associated death domain protein) (Burz, Berindan-Neagoe et al. 2009; Duprez, Wirawan et al. 2009).

La seconde, appelée voie intrinsèque ou voie mitochondriale, est dépendante du relargage du cytochrome c mitochondrial (Burz, Berindan-Neagoe et al. 2009; Duprez, Wirawan et al. 2009). C'est surtout l'implication de cette dernière qui a été observée ici.

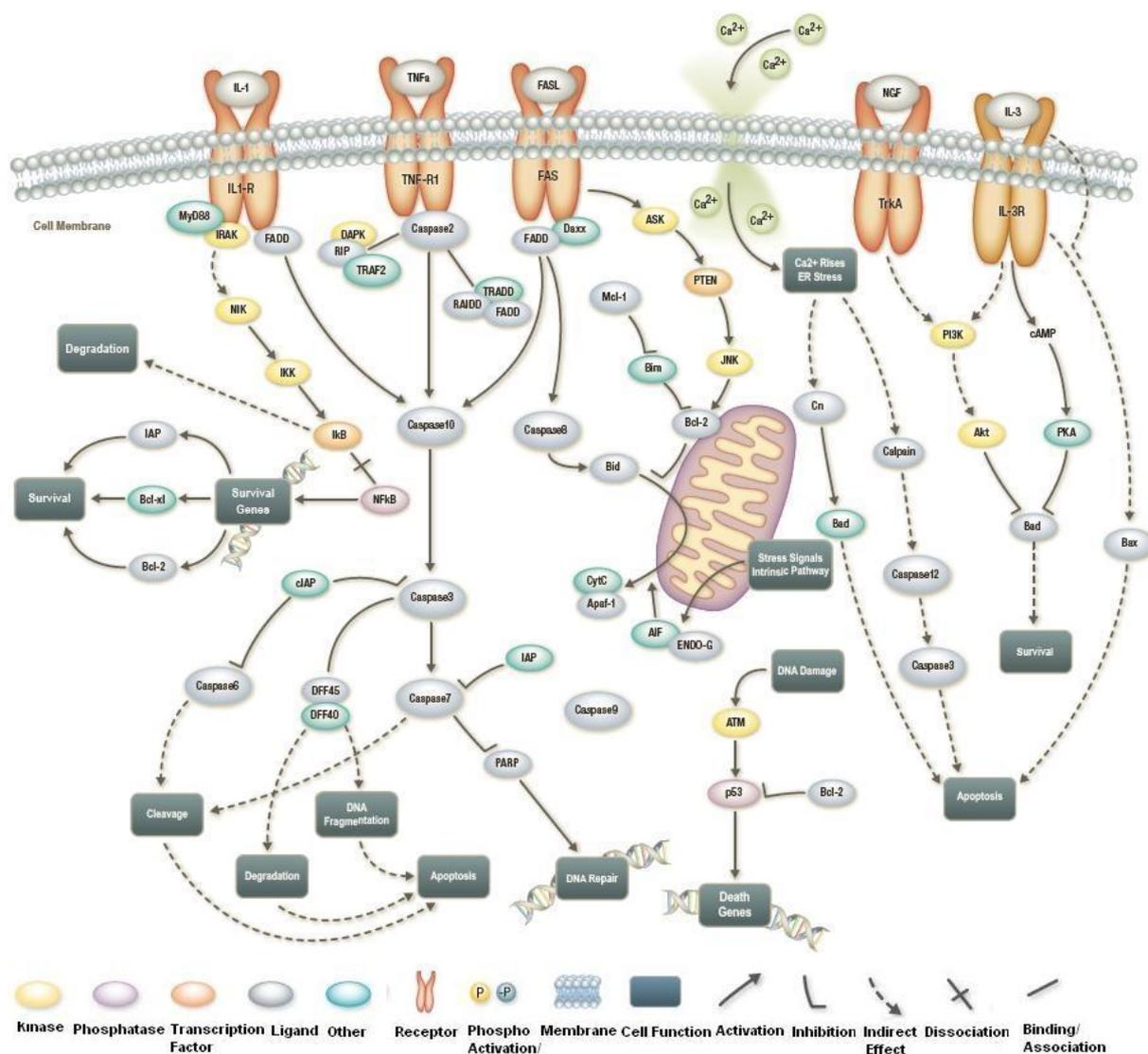


Figure 49: Voies de signalisation de l'apoptose (adapté d'Epitomics, <http://www.Epitomics.com/products/pathways/apoptosis.php>)

Récemment, une autre voie intrinsèque a été identifiée, régulée par le réticulum endoplasmique (RE), impliquant la caspase-4, la caspase-8 et la caspase-3 (Rosati, Sabatini et al. 2010).

La technologie des antibody microarrays nous a effectivement permis d'étudier 35 protéines associés à l'apoptose dans les cellules de LLC. L'utilisation des contrôles négatifs (incubation en milieu seul) permet ainsi d'explorer les modalités de l'apoptose spontanée classiquement observée *in vitro* pour ces cellules. Les protéines les plus impliquées identifiées ici sont la catalase, la caspase-3, p53S15, SMAC/Diablo, p27kip1, le cytochrome c, Bax, HO-1/HMOX1, HO-2/HMOX2 et HSP60. De plus, l'activité de toutes ces protéines est plus importante chez les patients avec une forme stable, qui ont effectivement tendance à apoptoser de façon plus rapide.

Comme mentionné plus haut, les niveaux d'expression de caspase-3 et de caspase-3 clivée corroborent l'implication de cette voie dans l'apoptose spontanée des cellules de LLC.

Les signaux les plus importants observés concernaient la catalase, avec un niveau jusqu'à 25 fois plus important que celui des protéines les plus faiblement exprimées. La catalase est principalement localisée dans les peroxisomes et le cytoplasme, mais il en existe également dans la matrice mitochondriale (Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2012). Cette enzyme catalyse le peroxyde d'hydrogène, entraînant une diminution du niveau des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, Reactive oxygen species), qui jouent des rôles positifs et négatifs respectivement, dans la prolifération et la survie des cellules (Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2012). Les enzymes HO-1 et HO-2 sont aussi des enzymes anti-oxydantes (Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2012).

L'expression forte de ces enzymes reflète indirectement l'implication du stress oxydatif dans l'apoptose des cellules de LLC, leur production visant à contrecarrer ce dernier. Ces résultats corroborent ceux de Moran EC et al. qui ont rapporté que l'apoptose spontanée des cellules de LLC in vitro est liée au stress oxydatif, principalement produit par la respiration mitochondriale. Ces auteurs ont également montré une expression intracellulaire et une production autocrine de catalase par les cellules B de LLC visant à diminuer le stress oxydatif intracellulaire et tenter d'inhiber l'apoptose des cellules de LLC (Moran, Kamiguti et al. 2002). Une augmentation de l'activité plasmatique de la catalase a été rapportée chez des patients atteints de LLC par comparaison avec des sujets contrôles et cette activité est plus élevée chez les patients avec une forme progressive (Zelen, Djurdjevic et al. 2010). Ceci est cohérent avec la plus forte résistance à l'apoptose des cellules des patients présentant une forme agressive. Au niveau cellulaire, Oltra et al. ont montré de la même manière une diminution de différents paramètres du stress oxydatif dans les formes plus agressives résistant mieux à l'apoptose (Oltra, Carbonell et al. 2001). Une augmentation d'expression de HO-1 et de catalase a également été rapportée dans la leucémie myeloïde aiguë et la leucémie myéloïde chronique (Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2012). Dans ces deux leucémies, HO-1 promeut la prolifération et la survie et est associée à la résistance à la chimiothérapie (Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2012). Le stress oxydatif peut induire l'activation de p53 (Gu and Zhu 2012), capable d'activer des facteurs pro-apoptotiques tels que Bax, Puma ou Noxa. Ces derniers entraînent une libération de cytochrome c et des autres protéines mitochondriales pro-apoptotiques comme SMAC/Diablo. Ceci aboutit finalement à l'activation de la caspase-3 et à l'apoptose (Burz, Berindan-Neagoe et al. 2009). SMAC/Diablo inhibe de plus l'activité des protéines anti-apoptotiques IAPs (Burz, Berindan-Neagoe et al. 2009).

La protéine p27kip1, un régulateur clé du cycle cellulaire, est principalement impliquée dans l'inhibition de la prolifération cellulaire. Elle est fortement exprimée quand les cellules sont arrêtées au stade G0/G1 et son expression diminue quand les cellules progressent vers la phase S (Vrhovac, Delmer et al. 1998). De nombreuses études ont montré une expression importante de p27 au niveau des cellules tumorales de LLC in vivo et in vitro, mais son rôle dans l'apoptose cellulaire est controversé (Vrhovac, Delmer et al. 1998; Wolowiec, Wojtowicz et al. 2009; Frenquelli, Muzio et al. 2010). Nous avons aussi retrouvé une expression importante de p27 indiquant que les cellules tumorales de LLC testées étaient plutôt en phase G0/G1 mais aussi que p27 pourrait jouer un rôle dans l'apoptose.

HSP60, une autre protéine importante dans notre étude, est un membre de la famille des protéines HSPs (Heat shock proteins), nécessaires à la survie cellulaire en présence de stress (Calderwood, Khaleque et al. 2006). Parmi ces HSPs, HSP90 est impliquée dans la prolifération cellulaire, et HSP70 et HSP27 protègent les tumeurs de l'apoptose (Calderwood, Khaleque et al. 2006). Cohen-Sfady M et al., ont montré que HSP60 peut activer des cellules B naïves, ce qui se traduit par une augmentation de l'expression des molécules de classe II du MHC et des molécules de co-stimulation, ainsi que par la production de cytokines et une prolifération. L'engagement de HSP60 peut aussi protéger contre l'apoptose des cellules B de souris (Cohen-Sfady, Nussbaum et al. 2005; Cohen-Sfady, Pevsner-Fischer et al. 2009).

En conclusion, l'expression importante de ces protéines dans notre étude, apporte des précisions sur les mécanismes complexes et intriqués conduisant à l'apoptose spontanée des cellules tumorales de LLC in vitro. Ils confirment également l'utilisation préférentielle par ces cellules de la voie mitochondriale.

Les voies AKT et STATs sont impliquées dans la prolifération et la survie des cellules de LLC ainsi que la phosphorylation de p53, RSK et AMPK

La technologie d'antibody miroarray a également été appliquée à la détection de 46 phosphoprotéines impliquées dans la prolifération et la survie. Les signaux les plus forts ont été observés pour pAKT^{T308}, p70S6Kinase^{T421/S424}, p70S6Kinase^{T229}, pAMPK α 2^{T172}, p53^{S15}, p53^{S46}, pSTAT1^{Y701}, pSTAT2^{Y689}, pSTAT4^{Y693}, pRSK1/2^{S221} et pRSK1/2/3^{S380}. De plus, une détection plus importante de toutes les phosphoprotéines a été observée pour les patients présentant une forme agressive.

AKT, un serine/threonine kinase, est le médiateur central de la voie de la PI3Kinase (figure50). Son activation favorise la synthèse de protéines, la prolifération et la survie des

cellules et contribue au phénotype malin (Markman, Dienstmann et al. 2010). L'activation complète d'AKT nécessite sa phosphorylation sur la thréonine 308 et la sérine 473 (Duronio 2008). Une activation constitutive d'AKT renforçant les signaux de survie a été démontrée dans la LLC, et l'inhibition de son activation peut induire l'apoptose de ces cellules (Polak and Buitenhuis 2012). La Perifosine, un inhibiteur d'AKT, est actuellement testée dans un essai de phase II chez des patients atteints de LLC (Polak and Buitenhuis 2012).

La p70S6Kinase est une sérine/thréonine kinase, impliquée dans la voie PI3K/AKT et a donc les mêmes effets (Ip and Wong 2012; Ip and Wong 2012) (figure 50). Son activation a été observée dans de nombreuses tumeurs (Ip and Wong 2012; Ip and Wong 2012). Son activation est initiée par la phosphorylation de sites du domaine auto-inhibiteur, tels que Thr421 et Ser424, suivie par la phosphorylation de la région linker et ensuite du domaine catalytique, sur T229, pour obtenir l'activation complète de la kinase (Ip and Wong 2012; Ip and Wong 2012). L'expression importante d'AKT^{T308}, de la p70S6kinase^{T421/S424} et de la p70S6kinase^{T229} indique l'implication de la voie d'AKT dans la prolifération et la survie des cellules de LLC dans notre étude.

AMPK, activé par des stress métaboliques, régule non seulement le métabolisme, mais aussi presque tous les aspects des fonctions cellulaires, y compris la prolifération. Son activité est diminuée dans les tumeurs (Hardie 2011; Mihaylova and Shaw 2011). Dans la plupart des espèces, AMPK consiste en un hétérotrimère contenant une sous-unité catalytique (α) et deux sous-unités régulatrices (β et γ) (Mihaylova and Shaw 2011). L'activité d'AMPK nécessite la phosphorylation d'AMPK α en Thr172 (Mihaylova and Shaw 2011). Le mécanisme le plus décrit par lequel AMPK inhibe la croissance cellulaire est la suppression du mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), et en conséquence l'inhibition de la voie mTOR (Hardie 2011; Mihaylova and Shaw 2011). De plus, l'activation d'AMPK induit une augmentation de p53 et p27^{kip1} (Hardie 2011; Mihaylova and Shaw 2011). Notre observation d'une expression importante d'AMPK α 2^{T172} indique qu'il existe une inhibition de la prolifération dans la LLC et pourrait expliquer la prolifération relativement modérée observée en présence d'ODN par rapport à la PMA.

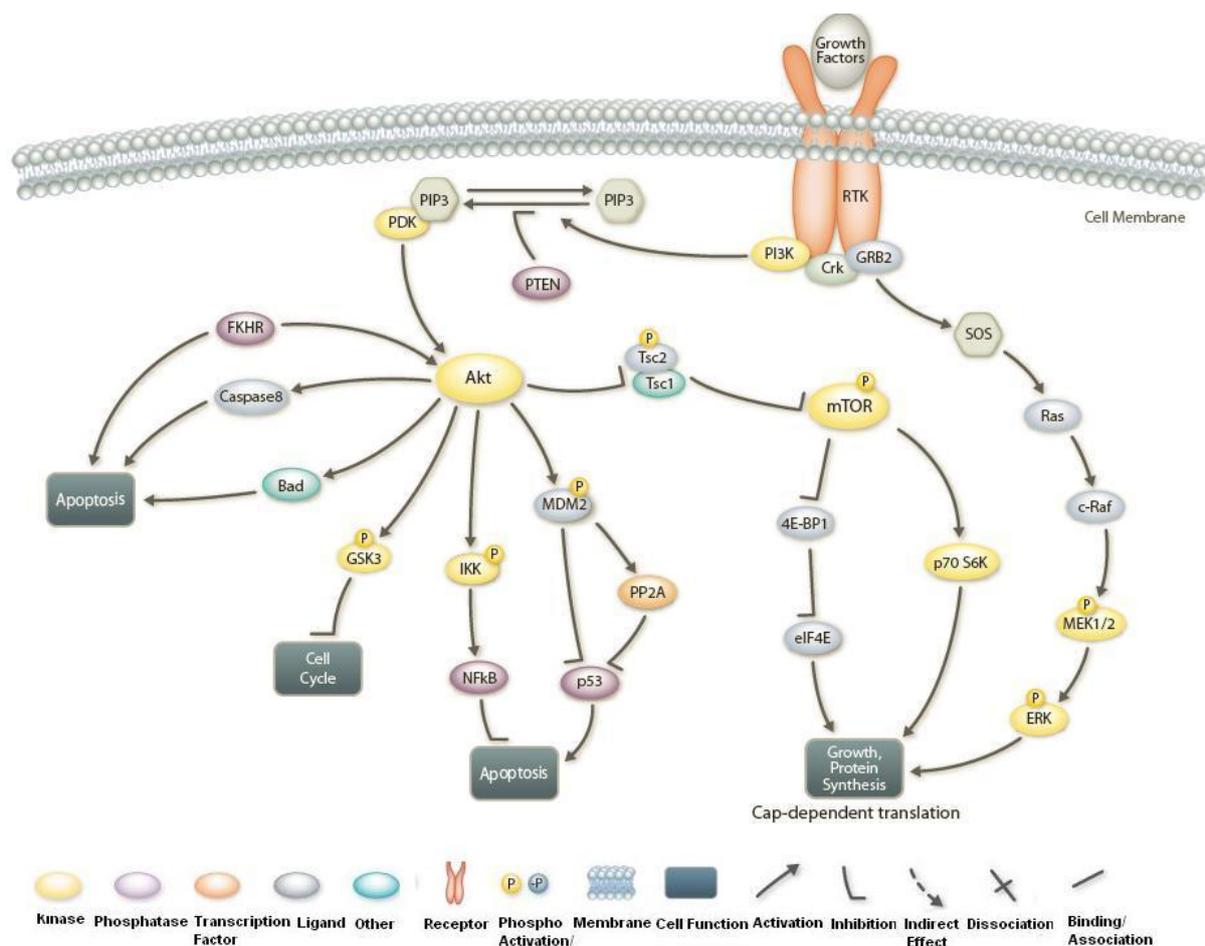


Figure 50: Voies de signalisation AKT et mTOR (adapté d'Epitomics, http://www.epitomics.com/products/pathways/akt_mtor.php)

RSK (90 kDa ribosomal S6 kinase), incluant RSK1-4, phosphorylée par MAPK/ERK et PDK1 (3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), favorise la prolifération, la survie, la motilité et la synthèse de protéines par les cellules (Romeo, Zhang et al. 2012). Elle joue également un rôle très important dans la tumorigénèse (Eisinger-Mathason, Andrade et al. 2010). Une activité complète de RSK implique sa phosphorylation sur Ser380 puis sur Ser221 (Romeo, Zhang et al. 2012). Une phosphorylation sur ces deux sites a été observée ici dans les cellules tumorales de LLC, témoignant de la présence d'une forme active de l'enzyme.

Les protéines STATs, incluant STAT-1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6, sont impliquées dans la voie JAK-STAT (figure 51). Elles participent à la régulation de la réponse cellulaire aux cytokines et facteurs de croissance (Kiu and Nicholson 2012). L'activité des STATs est principalement régulée par des phosphorylations sur les résidus sérine et tyrosine (Kiu and Nicholson 2012). L'activation de STAT 1, 2 et 4 induit plutôt l'apoptose, alors que STAT 3, 5 et 6 inhibent l'apoptose et la favoriseraient la prolifération des cellules (Yu, Pardoll et al. 2009; Vera, Rateitschak et al. 2011). De nombreux travaux indiquent qu'il existe une dysrégulation de la

voie de signalisation JAK-STAT, en particulier STAT 1, 3 et 5, en pathologie, y compris dans le cancer (Yu, Pardoll et al. 2009; Vera, Rateitschak et al. 2011). Il y a assez peu de travaux sur les STATs dans la LLC. Frank et al. ont rapporté que la phosphorylation de STAT 1 et 3 sur tyrosine ne se voit jamais dans des cellules fraîches de LLC, alors qu'une phosphorylation inhabituelle sur sérine de ces STATs y est systématiquement présente (Frank, Mahajan et al. 1997). La présence de STAT 1, 2 et 4 phosphorylées sur tyrosine dans nos résultats pourrait être liée à la production de cytokines observée et être impliquée dans la régulation de l'apoptose des cellules de LLC.

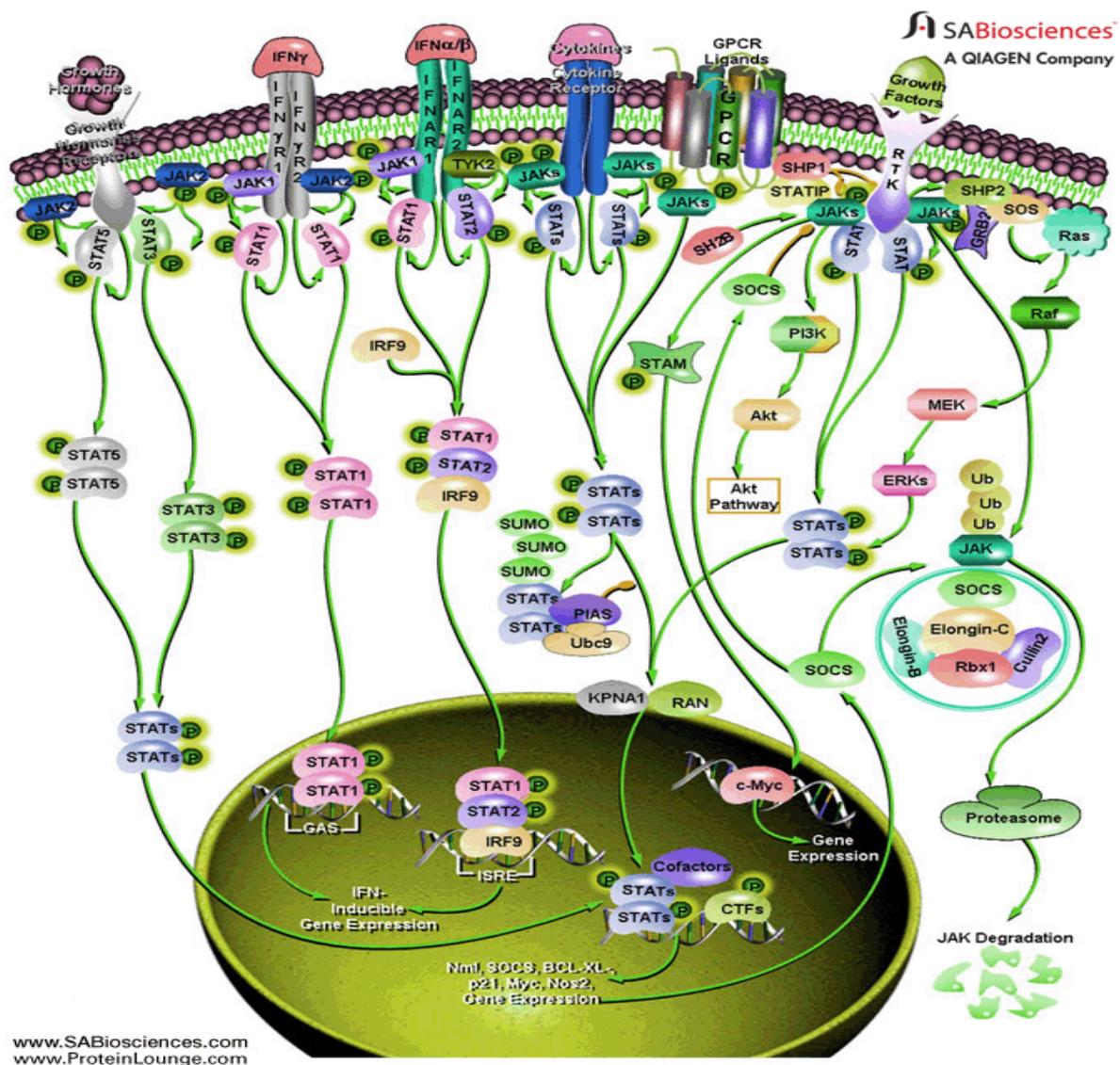


Figure 51: Voies de signalisation de JAK-STAT (adapté de SABiosciences, http://www.sabiosciences.com/pathway.php/sn=JAK_STAT_Pathway)

L'expression importante de p53 ser15 et ser46 joue un rôle pro-apoptotique, comme mentionné ci-dessus.

Les voies d'AKT et l'activité de RSK pourraient être impliquées dans une régulation positive de la prolifération et de la survie, alors qu'une régulation négative serait exercée par les voies de p53 et STAT1, 2 et 4 et l'activité d'AMPK. En conclusion, l'expression importante de ces phosphoprotéines indique que la survie et la prolifération des cellules tumorales de LLC sont régulées par des voies complexes interactives.

Signalisation proapoptotique induite par l'imiquimod R837

Nos résultats de Western blot ont confirmé que l'activité de p38 était augmentée significativement après stimulation par l'Imiquimod mais diminuée après stimulation par l'ODN CpG M362. La voie de MAPK/p38 est impliquée dans la transduction de signaux apoptotiques et dans la transcription de nombreuses protéines (figure 52). L'activation de p38 a été rapporté lors de l'apoptose de cellules de LLC induite par le flavopiridol, un analogue de la vitamine D3(EB1089), par des anticorps anti-CD20 (rituximab) ou par l'OSU-DY7, un dérivé du D-tyrosinol ciblant P38 (Pedersen, Buhl et al. 2002; Pepper, Thomas et al. 2003; Pepper, Thomas et al. 2003; Bai, Ma et al. 2011). Ceci indique que l'apoptose importante induite par l'Imiquimod passe par cette voieMAPK/p38 et confirme le rôle protecteur des ODN qui n'activent pas p38.

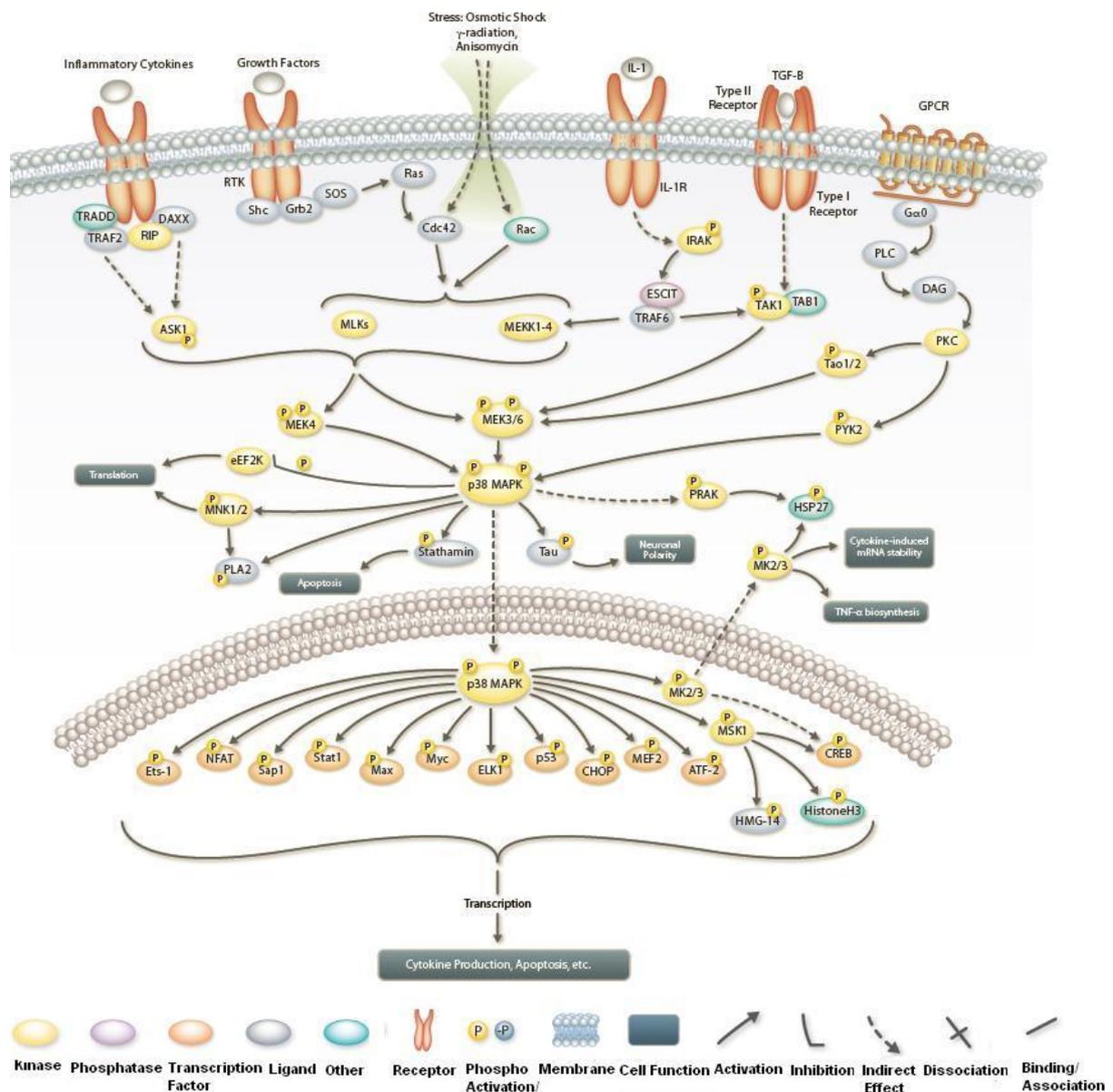


Figure 52 : Voies de signalisation de MAPKp38 (adapté d'Epitomics, <http://www.epitomics.com/products/pathways/MAPKp38.php>)

Les études de Schön et al. ont montré, comme nous le retrouvons, que l'effet proapoptotique de l'Imiquimod sur des lignées tumorales épithéliales et de mélanome, est indépendant des récepteurs de mort, mais dépendant de l'activité des caspases et des protéines de la famille de Bcl-2 (Schon and Schon 2007). Dans notre étude, l'expression des récepteurs de mort et de leur protéine adaptatrice FADD était effectivement faible et inchangée après stimulation par l'Imiquimod. L'implication de la famille Bcl-2 après stimulation par l'Imiquimod est difficile à interpréter avec les données d'antibody-microarray en raison des interactions importantes de protéines pro- et anti-apoptotiques et de l'existence d'une apoptose spontanée non négligeable dans les cellules contrôle. Cependant, dans toutes les

conditions, les ratios examinés étaient plutôt en faveur d'une balance pro-apoptotique.

La famille des c-JunN-terminal kinases JNK, comprend JNK1, JNK2 et JNK3. La voie MAPK/JNK joue un rôle très important dans la régulation de la survie et l'apoptose, avec des effets variables selon la stimulation, le type de cellules et la molécule JNK impliquée (Wada and Penninger 2004; Sabapathy 2012). Après 72 heures de culture avec de l'Imiquimod, nous avons observé une phosphorylation globale des protéines JNK (signal panJNK) plus importante chez les patients agressifs et donc probablement pas d'implication dans l'initiation de l'apoptose.

Une autre voie de signalisation cellulaire impliquée dans la survie cellulaire et activée par l'Imiquimod est celle de l'activation du facteur de transcription NF- κ B. L'activation de NF- κ B conduit à sa translocation dans le noyau où il active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ou l'inhibition de l'apoptose mais elle peut aussi promouvoir l'apoptose dans des contextes particuliers (Baldwin 2012). La translocation de NF- κ B peut en effet induire la transcription de protéines pro-apoptotiques telles que Fas, c-myc, p53 et I κ B α (Prasad, Ravindran et al. 2010). Nous n'avons pas étudié NF- κ B mais il est peut-être impliqué dans la signalisation induite par l'Imiquimod.

Enfin, les phosphoSTATs ne semblent pas plus impliquées que dans les cellules incubées en milieu seul dans l'apoptose induite par l'Imiquimod.

Signalisation antiapoptotique et proliférative induite par l'ODN CpG M362

L'analyse en antibody-microarray montre que de nombreuses protéines anti-apoptotiques sont significativement augmentées par la stimulation avec l'ODN CpG M362, surtout chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutés. Il s'agit essentiellement de Bcl-2 et Bcl-xL, de la survivine, de XIAP, HIF-1 α , HO-2/HMOX2, HSP27, HSP60, HSP70, cIAP-2, cIAP-1 et de la clusterine. L'ODN induit aussi une diminution de l'activité de protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bad et p53^{S15}. Les rôles de ces protéines dans l'apoptose sont bien décrits (Calderwood, Khaleque et al. 2006; Burz, Berindan-Neagoe et al. 2009; Klock, Baiersdorfer et al. 2009).

L'augmentation de ces protéines anti-apoptotiques et une diminution de Bax et Bad sont liées à l'activité d'AKT. Effectivement, nous avons également observé une augmentation de pAKT^{S473} après stimulation par l'ODN CpG M362. AKT inhibe directement ou indirectement de nombreuses protéines pro-apoptotiques telles que Bad, Bax, Puma, Bim, p53 et Fas-L. Il augmente aussi, directement ou indirectement, la production de protéines anti-apoptotiques

comme Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1 et les IAPs (Duronio 2008).

Comme nous l'avons observé pour la LLC, plusieurs études ont montré que l'ODN inhibe l'apoptose dans diverses cellules, telles que les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes B ou encore des cellules myocardiques. Ces modèles humains ou murins soulignent le rôle de la voie AKT dans ces effets, accompagnés par une augmentation de Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, IAP et une diminution de l'activité de p53, Bax et Bad (Francois, El Benna et al. 2005; Sester, Brion et al. 2006; Zhou, Zhen et al. 2009; Cao, Ren et al. 2012).

Nous avons mesuré l'activation des protéines apoptotiques au début de la stimulation (J1) et les phosphorylations à J3, mais nos résultats confirment que la voie AKT peut être impliquée dans la protection contre l'apoptose conférée par la stimulation par ODN-CpG.

La protéine AKT, comme mentionné ci-dessus, peut être aussi impliquée dans la prolifération de cellules normales et cancéreuses. Elle favorise la croissance cellulaire et la synthèse de protéines par l'activation de mTOR, suivie de celle de la p70S6kinase (Markman, Dienstmann et al. 2010). Elle induit la prolifération par inhibition des inhibiteurs du cycle cellulaire (p27 et p21) et en promouvant des protéines d'engagement dans le cycle (c-Myc et cycline D1) (Markman, Dienstmann et al. 2010). En effet, Longo et al, ont rapporté que l'ODN 2006, un ODN CpG de type B induit une activation d'AKT plus importante chez les patients atteints de LLC dont les cellules prolifèrent en réponse aux CpG ODN et que cette voie de signalisation est suffisante pour vaincre l'hyporéactivité des cellules tumorales de LLC à des signaux prolifératifs (Longo, Laurenti et al. 2007).

Dans notre étude, il semble toutefois, en dépit de l'augmentation d'AKT, que la voie mTOR soit peu impliquée.

En effet, nous avons bien observé une diminution de l'activité de GSK-3 α/β compatible avec une levée du contrôle du cycle cellulaire. Par contre, les phosphoprotéines mTOR^{S2448}, p70S6K^{T389}, p70S6K^{T421} et p70S6K^{T229} étaient diminuées. Ceci était compatible avec l'observation de l'augmentation des phosphoprotéines AMPK α 1^{T174} et AMPK α 2^{T172} qui ont été rapportées capables d'inhiber l'activité de mTOR (Inoki, Kim et al. 2012) et en conséquence de diminution la phosphorylation de p70S6K.

Les voies de signalisation conduisant à l'activation d'AKT via les ODN CpG ne sont toutefois pas claires. Il a été rapporté, comme mentionné plus haut, que l'activation d'AKT en réponse aux ODN CpG pourrait passer par DNA-PK (Dragoi, Fu et al. 2005). Toutefois, Sester et al. ont montré que les ODN CpG induisent la survie de macrophages murins via TLR-9 et la voie PI3K/AKT, indépendamment de DNA-PK (Sester, Brion et al. 2006).

La voie de signalisation Raf/MEK/ERK, activée par les ODN CpG via TLR-9 peut également contrôler l'expression de nombreuses protéines essentielles pour la survie et la prolifération cellulaire. Elle inhibe l'activité de protéines pro-apoptotiques, tel que Bad et Bim, mais augmente les protéines anti-apoptotiques, tel que Bcl-2, Mcl-1. Elle diminue également l'activité de la caspase-9, favorisant ainsi la survie cellulaire (McCubrey, Steelman et al. 2007). Ainsi, cette voie peut augmenter l'expression des cyclines D1 et E, de Cdk2 et de Cdk4 et diminuer l'expression de p27kip1, favorisant ainsi l'entrée dans la phase S du cycle et la prolifération cellulaire (McCubrey, Steelman et al. 2007). Les cellules malignes de LLC expriment une forme d'ERK activée constitutivement et une diminution de l'activité d'ERK est impliquée dans l'apoptose des cellules de LLC dans différents modèles (Wickremasinghe, Prentice et al. 2011). L'activité des protéines impliquées dans cette voie est régulée par la phosphorylation (Yoon and Seger 2006). Dans notre étude, la phosphorylation de MEK1/2 et MSK1/2 mais surtout d'ERK1/2 était augmentée par l'ODN CpG M362, suggérant que la protection contre l'apoptose et la prolifération conférée par cette stimulation passe par cette voie. Ceci est corroboré par des études ayant montré que la stimulation par ODN CpG peut induire l'activité de ERK dans des macrophages, des cellules dendritiques ou des lymphocytes B murins (Takeshita, Gursel et al. 2004). Longo et al, déjà mentionnés plus haut, ont de plus également montré que l'ODN 2006 induit aussi une activation d'ERK plus importante chez les patients dont les cellules prolifèrent en réponse à CpG ODN et que l'activation simultanée de AKT, ERK et JNK est nécessaire pour la progression du cycle cellulaire et la prolifération (Longo, Laurenti et al. 2007).

Les STATs, comme mentionné précédemment, participent à la régulation de la réponse cellulaire aux cytokines, et peuvent être impliquées dans le contrôle de la survie et de la prolifération cellulaire. Dans notre étude, après 72 heures de culture en présence d'ODN M362, nous avons effectivement observé une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de STAT 3, 5, 6 (surtout STAT5 α) et une diminution de la phosphorylation sur tyrosine de STAT 1 et 4 chez les patients avec une forme agressive mieux protégés contre l'apoptose et proliférant plus.

P38, comme mentionné au-dessus, joue un rôle important dans l'apoptose induite par l'Imiquimod dans notre étude. A l'inverse, son activité était logiquement diminuée, après stimulation par l'ODN CpG M362.

JNK, comme mentionné au-dessus, joue un rôle très important dans la régulation de la survie et l'apoptose. Alors que ces protéines ne semblent pas impliquées dans l'apoptose, l'activité JNK était augmentée après 72 heures de culture en présence d'ODN CpG M362,

chez les patients avec une forme agressive. Ceci suggère l'implication de la famille JNK dans la prolifération et/ou la protection contre l'apoptose.

La voie de NF- κ B, qui peut être activée par les ODN CpG, comme mentionné plus haut, est impliquée dans la prolifération et l'apoptose, mais nous ne l'avons pas étudiée directement.

Applications potentielles de l'activation de TLR-7 et TLR-9

Ces effets induits par l'Imiquimod et l'ODN CpG M362 indiquent que l'Imiquimod et l'ODN CpG M362 pourraient entrer dans une stratégie d'immunothérapie adjuvante pour les patients atteints de LLC.

En effet, un essai de phase I/II, utilisant un autre ligand de TLR-7, l'Imiquimod 852A, en injections intraveineuses, a montré que ce produit peut être administré sans risque aux patients atteints de LLC à une dose d'au moins 0.6 mg/m². Cette injection induisait la production de cytokines inflammatoires et d'IgM (Spaner, Shi et al. 2010). Dans cet essai, pour un patient sur neuf, l'exposition à l'imiquimod 852A a rendu les cellules tumorales plus sensibles à un régime de chimiothérapie basé sur la vincristine (Spaner, Shi et al. 2010). Malgré ces observations encourageantes, l'Imiquimod 852A seul avait une faible efficacité clinique faible, décevante au vu des observations ex vivo et de l'activité des ligands de TLR-7 contre les lymphomes cutanés (Spaner, Shi et al. 2010). Il faut toutefois noter que cet essai a utilisé des doses extrêmement faibles chez des patients à un stade avancé d'une forme agressive. Nos résultats indiquent que l'activation de TLR-7 serait moins efficace dans ces conditions. Des stratégies améliorées et une sélection différente des patients pourraient augmenter l'efficacité clinique des ligands de TLR-7.

En ce qui concerne les ODN CpG, l'ODN CpG 7909 (type B) a été utilisé dans un essai clinique de phase I, bien toléré en injections intraveineuses et sous-cutanées. Cet essai n'a pas montré que CpG 7909 avait un effet thérapeutique clinique sur la LLC. Cependant, des modifications immunologiques ont été observées sur les cellules de LLC et les cellules T et NK des patients, confirmant des travaux in vitro et cliniques antérieurs (Zent, Smith et al. 2012). Ces effets, dose- et voie-dépendants, incluent une uprégulation de CD20, CD86 et TRAIL sur les cellules de LLC et une augmentation du nombre et de l'activation des cellules T et NK (Zent, Smith et al. 2012).

CONCLUSIONS

Cette étude montre que TLR-7 et TLR-9 sont actifs et répondent à leurs ligands sur les cellules de LLC. Ces réponses passent par la mise en jeu de nombreuses voies de signalisation que nous avons tenté d'approcher. Les résultats de nos différentes observations sont cohérents et permettent de mieux décrire les conséquences de l'engagement de ces récepteurs sur les cellules de LLC. Ils indiquent par ailleurs que l'agressivité de la maladie et/ou le statut mutationnel sont liés à des modalités de réponse différentes, bien que les niveaux d'expression de ces deux TLRs soient similaires.

L'analyse des voies de signalisation dans les cellules de LLC cultivées a été compliquée par les caractéristiques intrinsèques de ces cellules. En effet, nous avons pu confirmer que l'apoptose spontanée importante in vitro propre à ces cellules passe par l'activation de la voie mitochondriale lorsqu'elles sont incubées en milieu seul. Ces cellules « témoin » présentent également un engagement des voies de survie surtout chez les patients présentant une forme agressive et/ou non mutée, et une production spontanée d'IL-8.

L'Imiquimod induit une apoptose des cellules tumorales, surtout chez les patients avec une forme stable et/ou mutée, impliquant en plus de la voie mitochondriale, la voie MAPK/p38. Cette dernière est probablement également impliquée dans l'augmentation de l'expression de CD20 et la production des cytokines IL-6 et IL-8 observée après stimulation de TLR-7.

L'ODN peut induire la prolifération des cellules tumorales et les protège contre l'apoptose, surtout pour les patients avec une forme agressive et/ou non mutée. Cette inhibition de l'apoptose passe par la production de nombreuses protéines anti-apoptotiques. L'observation d'une activité augmentée des voies MAPK/ERK, PI3K/AKT et Jak/Stat et d'une activité diminuée de la voie MAPK/p38 explique ces effets anti-apoptotiques. Ces voies de signalisation sont également impliquées de façon cohérente dans la prolifération cellulaire et les augmentations de synthèses protéiques (CD19 et CD20 membranaires, IL-6 et IL-8 sécrétées) observées.

L'activation des voies de transcription de protéines n'est cependant pas univoque car l'Imiquimod et l'ODN CpG M362 induisent tous deux une diminution de l'expression de CD52 et CD5, surtout chez les patients avec une forme agressive et/ou non mutée.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'Imiquimod pourrait entrer dans une stratégie d'immunothérapie adjuvante pour les patients atteints de LLC à un stade précoce et un statut muté de la maladie par son effet anti-tumoral directe d'induction de l'apoptose. L'Imiquimod pourrait également augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales de LLC, en augmentant leur production de cytokines et l'expression de molécules co-stimulation. Il

pourrait enfin sensibiliser les cellules à une meilleure réponse aux anticorps anti-CD20 en augmentant le niveau d'expression membranaire de cet antigène de différenciation. De plus l'induction d'apoptose médiée par l'imiquimod R837 pourrait permettre la production in vitro de structures hautement immunogènes reconnues par des cellules dendritiques permettant d'éliminer les cellules malignes en association avec la chimiothérapie ou en thérapie adjuvante.

Les ODN CpG M362 pourraient également être utilisés dans une telle approche adjuvante pour transformer les cellules B tumorales en cellules présentatrices d'antigènes efficaces, se traduisant par la production de cytokines et l'expression de molécules co-stimulation. La stimulation par les ODN CpG en présence de corps apoptotiques générés par l'Imiquimod pourrait permettre un chargement efficace de motifs tumoraux et permettre, en présence d'un environnement cytokinique approprié, d'obtenir une activation lymphocytaire efficace.

PERSPECTIVES

Dans la continuité de ce travail, nous pouvons envisager un certain nombre d'études.

- Il faudrait confirmer que l'apoptose observée après la stimulation avec l'Imiquimod et la protection contre l'apoptose obtenue après stimulation par l'ODN CpG M362 sont respectivement dépendantes ou non de TLR-7 et TLR-9. La chloroquine qui est un inhibiteur de l'acidification endosomale connu pour bloquer l'activation médiée par TLR-7 et TLR-9 pourrait être utilisée.

- La prolifération induite par l'ODN CpG M362 pourrait être étudiée pendant plus longtemps et complétée et par une étude de l'entrée en cycle cellulaire, en utilisant un marquage par iodure de propidium.

- Une étude plus approfondie de l'engagement de la voie mitochondriale d'apoptose des cellules tumorales avec ou sans stimulation par l'Imiquimod pourrait être engagée, en particulier en comparant des extraits protéiques cytoplasmiques et mitochondriaux.

- Une confirmation de l'implication de voie de MAPK/p38 dans l'apoptose induite par l'Imiquimod, pourrait être vérifiée en utilisant des inhibiteurs de p38MAPK, tels que SB203580.

- De même, des inhibiteurs pourraient permettre de préciser l'implication des voies PI3K/AKT, MAPK/ERK et STATs (STAT5 α) dans la prolifération et la protection contre l'apoptose induites par l'ODN CpG M362. Ceci pourrait utiliser LY294002, inhibiteur de la voie PI3K/AKT ou U0126, inhibiteur de la voie MEK/ERK.

- La voie de NF-kB rapportée dans plusieurs études, n'a pas été explorée dans notre modèle et pourrait l'être par Western blot ou en cytométrie en présence de BAY-11, inhibiteur de la dégradation d'I κ B.

- L'effet de l'augmentation de l'expression de CD20 induite par l'Imiquimod et l'ODN CpG M362 sur la réponse aux anticorps anti-CD20 pourrait être étudié in vitro dans un premier temps.

- Enfin, l'objectif initial de la réalisation de ces travaux, à savoir l'utilisation d'agonistes de TLR-7 et TLR-9 dans une stratégie thérapeutique reste à explorer. Ceci passe par la démonstration in vitro de l'induction de la prolifération de lymphocytes T allogéniques stimulées par des cellules de LLC activées par un ODN CpG et chargées par des corps apoptotiques autologues obtenus après stimulation par l'Imiquimod. Dans ce modèle, l'activation T induite pourrait être examinée par mesure de leur prolifération (CSFE), de leur production cytokinique (cytométrie en flux multiparamétrique) et de leur potentiel cytotoxique (granzyme B en cytométrie en flux). En effet il est important de vérifier dans quelle mesure les cellules de LLC se comportent comme cellules présentatrices activatrices de

la cytotoxicité ou au contraire anergisantes ou tolérogènes.

- Dans un deuxième temps, le potentiel cytotoxique de CTL autologues vis-à-vis des cellules tumorales stimulées avec l'Imiquimod et l'ODN CpG M362 pourrait alors être évalué.

L'objectif final serait l'utilisation de ces agonistes de TLRs dans des études cliniques de phase I.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aderka, D., Y. Maor, et al. (1993). "Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia cells that is induced by tumor necrosis factor-alpha or -beta." Blood **81**(8): 2076-2084.
- Agathangelidis, A., N. Darzentas, et al. (2012). "Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies." Blood **119**(19): 4467-4475.
- Akira, S. (2003). "Mammalian Toll-like receptors." Curr Opin Immunol **15**(1): 5-11.
- Akira, S., T. Taga, et al. (1993). "Interleukin-6 in biology and medicine." Adv Immunol **54**: 1-78.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Alatrash, G., M. Albitar, et al. (2010). "Circulating CD52 and CD20 levels at end of treatment predict for progression and survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR)." Br J Haematol **148**(3): 386-393.
- AltekruseSF, KosariCL, Krapcho M et al(2010). SEER Clinical Statistics Review, 1975–2007. National Cancer Institute, Bethesda, MD. Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007
- Andrieu.JM and Colonna.P, Eds. (1997). Cancers : évaluation, traitement et surveillance. . Paris.
- Ara, T. and Y. A. Declerck (2010). "Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression." Eur J Cancer **46**(7): 1223-1231.
- Bai, L. Y., Y. Ma, et al. (2011). "OSU-DY7, a novel D-tyrosinol derivative, mediates cytotoxicity in chronic lymphocytic leukaemia and Burkitt lymphoma through p38 mitogen-activated protein kinase pathway." Br J Haematol **153**(5): 623-633.
- Baldwin, A. S. (2012). "Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF-kappaB: critical mechanisms in immune function and cancer." Immunol Rev **246**(1): 327-345.
- Barnes, B. J., M. J. Kellum, et al. (2003). "Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death." Cancer Res **63**(19): 6424-6431.
- Barragan, M., M. de Frias, et al. (2006). "Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C{beta}." J Leukoc Biol **80**(6): 1473-1479.
- Baum, T. P., N. Pasqual, et al. (2004). "IMGT/GeneInfo: enhancing V(D)J recombination database accessibility." Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D51-54.
- Bell, J. K., G. E. Mullen, et al. (2003). "Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors." Trends Immunol **24**(10): 528-533.

- Belot, A., P. Grosclaude, et al. (2008). "Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005." Rev Epidemiol Sante Publique **56**(3): 159-175.
- Bernal, A., R. D. Pastore, et al. (2001). "Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor." Blood **98**(10): 3050-3057.
- Bernasconi, N. L., N. Onai, et al. (2003). "A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells." Blood **101**(11): 4500-4504.
- Beyer, M., M. Kochanek, et al. (2005). "Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine." Blood **106**(6): 2018-2025.
- Bianchi, A. C., H. E. Heslop, et al. (1988). "Effects of tumour necrosis factor and alpha interferon on chronic B cell malignancies." Nouv Rev Fr Hematol **30**(5-6): 317-319.
- Binet, J. L., A. Auquier, et al. (1981). "A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis." Cancer **48**(1): 198-206.
- Binsky, I., M. Haran, et al. (2007). "IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor- and CD74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13408-13413.
- Blasius, A. L. and B. Beutler (2010). "Intracellular toll-like receptors." Immunity **32**(3): 305-315.
- Boyum, A. (1976). "Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages." Scand J Immunol Suppl **5**: 9-15.
- Brat, D. J., A. C. Bellail, et al. (2005). "The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis." Neuro Oncol **7**(2): 122-133.
- Brenner, H., A. Gondos, et al. (2008). "Trends in long-term survival of patients with chronic lymphocytic leukemia from the 1980s to the early 21st century." Blood **111**(10): 4916-4921.
- Browne, E. P. (2012). "Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors." Immunology **136**(4): 370-379.
- Burz, C., I. Berindan-Neagoe, et al. (2009). "Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets." Acta Oncol **48**(6): 811-821.
- Bussing, A., G. M. Stein, et al. (1999). "Release of interleukin-6 in cultured B-chronic lymphocytic leukaemia cells is associated with both activation and cell death via apoptosis." Anticancer Res **19**(5B): 3953-3959.
- Busuttill, V., V. Bottero, et al. (2002). "Blocking NF-kappaB activation in Jurkat leukemic T cells converts the survival agent and tumor promoter PMA into an apoptotic effector." Oncogene **21**(20): 3213-3224.
- Calderwood, S. K., M. A. Khaleque, et al. (2006). "Heat shock proteins in cancer: chaperones

of tumorigenesis." Trends Biochem Sci **31**(3): 164-172.

- Calissano, C., R. N. Damle, et al. (2009). "In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Blood **114**(23): 4832-4842.
- Calissano, C., R. N. Damle, et al. (2011). "Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells." Mol Med **17**(11-12): 1374-1382.
- Callard, R. E., K. P. Rigley, et al. (1992). "CD19 regulation of human B cell responses. B cell proliferation and antibody secretion are inhibited or enhanced by ligation of the CD19 surface glycoprotein depending on the stimulating signal used." J Immunol **148**(10): 2983-2987.
- Calzascia, T., M. Pellegrini, et al. (2007). "TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice." J Clin Invest **117**(12): 3833-3845.
- Cantwell, M., T. Hua, et al. (1997). "Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia." Nat Med **3**(9): 984-989.
- Cao, Z., D. Ren, et al. (2012). "CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury: Involving activation of PI3K/Akt signaling." Biochim Biophys Acta.
- Carballido, E., M. Veliz, et al. (2012). "Immunomodulatory drugs and active immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia." Cancer Control **19**(1): 54-67.
- Carty, M., R. Goodbody, et al. (2006). "The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling." Nat Immunol **7**(10): 1074-1081.
- Castro, J. E., C. E. Prada, et al. (2006). "Thymidine-phosphorothioate oligonucleotides induce activation and apoptosis of CLL cells independently of CpG motifs or BCL-2 gene interference." Leukemia **20**(4): 680-688.
- Cheson, B. D. (2010). "Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukaemia." Best Pract Res Clin Haematol **23**(1): 133-143.
- Chiorazzi, N. and M. Ferrarini (2011). "Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities." Blood **117**(6): 1781-1791.
- Cimmino, A., G. A. Calin, et al. (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13944-13949.
- Clarke, C. A., S. L. Glaser, et al. (2011). "Lymphoid malignancies in U.S. Asians: incidence rate differences by birthplace and acculturation." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **20**(6): 1064-1077.
- Cohen-Sfady, M., G. Nussbaum, et al. (2005). "Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway." J Immunol **175**(6): 3594-3602.
- Cohen-Sfady, M., M. Pevsner-Fischer, et al. (2009). "Heat shock protein 60, via MyD88 innate signaling, protects B cells from apoptosis, spontaneous and induced." J Immunol

183(2): 890-896.

- Collins, R. J., L. A. Verschuer, et al. (1989). "Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro." Br J Haematol **71**(3): 343-350.
- Crespo, M., F. Bosch, et al. (2003). "ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia." N Engl J Med **348**(18): 1764-1775.
- Damle, R. N., S. Temburni, et al. (2007). "CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells." Blood **110**(9): 3352-3359.
- Damle, R. N., T. Wasil, et al. (1999). "Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia." Blood **94**(6): 1840-1847.
- Darzynkiewicz, Z. and F. Traganos (1998). "Measurement of apoptosis." Adv Biochem Eng Biotechnol **62**: 33-73.
- Dasari, P., I. C. Nicholson, et al. (2005). "Expression of toll-like receptors on B lymphocytes." Cell Immunol **236**(1-2): 140-145.
- Deaglio, S., A. Capobianco, et al. (2003). "CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells." Blood **102**(6): 2146-2155.
- Decker, T., F. Schneller, et al. (2000). "Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells." Blood **95**(3): 999-1006.
- Delgado, J., G. Pratt, et al. (2009). "Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate." Br J Haematol **145**(6): 801-805.
- Dewald, G. W., S. R. Brockman, et al. (2003). "Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia." Br J Haematol **121**(2): 287-295.
- Di Bernardo, M. C., D. Crowther-Swanepoel, et al. (2008). "A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia." Nat Genet **40**(10): 1204-1210.
- di Celle, P. F., A. Carbone, et al. (1994). "Cytokine gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of constitutive interleukin-8 (IL-8) mRNA expression and secretion of biologically active IL-8 protein." Blood **84**(1): 220-228.
- Di Raimondo, F., R. Giustolisi, et al. (2001). "Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL patients with active disease treated with fludarabine." Ann Oncol **12**(5): 621-625.

- Dicker, F., S. Schnittger, et al. (2006). "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 **108**(9): 3152-3160.
- Dighiero, G., K. Maloum, et al. (1998). "Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia." N Engl J Med **338**(21): 1506-1514.
- Djurdjevic, P., I. Zelen, et al. (2009). "Role of decreased production of interleukin-10 and interferon-gamma in spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia lymphocytes in vitro." Arch Med Res **40**(5): 357-363.
- Dohner, H., K. Fischer, et al. (1995). "p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias." Blood **85**(6): 1580-1589.
- Dohner, H., S. Stilgenbauer, et al. (2000). "Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia." N Engl J Med **343**(26): 1910-1916.
- Dragoi, A. M., X. Fu, et al. (2005). "DNA-PKcs, but not TLR9, is required for activation of Akt by CpG-DNA." EMBO J **24**(4): 779-789.
- Dreger, P., P. Corradini, et al. (2007). "Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus." Leukemia **21**(1): 12-17.
- Duprez, L., E. Wirawan, et al. (2009). "Major cell death pathways at a glance." Microbes Infect **11**(13): 1050-1062.
- Durig, J., H. Nuckel, et al. (2003). "ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia." Leukemia **17**(12): 2426-2434.
- Duronio, V. (2008). "The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway." Biochem J **415**(3): 333-344.
- Eichhorst, B., M. Dreyling, et al. (2011). "Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **22 Suppl 6**: vi50-54.
- Eisinger-Mathason, T. S., J. Andrade, et al. (2010). "RSK in tumorigenesis: connections to steroid signaling." Steroids **75**(3): 191-202.
- Ernst, J. A., H. Li, et al. (2005). "Isolation and characterization of the B-cell marker CD20." Biochemistry **44**(46): 15150-15158.
- Evrard, S., P. Gaussem, et al. (2005). "[Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: contribution of recent biological markers]." Ann Biol Clin (Paris) **63**(6): 589-597.
- Extermann, M., J. Overcash, et al. (1998). "Comorbidity and functional status are independent in older cancer patients." J Clin Oncol **16**(4): 1582-1587.
- Fan, H. and J. A. Cook (2004). "Molecular mechanisms of endotoxin tolerance." J Endotoxin

Res **10**(2): 71-84.

- Fan, L., L. Wang, et al. (2012). "Richter transformation in 16 of 149 Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia." Leuk Lymphoma.
- Fecteau, J. F. and T. J. Kipps (2012). "Structure and function of the hematopoietic cancer niche: focus on chronic lymphocytic leukemia." Front Biosci (Schol Ed) **4**: 61-73.
- Fluckiger, A. C., I. Durand, et al. (1994). "Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells." J Exp Med **179**(1): 91-99.
- Francia di Celle, P., S. Mariani, et al. (1996). "Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion." Blood **87**(10): 4382-4389.
- Francois, S., J. El Benna, et al. (2005). "Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad." J Immunol **174**(6): 3633-3642.
- Frank, D. A., S. Mahajan, et al. (1997). "B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues." J Clin Invest **100**(12): 3140-3148.
- Frenquelli, M., M. Muzio, et al. (2010). "MicroRNA and proliferation control in chronic lymphocytic leukemia: functional relationship between miR-221/222 cluster and p27." Blood **115**(19): 3949-3959.
- Fukui, R., S. Saitoh, et al. (2011). "Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking." Immunity **35**(1): 69-81.
- Funaro, A., M. Morra, et al. (1997). "Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation." Tissue Antigens **49**(1): 7-15.
- Funaro, A., G. C. Spagnoli, et al. (1990). "Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation." J Immunol **145**(8): 2390-2396.
- Gary-Gouy, H., J. Harriague, et al. (2002). "Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production." Blood **100**(13): 4537-4543.
- Gary-Gouy, H., A. Sainz-Perez, et al. (2007). "Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype." J Immunol **179**(7): 4335-4344.
- Gautier, G., M. Humbert, et al. (2005). "A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells." J Exp Med **201**(9): 1435-1446.
- Gentile, M., G. Cutrona, et al. (2009). "Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages." Haematologica **94**(6): 887-888.

- Ghia, P., G. Guida, et al. (2003). "The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression." Blood **101**(4): 1262-1269.
- Ginaldi, L., M. De Martinis, et al. (1998). "Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H." Leuk Res **22**(2): 185-191.
- Goldin, L. R., M. Bjorkholm, et al. (2009). "Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia." Haematologica **94**(5): 647-653.
- Goldin, L. R., O. Landgren, et al. (2010). "Familial Aspects of Chronic Lymphocytic Leukemia, Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL), and Related Lymphomas." European J Clin Med Oncol **2**(1): 119-126.
- Gomariz, R. P., A. Arranz, et al. (2007). "Regulation of TLR expression, a new perspective for the role of VIP in immunity." Peptides **28**(9): 1825-1832.
- Gonzalez, D., P. Martinez, et al. (2011). "Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial." J Clin Oncol **29**(16): 2223-2229.
- Gorgun, G., T. A. Holderried, et al. (2005). "Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells." J Clin Invest **115**(7): 1797-1805.
- Grandjennette, C., A. Kennel, et al. (2007). "Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells." Haematologica **92**(9): 1279-1281.
- Grever, M. R., D. M. Lucas, et al. (2007). "Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997." J Clin Oncol **25**(7): 799-804.
- Griffin, D. O., N. E. Holodick, et al. (2011). "Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70." J Exp Med **208**(1): 67-80.
- Gu, B. and W. G. Zhu (2012). "Surf the post-translational modification network of p53 regulation." Int J Biol Sci **8**(5): 672-684.
- Hallaert, D. Y., A. Jaspers, et al. (2008). "c-Abl kinase inhibitors overcome CD40-mediated drug resistance in CLL: implications for therapeutic targeting of chemoresistant niches." Blood **112**(13): 5141-5149.
- Hallek, M., B. D. Cheson, et al. (2008). "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 **111**(12): 5446-5456.

- Hallek, M., K. Fischer, et al. (2010). "Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial." Lancet **376**(9747): 1164-1174.
- Hallek, M. and N. Pflug (2011). "State of the art treatment of chronic lymphocytic leukaemia." Blood Rev **25**(1): 1-9.
- Hallek, M., L. Wanders, et al. (1996). "Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma." Leuk Lymphoma **22**(5-6): 439-447.
- Hamblin, T. J. (1987). "Chronic lymphocytic leukaemia." Baillieres Clin Haematol **1**(2): 449-491.
- Hamblin, T. J., Z. Davis, et al. (1999). "Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia." Blood **94**(6): 1848-1854.
- Hamblin, T. J., J. A. Orchard, et al. (2002). "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 **99**(3): 1023-1029.
- Hammadi, A., C. Billard, et al. (2008). "Stimulation of iNOS expression and apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells through engagement of Toll-like receptor 7 (TLR-7) and NF-kappaB activation." Nitric Oxide **19**(2): 138-145.
- Hanagata, N. (2012). "Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system." Int J Nanomedicine **7**: 2181-2195.
- Hardie, D. G. (2011). "AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function." Genes Dev **25**(18): 1895-1908.
- Hedayat, M., K. Takeda, et al. (2012). "Prophylactic and therapeutic implications of toll-like receptor ligands." Med Res Rev **32**(2): 294-325.
- Herishanu, Y. and A. Polliack (2005). "Chronic lymphocytic leukemia: a review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options." Transfus Apher Sci **32**(1): 85-97.
- Honda, K., H. Yanai, et al. (2005). "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses." Nature **434**(7034): 772-777.
- Horowitz, M. M., R. P. Gale, et al. (1990). "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." Blood **75**(3): 555-562.
- Hulkkonen, J., J. Vilpo, et al. (1998). "Diminished production of interleukin-6 in chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells from patients at advanced stages of disease. Tampere CLL Group." Br J Haematol **100**(3): 478-483.
- Ibrahim, S., M. Keating, et al. (2001). "CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Blood **98**(1): 181-186.

- Inoki, K., J. Kim, et al. (2012). "AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets." Annu Rev Pharmacol Toxicol **52**: 381-400.
- Inoue, S., M. MacFarlane, et al. (2004). "Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies." Cell Death Differ **11 Suppl 2**: S193-206.
- Ip, C. K. and A. S. Wong (2012). "Exploiting p70 S6 kinase as a target for ovarian cancer." Expert Opin Ther Targets **16**(6): 619-630.
- Ip, C. K. and A. S. Wong (2012). "p70 S6 kinase and actin dynamics: A perspective." Spermatogenesis **2**(1): 44-52.
- Irwin, M. E., N. Rivera-Del Valle, et al. (2012). "Redox Control of Leukemia: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities." Antioxid Redox Signal.
- Ishii, K. J., S. Uematsu, et al. (2006). "'Toll' gates for future immunotherapy." Curr Pharm Des **12**(32): 4135-4142.
- Jahrsdorfer, B., G. Hartmann, et al. (2001). "CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens." J Leukoc Biol **69**(1): 81-88.
- Jahrsdorfer, B., L. Muhlenhoff, et al. (2005). "B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides." Clin Cancer Res **11**(4): 1490-1499.
- Jahrsdorfer, B., J. E. Wooldridge, et al. (2005). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells." J Leukoc Biol **77**(3): 378-387.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Kawai, T. and S. Akira (2007). "TLR signaling." Semin Immunol **19**(1): 24-32.
- Kawai, T. and S. Akira (2008). "Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling." Ann N Y Acad Sci **1143**: 1-20.
- Kiu, H. and S. E. Nicholson (2012). "Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways." Growth Factors **30**(2): 88-106.
- Klein, U., Y. Tu, et al. (2001). "Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells." J Exp Med **194**(11): 1625-1638.
- Klock, G., M. Baiersdorfer, et al. (2009). "Chapter 7: Cell protective functions of secretory Clusterin (sCLU)." Adv Cancer Res **104**: 115-138.
- Knauf, W. U., I. Langenmayer, et al. (1997). "Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia." Leuk Lymphoma **27**(5-6): 523-532.
- Krober, A., T. Seiler, et al. (2002). "V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic

aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia." Blood **100**(4): 1410-1416.

- Kurtova, A. V., K. Balakrishnan, et al. (2009). "Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance." Blood **114**(20): 4441-4450.
- Lanasa, M. C. (2010). "Novel insights into the biology of CLL." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2010**: 70-76.
- Langerak, A. W., F. Davi, et al. (2011). "Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases." Leukemia **25**(6): 979-984.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-983.
- Lepretre, S. and É. V. D. Neste (2006). "Place de la chimiothérapie dans la leucémie lymphoïde chronique." Hématologie **12**(6): 28-34.
- Liang, X., E. A. Moseman, et al. (2010). "Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells." Blood **115**(24): 5041-5052.
- Longo, P. G., L. Laurenti, et al. (2007). "The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease." Leukemia **21**(1): 110-120.
- Lozanski, G., N. A. Heerema, et al. (2004). "Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions." Blood **103**(9): 3278-3281.
- Mackus, W. J., F. N. Frakking, et al. (2003). "Expansion of CMV-specific CD8+CD45RA+CD27- T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Blood **102**(3): 1057-1063.
- Malavasi, F., S. Deaglio, et al. (2008). "Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology." Physiol Rev **88**(3): 841-886.
- Mansson, A., M. Adner, et al. (2006). "A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation." Immunology **118**(4): 539-548.
- Markey, G. M., H. D. Alexander, et al. (1986). "Enumeration of absolute numbers of T lymphocyte subsets in B-chronic lymphocytic leukaemia using an immunoperoxidase technique: relation to clinical stage." Br J Haematol **62**(2): 257-273.
- Markman, B., R. Dienstmann, et al. (2010). "Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs." Oncotarget **1**(7): 530-543.

- Matthews, C., M. A. Catherwood, et al. (2006). "Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression." *Eur J Haematol* **77**(4): 309-317.
- Matutes, E., K. Owusu-Ankomah, et al. (1994). "The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL." *Leukemia* **8**(10): 1640-1645.
- Mauro, F. R., G. Bandini, et al. (2012). "SIE, SIES, GITMO updated clinical recommendations for the management of chronic lymphocytic leukemia." *Leuk Res* **36**(4): 459-466.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, et al. (2007). "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1263-1284.
- Meinhardt, G., C. M. Wendtner, et al. (1999). "Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival." *J Mol Med (Berl)* **77**(2): 282-293.
- Messmer, B. T., E. Albesiano, et al. (2004). "Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia." *J Exp Med* **200**(4): 519-525.
- Messmer, B. T., D. Messmer, et al. (2005). "In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells." *J Clin Invest* **115**(3): 755-764.
- Meuleman, N., B. Stamatopoulos, et al. (2008). "Doubling time of soluble CD23: a powerful prognostic factor for newly diagnosed and untreated stage A chronic lymphocytic leukemia patients." *Leukemia* **22**(10): 1882-1890.
- Mihaylova, M. M. and R. J. Shaw (2011). "The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism." *Nat Cell Biol* **13**(9): 1016-1023.
- Molica, S. (1994). "Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment." *Leuk Lymphoma* **13**(3-4): 203-214.
- Molica, S. (2005). "Second neoplasms in chronic lymphocytic leukemia: incidence and pathogenesis with emphasis on the role of different therapies." *Leuk Lymphoma* **46**(1): 49-54.
- Molica, S. and A. Alberti (1987). "Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia." *Cancer* **60**(11): 2712-2716.
- Molica, S., J. C. Reverter, et al. (1990). "Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance." *Eur J Haematol* **44**(5): 277-281.
- Molica, S., G. Vitelli, et al. (1999). "Clinico-biological implications of increased serum levels of interleukin-8 in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Haematologica* **84**(3): 208-211.
- Mond, J. J., N. Feuerstein, et al. (1991). "Bimodal effect of phorbol ester on B cell activation.

Implication for the role of protein kinase C." J Biol Chem **266**(7): 4458-4463.

- Montserrat, E., M. Fontanillas, et al. (1991). "Chronic lymphocytic leukemia treatment: an interim report of PETHEMA trials." Leuk Lymphoma **5**: 89-92.
- Montserrat, E., J. Sanchez-Bisono, et al. (1986). "Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance." Br J Haematol **62**(3): 567-575.
- Moran, E. C., A. S. Kamiguti, et al. (2002). "Cytoprotective antioxidant activity of serum albumin and autocrine catalase in chronic lymphocytic leukaemia." Br J Haematol **116**(2): 316-328.
- Moreau, E. J., E. Matutes, et al. (1997). "Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b)." Am J Clin Pathol **108**(4): 378-382.
- Morrison, V. A. (2010). "Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches." Best Pract Res Clin Haematol **23**(1): 145-153.
- Morton, L. M., R. E. Curtis, et al. (2010). "Second malignancy risks after non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: differences by lymphoma subtype." J Clin Oncol **28**(33): 4935-4944.
- Munk Pedersen, I. and J. Reed (2004). "Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells." Leuk Lymphoma **45**(12): 2365-2372.
- Murray, F., N. Darzentas, et al. (2008). "Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis." Blood **111**(3): 1524-1533.
- Mustelin, T. and K. Tasken (2003). "Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases." Biochem J **371**(Pt 1): 15-27.
- Negishi, H., Y. Fujita, et al. (2006). "Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(41): 15136-15141.
- Oltra, A. M., F. Carbonell, et al. (2001). "Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia." Free Radic Biol Med **30**(11): 1286-1292.
- Orchard, J. A., R. E. Ibbotson, et al. (2004). "ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia." Lancet **363**(9403): 105-111.
- Oscier, D. G., A. C. Gardiner, et al. (2002). "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 **100**(4): 1177-1184.

- Pan, J. W., L. S. Cook, et al. (2002). "Incidence of leukemia in Asian migrants to the United States and their descendants." Cancer Causes Control **13**(9): 791-795.
- Parish, C. R. (1999). "Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies." Immunol Cell Biol **77**(6): 499-508.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity." Microbes Infect **6**(15): 1382-1387.
- Pavletic, Z. S., E. R. Arrowsmith, et al. (2000). "Outcome of allogeneic stem cell transplantation for B cell chronic lymphocytic leukemia." Bone Marrow Transplant **25**(7): 717-722.
- Pedersen, I. M., A. M. Buhl, et al. (2002). "The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism." Blood **99**(4): 1314-1319.
- Pekarsky, Y., U. Santanam, et al. (2006). "Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181." Cancer Res **66**(24): 11590-11593.
- Pepper, C., A. Thomas, et al. (2003). "Flavopiridol induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells through a p38 and ERK MAP kinase-dependent mechanism." Leuk Lymphoma **44**(2): 337-342.
- Pepper, C., A. Thomas, et al. (2003). "The vitamin D3 analog EB1089 induces apoptosis via a p53-independent mechanism involving p38 MAP kinase activation and suppression of ERK activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro." Blood **101**(7): 2454-2460.
- Pillai, S. and A. Cariappa (2009). "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision." Nat Rev Immunol **9**(11): 767-777.
- Pleyer, L., A. Egle, et al. (2009). "Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches." Nat Rev Clin Oncol **6**(7): 405-418.
- Poe, J. C., M. Hasegawa, et al. (2001). "CD19, CD21, and CD22: multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction." Int Rev Immunol **20**(6): 739-762.
- Poe, J. C., V. Minard-Colin, et al. (2012). "A c-Myc and Surface CD19 Signaling Amplification Loop Promotes B Cell Lymphoma Development and Progression in Mice." J Immunol **189**(5): 2318-2325.
- Polak, R. and M. Buitenhuis (2012). "The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia." Blood **119**(4): 911-923.
- Prasad, S., J. Ravindran, et al. (2010). "NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship." Mol Cell Biochem **336**(1-2): 25-37.
- Prevodnik, V. K., J. Lavrencak, et al. (2011). "The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas." Diagn Pathol **6**: 33.
- Puente, X. S., M. Pinyol, et al. (2011). "Whole-genome sequencing identifies recurrent

mutations in chronic lymphocytic leukaemia." Nature **475**(7354): 101-105.

- Rai, K. R., A. Sawitsky, et al. (1975). "Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia." Blood **46**(2): 219-234.
- Raman, C. (2002). "CD5, an important regulator of lymphocyte selection and immune tolerance." Immunol Res **26**(1-3): 255-263.
- Ramsay, A. G., A. J. Johnson, et al. (2008). "Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug." J Clin Invest **118**(7): 2427-2437.
- Rassenti, L. Z., S. Jain, et al. (2008). "Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia." Blood **112**(5): 1923-1930.
- Ravandi, F. and S. O'Brien (2006). "Immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia." Cancer Immunol Immunother **55**(2): 197-209.
- Redaelli, A., B. L. Laskin, et al. (2004). "The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia." Eur J Cancer Care (Engl) **13**(3): 279-287.
- Reittie, J. E., K. L. Yong, et al. (1996). "Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia." Leuk Lymphoma **22**(1-2): 83-90, follow 186, color plate VI.
- Retter, I., H. H. Althaus, et al. (2005). "VBASE2, an integrative V gene database." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D671-674.
- Ribera, J. M., N. Vinolas, et al. (1987). "'Spontaneous' complete remissions in chronic lymphocytic leukemia: report of three cases and review of the literature." Blood Cells **12**(2): 471-483.
- Robak, T., A. Wierzbowska, et al. (1999). "Serum levels of IL-6 type cytokines and soluble IL-6 receptors in active B-cell chronic lymphocytic leukemia and in cladribine induced remission." Mediators Inflamm **8**(6): 277-286.
- Rode, H. J., D. Eisel, et al., Eds. (2008). Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation. Mannheim.
- Romano, C., U. De Fanis, et al. (2005). "Induction of CD95 upregulation does not render chronic lymphocytic leukemia B-cells susceptible to CD95-mediated apoptosis." Immunol Lett **97**(1): 131-139.
- Romeo, Y., X. Zhang, et al. (2012). "Regulation and function of the RSK family of protein kinases." Biochem J **441**(2): 553-569.
- Rosati, E., R. Sabatini, et al. (2010). "Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in B-CLL." Blood **116**(15): 2713-2723.
- Rosati, E., R. Sabatini, et al. (2005). "B-chronic lymphocytic leukemia cells exert an in vitro

cytotoxicity mediated by tumor necrosis factor alpha." Leuk Res **29**(7): 829-839.

- Rosenwald, A., A. A. Alizadeh, et al. (2001). "Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia." J Exp Med **194**(11): 1639-1647.
- Rossi, D., M. Cerri, et al. (2008). "Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome." Br J Haematol **142**(2): 202-215.
- Rossi, D., V. Spina, et al. (2011). "The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation." Blood **117**(12): 3391-3401.
- Royle, J. A., P. D. Baade, et al. (2011). "Second cancer incidence and cancer mortality among chronic lymphocytic leukaemia patients: a population-based study." Br J Cancer **105**(7): 1076-1081.
- Rozkova, D., L. Novotna, et al. (2010). "Toll-like receptors on B-CLL cells: expression and functional consequences of their stimulation." Int J Cancer **126**(5): 1132-1143.
- Sabapathy, K. (2012). "Role of the JNK pathway in human diseases." Prog Mol Biol Transl Sci **106**: 145-169.
- Saka, B., M. Aktan, et al. (2006). "Prognostic importance of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Clin Lab Haematol **28**(1): 30-35.
- Sanjuan, M. A., N. Rao, et al. (2006). "CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion." J Cell Biol **172**(7): 1057-1068.
- Sarfati, M., D. Bron, et al. (1988). "Elevation of IgE-binding factors in serum of patients with B cell-derived chronic lymphocytic leukemia." Blood **71**(1): 94-98.
- Sarfati, M., S. Chevret, et al. (1996). "Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia." Blood **88**(11): 4259-4264.
- Sato, S., D. A. Steeber, et al. (1997). "CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19." J Immunol **158**(10): 4662-4669.
- Schattner, E. J. (2002). "Apoptosis in lymphocytic leukemias and lymphomas." Cancer Invest **20**(5-6): 737-748.
- Schlesinger, M., I. Broman, et al. (1996). "The complement system is defective in chronic lymphatic leukemia patients and in their healthy relatives." Leukemia **10**(9): 1509-1513.
- Schmitz, F., A. Heit, et al. (2007). "Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells." Eur J Immunol **37**(2): 315-327.
- Schoenemeyer, A., B. J. Barnes, et al. (2005). "The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling." J Biol Chem **280**(17): 17005-17012.
- Schon, M. P. and M. Schon (2007). "Imiquimod: mode of action." Br J Dermatol **157** **Suppl 2**:

8-13.

- Schwarzmeier, J. D., M. Shehata, et al. (2002). "The role of soluble CD23 in distinguishing stable and progressive forms of B-chronic lymphocytic leukemia." Leuk Lymphoma **43**(3): 549-554.
- Scrivener, S., R. V. Goddard, et al. (2003). "Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia." Leuk Lymphoma **44**(3): 383-389.
- Secchiero, P., F. Corallini, et al. (2006). "Role of the RANKL/RANK system in the induction of interleukin-8 (IL-8) in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells." J Cell Physiol **207**(1): 158-164.
- Sester, D. P., K. Brion, et al. (2006). "CpG DNA activates survival in murine macrophages through TLR9 and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway." J Immunol **177**(7): 4473-4480.
- Sgambati, M., M. Linet, et al., Eds. (2001). Chronic lymphocytic leukemia: epidemiological, familial, and genetic aspects. Basel, Switzerland: Marcel Dekker.
- Shaikh.z (2011). "Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review." Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS), **2**(11): 1247-1263.
- Shanafelt, T. D., T. E. Witzig, et al. (2006). "Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia." J Clin Oncol **24**(28): 4634-4641.
- Shustik, C., R. Mick, et al. (1988). "Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: intermittent chlorambucil versus observation." Hematol Oncol **6**(1): 7-12.
- Simonsson, B., L. Wibell, et al. (1980). "Beta 2-microglobulin in chronic lymphocytic leukaemia." Scand J Haematol **24**(2): 174-180.
- Sims, G. P., R. Ettinger, et al. (2005). "Identification and characterization of circulating human transitional B cells." Blood **105**(11): 4390-4398.
- Slack, J. L., K. Schooley, et al. (2000). "Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways." J Biol Chem **275**(7): 4670-4678.
- Smit, L. A., D. Y. Hallaert, et al. (2007). "Differential Noxa/Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity." Blood **109**(4): 1660-1668.
- Spaner, D. E. and A. Masellis (2007). "Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia." Leukemia **21**(1): 53-60.
- Spaner, D. E., Y. Shi, et al. (2006). "Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells." Leukemia **20**(2): 286-295.
- Spaner, D. E., Y. Shi, et al. (2010). "A phase I/II trial of TLR-7 agonist immunotherapy in

chronic lymphocytic leukemia." Leukemia **24**(1): 222-226.

- Stamatopoulos, K., C. Belessi, et al. (2007). "Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations." Blood **109**(1): 259-270.
- Stevenson, F. K., T. J. Hamblin, et al. (1980). "Extracellular idiotypic immunoglobulin arising from human leukemic B lymphocytes." J Exp Med **152**(6): 1484-1496.
- Stilgenbauer, S. and H. Dohner (2002). "Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy." N Engl J Med **347**(6): 452-453.
- Strati, P. and F. Caligaris-Cappio (2011). "A matter of debate in chronic lymphocytic leukemia: is the occurrence of autoimmune disorders an indicator of chronic lymphocytic leukemia therapy?" Curr Opin Oncol **23**(5): 455-460.
- Taylor, P., T. Tamura, et al. (2007). "The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8." Immunity **27**(2): 228-239.
- Takaoka, A., H. Yanai, et al. (2005). "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors." Nature **434**(7030): 243-249.
- Takeshita, F., I. Gursel, et al. (2004). "Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9." Semin Immunol **16**(1): 17-22.
- Tarnani, M., L. Laurenti, et al. (2010). "The proliferative response to CpG-ODN stimulation predicts PFS, TTT and OS in patients with chronic lymphocytic leukemia." Leuk Res **34**(9): 1189-1194.
- Tedder, T. F. and P. Engel (1994). "CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes." Immunol Today **15**(9): 450-454.
- Thorselius, M., A. Krober, et al. (2006). "Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status." Blood **107**(7): 2889-2894.
- Tinhofer, i. and E. al. (1998). " inversion of CD4+/CD8+ ratio in B chronic lymphocytic leukemia correlates with differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (APO-1/CD95) ligand(+) tumor cells." Blood **92**(271B).
- Tobin, G., U. Thunberg, et al. (2003). "Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope." Blood **101**(12): 4952-4957.
- Tobin, G., U. Thunberg, et al. (2004). "Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia." Blood **104**(9): 2879-2885.
- Troussard, X., V. Duchenet, et al. (2009). "[Haematological malignancies: incidence in Basse-

Normandie, France, for 1997-2004]." Rev Epidemiol Sante Publique **57**(3): 151-158.

- Tsimberidou, A. M. and M. J. Keating (2005). "Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies." Cancer **103**(2): 216-228.
- Tsujimura, H., T. Tamura, et al. (2004). "Toll-like receptor 9 signaling activates NF-kappaB through IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein in dendritic cells." J Immunol **172**(11): 6820-6827.
- Vasconcelos, Y., F. Davi, et al. (2003). "Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia." J Clin Oncol **21**(21): 3928-3932.
- Vera, J., K. Rateitschak, et al. (2011). "Systems biology of JAK-STAT signalling in human malignancies." Prog Biophys Mol Biol **106**(2): 426-434.
- Vilpo, J., G. Tobin, et al. (2005). "Mitogen induced activation, proliferation and surface antigen expression patterns in unmutated and hypermutated chronic lymphocytic leukemia cells." Eur J Haematol **75**(1): 34-40.
- Vilpo, J., L. Vilpo, et al. (1999). "Induction of beta-2-microglobulin release in vitro by chronic lymphocytic leukaemia cells: relation to total protein synthesis." Leuk Res **23**(10): 913-920.
- Vinolas, N., J. C. Reverter, et al. (1987). "Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: an update of its prognostic significance." Blood Cells **12**(2): 457-470.
- Vrhovac, R., A. Delmer, et al. (1998). "Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia." Blood **91**(12): 4694-4700.
- Wada, T. and J. M. Penninger (2004). "Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation." Oncogene **23**(16): 2838-2849.
- Wadhwa, P. D. and V. A. Morrison (2006). "Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia." Semin Oncol **33**(2): 240-249.
- Wickremasinghe, R. G., A. G. Prentice, et al. (2011). "Aberrantly activated anti-apoptotic signalling mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia cells: clues to the identification of novel therapeutic targets." Br J Haematol **153**(5): 545-556.
- Wierda, W., S. O'Brien, et al. (2005). "Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia." J Clin Oncol **23**(18): 4070-4078.
- Wierda, W. G., M. M. Johnson, et al. (2003). "Plasma interleukin 8 level predicts for survival in chronic lymphocytic leukaemia." Br J Haematol **120**(3): 452-456.
- Wiernik, P. H. (2004). "Second neoplasms in patients with chronic lymphocytic leukemia." Curr Treat Options Oncol **5**(3): 215-223.
- Wiestner, A., A. Rosenwald, et al. (2003). "ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical

outcome, and distinct gene expression profile." Blood **101**(12): 4944-4951.

- Wolowiec, D., M. Wojtowicz, et al. (2009). "High intracellular content of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in early- and intermediate stage B-cell chronic lymphocytic leukemia lymphocytes predicts rapid progression of the disease." Eur J Haematol **82**(4): 260-266.
- Wortis, H. H., M. Teutsch, et al. (1995). "B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3348-3352.
- Woyach, J. A., A. J. Johnson, et al. (2012). "The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL." Blood.
- Xu, Y., X. Tao, et al. (2000). "Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains." Nature **408**(6808): 111-115.
- Yang, C. and M. G. Kazanietz (2003). "Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC." Trends Pharmacol Sci **24**(11): 602-608.
- Yap, G., M. Pesin, et al. (2000). "Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*." J Immunol **165**(2): 628-631.
- Yazawa, N., M. Fujimoto, et al. (2003). "CD19 regulates innate immunity by the toll-like receptor RP105 signaling in B lymphocytes." Blood **102**(4): 1374-1380.
- Yoon, S. and R. Seger (2006). "The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions." Growth Factors **24**(1): 21-44.
- Yoshizaki, A., Y. Iwata, et al. (2008). "CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma." Am J Pathol **172**(6): 1650-1663.
- Youinou, P., C. Jamin, et al. (1999). "CD5 expression in human B-cell populations." Immunol Today **20**(7): 312-316.
- Young, J. A. (2011). "Epidemiology and management of infectious complications of contemporary management of chronic leukemias." Infect Disord Drug Targets **11**(1): 3-10.
- Yu, H., D. Pardoll, et al. (2009). "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3." Nat Rev Cancer **9**(11): 798-809.
- Zelen, I., P. Djurdjevic, et al. (2010). "Antioxidant enzymes activities and plasma levels of oxidative stress markers in B-chronic lymphocytic leukemia patients." J BUON **15**(2): 330-336.
- Zelenetz, A. D., J. S. Abramson, et al. (2010). "NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: non-Hodgkin's lymphomas." J Natl Compr Canc Netw **8**(3): 288-334.
- Zent, C. S. and N. E. Kay (2010). "Autoimmune complications in chronic lymphocytic

leukaemia (CLL)." Best Pract Res Clin Haematol **23**(1): 47-59.

- Zent, C. S., B. J. Smith, et al. (2012). "Phase I clinical trial of CpG oligonucleotide 7909 (PF-03512676) in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia." Leuk Lymphoma **53**(2): 211-217.
- Zenz, T., A. Benner, et al. (2008). "Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer: the role of the p53 pathway." Cell Cycle **7**(24): 3810-3814.
- Zhou, Y., H. Zhen, et al. (2009). "PI3K/AKT mediated p53 down-regulation participates in CpG DNA inhibition of spontaneous B cell apoptosis." Cell Mol Immunol **6**(3): 175-180.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., R. Schlag, et al. (1989). "Favorable response of early stage B CLL patients to treatment with IFN-alpha 2." Blood **73**(6): 1426-1430.
- Zupo, S., R. Massara, et al. (2000). "Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD." Blood **95**(4): 1199-1206.
- Zupo, S., E. Rugari, et al. (1994). "CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevents apoptosis of human germinal center B cells." Eur J Immunol **24**(5): 1218-1222.

PUBLICATIONS

Chen M, De Carvalho Bittencourt M, Feugier P, Faure GC, Béné MC. Active Toll-like receptor-7 triggering of chronic lymphocytic leukemia B-cells by imiquimod. *Leuk Lymphoma*. 2012; 53(4):739-42.

Chen M, Mohtize M, Mattei MF, Villemot JP, Kohler C, Faure GC, Béné MC, de Carvalho Bittencourt M. Reduced levels of both circulating CD4+ CD25+ CD127(low/neg) and CD4+ CD8(neg) invariant natural killer regulatory T cells in stable heart transplant recipients. *Clin Exp Immunol*. 2011; 163(1):104-12.

Chen M, Massin F, Mathieu CP, Mattei MF, Villemot JP, Faure GC, Béné MC, de Carvalho-Bittencourt M. B1 cells expressing CXCR3 possibly involved in the control of cardiac allograft rejection could be monitored in peripheral blood. Abstract 2nd European Congress of Immunology in Berlin, September 13-16, 2009. Soumis.

LETTER TO THE EDITOR

Active Toll-like receptor-7 triggering of chronic lymphocytic leukemia B-cells by imiquimod

Min Chen¹, Marcelo de Carvalho Bittencourt¹, Pierre Feugier², Gilbert C. Faure¹ & Marie C. Béné¹

¹Laboratoire d'Immunologie and ²Service d'Hématologie, CHU de Nancy and EA 4369 RHEM Nancy Université, Vandoeuvre les Nancy, France

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most common type of leukemia, in spite of recent progress remains incurable. The chronicity of the disease is related at least in part to *in vivo* resistance to apoptosis [1] and weak immunogenicity of the malignant cells [2]. The most obvious target of cytotoxic immune responses on CLL cells is their clonal B-cell receptor (BCR), but malignant CLL cells generate a state of mild immunodeficiency with reduced T- and natural killer (NK)-cell functions, suggesting that successful immunotherapy would require a better proinflammatory environment [2].

Several Toll-like receptors (TLRs), innate immunity receptors involved in pathogen recognition, have been described by our group and others as being expressed by normal and CLL B-cells, more specifically TLR-7, TLR-9 and TLR-10 [3–5].

Oxidized guanosines and imidazoquinolines are synthetic human TLR-7 ligands [6] to which CLL cells have been shown to respond by increasing the expression of costimulatory molecules [3,4]. Using imiquimod, we have previously reported that CLL triggering concomitantly induced early apoptosis [3]. Here we investigated the effect of three different doses of imiquimod on CLL cell apoptosis and cytokine production.

This study was performed on cells from eight patients with CLL (characteristics in Table I). All had a Matutes score of 5, required no treatment, suffered from no acute infection or autoimmune disease at the time of investigation and provided informed consent.

Peripheral blood samples collected on ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-K were processed within 8 h for peripheral blood mononuclear cell (PBMC) separation as reported [4]. The proportions of malignant CLL cells in each retrieved sample (76–91.4%) were established by multiparameter flow cytometry (FC500; Beckman Coulter, FL) after staining with CD45-ECD, CD19-PC7 and CD5-PC5 antibodies (Beckman Coulter). The proportions of T- and normal B-cells were respectively between 5.6 and 18% and 0 and 0.9%. Aliquots of 1×10^6 PBMCs in 200 μ L were cultured as reported elsewhere [4] in three different conditions: negative control

(medium alone), positive control (5 ng/mL phorbolmyristate acetate [PMA]; Sigma, St Louis, MO) and 5, 10 or 20 μ g/mL imiquimod-R837 (InvivoGen, San Diego, CA). After 24 h, 48 h and 72 h of incubation, supernatants of each well were collected and stored at -80°C for cytokine assay and the PBMCs were tested using flow cytometry.

The TUNEL method (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), evidencing DNA fragmentation, was used as previously [4] to measure apoptosis. Collected PBMCs were surface-labeled with CD45-ECD, CD19-PC7 and CD5-PC5 (Beckman Coulter) before TUNEL labeling. Apoptosis in gated malignant CD19+ /CD5+ cells was then analyzed by multiparameter flow cytometry, measuring the percentage of TUNEL-positive cells among gated CD5+CD19+CD45+ B-CLL cells. Moreover, all mean fluorescence intensities (MFIs) of CD19 and CD5 were recorded and MFI ratios calculated using non-stimulated cells at day 1 as denominator.

As shown in Fig. 1(a), there was no change in CD5 expression and only a small decrease of CD19 expression on negative-control cells. PMA induced a significant increase in expression of both molecules. For both CD5 and CD19, imiquimod triggering was conversely associated with a dose- and time-dependent significantly decreased expression.

Apoptosis was measured in all conditions. Negative-control cells allowed evaluation of the spontaneous apoptosis of B-CLL cells. In PMA-positive wells, B-CLL cells were protected from spontaneous apoptosis, with fewer than 20% TUNEL-positive cells at all time points. Imiquimod at 10 μ g/mL or higher increased the apoptosis of leukemic cells compared to the negative control. There was a significant difference of viability between PMA wells and all other conditions at each time point. With the highest dose of imiquimod (20 μ g/mL), apoptosis was significantly different from that in paired negative wells at day 1 ($61.05 \pm 10.97\%$ vs. $30.15 \pm 6.95\%$, respectively, $p = 0.003$), day 2 ($74.88 \pm 7.47\%$

Table I. Clinical characteristics of patients with CLL.

Patient	Sex	Age (years)	Binet stage	WBC ($\times 10^9$)	Duration (years)	Treatment	CD38 (%)	Doubling time (years)
1	M	81	A	23	0	No	8	ND
2	M	62	A	19	10	No	ND	>1
3	M	60	A	41	9	No	0	>1
4	F	47	A	30	1	No	0	>1
5	F	46	A	43	4	No	4	>1
6	F	70	A	48	4	No	1	>1
7	F	51	A	18	3	No	78	>1
8	F	62	A	39	3	No	5	>1

CLL, chronic lymphocytic leukemia; WBC, white blood cell count; ND, not determined.

vs. $54.74 \pm 9.39\%$, $p = 0.002$) and day 3 (86.9 ± 4.68 vs. 63.69 ± 8.86 , $p = 0.004$). The pro-apoptotic effect of imiquimod was dose- and time-dependent.

Cytokines were assayed using a cocktail of seven fluorescent beads covered by anti-cytokine antibodies (BMS FlowCytomix; Bender Medsystems GmbH, Vienna, Austria). Briefly, 25 μ L aliquots of each supernatant were incubated with the beads then with a mixture of biotin-conjugated antibodies to interleukin 6 (IL-6), IL-8, IL-10, IL-12, interferon α (IFN- α), IFN- γ or tumor necrosis factor α (TNF- α) followed by phycoerythrin (PE)-streptavidin. Titration curves were determined for each cytokine. Data were acquired by flow

cytometry (FC500; Beckman Coulter) and analyzed using the BMS FlowCytomix Software.

No secretion of IL-12p70 or IFN- γ was detected, and only a weak secretion of IL-10 was seen in 4/8 patients after imiquimod or PMA stimulation. There was no secretion of TNF- α in the negative control or imiquimod-triggered wells, but TNF- α was increased significantly by PMA stimulation at 24 and 48 h. Only one patient had a secretion of IFN- α , at a low level and only in response to imiquimod.

IL-6 secretion [Fig. 1(b)] could not be detected in the negative-control wells. PMA activation conversely yielded a strong production of IL-6 by B-CLL cells as well as

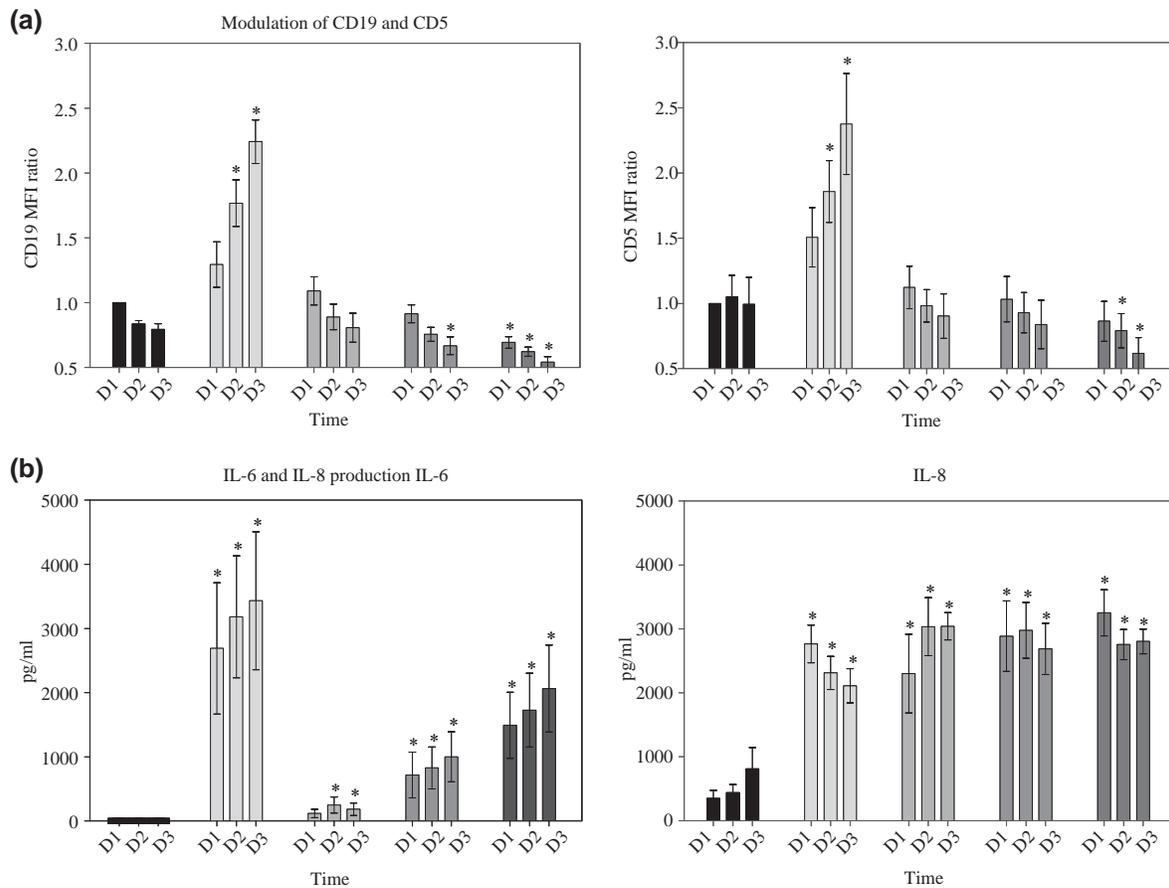


Figure 1. Modulation by imiquimod stimulation of CLL cells of CD19 and CD5 expression and IL-6 and IL-8 production. Between-groups comparisons were analyzed with paired Student's or Wilcoxon signed-rank tests depending on normality. p -Values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SigmaPlot 11 software (Systat Software, San Jose, CA). (a) Mean fluorescence intensity ratios (\pm SEM) calculated based on day-1 data of non-stimulated cells. PMA induces a significant increase in both CD19 and CD5 while imiquimod down-modulates both markers in a dose- and time-dependent fashion. White bars: control; pale gray: PMA; three other shades of gray are (from left to right) imiquimod at 5, 10 and 20 μ g/mL. * $p \leq 0.05$ compared to negative control. (b) IL-6 and IL-8 concentrations, measured in optimized standard curve ranges of 0–20 000 pg/mL for IL-6 and 0–10 000 pg/mL for IL-8. Data are presented as mean concentrations (\pm SEM) in culture supernatants at each time point and condition. White bars: control; pale gray: PMA; three other shades of gray are imiquimod at 5, 10 and 20 μ g/mL. * $p < 0.05$ compared to negative control.

imiquimod, in a dose- and time-dependent fashion. IL-6 production by cells stimulated by PMA or imiquimod at 20 µg/mL differed significantly from that in negative-control wells at all time points ($p < 0.05$). There were also significant differences in IL-6 production between stimulation by PMA and imiquimod at 5 and 10 µg/mL at all time points ($p < 0.05$) but not between PMA and imiquimod at 20 µg/mL.

There was a small secretion of around 500 pg/mL of IL-8 in the negative-control wells while PMA and, even more, imiquimod induced an important secretion of IL-8 ($p < 0.05$ at all time points) [Fig. 1(b)]. The difference was statistically significant at 72 h between imiquimod at 20 µg/mL and PMA ($p = 0.008$). This production of IL-8 remained stable on days 2 and 3 for all three doses of imiquimod.

This study confirms in an independent series our previous observations [4] of a rapid apoptosis of B-CLL cells induced by the TLR-7-ligand, imiquimod, in a dose- and time-dependent fashion. It further shows that this is associated with an active down-modulation of surface CD5 and CD19 and to the production of proinflammatory cytokines, especially IL-6 and IL-8.

A few studies have focused on the effect of imiquimod on the apoptosis of B-CLL cells. At very low doses of 1 µM (about 0.2 µg/mL), Hammadi *et al.* [7] reported an increased viability of B-CLL cells. The pro-apoptotic activity of imiquimod has, however, also been reported at concentrations of approximately 25–50 µg/mL, much nearer to what we used, in tumors of different origin *in vivo* as well as *in vitro* [8]. The spontaneous apoptosis of B-CLL cells *in vitro* was confirmed [9], yet at a lower rate than with imiquimod, suggesting an active induction of apoptosis after TLR-7 ligation. B-CLL apoptosis involving members of the MAP (mitogen activated protein) kinase superfamily [10] and usage of the STAT-1 (signal transducer and activator of transcription 1) pathway for imiquimod-induced IL-6 production [11] suggest that these two active cell-signaling mechanisms could be involved here. It would be consistent with the additional observation of membrane antigen down-modulation after triggering with imiquimod. Interestingly, PMA stimulation, actively protecting from apoptosis, was associated with an increased expression of both CD19 and CD5, while the near-similar level of spontaneous apoptosis resulted in virtually no change in expression of these markers in negative-control wells. Together with the previously reported increase in costimulatory signals, these observations suggest that the regulatory signals associated with CD19 and CD5 in CLL are down-regulated by TLR-7 engagement.

There was no production of IL-12 or IFN- γ , indicating that cytokine secretion was not related to the small proportions of T-cells or possibly dendritic cells in the cultures. Only one patient had a low level of secretion of IFN- α in response to imiquimod. This is consistent with data obtained with S28690, another TLR-7 agonist, on B-CLL cells [3].

IL-6 levels increased in a time- and dose-dependent fashion upon activation with PMA and imiquimod. IL-6 has a direct growth stimulatory effect on many tumor cells and can be an important regulator of cell survival, including in

B-CLL. However, concurrent reports have described associations between IL-6 and apoptosis [13]. The time-dependent production observed here with imiquimod, at stages when many cells had already undergone apoptosis, suggests a very strong activation of B-CLL cells by imiquimod, sustained in the remaining living cells at day 3. However, the different behavior of PMA- and imiquimod-triggered cells regarding apoptosis indicates that other protective factors are induced by PMA activation.

The production of IL-8 was even more important than that of IL-6, and was also sustained over the stimulation period in spite of apoptosis. Interestingly, IL-8 levels tended to decrease upon PMA activation, suggesting that activated B-CLL cells might use this cytokine in an autocrine fashion [14]. IL-8 is also a chemoattractant able to recruit effector CD8+ T cells, and, together with IL-6 effects on the activation of immune responses, could be involved in increasing the immunogenicity of B-CLL cells. This has already been alluded to by Spaner *et al.* [15] who, however, used a different TLR-7 ligand, at much lower doses and in different conditions, and mostly reported on enhanced killing of B-CLL cells.

The dose-dependent high production of IL-6 and IL-8 reported here together with strong apoptosis suggests that imiquimod could be useful *in vivo* to both eliminate malignant cells and stimulate immune responses toward the leukemic cells, a hypothesis that still requires to be demonstrated.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at www.informahealthcare.com/lal.

References

- [1] Chen J, McMillan NA. Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Biol Ther* 2008;7:174–179.
- [2] Gricks CS, Gribben JG. Cytotoxic T cell responses against immunoglobulin in malignant and normal B cells: implications for tumor immunity and autoimmunity. *Curr Pharm Des* 2003;9:1889–1903.
- [3] Spaner DE, Shi Y, White D, et al. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2006;20:286–295.
- [4] Grandjennette C, Kennel A, Faure GC, et al. Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2007;92:1279–1281.
- [5] Rozková D, Novotná L, Pytlík R, et al. Toll-like receptors on CLL cells: expression and functional consequences of their stimulation. *Int J Cancer* 2010;126:1132–1143.
- [6] Lenert PS. Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for Toll-like receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators Inflamm* 2010;2010:986596.
- [7] Hammadi A, Billard C, Faussat AM, et al. Stimulation of iNOS expression and apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells through engagement of Toll-like receptor 7 (TLR-7) and NF- κ B activation. *Nitric Oxide* 2008;19:138–145.
- [8] Schön MP, Schön M. Imiquimod: mode of action. *Br J Dermatol* 2007;157(Suppl. 2):8–13.
- [9] Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, et al. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture *in vitro*. *Neoplasia* 2004;51:181–187.
- [10] Pepper C, Thomas A, Hoy T, et al. The vitamin D3 analog EB1089 induces apoptosis via a p53-independent mechanism involving p38 MAP kinase activation and suppression of ERK activity in

B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Blood* 2003;101:2454-2460.

[11] Bottrel RL, Yang YL, Levy DE, et al. The immune response modifier imiquimod requires STAT-1 for induction of interferon, interferon-stimulated genes, and interleukin-6. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:856-861.

[12] Megyeri K, Au WC, Rosztoczy I, et al. Stimulation of interferon and cytokine gene expression by imiquimod and stimulation by Sendai virus utilize similar signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 1995;15:2207-2218.

[13] Büssing A. Release of interleukin-6 in cultured B-chronic lymphocytic leukaemia cells is associated with both activation and cell death via apoptosis. *Anticancer Res* 1999;19:3953-3959.

[14] Francia di Celle P, Mariani S, Riera L, et al. Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood* 1996;87:4382-4389.

[15] Spaner DE, Shi Y, White D, et al. A phase I/II trial of TLR-7 agonist immunotherapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2010;24:222-226.

Résumé

La leucémie lymphoïde chronique (LLC), caractérisée par une résistance à l'apoptose in vivo et par la faible immunogénicité des cellules leucémiques est une maladie de présentation hétérogène dont l'évolution est liée à certains facteurs pronostiques. L'immunochimiothérapie a permis de progresser dans le traitement de cette pathologie, mais l'identification de nouvelles cibles d'immunothérapie serait souhaitable. Dans ce contexte, la présence de TLR-7 et TLR-9 sur les cellules de LLC est une piste intéressante. L'objectif principal de cette étude était ainsi de préciser les effets in vitro de l'engagement de TLR-7 et TLR-9 sur les cellules tumorales par leur ligands respectifs Imiquimod R837 et ODN CpG M362. Ces effets ont été examinés sur des LLC classées en formes stables ou agressives et/ou selon leur statut mutationnel IgVH.

Les cellules séparées de 40 patients ont été cultivées pendant trois jours, avec du milieu seul, de l'acétate phorbolmyristate (PMA) ou des doses croissantes d'Imiquimod ou d'ODN. La cytométrie en flux a permis d'étudier l'expression des TLRs et d'antigènes de différenciation au niveau de la surface des cellules B tumorales, d'évaluer l'apoptose, de mesurer la prolifération et de doser les cytokines. Les voies de signalisation ont été explorées par une technique d'antibody-array et par western blot.

Les résultats obtenus confirment que les TLRs sont actifs et répondent à leurs ligands sur les cellules B tumorales de LLC. L'apoptose spontanée des cellules in vitro passe par la voie mitochondriale. L'Imiquimod induit une apoptose accrue des cellules tumorales, surtout chez les patients stables et mutés, impliquant également la voie p38MAPK. L'ODN induit la prolifération des cellules tumorales et les protège de l'apoptose, surtout pour les patients avec une forme agressive et/ou non mutée. Ceci s'accompagne de l'activation de nombreuses protéines anti-apoptotiques et de la production d'IL-8 et d'IL-6.

Ces résultats suggèrent que l'Imiquimod et l'ODN pourraient entrer dans une stratégie d'immunothérapie adjuvante pour les patients atteints de LLC.

MOTS CLES : Leucémie lymphoïde chronique, Toll-Like récepteur-7, Toll-Like récepteur-9, imiquimod R837, ODN CpG M362, cytokines, voies de signalisation

Summary

Chronic lymphoid leukemia (CLL), characterized by in vivo resistance to apoptosis and poor immunogenicity of leukemic cells is a heterogeneous disease the evolution of which depends on a number of prognostic factors. Immunochemotherapy has allowed to progress greatly in the treatment of this disease, but the identification of new immunotherapy targets would be welcome. In this context, the presence of TLR-7 and TLR-9 on CLL cells is a promising prospect. The main objective of this work was therefore to precise the effects of in vitro engagement of TLR-7 and TLR-9 on tumor cells by their respective ligands Imiquimod R837 and ODN CpG M362. These effects were examined on CLL classified according to clinical evolution (stable or aggressive) and /or according to their IgVH mutational status.

Separated cells from 40 patients were cultured for three days with medium alone, acetate phorbolmyristate (PMA) or graded doses of Imiquimod or ODN. Flow cytometry allowed to study the expression of TLRs and differentiation antigens on CLL cells' surface, to evaluate apoptosis, measure proliferation and assay cytokines production. Signaling pathways were further studied by antibody-array and western blot.

Data obtained confirmed that TLRs are active and respond to their ligands on CLL B-cells. Spontaneous in vitro apoptosis uses mitochondrial pathways. Imiquimod induces increased apoptosis, especially in patients with stable disease or mutated IgVH, with the additional involvement of the p38MAPK pathway. ODN induces cell proliferation and protects them from apoptosis, mostly for patients with an aggressive disease and/or unmutated IgVH. This is concomitant of the activation of anti-apoptotic proteins and of the production of IL-8 and d'IL-6.

These results suggest that Imiquimod and ODN could enter in an adjuvant immunotherapy strategy in CLL.

KEY WORDS: chronic lymphocytic leukemia, Toll-like receptors-7, Toll-like receptors-9, imiquimod R837, CpG ODN M362, cytokines, signal pathways