

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER**  
**FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

**ANNEE : 2015**

**THESE 2015/TOU3/2042**

**Mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées d'Innovation Pharmaceutique et Recherche  
tenant lieu de Thèse pour l'obtention du**

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le

Par Monsieur Frédéric BOISSARD

**ETUDE DE L'IMPACT DES « NURSE-LIKE » CELLS SUR LA SURVIE DES  
PATIENTS ET LA RESISTANCE AUX TRAITEMENTS DANS LA LEUCEMIE  
LYMPHOIDE CHRONIQUE**

**Directeurs de thèse :**

Madame le Docteur Mary POUPOT et Monsieur le Docteur Loïc YSEBAERT

**JURY**

Président : Monsieur le Professeur Bruno SEGUI  
1er assesseur : Monsieur le Professeur Bernard PAYRASTRE  
2ème assesseur : Madame le Docteur Murielle ROUSSEL  
3ème assesseur : Monsieur le Docteur Michel LAVIT

« Laboratoire. Même quand on ne trouve rien, on renifle l'odeur de la vérité qui se cache. »

Jean Rostand

« La science n'a jamais tout à fait raison, mais elle a rarement tout à fait tort, et, en général, elle a plus de chance d'avoir raison que les théories non scientifiques. Il est donc rationnel de l'accepter à titre d'hypothèse. »

Bertrand, 3ème comte Russell of Kingston Russell

« Les prédictions pour la semaine qui vient. Poisson : vendredi est votre jour. Taureau évitez les voyages en Espagne. Cancer: faites un dépistage. Balance : essayez de perdre du poids »

Philippe Geluck

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
**de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier**  
**au 1<sup>er</sup> octobre 2014**

**Professeurs Émérites**

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAU MONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
Mme SAUTEREAU A-M	Pharmacie galénique
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

## Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P	Pharmacie Clinique	Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie	Mme AUTHIER H	Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique	Mme BON C	Biophysique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie	M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F	Pharmacologie	Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
		M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C	Physiologie
		Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
		Mme COSTE A (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N	Biochimie
		Mme DERA EVE C	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
		Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F	Toxicologie
		Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
		Mme LEFEVRE L	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A	Biochimie
		M. MARTI G	Pharmacognosie
		Mme MIREY G (*)	Toxicologie
		Mme MONTFERRAN S	Biochimie
		M. OLICHON A	Biochimie
		M. PERE D	Pharmacognosie
		Mme PHILIBERT C	Toxicologie
		Mme PORTHE G	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D	Hématologie
		Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(\*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche	
Mme COOL C (**)	Physiologie	Mme PALOQUE L	Parasitologie
Mme FONTAN C	Biophysique	Mme GIRARDI C	Pharmacognosie
Mme KELLER L	Biochimie	M IBRAHIM H	Chimie anal. - galénique
M. PÉRES M. (**)	Immunologie		
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique		
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique		

(\*\*) Nomination au 1<sup>er</sup> novembre 2014

## REMERCIEMENTS

A mon président de Thèse, **Monsieur le Professeur Bruno Segui**. Vous me faites l'honneur de présider mon jury et je tiens à vous remercier de l'attention que vous portez à ce travail.

A mes directeurs de Thèse, **Madame le Docteur Mary Poupot** et **Monsieur le Docteur Loïc Ysebaert**. Vous m'avez fait l'honneur de diriger ce travail et de le juger. Je vous remercie de votre disponibilité, de votre enseignement, de votre esprit critique et qui sans vous rien n'aurait été possible. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

A **Monsieur le Professeur Bernard Payrastra**, je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury. Je pense que votre expérience avec l'ibrutinib promet une discussion et des remarques très intéressantes.

A **Madame le Docteur Murielle Roussel**, merci d'avoir accepté d'être dans ce jury de Thèse, vous qui êtes une experte du myélome, vous comprendrez ainsi pourquoi j'ai dû passer tant de temps à récupérer des données clinico-biologiques aux consultations.

A **Monsieur le Docteur Michel Lavit**, je vous remercie de participer à mon jury de Thèse. La discussion sur le suivi des patients traités par les nouvelles molécules, au vu de votre expertise dans le domaine du suivi thérapeutique des patients, sera, j'en suis sûr très enrichissante.

Veillez tous retrouver ici mes remerciements les plus sincères.

## REMERCIEMENTS

A **Julia**, merci de m'avoir suivi à Toulouse et pour tout ce que tu m'apporte tous les jours. Je t'aime.

A **ma famille**, merci pour votre soutien indéfectible depuis le tout début, les études m'ont éloigné de vous mais vous êtes toujours avec moi. Je vous aime.

### **Au labo,**

Merci à Emilie pour me supporter tous les jours et pour tes précieux conseils orthographiques. A Marie qui ne s'énerve jamais, Don-Marc au flegme olympien, à Anne avec laquelle nous nous partageons les prélèvements, à Chris la surexcitée pleine de bonne humeur, à Thibault et Sarah nos M2 médecins, à Ekaterina et enfin à Jean-Jacques qui m'a accepté dans son laboratoire.

### **A mes amis,**

Fréd, je serai prêt pour être dans ton jury, merci pour tout pendant toutes ces années ! A Thomas, plus gros fan d'AC/DC ! A Romain qui m'a accompagné durant toutes ces années de fac où l'on a beaucoup ri, à Céline et Héloïse, qui nous recadraient quand on riait trop justement ! Je n'ai qu'une chose à dire : Rendez-vous au RU à 7h !

A David, Domi et Aurélie, grâce à qui les années d'Internat ont été remplies d'anecdotes croustillantes (qui n'ont rien à faire dans ce manuscrit) durant les pauses du midi.

**Aux personnes que j'ai dû oublier**, désolé mais vous me connaissez je ne retiens rien et vous savez que je pense à vous !

**Aux patients**, qui donnent littéralement un peu d'eux pour la recherche.

# SOMMAIRE

SOMMAIRE .....	7
LISTE DES ABREVIATIONS .....	12
LISTE DES FIGURES .....	18
LISTES DES TABLES .....	21
INTRODUCTION.....	22
I. La leucémie lymphoïde chronique .....	22
I.A Définition et épidémiologie .....	22
I.A.1 Définition .....	22
I.A.2 Epidémiologie .....	22
I.A.3 Facteurs de risques et formes familiales .....	23
I.B Diagnostic .....	25
I.B.1 Circonstance de découverte et critères diagnostiques .....	25
I.B.1.1 Circonstance de découverte .....	25
I.B.1.2 Diagnostic .....	25
I.B.1.2.1 Hémogramme.....	25
I.B.1.2.2 Immuphénotypage et analyse morphologique .....	26
I.B.1.2.3 Diagnostic différentiel .....	27
I.B.2 Explorations initiales obligatoires .....	28
I.B.2.1 Interrogatoire .....	28
I.B.2.2 Examen clinique .....	28
I.B.2.3 Examens biologiques .....	28
I.C Origine de la leucémie lymphoïde chronique et physiopathologie.....	30
I.C.1 Origine de la leucémie lymphoïde chronique .....	30
I.C.1.1 La lymphocytose B monoclonale isolée.....	30
I.C.1.2 La cellule souche de la leucémie lymphoïde chronique .....	31
I.C.1.3 Rôle de la stimulation antigénique dans la leucémogénèse de la LLC.....	32
I.C.2 Physiopathologie .....	35
I.C.2.1 La résistance à l'apoptose.....	35
I.C.2.2 La prolifération .....	36
I.C.2.3 La voie de signalisation du BCR .....	37
I.D Facteurs pronostiques .....	39
I.D.1 Facteurs pronostiques généraux .....	39
I.D.2 Facteurs pronostiques clinico-biologiques.....	39

I.D.2.1 Classification de Binet.....	39
I.D.2.2 Classification de Rai.....	41
I.D.3 Les facteurs pronostiques liés à la signalisation du BCR .....	42
I.D.3.1 Le statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines.....	42
I.D.4 Marqueurs cytogénétiques .....	44
I.D.4.1 Délétion 13q14 .....	44
I.D.4.2 Délétion 11q22-23 .....	45
I.D.4.3 Trisomie 12.....	46
I.D.4.4 Délétion 17p13 .....	46
I.D.4.5 Autres anomalies chromosomiques.....	46
I.D.4.6 Le caryotype complexe .....	47
I.D.5 Mutations récurrentes.....	47
I.D.5.1 Mutation de <i>TP53</i> .....	48
I.D.5.2 Mutation de <i>NOTCH1</i> .....	49
I.D.5.3 Mutation de <i>SF3B1</i> .....	50
I.D.5.4 Mutation de <i>MYD88</i> .....	51
I.D.5.5 Mutation de <i>BIRC3</i> .....	51
I.D.5.6 Classification combinant les anomalies caryotypiques et les mutations récurrentes .....	52
I.D.6 Marqueurs sériques pronostiques.....	53
I.D.6.1 $\beta$ 2 microglobulinémie.....	53
I.D.6.2 Taux de Thymidine Kinase sérique.....	54
I.D.6.3 Utilisation routinière des marqueurs sériques .....	55
I.D.7 Synthèse sur les facteurs pronostiques.....	55
I.E Traitements conventionnels de la leucémie lymphoïde chronique .....	56
I.E.1 Critères de mise en place du traitement.....	56
I.E.2 Traitement de première ligne des patients avec un bon état général, non réfractaires à la fludarabine et <i>TP53</i> non muté : Rituximab + Fludarabine + Cyclophosphamide ..	58
I.E.2.1 Le rituximab (Mabthera ®).....	59
I.E.2.2 La fludarabine (Fludara ®) .....	60
I.E.2.3 Le cyclophosphamide (Endoxan ®) .....	61
I.E.3 Le traitement de première ligne chez les patients âgés ou avec un mauvais état général sans mutation <i>TP53</i> : Rituximab + Bendamustine .....	62
I.E.4 Le traitement des patients avec une mutation de <i>TP53</i> , en rechute ou réfractaire : les petites molécules.....	63
I.E.4.1 L'ibrutinib (Imbruvica ®).....	63
I.E.4.2 Idélalisib (Zydelig ®) .....	67

II. Le microenvironnement tumoral.....	69
II.A L'immunosurveillance anti tumorale .....	70
II.A.1 Concept théorique.....	70
II.A.2 Les forces en présence dans la réaction immunitaire anti-tumorale.....	71
II.A.2.1 Les acteurs de l'immunité innée .....	72
II.A.2.2 Les acteurs de l'immunité adaptative.....	73
II.B Immunoédition et les acteurs du microenvironnement tumoral .....	75
II.B.1 Concept théorique .....	75
II.B.2 Les grandes phases de l'immunoédition des tumeurs.....	76
II.B.3 Les acteurs du microenvironnement tumoral.....	78
III. Les macrophages associés aux tumeurs.....	80
III.A Les macrophages.....	80
III.A.1 Les macrophages de type I et de type II.....	80
III.B Les macrophages et les tumeurs.....	82
III.B.1 Définition des macrophages associés aux tumeurs.....	82
III.B.2 Recrutement et différenciation .....	82
III.B.2.1 Le recrutement des monocytes.....	82
III.B.2.2 Différenciation .....	83
III.B.3 Phénotype .....	84
III.B.4 Fonctions .....	85
III.B.4.1 Immunosuppression .....	85
III.B.4.2 Rôle pro-angiogénique.....	86
III.B.4.3 Rôle dans l'invasion et la dissémination tumorale .....	87
III.B.5 Impact pronostique .....	88
III.B.6 Influence des macrophages associés aux tumeurs sur les traitements.....	91
III.B.6.1 Chimiothérapie.....	91
III.B.6.2 Thérapies ciblées.....	92
III.C Les « nurses-like cells » : les macrophages associés aux tumeurs de la leucémie lymphoïde chronique .....	93
III.C.1 Localisation tissulaire chez le patient.....	94
III.C.2 Les macrophages associés aux tumeurs de la leucémie lymphoïde chronique ..	95
III.C.3 Origine et différenciation.....	96
III.C.4 Fonctions .....	98
III.C.4.1 Attraction des cellules leucémiques.....	98
III.C.4.2 Protection contre l'apoptose des cellules leucémiques <i>in vitro</i> .....	99
III.C.4.2.1 Protection <i>via</i> les facteurs solubles .....	99

III.C.4.2.2 Protection <i>via</i> des interactions contact-dépendantes .....	99
III.C.4.3 Favorisation de l'immunoéchappement .....	101
III.C.4.4 Rôle dans la pathogénèse et dans l'évolution de la leucémie lymphoïde chronique .....	102
III.C.5 Impact pronostique .....	104
III.C.6 Effets sur les thérapies utilisées dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique .....	105
III.C.6.1 Effets sur les thérapies classiques .....	105
III.C.6.2 Effets sur l'efficacité des petites molécules .....	106
III.C.7 Cibler les « nurse-like cells » : le nouvel Eldorado de la leucémie lymphoïde chronique ? .....	106
III.C.8 Les « nurse-like cells », des cellules spécifiques de la leucémie lymphoïde chronique ? .....	108
OBJECTIFS DE LA THESE .....	109
MATERIELS ET METHODES .....	111
Culture et préparation cellulaire .....	111
Détermination du statut IgHV, des anomalies caryotypiques et des mutations récurrentes .....	112
Cytométrie en flux .....	113
Viabilité cellulaire .....	114
Expression génique .....	114
Immunohistochimie et microscopie confocale .....	115
Collection de sérums et ELISA .....	115
Numération formule sanguine .....	116
Drogues .....	116
Analyses statistiques .....	116
RESULTATS .....	118
I. Le taux de sCD163 est un facteur pronostique dans la leucémie lymphoïde chronique. 118	
I.A Caractéristiques des patients de l'étude .....	118
I.B L'analyse phénotypique révèle que les NLC sont proches mais distinctes des NLC « hétérologues » .....	119
I.C LES NLC et les NLC « hétérologues » favorisent la survie des cellules leucémiques mais pas les NLC « saines » .....	122
I.D L'infiltration ganglionnaire par des cellules CD163 <sup>+</sup> est associée à une maladie progressive .....	123
I.E Les concentrations de sCD163, sCD68 et sHMGB1 sont augmentées dans les sérums de patients comparés aux sérums de donneurs sains .....	126

## SOMMAIRE

I.F La concentration en sCD163 est corrélée au statut IgHV, au caryotype complexe et aux altérations de <i>TP53</i> .....	126
I.G Le taux de sCD163, mais pas celui de sCD68 ni celui de sHMGB1 est associé à la l'évolution de la LLC .....	129
II. L'ibrutinib n'a pas d'impact sur les effets pro-survie des NLC .....	133
II.A Les NLC ne sortent pas des ganglions durant le traitement par ibrutinib .....	133
II.B Les cellules CD14 <sup>+</sup> de patients traités par ibrutinib se différencient en NLC.....	135
II.C <i>In vitro</i> les NLC protègent les cellules leucémiques de l'ibrutinib .....	137
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	143
SERMENT DE GALIEN .....	165

## LISTE DES ABBREVIATIONS

### **β**

β2m : β2 microglobuline

### **A**

ADCP : Phagocytose dépendante des anticorps

ADM : Adrénomédulline

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

Ag : Antigène

*ANG2* : Angiopoeitine 2

APRIL : A proliferation-inducing ligand

ARN : Acide Ribo Nucléique

ARNm : ARN messagers

*ATM* : Ataxia Telangiectasia Mutated

### **B**

BAFF : B-cell activating factor

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 : B-cell CLL/lymphoma 2

Bcl-xl : B-cell lymphoma extra-large

Bcl-xs : B-cell lymphoma

BCR : B Cell Receptor

bFGF : Basic fibroblast growth factor

*BIRC3* : Baculoviral IAP Repeat Containing 3

BTK : Bruton Tyrosine Kinase

### **C**

CD : Cluster de differentiation

CD40L : CD40 ligand

CD79a : Immunoglobulin α

## LISTE DES ABBREVIATIONS

CD79b	:	Immunoglobulin $\beta$
CDR3	:	Complementary Determining Region 3
CHOP prednisone	:	Cyclophosphamide + hydroxyadriamycine + vincristine +
CHV	:	Cyclophosphamide + hydroxyadriamycine + étoposide
CLL-NLC	:	NLC
CMH	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNIL	:	Comité National Informatique et Libertés
COX-2	:	Cyclooxygenase 2
CSF-1	:	Colony stimulating factor 1
CSF-1R	:	Récepteur au CSF-1
CTLA-4	:	Cytotoxic T-lymphocytes associated protein 4
CXCL12	:	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12
CXCL13	:	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 13
CXCL1	:	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1

## D

DC	:	Cellules dendritiques
DDX3	:	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3
DFG	:	Débit de Filtration Glomérulaire

## E

EGF	:	Epidermal growth factor
EGFR	:	Epidermal growth factor receptor
EPO	:	Eosinophil peroxidase

## F

FasL	:	Fas ligand
<i>FBXW7</i> ligase	:	F-box and WD repeat domain containing 7 E3 ubiquitin protein
<i>FCGR2B</i>	:	Fc fragment of IgG low affinity IIb receptor
FISH	:	Hybridation In Situ en Fluorescence

## LISTE DES ABBREVIATIONS

### H

HAS	:	Haute Autorité de Santé
HD-NLC	:	NLC « saines »
Het-NLC	:	NLC « hétérologues »
HGF	:	Hepatocyte growth factor
HRM	:	High Resolution Mel
HSP-27	:	Heat shock protein 27

### I

IAP	:	Inhibiteurs de l'apoptose
IDO	:	Indoleamine 2-3 dioxygénase
IFN $\gamma$	:	Interferon $\gamma$
Ig	:	Immunoglobuline
IgHV	:	Immunoglobulin Heavy Chain
IL-4	:	Interleukine 4
InVS	:	Institut de Veille Sanitaire

### K

<i>KLH6</i>	:	Kelch-Lite 6
-------------	---	--------------

### L

LLC	:	Leucémie Lymphoïde chronique
LPS	:	Lipopolysaccharides
<i>LYZ</i>	:	Lysozyme

### M

M1	:	Macrophages de type 1
M2	:	Macrophages de type 2
MAC-1	:	Macrophage-1 antigen
MAPK	:	Mitogen-Activated Protein Kinases
<i>MAPK1</i>	:	Mitogen Activated Protein Kinase 1
MB	:	Megabases

## LISTE DES ABBREVIATIONS

MBL	:	Lymphocytose B Monoclonale isolée
MBP	:	Major Basic Protein
Mcl-1	:	Myeloid cell leukemia 1
MDSC	:	Cellules suppressives de la moelle
MEC	:	Matrice extracellulaire
MFG-E8	:	Milk fat globule-epidermal growth factor 8 protein
MICA	:	MCH class I polypeptide-related sequence A
MICB	:	MCH class I polypeptide-related sequence B
MIF	:	Macrophage migration inhibitor factor
MMP	:	Matrix metalloprotéinase
<i>MYD88</i>	:	Myeloid Differentiation Primary Response 88

### **N**

NAMPT	:	Nicotinamide phosphoribosyltransférase
NF-KB	:	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NFAT	:	Nuclear Factor of Activated T-cells
NFS	:	Numération Formule Sanguine
NK	:	Natural Killer
NLC	:	Nurse Like Cells

### **O**

OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
OS	:	Survie globale

### **P**

PBL	:	Peripheral blood lymphocytes
PBMC	:	Peripheral mononuclear cells
PCA	:	Principal component analysis
PD-1	:	Programmed Cell Death 1
PDGF	:	Platelet-derived growth factor
PD-L1	:	Programm cell death ligand 1
PFS	:	Survie sans progression

## LISTE DES ABBREVIATIONS

PGE-2	:	Prostaglandin E2
PI3K $\delta$	:	isoforme $\delta$ de la Phosphatidylinositol-3 Kinase
<i>PLEKHG5</i> domain) member 5	:	Pleckstrin homology domain containing family G (with RhoGef
PRR	:	Pattern Recognition Receptors

### R

<i>RAG2</i>	:	Recombinaison activating gene 2
RAGE	:	Receptor for advanced glycosylation endproducts
RFC	:	Fludarabine Cyclophosphamide Rituximab
ROS	:	Espèces réactives de l'oxygène

### S

S1P	:	Sphingosine 1 phosphate
S1PR1	:	Sphingosine-1-phosphate receptor 1
sCD163	:	CD163 soluble
<i>SF3B1</i>	:	Splicing Factor 3b subunit 1 155kDa
sHMGB1	:	Soluble high mobility group box 1
SIDA	:	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SLL	:	Small Lymphocytic Leukemia
sTK	:	Thymidine Kinase sérique
SYK	:	Spleen Tyrosine Kinase

### T

TAM	:	Macrophages associés aux tumeurs
TCL1	:	T-cell Leukemia 1
TCR	:	T Cell Receptor
<i>TGM7</i>	:	Transglutaminase 7
Tie2 domains	:	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology
TK	:	Thymidine Kinase
TMEM	:	Tumor microenvironment for metastasis
TNF $\alpha$	:	Tumor necrosis factor $\alpha$

## LISTE DES ABBREVIATIONS

<i>TP53</i>	:	Tumor Protein p53
TRAIL	:	Tumor-necrosis factor related apoptosis inducing ligand
Treg	:	Lymphocytes T régulateurs
TTFT	:	Temps avant le premier traitement (depuis le diagnostic)
TTNT	:	Temps avant le second traitement (depuis le premier traitement)

### **U**

uPA	:	Urokinase-type plasminogen activator
-----	---	--------------------------------------

### **V**

VDJ	:	Variable Diversity Joining
VEGF-A	:	Vascular endothelial growth factor A
VEGFR	:	Vascular endothelial growth factor receptor 2
VIH	:	Virus de l'immunodéficience humaine

### **X**

<i>XPO1</i>	:	Exportin 1
-------------	---	------------

### **Z**

<i>ZMYM3</i>	:	Zinc finger MYM-type 3
--------------	---	------------------------

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Incidence par âge en 2012 de la LLC et du lymphome lymphocytaire (extrait de <sup>3</sup> ). .....	23
Figure 2 : Étalement sanguin typique d'une LLC (gauche). Nombreux petits lymphocytes avec noyau arrondi et cytoplasme très réduit avec des ombres de Gumprecht (croix) (droite) (source : <a href="http://campus.cerimes.fr/">http://campus.cerimes.fr/</a> ). .....	26
Figure 3: Représentation schématique d'un clone leucémique typique de LLC (haut : marqueurs pris en compte dans le score de Matutes). .....	27
Figure 4 : Prévalence de la MBL aux Etats-Unis et dans différents pays européens (extrait de <sup>20</sup> ). .....	30
Figure 5: Présentation schématique du développement de LLC chez l'Homme basée sur un modèle de xéno greffe murine (extrait de <sup>26</sup> ). .....	32
Figure 6: Représentation schématique du développement et de l'évolution de la LLC dépendante de la stimulation antigénique selon le modèle de Chiorazzi (adapté de <sup>31</sup> ). .....	34
Figure 7: Représentation schématique du signalosome du BCR (extrait de <sup>54</sup> ). .....	38
Figure 8 : Les cinq aires lymphoïdes palpables (extrait de <sup>2</sup> ). .....	39
Figure 9: Courbes de survie en fonction du stade de Binet en 1981 (extrait de <sup>61</sup> ). .....	40
Figure 10: Courbe de survie en fonction du stade de Binet en 2011 (Hallek, communication personnelle). .....	41
Figure 11: Courbes de survie en fonction du stade de Rai (extrait de <sup>62</sup> ). .....	42
Figure 12: Courbes de survie sans progression de patients LLC traités par RFC (Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab) en fonction du statut IgHV (courbe verte : IgHV muté, courbe orange : IgHV non muté) (Fisher K., IwCLL, 2013). .....	43
Figure 13: Courbes de survie globale de patients atteints de LLC en fonction de leurs anomalies cytogénétiques (extrait de <sup>68</sup> ). .....	45
Figure 14: Courbes de survie en fonction de la présence ou non d'un caryotype complexe (extrait de <sup>86</sup> ). .....	47
Figure 15: Courbes de survie en fonction du statut mutationnel de <i>TP53</i> et de la fréquence de cette mutation (extrait de <sup>91</sup> ). .....	49
Figure 16: Courbes de Survie en fonction du statut mutationnel de <i>NOTCH1</i> (extrait de <sup>95</sup> ). .....	50
Figure 17: Courbes de survie globale en fonction du statut mutationnel de <i>SF3B1</i> (extrait de <sup>100</sup> ). .....	51
Figure 18: Courbes de survie globale en fonction du statut mutationnel de <i>BIRC3</i> (extrait de <sup>103</sup> ). .....	52
Figure 19: Courbes de survie globale selon la classification hiérarchique proposée par Rossi <i>et al</i> basée sur les anomalies cytogénétiques et les mutations récurrentes (extrait de <sup>101</sup> ). .....	53
Figure 20: Schéma de la stratégie décisionnelle dans la LLC <sup>2</sup> . .....	56
Figure 21: Survie sans progression de patients traités par RFC (courbe verte) ou FC (courbe bleue) (extrait de <sup>112</sup> ). .....	59
Figure 22: Représentation schématique des différents mécanismes d'action du rituximab (extrait de <sup>117</sup> ). .....	60
Figure 23: Analyses en sous-groupes du taux de réponse globale de patients traités par ibrutinib (Étude PCYC-1104-CA) (source: Vidal®). .....	64

Figure 24: Implication de BTK dans les signalisations du clone leucémique (Ysebaert, non publié).....	65
Figure 25: Modélisation structurale de l'interaction de la BTK muté ou non avec l'ibrutinib (extrait de <sup>132</sup> ).....	66
Figure 26: Acquisition et propriétés transformantes des cellules cancéreuses (extrait de <sup>141</sup> ). ..	69
Figure 27: Courbes d'incidence des tumeurs chimiquement induites chez des souris immunodéficientes ou immunocompétentes (extrait de <sup>144</sup> ).....	70
Figure 28: Représentation schématique des effecteurs de l'immunité innée (gauche) et acquise (droite) dans la réponse anti-tumorale (CTL : lymphocytes T cytotoxiques) (extrait de <sup>151</sup> ). ..	72
Figure 29: Représentation schématique de la réponse immunitaire anti-tumorale (extrait de <sup>151</sup> ). ..	74
Figure 30: Les tumeurs provenant de souris immunocompétentes sont qualitativement différentes des tumeurs provenant de souris immunodéprimées (extrait de <sup>144</sup> ).....	76
Figure 31: Représentation schématique de l'immunoédition des tumeurs (extrait de <sup>164</sup> ). .....	77
Figure 32: Le microenvironnement tumoral (extrait de <sup>165</sup> ).....	79
Figure 33: Phénotype des macrophages suivant leurs états de polarisation (extrait de <sup>167</sup> ).....	81
Figure 34: Mécanismes de recrutement des monocytes au sein des tumeurs (extrait de <sup>168</sup> )... ..	83
Figure 35: Mécanismes de différenciation des monocytes en TAM au sein des tumeurs (extrait de <sup>196</sup> ).....	84
Figure 36: Exemple de phénotype de TAM (extrait de <sup>205</sup> ). .....	85
Figure 37 : Mécanismes d'immunosubversion médiés par les TAM (extrait de <sup>216</sup> ).....	86
Figure 38: Les TAM contribuent au potentiel invasif des cellules tumorales (extrait de <sup>216</sup> ).. ..	88
Figure 39: Les NLC protègent les cellules leucémiques de l'apoptose <i>in vitro</i> (courbe noire: co-culture de NLC et de cellules leucémiques, courbe blanche: cellules leucémiques cultivées seules) (extrait de <sup>42</sup> ). .....	93
Figure 40: Morphologie des NLC (extrait de <sup>42</sup> ).....	94
Figure 41: Cellules CD163 <sup>+</sup> (marron) au sein d'un ganglion de patient (la zone entourée correspond au pseudo-follicule) (extrait de <sup>257</sup> ). .....	95
Figure 42: Les NLC ont un profil transcriptomique de TAM like (extrait de <sup>257</sup> ). .....	96
Figure 43: BAFF, APRIL et CXCL12 sont moins efficaces que les NLC pour protéger les cellules leucémiques de l'apoptose (extrait de <sup>264</sup> ). .....	100
Figure 44 : Les NLC ont un profil d'expression phénotypique proche mais distinct des NLC « hétérologues » et des NLC « saines » .....	121
Figure 45 : Les NLC et les NLC « hétérologues » favorisent la survie des cellules leucémiques. ....	122
Figure 46 : Infiltration des NLC au sein des ganglions lymphatiques .....	124
Figure 47 : La distribution et la densité des cellules CD163 <sup>+</sup> dans les ganglions de patients sont associées à la progressivité de la maladie .....	125
Figure 48 : Les concentrations en sCD163, sCD68 et sHMGB1 sont significativement augmentées dans le sérum des patients par rapport au sérum de donneurs sains.....	126
Figure 49 : Corrélations entre sCD163, sCD68 ou sHMGB1 et la lymphocytose, la monocytose et entre les différents marqueurs solubles. ....	128
Figure 50 : Association entre la concentration en sCD163 (gauche), sCD68 (centre) ou sSMGB1 (droite) et l'évolution de la LLC .....	132
Figure 51 : Evolution de la monocytose et de la lymphocytose à 15 et 30 jours de traitement par ibrutinib. ....	134

## LISTES DES FIGURES

Figure 52: Les NLC ne sont pas présentes dans le sang périphérique au moment du prélèvement lors du traitement par ibrutinib.....	134
Figure 53: La différenciation et le phénotype des NLC ne sont pas modifiés par le traitement par ibrutinib.....	136
Figure 54 : Les NLC protègent les cellules leucémiques <i>in vitro</i> de l'ibrutinib.....	138
Figure 55: Profil transcriptomique de 19 NLC en fonction du statut IgHV et du caryotype des cellules leucémiques.....	140

## LISTES DES TABLES

Table 1: Score de Matutes <sup>17</sup> .....	27
Table 2: Classification des stades de Binet <sup>61</sup> .....	40
Table 3: Classification de Rai <sup>17</sup> .....	41
Table 4: Médiane de survie en fonction du taux de $\beta 2$ microglobuline <sup>106</sup> .....	54
Table 5: Résultats d'efficacité de l'étude 312-0116 comparant l'association rituximab et idéalisisib à l'association rituximab et placebo (source: Vidal®).....	67
Table 6: Relation entre TAM et pronostic dans différents cancers (adapté de <sup>187</sup> ).....	91
Table 7: Détails des amorces utilisées pour le séquençage des mutations récurrentes (S : séquence « sens », AS : séquence « antisens ») .....	113
Table 8: Caractéristiques cliniques des 94 patients (variables catégoriques) .....	119
Table 9: Caractéristiques cliniques des 94 patients (variables continues) .....	119
Table 10 : Concentrations du sCD163, sCD68 et du sHMGB1 en fonction de marqueurs pronostiques préexistants dans la LLC.....	127
Table 11: Traitements reçus par les patients lors de la première cure de chimiothérapie.....	129
Table 12: Temps avant le premier traitement en fonction des différents facteurs pronostiques connus dans la LLC.....	130
Table 13: Survie globale en fonction des différents marqueurs pronostiques connus de la LLC.....	131

# INTRODUCTION

## I. La leucémie lymphoïde chronique

### I.A Définition et épidémiologie

#### I.A.1 Définition

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par une accumulation dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires de petits lymphocytes d'aspect mature<sup>1</sup>, apparentés à la lignée B dans 95 % des cas. Le diagnostic est biologique. La Haute Autorité de Santé (HAS) définit la LLC selon ces critères «Toute lymphocytose isolée de plus de 5 000 / mm<sup>3</sup>, persistant depuis plus de 3 mois, chez un sujet adulte, doit faire évoquer le diagnostic de LLC»<sup>2</sup>.

#### I.A.2 Epidémiologie

La LLC est l'hémopathie maligne la plus fréquente dans les pays occidentaux. L'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) estime à 4 464 le nombre de nouveaux cas en France en 2012, avec une prévalence nettement masculine (60 % de nouveaux cas pour les hommes et 40 % pour les femmes)<sup>3</sup>. Au niveau mondial, l'incidence standardisée sur la population mondiale est de 4,4 pour 100 000 personnes-année chez l'homme et de 2,2 pour 100 000 personnes-année chez la femme, soit un sex-ratio de 2. Il convient de noter que des variations ethniques étudiées aux États-Unis sont marquées par une incidence plus faible chez les Asiatiques et les Afro-Américains comparée à celle des Caucasiens<sup>4</sup> mais en Europe, aucune variation n'a pu être établie<sup>5</sup>.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

L'incidence a peu varié entre 1980 et 2012, avec un taux annuel moyen d'évolution proche de 1. En revanche, sur une période plus récente de 2005 à 2012, on note une diminution de l'incidence avec un taux annuel moyen d'évolution de moins 1,3 % et de moins 2,4 %, respectivement chez l'homme et la femme, ce qui pourrait s'expliquer par des modifications de la définition de la maladie ou par un sous-enregistrement potentiel.

Il s'agit d'une maladie du sujet âgé, avec un âge médian lors du diagnostic de 71 ans chez l'homme et 74 ans chez la femme. L'incidence, quasi nulle chez les patients de moins de 35 ans avec 0,8 cas-année pour 100 000 habitants chez l'homme et 0,4 cas-année pour 100 000 habitants chez la femme, augmente ensuite de manière exponentielle pour atteindre chez les personnes de plus de 80 ans, 205.8 pour 100 000 chez les hommes et 88.5 pour 100 000 chez les femmes (Figure 1) <sup>3</sup>.

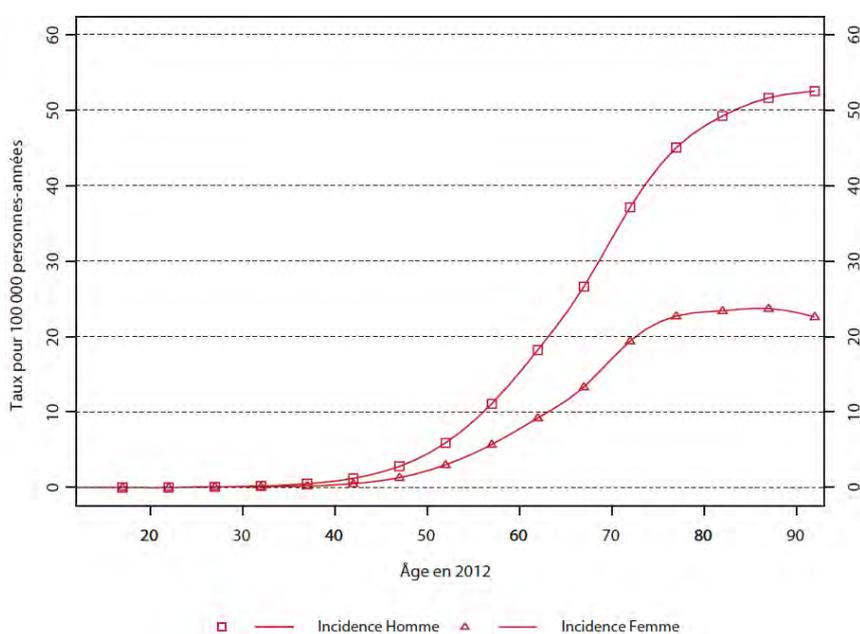


Figure 1: Incidence par âge en 2012 de la LLC et du lymphome lymphocytaire (extrait de <sup>3</sup>).

### I.A.3 Facteurs de risques et formes familiales

Malgré la forte incidence, il existe peu de preuves de l'existence de cancérigènes provoquant une apparition de la LLC. Ainsi, l'exposition au benzène, connue pour induire des leucémies myéloïdes aiguës n'a aucune influence sur l'apparition de LLC <sup>6</sup>. A ce jour, seuls les herbicides semblent avoir un lien avec l'apparition d'une LLC. Bien que la mécanistique de cette cancérogénèse ne soit pas élucidée, il a été observé dans des études rétrospectives aux

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

Etats-Unis que les fermiers ayant utilisé de façon intensive des pesticides ont un risque de décès supérieur de 1,67 comparé à la population témoin <sup>7, 8</sup>. Le cancérigène le plus connu dans la LLC, l'Agent Orange, est un mélange de deux herbicides l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et l'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T) contaminé par du 2,3,7,8-tétrachlorobenzo-p-dioxine. En 2002, le département d'état américain chargé des vétérans a admis qu'il existait une association de preuves suffisante entre une exposition à ce composé et la LLC en se basant sur les études réalisées dans l'agriculture avec des composés similaires. Néanmoins, à ce jour, il existe très peu de résultats sur l'exposition à l'Agent Orange pendant de la guerre du Vietnam aussi bien du côté américain que vietnamien. Une étude américaine révèle que les vétérans sont diagnostiqués à un âge plus précoce (64 vs 72 ans) et qu'ils nécessitent un traitement plus rapide (9,6 vs 30,2 mois). Enfin, la survie globale de ces patients, ajustée sur l'âge, révèle un risque de décès supérieur de 1,8 par rapport aux patients non exposés <sup>9</sup>.

Dans la LLC, il existe des formes familiales avec un risque relatif 8,5 fois plus élevé chez les descendants de patients, ce qui suggérerait une prédisposition génétique <sup>10, 11</sup>. Néanmoins, ces patients ne nécessitent pas de consultation d'oncogénétique. Au total, plus de vingt polymorphismes ont été identifiés et expliqueraient près de 50 % du risque familial <sup>12-14</sup>, sans qu'aucune mutation initiatrice n'ait été décrite.

## **I.B Diagnostic**

### **I.B.1 Circonstance de découverte et critères diagnostiques**

#### **I.B.1.1 Circonstance de découverte**

Les signes cliniques de la LLC sont extrêmement variables. Dans la majorité des cas, la LLC est découverte de manière fortuite, lors d'un hémogramme de routine et est confirmée trois mois plus tard <sup>15</sup>. En effet, les symptômes, minimes dans la majorité des cas, n'orientent pas le clinicien vers ce diagnostic.

Dans une minorité de cas symptomatiques, des adénopathies superficielles, une splénomégalie ou plus rarement une hypertrophie thyroïdienne permettent la suspicion d'une LLC qui doit néanmoins être confirmée par un hémogramme.

Enfin, dans des cas beaucoup plus rares, la LLC est suspectée *via* ses complications infectieuses ou auto-immunes (essentiellement une anémie hémolytique auto-immune (AHAI)).

#### **I.B.1.2 Diagnostic**

Le diagnostic de la LLC repose sur les résultats de deux examens : l'hémogramme et l'immunophénotypage du sang périphérique.

##### **I.B.1.2.1 Hémogramme**

La HAS, dans ses recommandations, évoque le diagnostic de LLC devant une hyperlymphocytose absolue ( $\geq 5\ 000$  lymphocytes /  $\text{mm}^3$ ) et persistante au-delà de 3 mois. Il n'y a généralement aucune indication pour un myélogramme, une biopsie ostéomédullaire ou même une biopsie ganglionnaire pour poser le diagnostic de LLC <sup>16</sup>.

### I.B.1.2.2 Immuphénotypage et analyse morphologique

Le frottis sanguin révèle un grand nombre de petits lymphocytes B d'aspect mature, avec un noyau arrondi et un cytoplasme très restreint. La chromatine est dense, parfois « motée ». On observe aussi classiquement des noyaux nus nommés ombres de Gümprrecht correspondant à des cellules leucémiques endommagées lors du frottis (Figure 2). Il existe également des formes cytologiques très atypiques, le plus souvent associées à des anomalies immunophénotypiques et cytologiques.

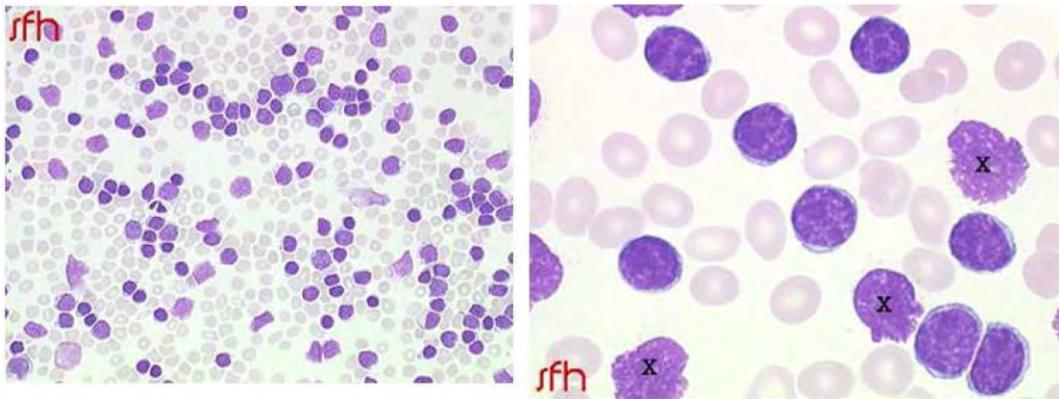


Figure 2 : Étalement sanguin typique d'une LLC (gauche). Nombreux petits lymphocytes avec noyau arrondi et cytoplasme très réduit avec des ombres de Gumprecht (croix) (droite) (source : <http://campus.cerimes.fr/>).

L'analyse immunophénotypique des cellules leucémiques est fondamentale pour poser formellement le diagnostic de LLC. On observe ainsi, dans le cas d'une LLC typique, que la cellule leucémique exprime des marqueurs classiques de lymphocytes B tels que le CD19 et le CD20 à un taux plus faible que les B normaux, mais aussi de manière pathologique le CD5, marqueur classique des cellules T. Elles expriment aussi également le CD23, élément diagnostique clé de la LLC vis-à-vis d'autres syndromes lymphoprolifératifs B. Enfin, le FMC7 (épitope conformationnel du CD20) ainsi que la chaîne  $\beta$  du BCR (B Cell Receptor) ne sont que peu ou pas exprimés. Il est, de plus, nécessaire pour confirmer le diagnostic de déterminer le caractère monoclonal de l'expansion leucémique *via* l'expression d'une seule chaîne légère d'immunoglobuline K dans 2/3 des cas ou  $\lambda$  dans les autres cas (Figure 3) <sup>17</sup>.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

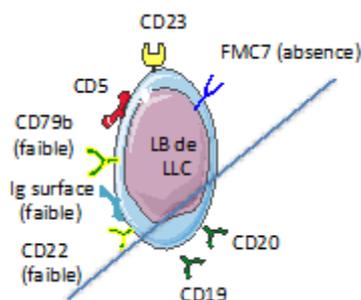


Figure 3: Représentation schématique d'un clone leucémique typique de LLC (haut : marqueurs pris en compte dans le score de Matutes).

L'ensemble de ces marqueurs, combinés dans le score de Matutes, permet de confirmer le diagnostic de LLC s'il est supérieur ou égal à quatre (Table 1) <sup>18</sup>. Un score inférieur à trois exclut le diagnostic de LLC et si le score est égal à trois on retient celui de LLC atypique.

Marqueurs	Score de Matutes	
	1 point	0 point
Intensité de l'immunoglobuline de surface monotypique	Faible	Forte
Expression du CD5	+	-
Expression du CD23	+	-
Expression de FMC7	-	+
Expression du CD79b	Faible	Forte
Expression du CD22	Faible	Forte

Table 1: Score de Matutes <sup>17</sup>.

#### I.B.1.2.3 Diagnostic différentiel

Il convient, en premier lieu, de différencier une hyperlymphocytose transitoire d'une LLC en réalisant deux NFS (Numération Formule Sanguine) à trois mois d'intervalle selon les recommandations de l'HAS.

Devant la persistance de cette hyperlymphocytose au-delà de trois mois, il est nécessaire de poser un diagnostic différentiel entre une LLC et d'autres pathologies lymphoprolifératives tel que le lymphome du manteau, le lymphome prolymphocytaire, le lymphome folliculaire, la leucémie à tricholeucocytes, les lymphomes B de la zone marginale, le lymphome B splénique à lymphocytes villeux. Ce diagnostic est permis par la clinique, l'immunophénotypage et le score de Matutes <sup>15</sup>.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

D'après la classification des néoplasies hématopoïétiques de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), la LLC diffère du lymphome lymphocytaire (SLL, Small Lymphocytic Leukemia) uniquement par des manifestations cliniques différentes<sup>19</sup>. Dans le SLL, on retrouve la présence d'adénopathies et/ou d'une splénomégalie, résultant de l'infiltration des cellules B matures identiques à celles de la LLC. Cependant dans le SLL, la lymphocytose est normalement inférieure à 5 000 lymphocytes / mm<sup>3</sup><sup>16</sup>.

## **I.B.2 Explorations initiales obligatoires**

### **I.B.2.1 Interrogatoire**

L'interrogatoire permet de rechercher des antécédents familiaux d'hémopathie maligne, notamment de LLC, pour trouver une éventuelle forme familiale, de maladie dysimmunitaire ou de cancer, ainsi que les comorbidités. Questionner le patient permet également de rechercher des symptômes éventuels sur les six derniers mois pour détecter des formes symptomatiques de la maladie.

Il est important de retrouver des hémogrammes antérieurs, pour renseigner l'évolutivité de la maladie.

### **I.B.2.2 Examen clinique**

L'examen clinique vise à définir la présence, le nombre et la taille des adénopathies superficielles. Ces adénopathies superficielles sont classiquement bilatérales, symétriques, indolores et mobiles. De manière générale, les mesures de la flèche hépatique (longueur du lobe droit du foie) et du débord splénique sont aussi classiquement recherchées. On peut aussi rechercher une hypertrophie amygdalienne. La recherche d'adénopathies profondes n'est pas systématique au moment du diagnostic.

### **I.B.2.3 Examens biologiques**

L'hémogramme est nécessaire au diagnostic, d'une part pour confirmer la lymphocytose et d'autre part pour quantifier les réticulocytes.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

L'électrophorèse des protéines sériques fait également partie des examens biologiques nécessaires au diagnostic. Elle permet de détecter une anomalie des  $\gamma$  globulines (pic monoclonal ou déficit).

Le test de Coombs direct est un élément important de ces examens, il permet de rechercher des phénomènes d'auto-immunisation (anémie et/ou thrombopénie auto-immune).

Enfin, les sérologies virales doivent être réalisées afin d'écarter une lymphocytose virale et de rechercher des comorbidités associées qui pourraient favoriser une réactivation de certains virus.

## I.C Origine de la leucémie lymphoïde chronique et physiopathologie

### I.C.1 Origine de la leucémie lymphoïde chronique

#### I.C.1.1 La lymphocytose B monoclonale isolée

La lymphocytose B monoclonale isolée (MBL) se définit par une lymphocytose B monoclonale persistante inférieure à 5 000 lymphocytes / mm<sup>3</sup> en l'absence d'atteinte ganglionnaire, de cytopénie ou de maladie auto-immune associée<sup>20</sup>. Elle est retrouvée chez 3 à 12 % des individus dans la population générale selon les études et les techniques analytiques utilisées (Figure 4).

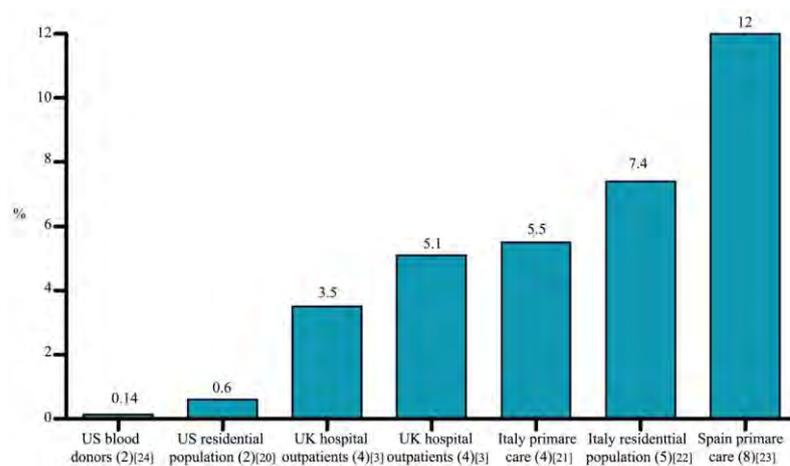


Figure 4 : Prévalence de la MBL aux Etats-Unis et dans différents pays européens (extrait de<sup>20</sup>).

L'immunophénotypage du clone B révèle que, dans 75 % des cas, ces cellules ont des caractéristiques proches des cellules leucémiques de LLC. De plus, parmi ces patients, 1 à 2 % par an évoluent vers une LLC, taux très supérieur à celui observé dans la population générale. Aujourd'hui il est communément admis que toute LLC est précédée d'une MBL.

Il est intéressant de noter que malgré la faible lymphocytose, les MBL peuvent présenter des anomalies cytogénétiques caractéristiques de la LLC<sup>21</sup> mais les données sur les mutations récurrentes manquent dans la littérature. Enfin, au niveau biologique, les MBL ne diffèrent des LLC stade Rai 0 (stade précoce de la maladie, ces stades seront plus précisément décrits dans la partie I.D.2.2 Classification de Rai) qu'au regard du statut IgHV (Immunoglobulin Heavy Chain), ce dernier étant plus souvent retrouvé non muté chez les patients Rai 0 comparés aux patients atteints de MBL<sup>22</sup>. Ces résultats posent la question du suivi des patients MBL, ainsi

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

en France l'InVS proposait en 2012 de rendre sa déclaration obligatoire, proposition restant sans réponse à l'heure actuelle.

#### 1.C.1.2 La cellule souche de la leucémie lymphoïde chronique

La cellule souche se définit fonctionnellement comme une cellule capable de s'autorenouveler et de se différencier en de multiples types cellulaires. En cancérologie ou en hématologie, des cellules ayant des propriétés souches ont été identifiées dans de nombreux types tumoraux<sup>23,24</sup>. Ces cellules, rares, sont capables de générer des tumeurs et permettent de maintenir la malignité de la maladie. De plus, elles présentent beaucoup de caractéristiques communes avec les cellules souches « normales » du tissu correspondant.

En 2010 et 2011, Kikushige et ses collègues ont démontré que dans la LLC, la cellule souche hématopoïétique est impliquée dans le développement de la maladie<sup>25, 26</sup>. En effet, ils ont prouvé que cette cellule produit un grand nombre de cellules pro-B polyclonales en réponse à une activation de la voie de signalisation du BCR. Cette cellule souche hématopoïétique est capable de produire des cellules B exprimant fréquemment le CD5 et le CD23, caractéristiques du clone leucémique. Enfin, ces cellules CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, obtenues suite à un prélèvement de moelle osseuse de patients LLC, génèrent chez la souris immunodéficiente une MBL, mais pas de LLC. Suite à cette étude, ils ont émis l'hypothèse que la cellule souche hématopoïétique de LLC génère un grand nombre de clones B polyclonaux, qui sont ensuite sélectionnés et amplifiés par activation de la signalisation de leur BCR conduisant à l'apparition de la MBL. Cette dernière évoluerait enfin vers une LLC suite à des évènements oncogéniques non définis (Figure 5).

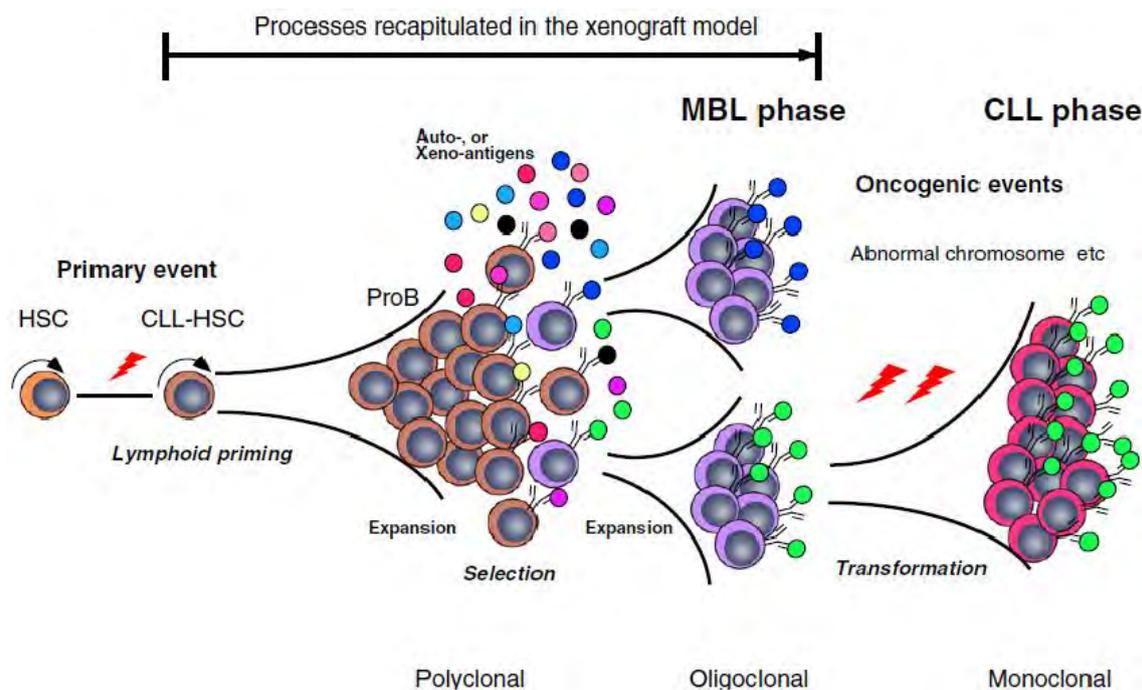


Figure 5: Présentation schématique du développement de LLC chez l'Homme basée sur un modèle de xélogreffe murine (extrait de <sup>26</sup>).

Malgré le travail important mis en place pour la recherche et la caractérisation de la cellule souche de LLC, aucune preuve formelle de son existence n'a à ce jour été avancée.

### 1.C.1.3 Rôle de la stimulation antigénique dans la leucémogénèse de la LLC

Au sein du lymphocyte B normal, la diversité du répertoire immunitaire du BCR est rendue possible par la recombinaison des chaînes VDJ (Variable Diversity Joining). Celle-ci a lieu au moment du stade pré-B dans la différenciation B, et par l'association de la variabilité des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines. A cette première diversité s'ajoute une diversité jonctionnelle due à des mécanismes d'additions et de délétions aléatoires de nucléotides au niveau des extrémités V, D et J avant fusion. Cette dernière, très importante sur le plan fonctionnel, concerne le site de contact direct avec l'antigène nommé Complementary Determing Region 3 (CDR3). Ainsi, à la sortie de la moelle osseuse, chaque lymphocyte B naïf exprime un BCR qui lui est propre et la probabilité qu'il existe au sein de l'organisme deux BCR identiques appartenant à deux lymphocytes B différents est quasi nulle.

Or, dans la LLC, des études ont montré l'existence de similarités de séquence du BCR chez environ 20 % des patients <sup>27, 28</sup>. Ces similarités, appelées stéréotypiques, suggèreraient un biais de répertoire qui serait le reflet d'une stimulation antigénique commune lors de la

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

leucémogénèse. Cette hypothèse se heurte au fait que le profil des antigènes (Ag) reconnus par le BCR diffère, suggérant que plusieurs Ag différents pourraient être responsables de la sélection du répertoire des Ig (Immunoglobulines) associées à la LLC <sup>29</sup>. De plus, le BCR des cellules leucémiques de LLC est capable de reconnaître un épitope interne à leur propre BCR, induisant sa stimulation autonome <sup>30</sup>. Ainsi, l'hypothèse d'une stimulation antigénique commune à l'origine de la LLC semble peu probable au vu de la diversité des Ag reconnus.

D'autres auteurs proposent de diviser la leucémogénèse des LLC en deux groupes sur la base du statut mutationnel d'IgHV (Figure 6) <sup>31</sup>.

Ainsi, les cellules leucémiques à IgHV non muté, qui expriment plus souvent un BCR polyréactif proviendraient de lymphocytes B normaux soumis à une stimulation antigénique de faible intensité mais constante ce qui induirait leur prolifération. La localisation tissulaire de cette stimulation est quant à elle peu claire. Les hypothèses les plus communément retenues évoquent les centres germinatifs, bien que l'on n'observe pas de commutation isotypique, ou encore la zone marginale, *via* une réponse à des Ag T indépendants <sup>32</sup>.

Les cellules leucémiques à IgHV muté, quant à elles, dériveraient de lymphocytes B normaux soumis à une stimulation antigénique persistante au sein des centres germinatifs. Ces clones, initialement répondeurs, deviendraient anergiques suite à cette stimulation au long cours.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

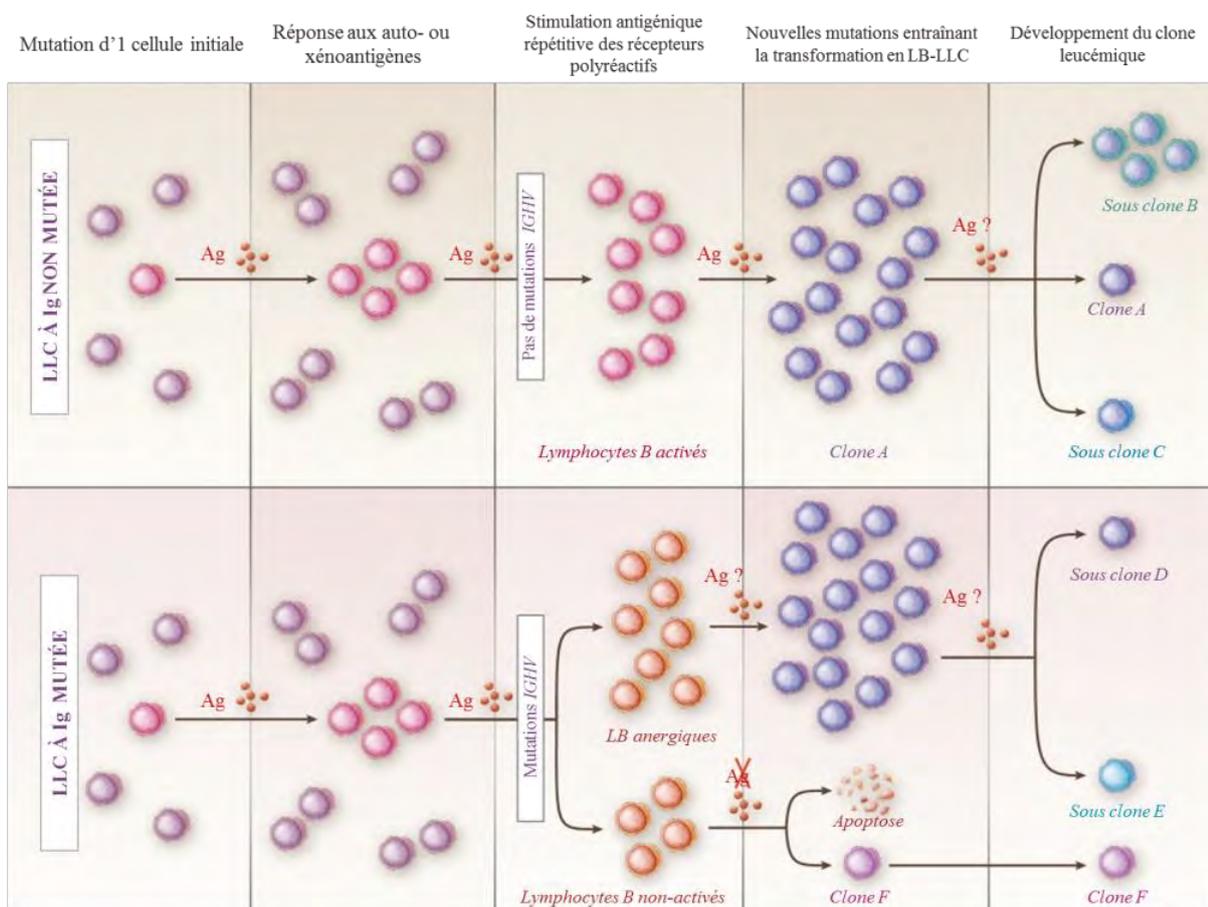


Figure 6: Représentation schématique du développement et de l'évolution de la LLC dépendante de la stimulation antigénique selon le modèle de Chiorazzi (adapté de<sup>31</sup>).

Cette hypothèse, bien qu'intellectuellement brillante, se heurte durement à la réalité. Ainsi, les données morphologiques, phénotypiques et transcriptomiques révèlent que les cellules leucémiques IgHV muté ou non sont extrêmement proches, ce qui sous-tend plutôt une leucémogénèse commune.

Une autre hypothèse a donc été formulée. La LLC, peu importe le statut IgHV, proviendrait de la prolifération de lymphocytes B mémoire de la zone marginale. Ainsi, suivant leur mode d'activation, il y aurait ou non des mutations hypersomatiques ce qui expliquerait l'émergence de clones mutés ou non. Cependant, dans cette théorie, les lymphocytes B mémoires n'expriment ni le CD5 ni le CD23, deux marqueurs d'un état activé. Enfin, afin de complexifier encore cette théorie, il a récemment été décrit un clone leucémique IgHV non

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

muté mais sélectionné par une stimulation antigénique dépendante des cellules T *via* des cellules dendritiques<sup>32</sup>. Cette hypothèse reste donc à ce jour purement intellectuelle, avec peu de preuves expérimentales venant la confirmer ou l'infirmier.

A ce jour, le rôle de la stimulation antigénique dans la LLC, bien qu'alléchant, reste peu clair.

## I.C.2 Physiopathologie

### I.C.2.1 La résistance à l'apoptose

Il y a vingt ans, la vision classique de la LLC considérait les cellules leucémiques comme des cellules B naïves, immunologiquement incompetentes, non proliférantes, s'accumulant en raison d'un défaut d'apoptose *in vivo*.

En effet, une surexpression de la protéine antiapoptique Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) a été mise en évidence dans les cellules leucémiques<sup>33, 34</sup>. Initialement cette surexpression était expliquée par une hypométhylation du promoteur de Bcl-2<sup>35</sup>, mais aujourd'hui l'hypothèse la plus communément admise est que miR-15-a et miR-16-1, qui régulent négativement Bcl-2 au niveau post traductionnel, sont sous-exprimés dans la LLC. Cette régulation de la transcription de Bcl-2 conduit à une accumulation de cette protéine<sup>36</sup>. De plus, d'autres protéines antiapoptiques telles que Bcl-xl (B-cell lymphoma-extra large), Mcl-1 (Myeloid cell leukemia 1) sont surexprimées dans cette pathologie, tandis que des protéines proapoptiques telles que Bax (BCL2-associated X protein) et Bcl-xs (B-cell lymphoma-extra small) sont quant à elles sous-exprimées<sup>37</sup>. De ce déséquilibre résulterait un défaut d'apoptose des cellules leucémiques. En plus de favoriser la survie des cellules leucémiques, ces protéines ont été décrites comme étant des facteurs clés dans la résistance aux traitements. Ainsi, une augmentation du rapport Bcl-2/Bax est associée à une maladie en progression et une résistance aux drogues *in vitro*<sup>38</sup>. On peut également noter qu'un taux élevé de Mcl-1, *in vitro* ou *in vivo*, ou du rapport Mcl-1/Bax sont corrélés à une mauvaise réponse à la fludarabine et un temps avant traitement réduite<sup>39</sup>.

A ce déséquilibre s'ajoutent, dans les LLC de mauvais pronostics, des pertes ou des mutations d'autres régulateurs classiques de l'apoptose tel que *TP53* (Tumor Protein p53) et *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated) qui sont mutés ou perdus notamment lors des délétions 17p13 et 11q22-23 (voir I.D.4.4 Délétion 17p13 et I.D.4.2 Délétion 11q22-23 respectivement).

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

Cette évidence de défaut d'apoptose *in vivo* contraste très fortement avec l'hypersensibilité de ces cellules à la mort programmée *in vitro*. En effet, *ex vivo* ces cellules leucémiques engagent spontanément des processus apoptotiques<sup>40</sup>. Ce processus peut être inhibé par la culture de ces cellules leucémiques avec des cellules de leur microenvironnement tumoral telles que les cellules stromales de moelle osseuse<sup>40</sup>, les cellules mésenchymateuses<sup>41</sup>, ou les Nurse-Like Cells (NLC)<sup>42</sup> (voir III.C.4.2 Protection contre l'apoptose des cellules leucémiques *in vitro*).

### I.C.2.2 La prolifération

La vision selon laquelle la LLC serait une maladie quiescente résultant d'un défaut d'apoptose plus que d'une prolifération reposait sur plusieurs faits objectifs. Premièrement, les cellules leucémiques, prélevées dans le sang périphérique, sont des lymphocytes quiescents. On observe en effet au niveau morphologique une chromatine nucléaire condensée, un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, et une absence de nucléole. Deuxièmement, ces cellules, toujours prélevées dans le sang périphérique, sont bloquées en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire. L'hypothèse retenue pour expliquer ce phénomène serait que les gènes contrôlant ce cycle seraient dérégulés. En effet dans les cellules leucémiques, la protéine p27Kip1, un inhibiteur de kinases dépendantes du cycle cellulaire, est sur-exprimée ce qui expliquerait le blocage en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

La plus grosse brèche dans cette théorie apparaît dans l'étude de Messmer et al<sup>43</sup>. En faisant ingérer à des patients de l'eau lourde quotidiennement, ils ont étudié l'incorporation de ce radio isotope au sein des cellules leucémiques. Grâce à cette méthode, ils ont pu montrer que 0,1 à 1,75 % de l'ensemble des cellules leucémiques proliféraient soit environ de  $1 \times 10^9$  à  $1 \times 10^{12}$  cellules naissantes chaque jour. De plus, ils proposent qu'un taux de prolifération supérieur à 0,35 % serait le reflet d'une maladie progressive<sup>43</sup>.

Ensuite, les cellules leucémiques expriment un certain nombre de marqueurs d'activation (CD23 et souvent CD25, CD69 et CD71). Ces observations indiquent que ces cellules malignes ressemblent à des lymphocytes B activés ayant eu une expérience antigénique.

De plus, l'analyse de la longueur des télomères apporte une autre preuve de la prolifération des cellules leucémiques. Les télomères sont des séquences polynucléotidiques répétées en tandem, situées aux extrémités des chromosomes et se raccourcissant après chaque division cellulaire. Plusieurs études révèlent que les cellules leucémiques ont des télomères plus courts que les lymphocytes B normaux démontrant ainsi une augmentation de leur prolifération<sup>44-48</sup>.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

Finalement, des cellules leucémiques en prolifération peuvent être retrouvées au sein des ganglions lymphatiques ou plus rarement dans la moelle osseuse<sup>49</sup>. Elles sont regroupées au niveau de structures histologiques particulières appelées pseudo-follicules. Elles sont composées de foyers nodulaires contenant de grands agrégats de cellules tumorales, proliférantes (Ki67<sup>+</sup>) et exprimant fortement des molécules anti-apoptotiques. Au sein même de ces centres de prolifération, ces cellules leucémiques sont en contact avec les cellules du microenvironnement tumoral et leur délivrent de nombreuses cytokines et chimiokines permettant leur prolifération et leur survie au sein de la niche<sup>50, 51</sup>. Ainsi, les cellules proliféreraient au sein des ganglions et migreraient ensuite dans le sang périphérique *via* un mécanisme impliquant la sphingosine-1-phosphate et son récepteur<sup>52</sup>. Dans le sang, sans leur microenvironnement, ces cellules deviendraient quiescentes.

L'ensemble des données démontre clairement qu'en plus d'être une maladie résultant d'un défaut d'apoptose, la LLC est bel et bien une hémopathie proliférante.

### I.C.2.3 La voie de signalisation du BCR

Le BCR et son signalosome contrôlent très finement la différenciation et la maturation des lymphocytes B. Ainsi, l'évidence selon laquelle le BCR ou les protéines de sa voie de signalisation seraient modifiés dans LLC s'est très vite imposée.

Le BCR est constitué d'une Ig de surface associée au CD79a et CD79b (Immunoglobulin  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement). Son activation, suite à la fixation d'un antigène sur l'Ig de surface, entraîne une phosphorylation de la partie intracellulaire de l'hétérodimère CD79a/CD79b. Cette fixation permet le recrutement de la protéine kinase SYK (Spleen Tyrosine Kinase) qui active ensuite une cascade de signalisation impliquant BTK (Bruton Tyrosine Kinase) et PI3K $\delta$  (isoforme delta de la Phosphatidylinositol-3 Kinase). Ces kinases activeront ensuite différentes protéines des voies de prolifération et de survie comme les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ou NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)<sup>53</sup> (Figure 7).

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

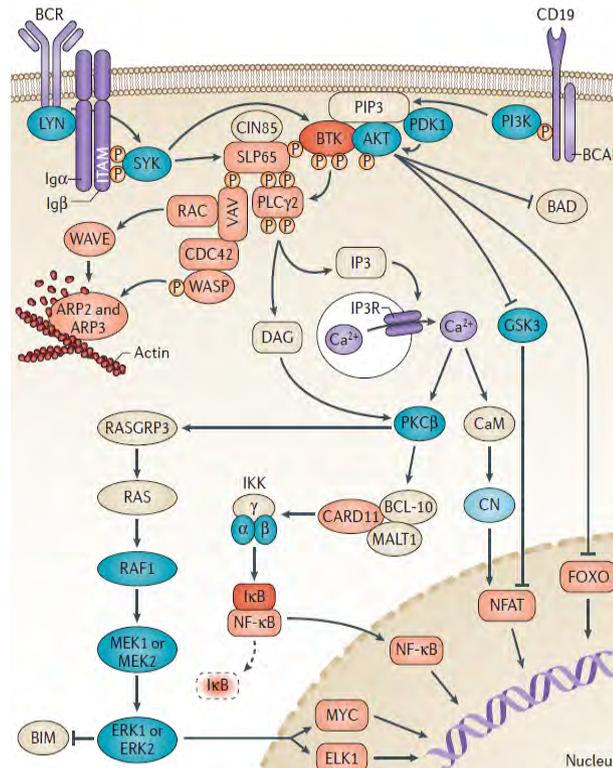


Figure 7: Représentation schématique du signalosome du BCR (extrait de <sup>54</sup>).

Dans la LLC, la voie de signalisation du BCR est essentielle à la survie, à la prolifération, et aux interactions avec le microenvironnement <sup>50</sup>.

De plus, lorsque l'on dicotomise les patients suivant leur statut IgHV (voir I.D.3.1 Le statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines), on observe au niveau transcriptomique que parmi la centaine de gènes différentiellement exprimés la plupart concernait la signalisation du BCR <sup>55, 56</sup>. En effet, ces auteurs ont retrouvé notamment ZAP-70 (zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa), protéine non présente dans la voie de signalisation normale du lymphocyte B. Cette protéine est utilisée dans la LLC pour augmenter la signalisation du BCR *via* une augmentation des flux calciques et en activant diverses kinases dont BTK <sup>57</sup>.

Enfin, cette voie de signalisation fait actuellement l'objet d'une attention toute particulière car de nombreux inhibiteurs des protéines de signalisation sont en cours de développement ou déjà sur le marché (pour plus d'informations voir I.E.4.1 L'ibrutinib (Imbruvica ®) et I.E.4.2 Idélalisib (Zydelig ®)) pour le traitement de la LLC notamment.

## I.D Facteurs pronostiques

La LLC est une hémopathie maligne d'évolution extrêmement variable d'un patient à l'autre, allant de l'espérance de vie non modifiée à un décès rapide dû à la pathologie et à ses complications. Devant cette hétérogénéité, de multiples facteurs pronostiques aussi bien cliniques ou biologiques que cytogénétiques permettent de classifier les patients en différentes populations afin d'optimiser la réponse thérapeutique.

### I.D.1 Facteurs pronostiques généraux

Comme dans d'autres hémopathies malignes, l'âge avancé, un mauvais état général, l'existence de signes généraux des facteurs de comorbidités associés, ou encore le sexe masculin, ont un impact négatif sur la survie des patients <sup>58-60</sup>.

### I.D.2 Facteurs pronostiques clinico-biologiques

#### I.D.2.1 Classification de Binet

Cette classification est la plus utilisée en France et en Europe. Créée en 1981 par Jacques-Louis Binet, elle est déterminée par le nombre d'aires ganglionnaires atteintes, le plus souvent bilatérales, (Figure 8) et les troubles de l'hémogramme (Table 2), et divise les patients en trois groupes <sup>61</sup>. Au moment du diagnostic, 75 % des patients sont au stade A, 18 % au B et 7 % au C.

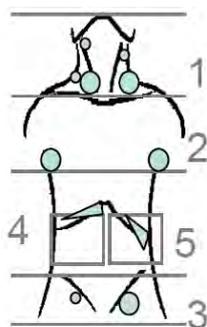


Figure 8 : Les cinq aires lymphoïdes palpables (extrait de <sup>2</sup>).

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

Hb $\geq$ 10 g and platelets $\geq$ 100,000/mm <sup>3</sup>	<3 Enlarged areas*	A
	$\geq$ 3 Enlarged areas	B
Hb < 10 g and/or platelets < 100,000/mm <sup>3</sup>	(Any number of enlarged areas)	C

Table 2: Classification des stades de Binet <sup>61</sup>.

Cette classification est hautement prédictive de la survie des patients (Figure 9), avec une médiane de survie supérieure à 12 ans pour les patients au stade A, tandis que les patients aux stades B ont des médianes de survie de 5 à 8 ans et ceux aux stades C ont une médiane de survie de moins de 5 ans.

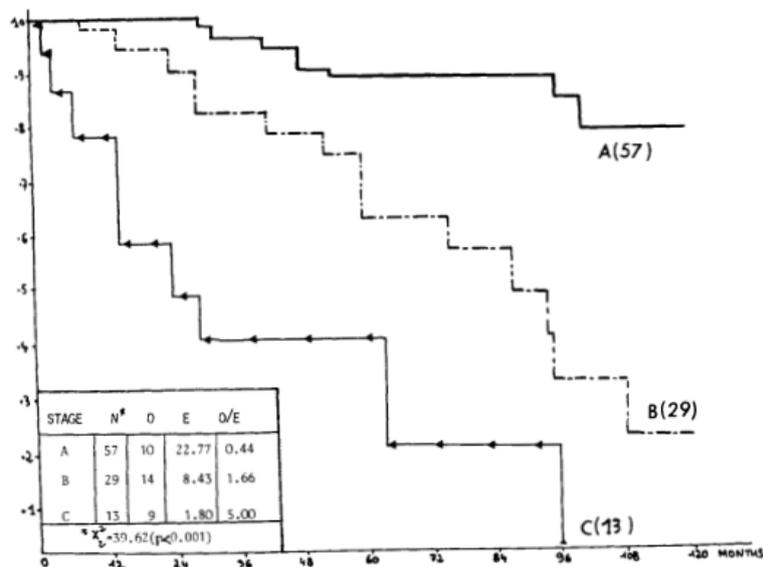


Figure 9: Courbes de survie en fonction du stade de Binet en 1981 (extrait de <sup>61</sup>).

Aujourd'hui, avec l'apparition de nouveaux traitements dans la LLC, cette classification est toujours d'actualité, bien que les survies globales des patients soient allongées et que le pronostic des patients de stades B et C soit semblable (Figure 10).

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

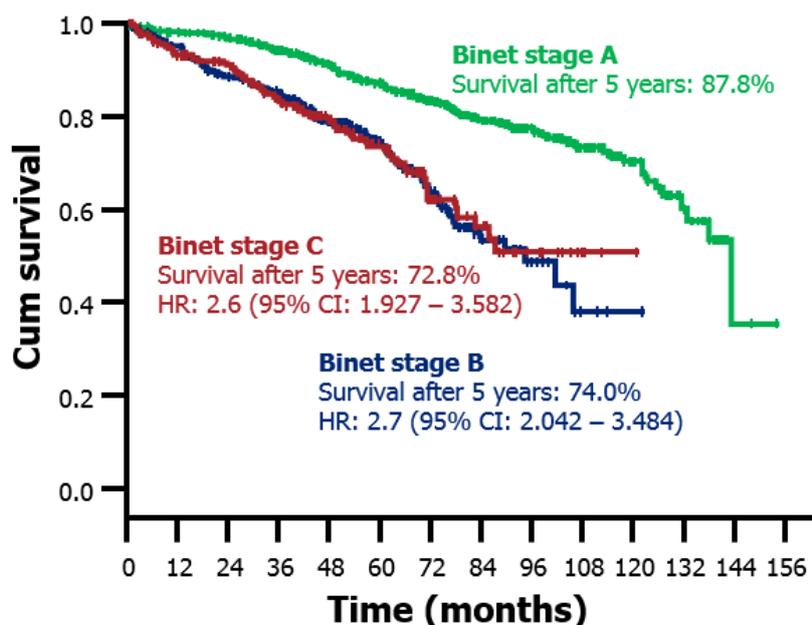


Figure 10: Courbe de survie en fonction du stade de Binet en 2011 (Hallek, communication personnelle).

### I.D.2.2 Classification de Rai

Décrite par Rai aux Etats-Unis en 1975, elle est beaucoup utilisée en Amérique du Nord. Elle définit quatre stades par l'existence d'un syndrome tumoral (adéno-, spléno- ou hépatomégalie) et la présence de cytopénies (anémie, thrombopénie) (Table 3) <sup>62</sup>. Là encore, cette classification est hautement pronostique de la survie (Table 3 et Figure 11).

Stade	Critères de définition	Pronostic	Médiane de Survie
0	Lymphocytose > 5000 mm <sup>3</sup>	Bon	≥ 10 ans
I	Lymphocytose + adénopathies	Intermédiaire	9 ans
II	Lymphocytose + hépato ou splénomégalie	Intermédiaire	5 - 7 ans
III	Lymphocytose + hémoglobine < 10 mg/L	Mauvais	2 - 5 ans
IV	Lymphocytose + plaquettes <100 000/μL	Mauvais	2 - 5 ans

Table 3: Classification de Rai <sup>17</sup>.

Malgré ces hautes valeurs pronostiques, ces classifications clinico-biologiques ne permettent pas de prédire l'évolution des malades de bon pronostic (Binet stade A et/ou Rai 0). C'est pourquoi des paramètres permettant de mieux anticiper l'évolution tumorale et la prise en charge thérapeutique des patients diagnostiqués à des stades précoces ont été recherchés.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

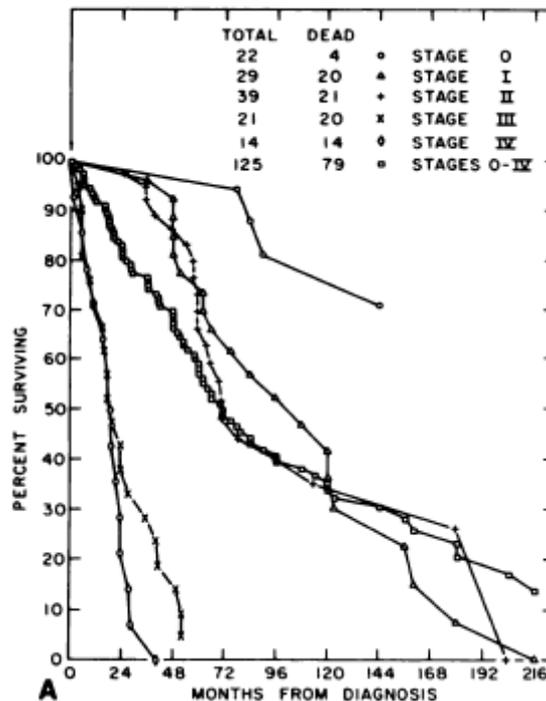


Figure 11: Courbes de survie en fonction du stade de Rai (extrait de <sup>62</sup>).

## I.D.3 Les facteurs pronostiques liés à la signalisation du BCR

### I.D.3.1 Le statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines

L'ontogénèse des lymphocytes B normaux est caractérisée par l'acquisition de marqueurs protéiques tels que le CD19, le CD20 mais aussi par l'expression d'une Ig de surface, récepteur à l'antigène formant avec le CD79a et le CD79b le BCR.

C'est au cours de la recombinaison VDJ que chaque cellule B acquiert un BCR qui lui est propre, lors de sa différenciation dans la moelle osseuse. Ces lymphocytes B naïfs rencontreront ensuite leur antigène au sein des centres germinatifs conduisant à leur prolifération avec la sélection de clones hautement affins vis-à-vis de l'antigène et à une commutation isotypique des classes IgM et IgD vers les classes IgG, IgA ou IgE. Les cellules ainsi sélectionnées positivement peuvent alors se différencier soit en lymphocytes B mémoires exprimant le marqueur CD27, soit en plasmocyte sécréteur d'anticorps exprimant le CD138. Ils sont alors appelés « post-centre germinatif ».

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

Bien que l'hypothèse de l'expérience antigénique des cellules à l'origine de la LLC reste peu claire, dans la LLC, l'étude du statut mutationnel des chaînes lourdes d'Ig appelées plus couramment IgHV a conduit à l'identification de deux entités.

La première concerne les LLC avec IgHV muté, environ 60 % des patients, où la chaîne lourde des Ig présente plus de 2 % de différences avec celle du lymphocyte B naïf. La seconde, les LLC avec IgHV non-muté, environ 40 % des patients, où la chaîne lourde de Ig présente moins de 2 % de différences avec le lymphocyte B naïf. Il s'agit d'un facteur pronostique important, les LLC à IgHV non muté ayant une diminution significative de leur survie sans progression, de leur temps sans retraitement <sup>63</sup> et de leur survie globale (Figure 12).

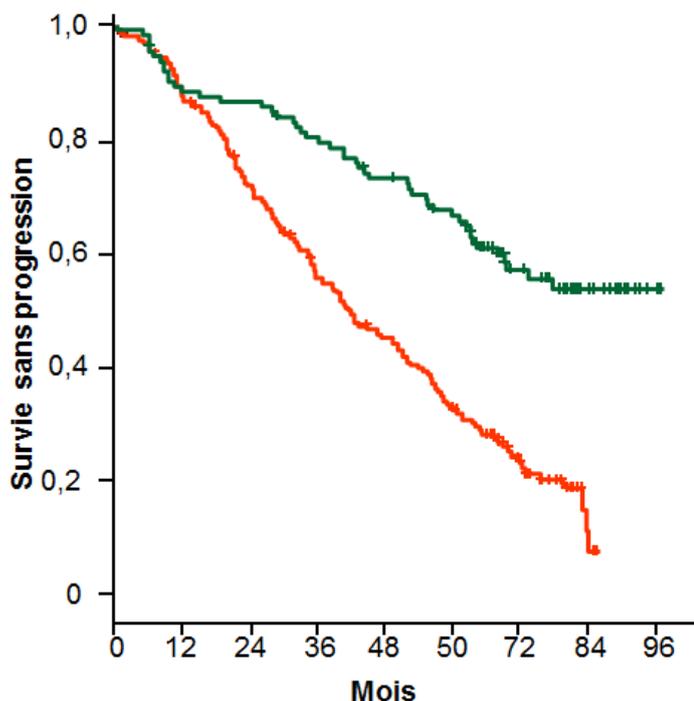


Figure 12: Courbes de survie sans progression de patients LLC traités par RFC (Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab) en fonction du statut IgHV (courbe verte : IgHV muté, courbe orange : IgHV non muté) (Fisher K., IwCLL, 2013).

Le statut mutationnel ne varie pas au cours de la LLC <sup>63</sup>. L'utilité de sa détermination est contrebalancée par le fait qu'elle fait appel à un procédé long, coûteux et nécessitant des techniques rarement accessibles hors des laboratoires hospitaliers des CHU.

#### I.D.4 Marqueurs cytogénétiques

La découverte de marqueurs cytogénétiques, notamment par la FISH (Hybridation *In Situ* en Fluorescence), a révolutionné la prise en charge de la LLC en retrouvant des anomalies cytogénétiques liées au pronostic, chez plus de 80 % des patients <sup>64, 65</sup>.

Contrairement à d'autres hémopathies malignes caractérisées par des arrangements chromosomiques récurrents, comme le chromosome Philadelphie dans les leucémies aiguës myéloïdes, dans la LLC aucun évènement oncogénique spécifique responsable de son initiation n'a été découvert. La majorité de ces anomalies apparaît au cours du développement et semble survenir plus fréquemment chez les patients ayant un statut IgHV non muté <sup>65</sup>.

Les anomalies les plus couramment retrouvées dans la LLC sont la délétion 13q14, la délétion 11q22-23, la trisomie 12q et la délétion 17p13.

##### I.D.4.1 Délétion 13q14

Retrouvée chez 51 % des patients, la délétion du bras long du chromosome 13 est l'anomalie cytogénétique la plus fréquente et est considérée comme un évènement précoce dans la transformation leucémique. Il s'agit d'une délétion cryptique de la bande 13q14.3, le plus souvent hétérozygote. Lors de cette délétion, il y a perte des régions codantes de deux micro-ARN (Acide Ribo Nucléique) miR-15a et miR-16-1 dont l'implication dans la leucémogénèse est prouvée <sup>66</sup>. Cette délétion, si elle est isolée, est associée à un bon pronostic avec le meilleur taux de survie (médiane de survie de 133 mois), supérieur à celui des patients avec un profil cytogénétique normal (Figure 13) <sup>15, 64, 67, 68</sup>.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

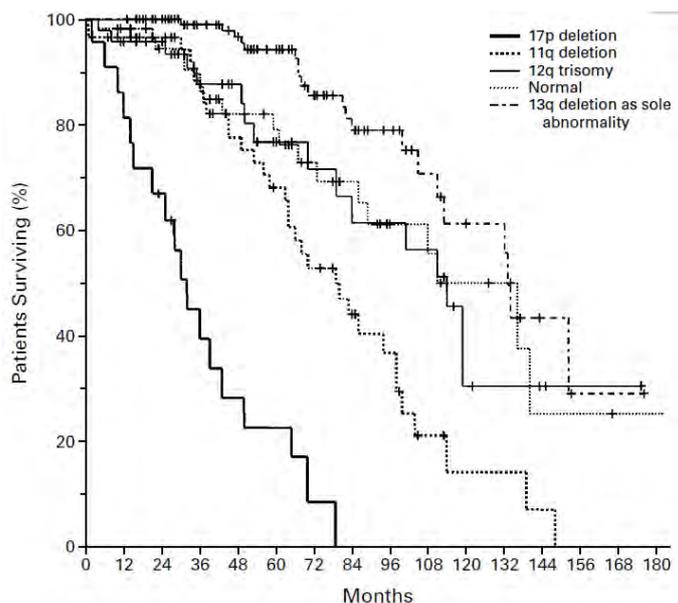


Figure 13: Courbes de survie globale de patients atteints de LLC en fonction de leurs anomalies cytogénétiques (extrait de <sup>68</sup>).

#### I.D.4.2 Délétion 11q22-23

Deuxième anomalie cytogénétique dans la LLC en terme de fréquence, la délétion 11q22.3 est retrouvée chez 17 à 19 % des patients. Cette délétion, de taille variable, est majoritairement supérieure à 20 mégabases (MB) mais la région minimale de délétion est confinée à une séquence de 2 à 3 MB voire moins <sup>69-72</sup>. Au niveau clinique, les patients présentant une délétion 11q22.3 ont une atteinte ganglionnaire importante et la plupart des études s'accordent sur le fait que cet événement cytogénétique est de mauvais pronostic (Figure 13) <sup>68, 73, 74</sup>.

Au cours de cette délétion, il y a notamment perte du gène *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), gène suppresseur de tumeur, qui a un rôle crucial dans la signalisation des dommages à l'ADN (Acide Desoxyribo Nucléique). Il permet l'activation de la voie p53 dans le cadre de la réponse aux cassures doubles brins de l'ADN. Le second allèle peut être muté dans 22 à 40 % des cas de délétion 11q22.23 entraînant une perte totale d'*ATM*.

Dans la majorité des LLC, la délétion 11q22.3 semble être un événement apparaissant tardivement dans l'histoire de la maladie, mais elle a été observée précocement dans une petite proportion des cas <sup>75</sup>. La perte d'*ATM* n'est cependant pas un événement initiateur de la LLC, comme il a été montré lors d'études réalisées au sein de cas familiaux de LLC <sup>76</sup>.

### I.D.4.3 Trisomie 12

Seule trisomie et première anomalie cytogénétique observée dans la LLC, elle est retrouvée chez 15 % des patients. L'observation de rares trisomies partielles du chromosome 12 a mis en évidence une zone minimale de duplication au niveau de la bande 12q13-15<sup>77</sup>. Au niveau cytologique, elle est très souvent associée à des atypies, ainsi qu'à un profil phénotypique particulier avec un score de Matutes inférieur à 4 (forte intensité d'expression de FMC7 et de l'Ig de surface)<sup>78</sup>.

Toutefois, la nature du/des gène(s) impliqué(s) dans la pathogénèse de la LLC avec trisomie 12 demeure encore inconnue et fait l'objet de controverses<sup>67</sup>. Son pronostic est également discuté, il est défini comme intermédiaire dans la plupart des études avec une médiane de survie de 114 mois (Figure 13)<sup>79</sup>.

### I.D.4.4 Délétion 17p13

La délétion impliquant la région 17p13 (5 à 7 % des patients) est associée à la perte de *TP53*. Cette anomalie survient le plus souvent au cours de l'évolution de la maladie. Malgré le faible taux observé au moment du diagnostic, elle est retrouvée chez 25 à 40 % des patients lors des maladies avancées et/ou réfractaires<sup>80, 81</sup> et est le plus mauvais facteur de risques dans la LLC (Figure 13)<sup>82</sup>.

p53, connu comme le gardien du génome, a un rôle clé dans la réparation des dommages de l'ADN, l'apoptose et la régulation cellulaire. Cette anomalie cytogénétique est un facteur de mauvais pronostic indépendant dans la LLC<sup>82</sup>. De plus, elle conditionne une mauvaise réponse aux agents alkylants et aux analogues des purines, en particulier la fludarabine, nécessitant une prise en charge particulière de ces patients<sup>83</sup>.

### I.D.4.5 Autres anomalies chromosomiques

Une délétion au niveau du chromosome 6 (del6q21) a été mise en évidence chez 5 à 6 % des patients. Elle est associée à une hyperlymphocytose importante, une morphologie atypique des lymphocytes B et à un pronostic intermédiaire<sup>84</sup>.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

Il existe également des translocations qui impliquent un réarrangement des gènes des chaînes lourdes des Ig (chromosome 14, locus 14q32). Elles sont décrites pour 4 à 7 % des cas de LLC, et sont associées à un mauvais pronostic <sup>85</sup>.

#### I.D.4.6 Le caryotype complexe

Défini comme un caryotype pour lequel on observe la présence de trois anomalies non apparentées <sup>86</sup>, le caryotype complexe est un facteur de mauvais pronostic. En effet, sa présence est associée à une diminution de la survie sans progression, de la survie globale <sup>86</sup> après chimiothérapie (Figure 14) ou allogreffe <sup>87</sup>.

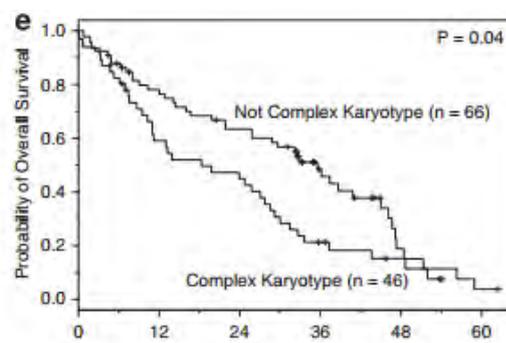


Figure 14: Courbes de survie en fonction de la présence ou non d'un caryotype complexe (extrait de <sup>86</sup>).

De plus, il a été montré en 2014 que le caryotype complexe est la seule anomalie caryotypique prédisant une résistance à l'ibrutinib <sup>88</sup>.

#### I.D.5 Mutations récurrentes

Le développement récent des techniques de séquençage à haut débit a mis en évidence des mutations somatiques récurrentes contribuant à la pathogenèse de la LLC. Au total 18 anomalies récurrentes ont été décrites dont *NOTCH1*, *XPO1* (Exportin 1), *MYD88* (Myeloid Differentiation Primary Response 88), *KLH6* (Kelch-Lite 6), *TP53* (Tumor Protein p53), *TGM7* (Transglutaminase 7), *BIRC3* (Baculoviral IAP Repeat Containing 3), *PLEKHG5* (pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 5), *ATM*, *SF3B1* (splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa), *ZMYM3* (zinc finger, MYM-type 3) *MAPK1*, *FBXW7*

## INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

(F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase) et *DDX3* (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3) <sup>89</sup>.

Au CHU de Toulouse, cette détection s'effectue par la technique HRM (High Resolution Melt) qui a un seuil de sensibilité d'environ 5 % de cellules pathologiques. Si ce test est positif, alors la validation s'effectue par séquençage dont le seuil de sensibilité est d'environ 20 %.

### I.D.5.1 Mutation de *TP53*

*TP53* est un gène suppresseur de tumeur situé sur le bras court du chromosome 17 en région 13.1. Il induit notamment un arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose cellulaire. Il est muté dans plus de la moitié des cancers humains. L'altération de ce gène permet aux cellules de poursuivre le cycle cellulaire malgré des dommages à l'ADN et d'échapper à l'apoptose.

Dans la LLC, la mutation hétérozygote de *TP53* est retrouvée chez 4 à 37 % des patients. De plus, environ 80 % des patients présentant une délétion 17p13 ont également une inactivation de l'allèle résiduel par mutation. On retrouve plus fréquemment *TP53* muté quand la pathologie est à des stades tardifs ou après chimiothérapie avec des agents induisant des dommages à l'ADN <sup>81</sup>.

Il existe, chez environ 4 à 5 % des patients, une mutation de *TP53* sans délétion 17p13 de pronostic aussi mauvais que celui des patients présentant la délétion 17p13 <sup>90 81</sup>. Enfin, Rossi et son équipe ont mis en évidence que les patients présentant des clones *TP53* mutés ultraminoritaires (9 % parmi une population de patients non traités) étaient de même pronostic que les patients présentant des clones mutés pour *TP53* plus fréquents <sup>91</sup> (Figure 15).

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

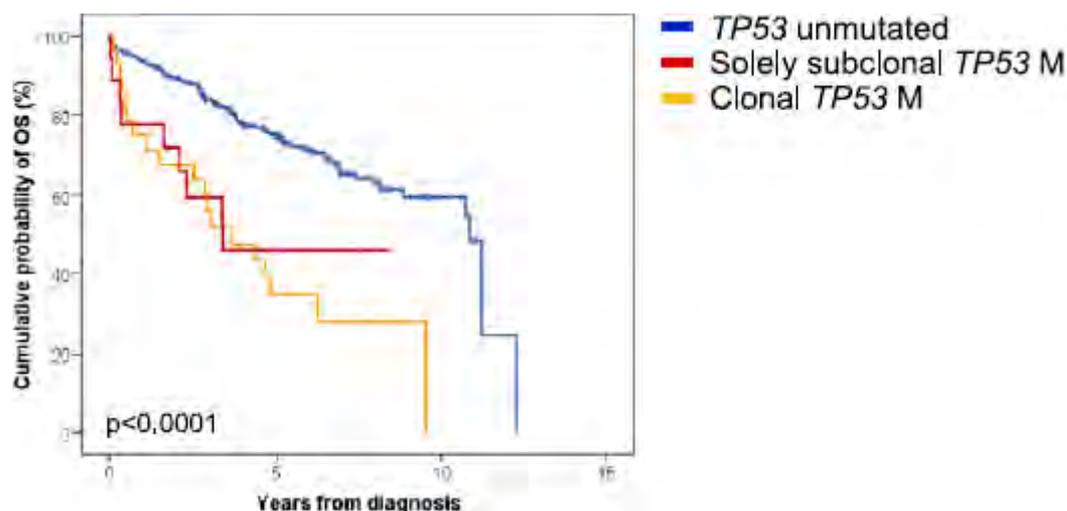


Figure 15: Courbes de survie en fonction du statut mutationnel de *TP53* et de la fréquence de cette mutation (extrait de <sup>91</sup>).

Au vu du pronostic des patients *TP53* mutés, même si le clone n'est qu'ultraminoritaire, la détection de cette mutation est donc cruciale. Actuellement, au CHU de Toulouse, la limite basse de détection de la mutation de *TP53* est de 1,39 %, ce qui permet la détection et la prise en charge appropriée des patients présentant un clone *TP53* muté ultraminoritaire.

#### I.D.5.2 Mutation de *NOTCH1*

*NOTCH1* est un gène présent sur le bras long du chromosome 9 en région 34.3. Il code pour un récepteur de surface ayant pour ligands Jagged1, Jagged2 et Delta1. Lorsque son ligand est présent, le domaine intracellulaire (NCID) est relargué dans le cytoplasme et il forme un complexe transcriptionnel activateur qui active des voies de signalisations anti-apoptiques telles que NF-KB et Akt <sup>92</sup>.

Dans la LLC, la mutation de *NOTCH1* entraîne la perte d'un élément régulateur ce qui conduit à l'accumulation de *NOTCH1* sous une forme stabilisée induisant une activation constitutive de sa voie de signalisation et des voies métaboliques du glucose.

Elle est retrouvée chez 8 à 12 % des patients selon les études et est considérée comme étant de mauvais pronostic <sup>89,93,94</sup>. En effet, les patients présentant cette mutation ont une survie globale plus courte et un temps avant traitement plus court <sup>94,95</sup> (Figure 16). De plus, ils évoluent plus fréquemment vers un lymphome B diffus à grandes cellules supposant un rôle de *NOTCH1* dans le développement et la progression de la maladie <sup>96-98</sup>. Elle est souvent associée avec la

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

trisomie 12, constituant donc un sous-groupe à pronostic défavorable parmi les patients atteints de trisomie 12<sup>99</sup>. Enfin, elle est virtuellement mutuellement exclusive avec la mutation *TP53*<sup>93</sup>.

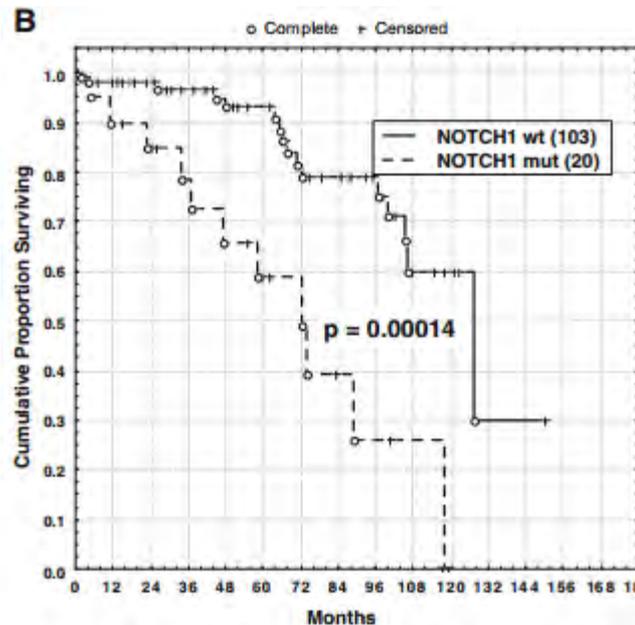


Figure 16: Courbes de Survie en fonction du statut mutationnel de *NOTCH1* (extrait de<sup>95</sup>).

### I.D.5.3 Mutation de *SF3B1*

*SF3B1* est un gène présent sur le bras long du chromosome 2 dans la région 33.1. *SF3B1* fait partie du complexe d'ubiquitination U2 impliqué dans l'épissage des ARNm (ARN messagers). Il intervient dans les interactions ARN/protéines et protéines/protéines. Sa mutation faux-sens provoque un défaut d'épissage des pré-ARNm.

Présente chez 5 à 18 % des patients atteints de LLC, cette anomalie est considérée comme étant de mauvais pronostic (Figure 17) notamment car les patients sont résistants aux chimiothérapies contenant de la fludarabine<sup>100</sup>. Elle est très souvent associée à la délétion 11q ce qui rend difficile d'établir sa valeur pronostique propre<sup>99</sup>. Ici encore, les mutations de *SF3B1* et de *TP53* sont virtuellement mutuellement exclusives<sup>100</sup>.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

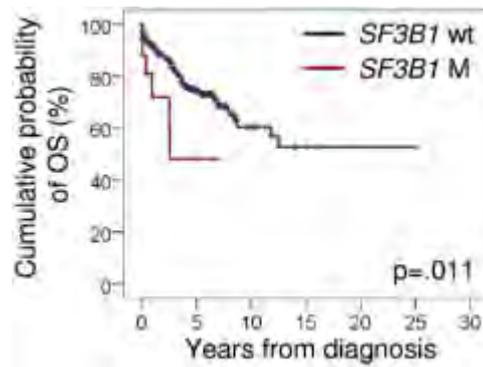


Figure 17: Courbes de survie globale en fonction du statut mutationnel de *SF3B1* (extrait de <sup>100</sup>).

#### I.D.5.4 Mutation de *MYD88*

*MYD88* est un gène présent sur le bras court du chromosome 3 en région 22. Son gène code pour une protéine adaptatrice cytosolique qui joue un rôle central dans les réactions immunitaires innées et adaptatives. Cette protéine fonctionne comme un capteur de signal essentiel dans la signalisation de l'interleukine-1. Les altérations de cette protéine peuvent conduire à des défauts dans les processus de mort cellulaire programmée.

Dans la cellule leucémique *MYD88* mutée, on retrouve en grande quantité la kinase *IRAK3* (interleukin-1 receptor-associated kinase 3). De plus, elle présente de forts taux de *STAT3* (signal transducer and activator of transcription 3) activé et de *NF-κB* actif, ces deux molécules étant des composantes de la machinerie antiapoptotique.

Dans la LLC, elle est présente chez environ 3 % des patients <sup>99</sup> et son impact pronostique reste peu clair <sup>89, 101</sup>. Il faut aussi noter que cette mutation est plus fréquente chez les patients à IgHV muté (5,6 %).

#### I.D.5.5 Mutation de *BIRC3*

*BIRC3* est un gène situé en 11q22.2 à moins d'une mégabase d'*ATM*. Ce gène code pour un membre de la famille des inhibiteurs de l'apoptose (IAP). Il est impliqué dans la régulation du facteur de transcription *NF-κB* et permet de maintenir la voie non canonique de *NF-κB* à un niveau basal.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

L'une des explications du rôle de *BIRC3* dans la LLC est que lorsqu'il est muté, il n'effectuerait plus son rôle de répresseur de la voie non canonique de NF- $\kappa$ B ce qui provoquerait une activation constitutive de cette voie de manière ligand indépendante.

Dans la LLC, *BIRC3* est ainsi perdu lors de la délétion 11q mais aussi par mutation<sup>102</sup>. Sa perte est retrouvée chez environ 2 % des patients au moment du diagnostic mais pas dans la MBL. Comme pour *SF3B1*, cette mutation a été décrite comme provoquant des résistances aux chimiothérapies à base de fludarabine dans plus de 24 % des cas et est associée à un mauvais pronostic<sup>103</sup> (Figure 18). Enfin, cette mutation est mutuellement exclusive avec les mutations de *TP53*, *NOTCH1* et *SF3B1*<sup>103</sup>.

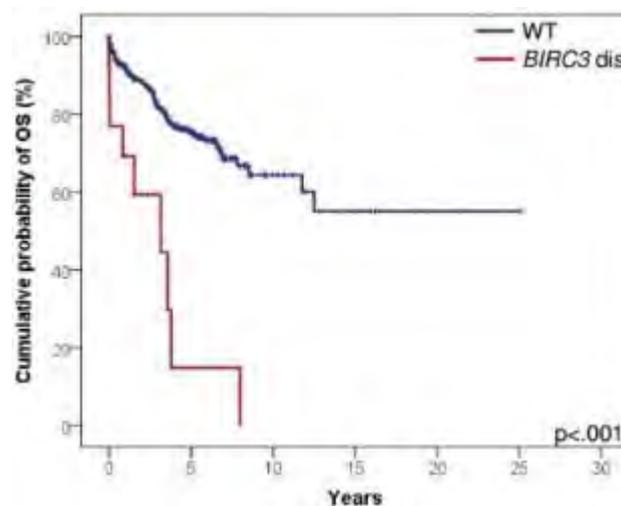


Figure 18: Courbes de survie globale en fonction du statut mutationnel de *BIRC3* (extrait de<sup>103</sup>).

#### I.D.5.6 Classification combinant les anomalies caryotypiques et les mutations récurrentes

En se basant sur les facteurs cytogénétiques et les mutations récurrentes, Rossi *et al* ont proposé une classification hiérarchique des patients nouvellement diagnostiqués en quatre groupes<sup>101</sup>. Le premier groupe, pour les patients à haut risque, concerne les patients mutés ou délétés pour *TP53* et/ou *BIRC3* indépendamment des autres mutations et/ou anomalies caryotypiques. Ces patients présentent une survie globale à dix ans de 29 %. Le second, pour les patients ayant des mutations sur *NOTCH1* et/ou *SF3B1* et/ou une délétion 11q22-23 en l'absence des mutations décrites dans le premier groupe, est défini comme un groupe de risque intermédiaire avec une survie à 10 ans de 37 %. La présence d'une trisomie 12, d'un caryotype normal et de *TP53*, *BIRC3*, *NOTCH1* et *SF3B1* non mutés forme le troisième groupe des

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

patients à risque faible avec une survie à dix ans de 57 %. Enfin, les patients ayant une délétion 13q forment le dernier groupe, à risque très faible dont la survie à dix ans ne diffère pas de la population témoin (Figure 19).

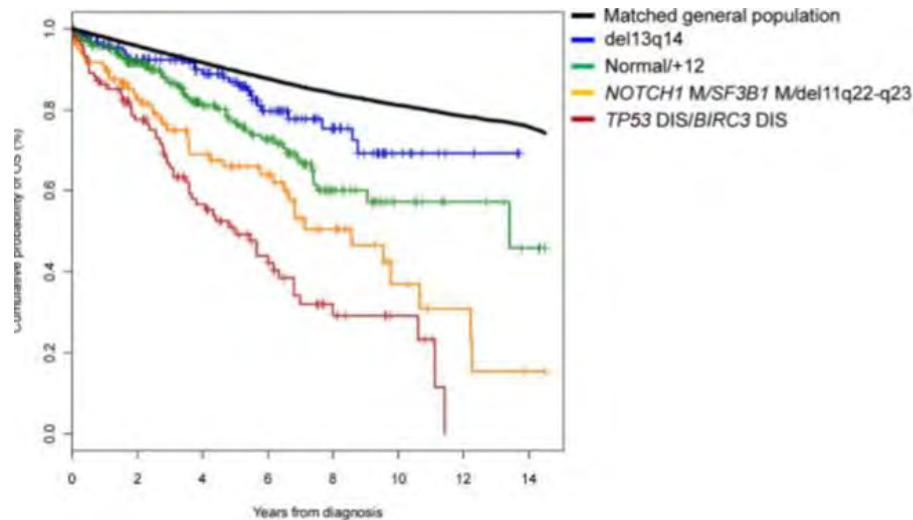


Figure 19: Courbes de survie globale selon la classification hiérarchique proposée par Rossi *et al* basée sur les anomalies cytogénétiques et les mutations récurrentes (extrait de <sup>101</sup>).

## I.D.6 Marqueurs sériques pronostiques

### I.D.6.1 $\beta 2$ microglobulinémie

La  $\beta 2$  microglobuline ( $\beta 2m$ ) est une protéine extracellulaire de la superfamille des Ig liée de façon non covalente à la chaîne  $\alpha$  des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I. La forme soluble de cette protéine est détectable dans le sérum et cette  $\beta 2$  microglobulinémie est un facteur pronostique indépendant <sup>104</sup>. Lorsqu'elle est élevée, on observe chez les patients à un stade avancé de la maladie, une charge tumorale élevée et une infiltration ganglionnaire et médullaire.

Une élévation de sa concentration est associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie <sup>105</sup> ainsi qu'un temps avant la rechute et une survie globale diminués <sup>65, 106</sup> (Table 4).

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

Taux de $\beta 2$ microglobuline	Médiane de survie (mois)	p
< 3mg/dL	Non atteinte	
$\geq$ 3mg/dL	55	< 0.00001

Table 4: Médiane de survie en fonction du taux de  $\beta 2$  microglobuline <sup>106</sup>.

Néanmoins, il faut prendre certaines précautions avec ce facteur. En effet, la  $\beta 2m$  a une élimination rénale dépendante du DFG (Débit de Filtration Glomérulaire) et peut donc être augmenté artificiellement par une insuffisance rénale. Ainsi, la valeur prédictive de ce facteur pronostique serait améliorée si on ajustait la  $\beta 2m$  au DFG <sup>65</sup>.

#### I.D.6.2 Taux de Thymidine Kinase sérique

La thymidine kinase (TK) est une enzyme cellulaire impliquée dans la réparation de l'ADN lors de sa synthèse. Elle contrôle la phosphorylation de la déoxythymidine en déoxythymidine monophosphate, ensuite incorporée sous forme triphosphate à l'ADN. Sa forme prédominante, TK1, est retrouvée dans les cellules en division, elle est donc corrélée à la prolifération cellulaire <sup>64, 65</sup> ce qui en fait un marqueur de l'activité proliférative. Dans la LLC, l'activité de la TK sérique (sTK) est donc probablement liée à la quantité de cellules leucémiques en division <sup>105</sup>. Un taux sérique de TK élevé est associé à une progression rapide et aux stades avancés de la maladie <sup>107, 108</sup>. Parmi les patients Binet stade A, des taux élevés de sTK sont corrélés à d'autres marqueurs pronostiques tels que le temps de doublement des lymphocytes, l'expression de CD38 et de ZAP-70, le CD23 soluble, les anomalies cytogénétiques et le statut IgHV <sup>109</sup>. De plus, la sTK est considérée comme étant un marqueur pronostique indépendant <sup>104</sup>.

La technique d'analyse de l'activité de la sTK est radio enzymatique ce qui limite son utilisation. De plus, sa spécificité n'est pas parfaite, car son activité peut être augmentée lors de carence en vitamine B12 ou d'infections virales <sup>110</sup>, il n'est donc pas dosé couramment en routine.

### **I.D.6.3 Utilisation routinière des marqueurs sériques**

La facilité d'accès à ces marqueurs, par simple prélèvement sanguin, constitue leur principal avantage. Cependant, en pratique, l'application clinique reste délicate. En effet, les méthodes de mesures ne sont pas standardisées, les résultats sont parfois contradictoires dans les études multi-variées, et il n'existe aucune étude prospective<sup>64, 65</sup>. Enfin, leur principal défaut est leur manque de spécificité.

Ces marqueurs, bien que très intéressants, sont donc peu utilisés en routine hormis la  $\beta$ 2m.

### **I.D.7 Synthèse sur les facteurs pronostiques**

Malgré la multitude de marqueurs pronostiques disponibles, très peu sont utilisés en clinique. En effet, dans la majorité des CHU, seul le caryotype, la recherche de la mutation *TP53* et des NFS régulières sont effectués.

## I.E Traitements conventionnels de la leucémie lymphoïde chronique

### I.E.1 Critères de mise en place du traitement

La stratégie décisionnelle pour la LLC est présentée en Figure 20. Pour les patients sans indication thérapeutique initiale, une surveillance est nécessaire afin de détecter une éventuelle progression de la maladie. Cette surveillance, effectuée par le médecin traitant, passe par l'examen clinique et des NFS régulières tous les 3 à 6 mois. Il est important de noter que plus de la moitié des patients diagnostiqués au stade de Binet A ne seront pas évolutifs et donc non traités ultérieurement.

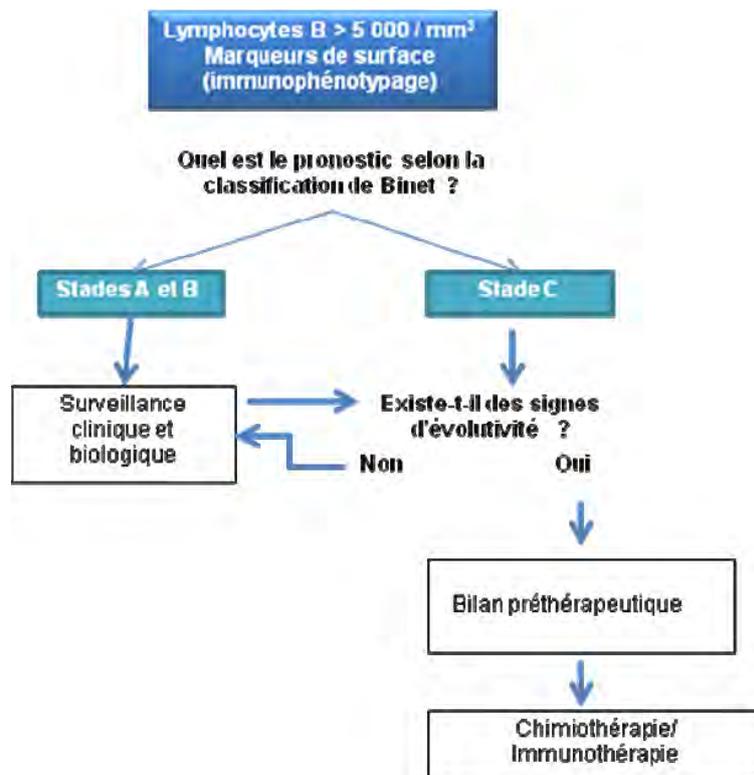


Figure 20: Schéma de la stratégie décisionnelle dans la LLC <sup>2</sup>.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

L'indication thérapeutique se fait en fonction de critères d'évolutivité ou de progression de la maladie définie en 2012 par l'HAS :

Symptômes systémiques (au moins un) :

- Perte de poids non intentionnelle  $\geq 10$  % dans les 6 derniers mois ;
- Fièvre  $> 38^{\circ}\text{C}$  pendant 2 semaines ou plus, sans preuve d'infection ;
- Sueurs nocturnes sans preuve d'infection ;
- Fatigue significative.

Syndrome tumoral volumineux :

- splénomégalie volumineuse ( $> 6$  cm de débord sous costal) ou progressive ;
- Adénopathie volumineuse ( $> 10$  cm), ou rapidement progressive ou symptomatique ;
- Hépatomégalie.

Hyperlymphocytose progressive avec :

- Une augmentation  $> 50$  % sur 2 mois ;
- Temps de doublement des lymphocytes  $< 6$  mois.

Insuffisance médullaire progressive ; apparition ou aggravation :

- Anémie ;
- Thrombocytopénie

Anémie hémolytique auto-immune et/ou thrombocytopénie ne répondant pas aux corticoïdes ou à un autre traitement standard.

En première ligne, la stratégie thérapeutique vise à rechercher la meilleure réponse et la plus durable possible, en tenant compte des comorbidités et non de l'âge. Elle repose sur de la chimiothérapie le plus souvent combinée à la prise anticorps monoclonaux. Le but du traitement est, dans la mesure du possible, d'obtenir une réponse complète (clinique et hématologique). Habituellement, la maladie évolue en phases successives, nécessitant plusieurs lignes de traitement. La stratégie thérapeutique dépend de l'existence de comorbidité(s), de la présence d'une délétion 17p13 et de la nature des traitements antérieurs.

## **I.E.2 Traitement de première ligne des patients avec un bon état général, non réfractaires à la fludarabine et *TP53* non muté : Rituximab + Fludarabine + Cyclophosphamide**

Il s'agit du traitement le plus agressif mais aussi celui présentant le plus fort taux de réponse dans la LLC. Utilisé classiquement chez les patients jeunes (< 70 ans) et sans comorbidité associée, il se compose de 6 cycles de 28 jours décomposés comme décrit ci-dessous :

Cycle 1 : Rituximab 375 mg/m<sup>2</sup> en IV (intraveineuse), à 50 mg/h (augmenté de 50 mg/h toutes les 30 min jusqu'à 400mg/h maximum) à J1 et cyclophosphamide 250 mg/m<sup>2</sup> *per os* à 1-3j et fludarabine 25 mg/m<sup>2</sup> en *per os* à J1-3.

Cycles 2-6 : Rituximab 500 mg/m<sup>2</sup> IV, à 50 mg/h (augmenté de 50mg/h toutes les 30 min jusqu'à 400mg/h max) à J1 et cyclophosphamide 250 mg/m<sup>2</sup> *per os* à 1-3j et fludarabine 25 mg/m<sup>2</sup> en *per os* à J1-3.

La différence de doses du rituximab entre le cycle 1 et les autres cycles s'explique par le fait que le rituximab peut induire un syndrome de relargage cytokinique lors de la première injection. La dose est donc diminuée et injectée à un débit réduit pouvant être augmentée si le patient ne présente pas de signes généraux de ce syndrome de relargage cytokinique. De plus, afin de prévenir ces syndromes toute injection de rituximab nécessite une prémédication par du paracétamol et un antihistaminique. Enfin, un traitement prophylactique, par une hydratation appropriée et une administration d'uricostatiques 48 heures avant l'instauration du traitement, est recommandé afin de réduire le risque de syndrome de lyse tumorale. Chez les patients ayant un nombre de lymphocytes supérieur à 25 x 10<sup>9</sup>/L, une prémédication par 100 mg de prednisone/prednisolone par voie intraveineuse est recommandée peu avant la perfusion de rituximab, afin de réduire le risque de réaction aiguë liée à la perfusion et/ou de syndrome de relargage des cytokines et leur sévérité.

Les doses de fludarabine et de cyclophosphamide seront de plus ajustées à la clairance rénale à chaque cycle. Enfin, s'il y a une chute des paramètres biologiques ou une infection grave les doses de fludarabine et de cyclophosphamide seront diminuées ou les cures seront décalées de 2 à 4 semaines.

L'efficacité de cette association a été démontrée dans l'essai randomisé ouvert allemand CLL8, où un total de 817 patients atteints de LLC non précédemment traités et 552 patients atteints de LLC en rechute ou réfractaires, ont été randomisés afin de recevoir une chimiothérapie soit FC

## INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

(fludarabine cyclophosphamide) soit RFC (rituximab, fludarabine, cyclophosphamide) <sup>111</sup> (Figure 21).

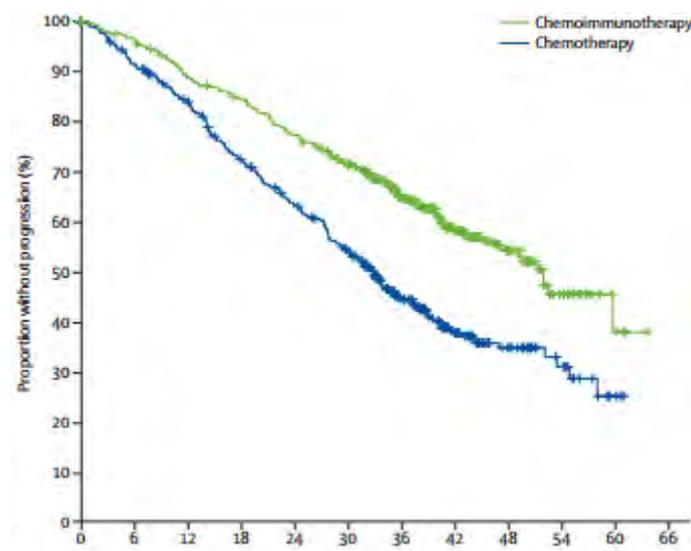


Figure 21: Survie sans progression de patients traités par RFC (courbe verte) ou FC (courbe bleue) (extrait de <sup>112</sup>).

### I.E.2.1 Le rituximab (Mabthera ®)

Le Rituximab est un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20 développé par Roche ® <sup>113</sup>. Il est indiqué en association à une chimiothérapie pour le traitement des patients atteints de LLC, non précédemment traités ou en rechute ou réfractaires.

Le rituximab se lie spécifiquement à l'antigène transmembranaire CD20, une phosphoprotéine non glycosylée exprimée sur les lymphocytes pré-B et B matures et qui est présente sur plus de 95 % des cellules B des lymphomes non hodgkiniens. Le fragment Fab du rituximab se lie au CD20 et le fragment Fc peut générer des fonctions d'effecteurs immunitaires qui entraînent la lyse de ces lymphocytes. Les mécanismes possibles de la lyse cellulaire induite par les effecteurs sont une cytotoxicité dépendante du complément (CDC), faisant intervenir la liaison du fragment C1q <sup>151</sup>. La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) est aussi impliquée, elle passe par un ou plusieurs des récepteurs aux fragments constant des Ig présent notamment sur la surface des granulocytes, des macrophages et des cellules NK (Natural Killer) <sup>114, 115</sup>. Il a aussi été démontré que le rituximab induit une mort cellulaire directe des cellules leucémiques par apoptose <sup>116</sup>. L'ensemble des actions du rituximab est résumé dans la Figure 22.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

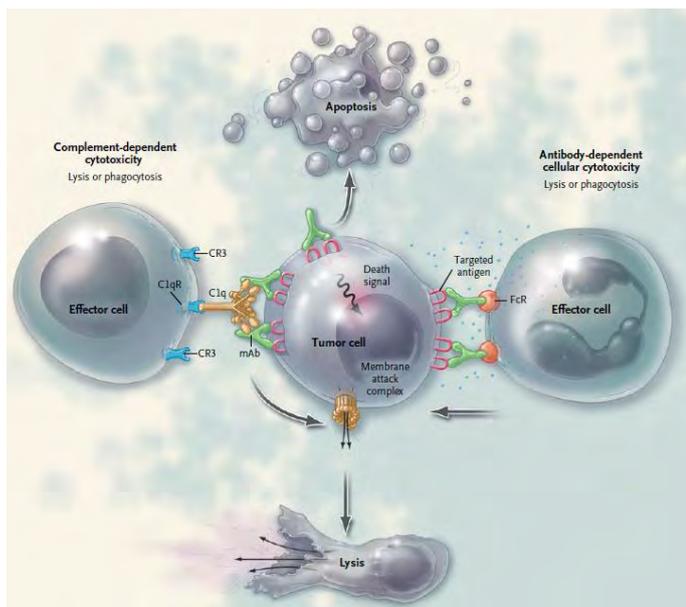


Figure 22: Représentation schématique des différents mécanismes d'action du rituximab (extrait de <sup>117</sup>).

Le rituximab est contre-indiqué dans les cas d'hypersensibilité connue ou d'hypersensibilité aux protéines d'origine murine du fait de son origine chimérique et lors d'infections sévères, et/ou évolutives. Son utilisation est également interdite chez les patients ayant un déficit immunitaire sévère, une insuffisance cardiaque sévère ou une maladie cardiaque sévère non contrôlée.

#### I.E.2.2 La fludarabine (Fludara ®)

Indiquée dans le traitement de la LLC à cellules B chez les patients ayant des réserves médullaires suffisantes, la fludarabine est un antinéoplasique de la famille des purines commercialisé par Sanofi ® <sup>118</sup>. C'est un nucléotide hydrosoluble fluoré et phosphaté analogue de l'agent antiviral vidarabine, 9- $\beta$ -arabinofuranosyladénine (ara-A) qui est relativement résistant à la désamination. Le phosphate de fludarabine est rapidement déphosphorylé en 2F-ara-A qui est incorporé dans la cellule puis subit une phosphorylation intracellulaire par la déoxycytidine kinase en triphosphate actif, le 2F-Ara-ATP. Il a été montré que ce métabolite inhibent la ribonucléotide réductase, l'ADN polymérase alpha/delta et epsilon, l'ADN primase et l'ADN ligase, inhibant ainsi la synthèse de l'ADN. De plus, en raison d'une inhibition partielle de l'ARN polymérase II, il se produit une importante inhibition de la synthèse des protéines. Bien que certains aspects du mécanisme d'action de la 2F-ara-ATP soient encore obscurs, il est établi que ses effets sur l'ADN, l'ARN et la synthèse des protéines contribuent à l'inhibition de

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

la prolifération des cellules leucémiques, l'inhibition de la synthèse de l'ADN étant le facteur principal<sup>119, 120</sup>.

Son élimination étant rénale, un ajustement posologique est nécessaire chez les patients insuffisants rénaux. Si la clairance de la créatinine sérique est comprise entre 30 et 70 mL/min, la dose de fludarabine doit être réduite jusqu'à 50 % et une surveillance hématologique étroite doit être instaurée pour évaluer la toxicité.

La fludarabine est contre-indiquée en cas d'hypersensibilité, d'insuffisance rénale sévère, d'anémie hémolytique décompensée et d'allaitement bien que ce dernier cas soit assez rare dans le traitement de la LLC.

### **I.E.2.3 Le cyclophosphamide (Endoxan®)**

Agent alkylant bifonctionnel de type oxazaphosphorine appartenant à la famille des moutardes azotées, le cyclophosphamide agit par interaction directe sur l'ADN en formant des liaisons covalentes avec les substrats nucléophiles par l'intermédiaire de ses radicaux alcoyles. Ceci entraîne des modifications profondes chimiques ou enzymatiques de l'ADN ainsi que la formation de "ponts" alcoyles intrabrin ou interbrins, avec pour conséquence une inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN aboutissant à la destruction cellulaire. Cette action est cycle dépendante, elle n'affecte pas les cellules en G0.

La tolérance du cyclophosphamide est bonne aux doses utilisées dans la LLC. Une neutropénie et rarement une thrombopénie modérée voire une anémie peuvent être observées, elles sont toujours spontanément réversibles après diminution de la posologie ou à l'arrêt du traitement. Certains patients peuvent présenter des nausées associées ou non à des vomissements qui sont facilement prévenus ou supprimés par les antiémétiques de la famille des sétrons. L'alopécie est inconstante, transitoire et réversible. Une aménorrhée ou une azoospermie sont possibles, voire définitives.

Le cyclophosphamide est contre indiqué en cas d'hypersensibilité, d'association au vaccin contre la fièvre jaune, d'insuffisance médullaire sévère, d'infection urinaire aiguë ou de cystite hémorragique préexistante, et chez les femmes en âge de procréer, enceintes ou allaitantes.

### I.E.3 Le traitement de première ligne chez les patients âgés ou avec un mauvais état général sans mutation *TP53* : Rituximab + Bendamustine

Au vu de la toxicité du RFC et des comorbidités couramment observées chez les patients âgés, l'utilisation du rituximab en association avec la bendamustine (RB) est souvent préférée chez ces patients. De plus, avant l'avènement des nouvelles molécules, elle constituait aussi une approche thérapeutique intéressante pour les patients réfractaires à la fludarabine.

En effet, bien que dans la population globale le RFC ait montré sa supériorité vis-à-vis du BR, l'étude allemande CLL10 présentée en 2014 au congrès annuel de l'ASH (American Society of Hematology) a montré que chez les patients âgés de plus de 65 ans ou ayant des comorbidités (Score CIRS>4) il n'y avait pas de différence entre RFC et BR au niveau de la survie globale sans progression mais que les patients traités par BR présentaient moins d'infections sévères (48,4 % pour RFC vs 26,8 % pour BR).

Ce schéma thérapeutique se compose de 6 cycles décrits ci-dessous :

Cycle 1: Rituximab 375 mg/m<sup>2</sup> IV à J1 et bendamustine 70 mg/m<sup>2</sup> IV à 1-2j.

Cycles 2-6: Rituximab 500 mg/m<sup>2</sup> IV à J1 et bendamustine 70 mg/m<sup>2</sup> IV à 1-2j.

Les précautions valables pour l'injection du rituximab lors du RFC sont également valables dans ce cas.

La bendamustine est un agent alkylant antitumoral possédant une activité originale. Son activité est essentiellement basée sur l'établissement de liaisons covalentes croisées par alkylation de l'ADN simple brin ou double brin. En conséquence, les fonctions de matrice de l'ADN, sa synthèse et sa réparation sont déficientes. Il agit toutefois *in vitro* de manière différente des autres alkylants et il existe très peu de résistance *in vitro*, au moins en partie en raison de la persistance, comparativement plus longue, de l'interaction avec l'ADN.

La bendamustine est contre indiquée en cas d'hypersensibilité, de vaccination contre la fièvre jaune, d'insuffisance hépatique sévère (bilirubine sérique > 3,0 mg/dL) ou d'ictère, de myélosuppression sévère, d'infections et d'intervention chirurgicale datant de moins de 30 jours.

## **I.E.4 Le traitement des patients avec une mutation de *TP53*, en rechute ou réfractaire : les petites molécules**

Le traitement des patients, réfractaires, en rechute ou mutés pour *TP53* constituait il y a encore quelques années un « challenge » pour le clinicien. Les patients en rechute ou réfractaires, traités en première ligne par du RFC recevaient à la rechute du BR, tandis que les patients mutés *TP53* étaient traités en première ligne par de l'alentuzumab (Campath®) qui a perdu son AMM en 2012. Une alternative à ces traitements était la greffe pour les patients jeunes ou l'inclusion dans des essais cliniques. Avec l'arrivée sur le marché de l'ibrutinib (Imbruvica®) et de l'association de l'idelalisib (Zydelig®) et du rituximab, cette prise en charge a été révolutionnée.

### **I.E.4.1 L'ibrutinib (Imbruvica®)**

L'ibrutinib est un inhibiteur suicide de la protéine Bruton Tyrosine Kinase (BTK). Pris par voie orale, il a obtenu son AMM en 2014 dans le traitement de la LLC en rechute/réfractaire (ou en première ligne avec délétion 17p/mutation *TP53*). Il est utilisé à 420 mg en une prise par jour, de façon chronique jusqu'à ce que la maladie progresse ou que les effets secondaires nécessitent l'arrêt. Il est très efficace quel que soit le caryotype, le statut IgHV, le statut de Rai et le nombre de traitements précédemment reçus (Figure 23).

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

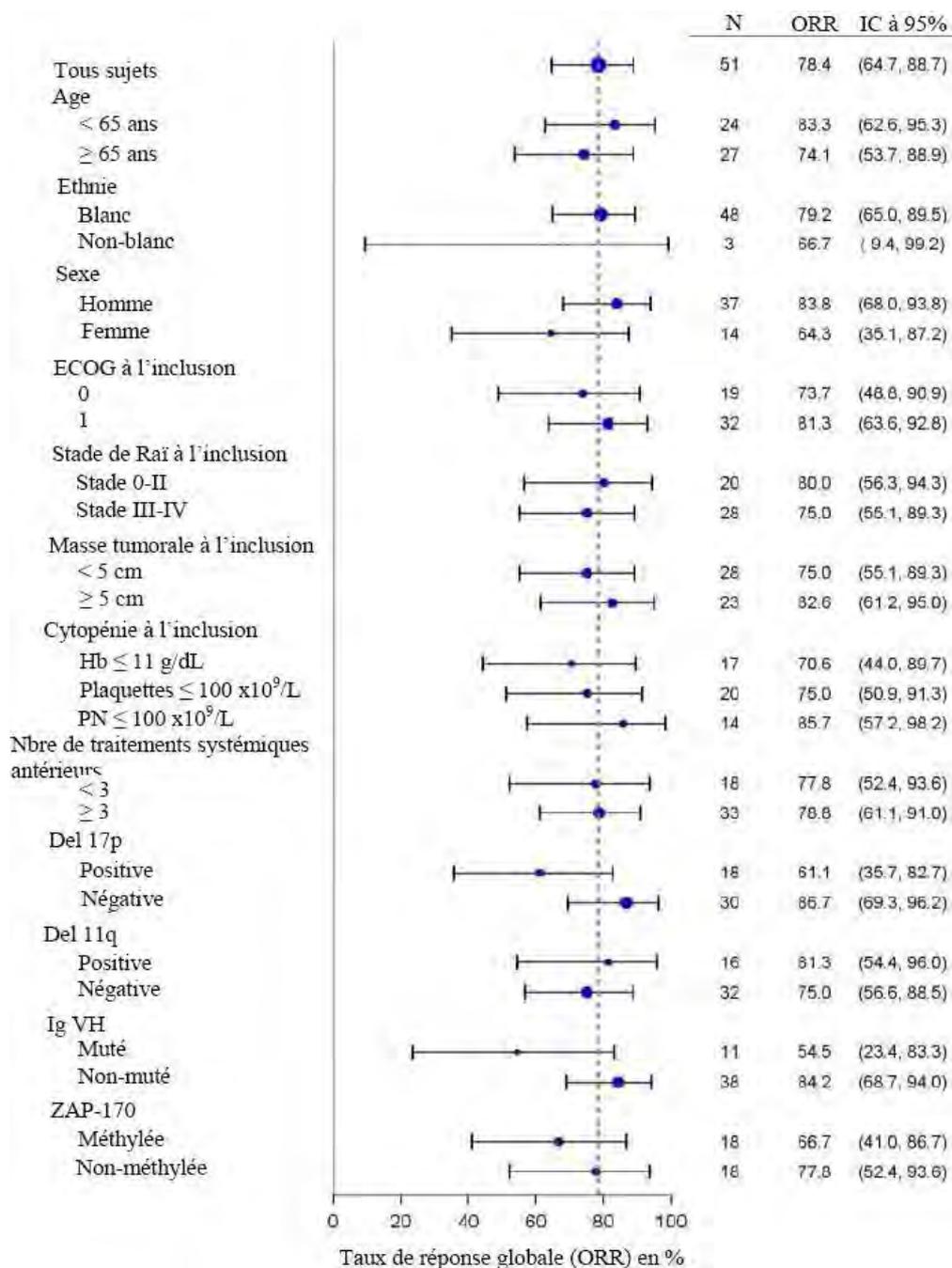


Figure 23: Analyses en sous-groupes du taux de réponse globale de patients traités par ibrutinib (Étude PCYC-1104-CA) (source: Vidal®).

BTK est une protéine kinase sans récepteur de la famille des Tec kinases, impliquée dans la signalisation du BCR mais aussi des TLR 4/9 (Toll-Like Receptors) et de CXCR4. La signalisation en aval du BCR promeut notamment la survie des cellules leucémiques *via* une activation séquentielle de protéines kinases présentées dans la Figure 24.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

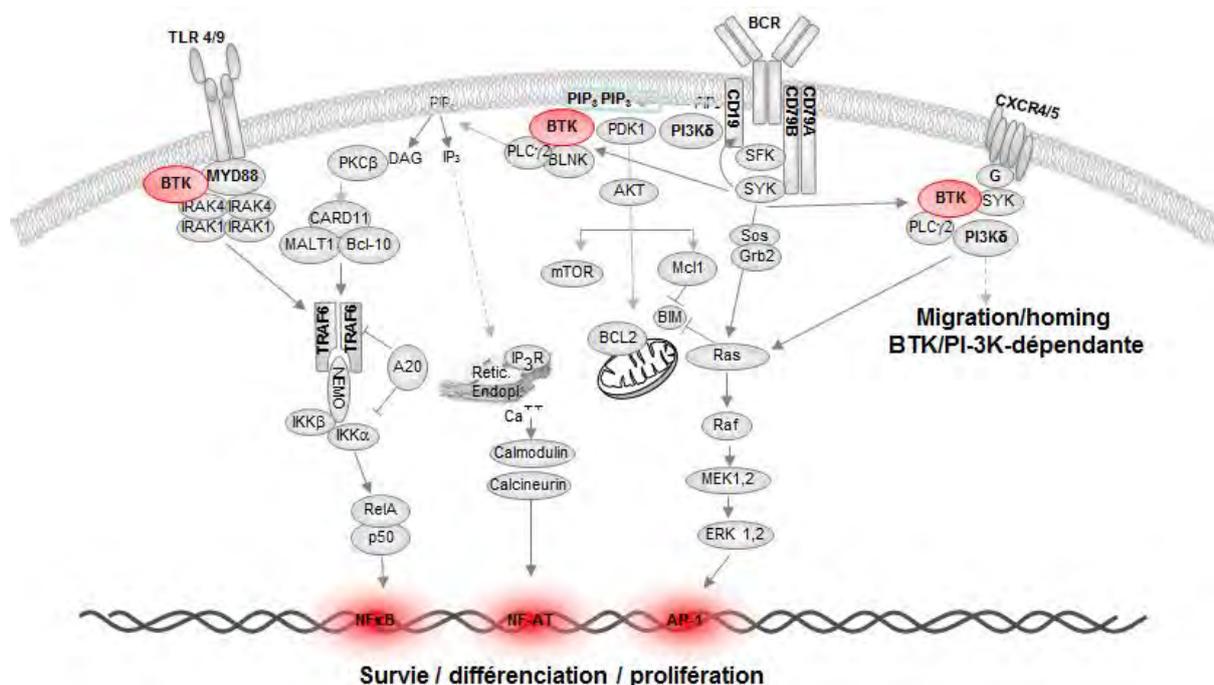


Figure 24: Implication de BTK dans les signalisations du clone leucémique (Ysebaert, non publié).

L'ibrutinib se lie de manière irréversible à BTK *via* une liaison covalente avec la cystéine 481 située dans le site actif de BTK avec une très forte affinité (IC50 0.5 nM)<sup>121</sup>. A 420 mg/ jour, il lie virtuellement l'ensemble des protéines BTK dans le sang périphérique<sup>122</sup>. Cette inhibition est vendue comme étant très sélective<sup>123-125</sup> et donc minimisant les effets secondaires. Les études précliniques ont montré qu'il inhibe la survie et la prolifération des cellules leucémiques<sup>126</sup>, la migration des cellules leucémiques *via* CXCL12 (Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12) et CXCL13 (Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 13) et l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines<sup>127, 128</sup>. *In vivo*, il provoque une rapide redistribution des cellules leucémiques situées notamment dans les ganglions lymphatiques vers le sang périphérique ce qui provoque une diminution rapide des adénopathies et une augmentation de la lymphocytose qui se stabilise en quelques mois<sup>125-131</sup>. Malgré cela, la majorité des patients traités par ibrutinib ne sont pas en rémission complète et la lymphocytose stabilisée reste significativement plus élevée que la normale<sup>129</sup>. De plus, le traitement favorise l'émergence de clones leucémiques mutants. En effet, chez des patients traités par ibrutinib, des cellules leucémiques présentant une substitution de la cystéine 481 du BTK par une sérine ont été décrites. Chez ces mutants, cette substitution rend l'ibrutinib incapable de se fixer sur la BTK et entraîne donc une résistance<sup>132</sup> (Figure 25).

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

De même, chez deux patients, il a été mis en évidence des mutations gain de fonction de PLC $\gamma$  2, un acteur situé en aval de BTK qui provoque une inefficacité de l'ibrutinib.



Figure 25: Modélisation structurale de l'interaction de la BTK muté ou non avec l'ibrutinib (extrait de <sup>132</sup>).

Enfin, il a été montré récemment que les patients ayant un caryotype complexe présentait une survie globale diminuée lorsqu'ils étaient traités par ibrutinib, bien qu'aucune preuve claire ne soit apportée pour l'expliquer <sup>88</sup>.

Les évènements indésirables non hématologiques les plus fréquents lors du traitement sont la diarrhée, les infections des voies respiratoires supérieures, la fatigue, la fièvre, l'œdème périphérique, l'arthralgie et la constipation. Les évènements indésirables hématologiques les plus fréquemment rapportés ont été la neutropénie, la thrombopénie et l'anémie. Les évènements indésirables de grade 3/4 les plus fréquents sont : neutropénie, pneumonie, thrombopénie, hypertension, neutropénie fébrile, déshydratation, fibrillation auriculaire, fatigue, asthénie, cellulite et sinusite. De plus, malgré son apparente spécificité l'ibrutinib induit des effets secondaires tels qu'un défaut fonctionnel des plaquettes sanguines, lié à la présence dans ces cellules de protéines de la famille Tek sur lesquelles se lie l'ibrutinib. Il se traduit cliniquement par des saignements spontanés d'intensité généralement modérée, de siège cutanéomuqueux, chez 30 à 40 % des patients en début de traitement.

A ce jour la seule contre-indication à l'ibrutinib est l'hypersensibilité au principe actif ou à un de ses excipients.

### I.E.4.2 Idélalisib (Zydelig®)

L'idélalisib est indiqué en association avec le rituximab, pour le traitement de patients atteints de LLC en rechute ou en progression après deux lignes de traitement et en première ligne de traitement chez les patients présentant une délétion 17p ou une mutation *TP53* et pour lesquels une chimio-immunothérapie n'est pas appropriée.

Cette association, très efficace, améliore la survie sans progression, la réponse globale et la survie globale comme montré dans la Table 5.

		Rituximab + idélalisib	Rituximab + placebo
<b>Survie sans progression</b>	Médiane (mois) (IC à 95 %)	NA (12,1 ; NA)	5,5 (3,7 ; 6,9)
	Hazard ratio (IC à 95 %)	0,15 (0,08 ; 0,28)	
	Valeur p	3 x 10 <sup>-11</sup>	
<b>Réponse globale au traitement</b>		80,7 %	12,5 %
	(IC à 95 %)	(70,9 ; 88,3)	(6,4 ; 21,3)
	Odds ratio (IC à 95 %)	29,92 (12,76 ; 70,11)	
	Valeur p	3,0 x 10 <sup>-19</sup>	
<b>Réponse ganglionnaire</b>		79/85 (92,9 %)	3/84 (3,6 %)
	Odds ratio (IC à 95 %)	264,46 (53,28 ; 1 312,71)	
	Valeur p	1,3 x 10 <sup>-30</sup>	
<b>Survie globale</b>	Médiane (mois)	NA	NA
	Hazard ratio (IC à 95 %)	0,28 (0,09 ; 0,86)	
	Valeur p	0,018	

Table 5: Résultats d'efficacité de l'étude 312-0116 comparant l'association rituximab et idélalisib à l'association rituximab et placebo (source: Vidal®).

L'idélalisib est un inhibiteur sélectif de l'isoforme p110 $\delta$  de la PI3K $\delta$  (Phosphoinositide 3-kinase) (IC<sub>50</sub> à 19nM) et interagit peu avec les isoformes PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$  et PI3K $\gamma$ .

Les PI3K forment une famille composée de trois classes (classe I, II et III) définies par leurs structures et leurs fonctions. Ces enzymes jouent un rôle majeur dans de nombreuses cascades de signalisation et sont hyperactivées dans de nombreux cancers<sup>133, 134</sup>. Elles régulent des processus de prolifération, différenciation, mobilité et de métabolisme<sup>161</sup>.

## INTRODUCTION

### La leucémie lymphoïde chronique

La classe IA active des protéines couplées à des récepteurs G (GPCR) par une interaction avec les protéines Ras activées et Rho. En effet, l'activité catalytique de la PIK3 médie la transformation du PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) qui est un second messenger ancré à la membrane plasmique qui active de nombreuses voies cellulaires. Elles sont formées d'un hétérodimère contenant une sous-unité régulatrice p85 et une sous-unité catalytique p110 (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  et p110 $\gamma$ ). L'association de la sous-unité régulatrice et de la sous-unité catalytique forme respectivement les 4 isoformes appelée PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$  et PI3K $\gamma$ . Dans les cellules B malignes ou non, PI3K $\delta$  régule de nombreuses voies de signalisation en aval du BCR, du récepteur aux chaînes lourdes des Ig (Fc $\gamma$ R), aux TLR, au CXCR4/5 et aux récepteurs de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) <sup>135, 136</sup>.

Dans la LLC, il a été démontré que la PI3K $\delta$  joue un rôle essentiel dans la transmission des signaux de survie, de prolifération et de « homing » par le microenvironnement <sup>137, 138</sup>. En effet, l'idélalisib est capable d'inhiber les signaux de survie *ex vivo* fournis par les NLC <sup>162</sup>, les cellules stromales et les cellules endothéliales.

Cliniquement, l'idélalisib, comme l'ibrutinib, provoque une sortie des cellules leucémiques des compartiments résidents vers le sang <sup>139, 140</sup>, provoquant une augmentation rapide et transitoire de la lymphocytose et une diminution des adénopathies.

Actuellement, la seule contre-indication à l'idélalisib est l'hypersensibilité à l'un des excipients ou au principe actif et les effets secondaires majoritaires sont des diarrées de grade III pouvant nécessiter des adaptations posologiques voir des arrêts du traitement.

## II. Le microenvironnement tumoral

Au siècle dernier, le cancer était considéré comme une maladie résultant d'une acquisition séquentielle de mutations conduisant une cellule saine à acquérir au fur et à mesure de ses divisions des altérations géniques aboutissant au final à l'apparition de cellules cancéreuses. Dans cette théorie, résumée par Hanahan et Weinberg en 2000 (Figure 26), la cellule cancéreuse est donc caractérisée par six grandes capacités : l'évasion à l'apoptose, un potentiel répliqueur illimité, une autosuffisance vis-à-vis des facteurs de croissance, une résistance aux signaux inhibiteurs de croissance, une promotion de l'angiogénèse pour son profit personnel et des capacités d'invasion et de métastase <sup>141</sup>.

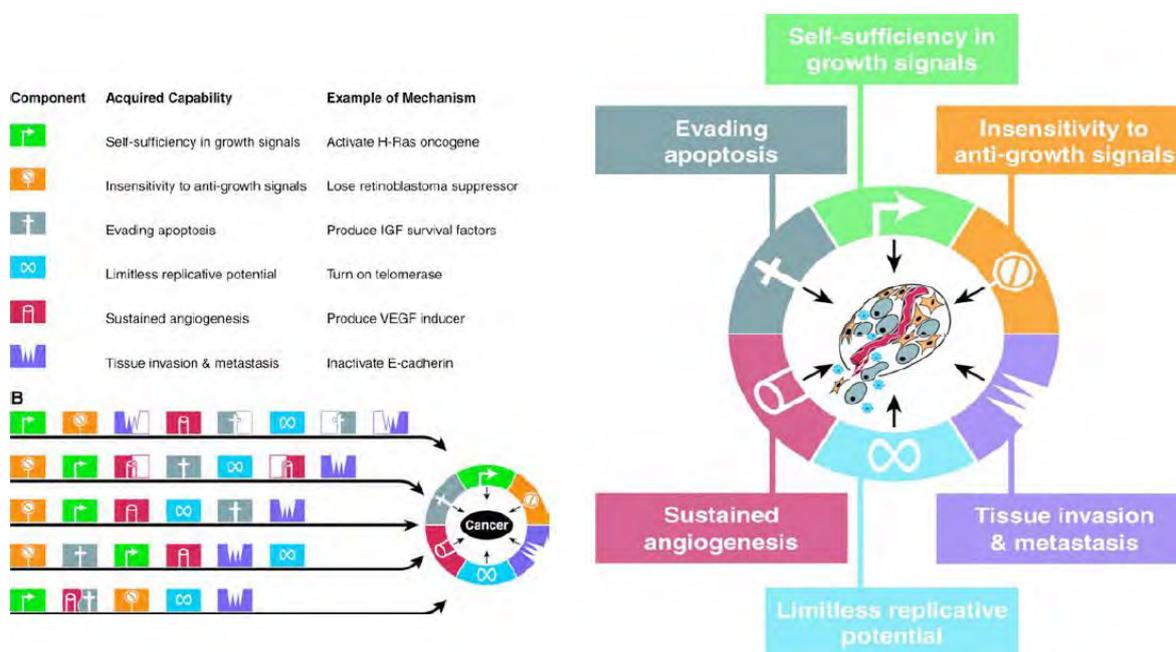


Figure 26: Acquisition et propriétés transformantes des cellules cancéreuses (extrait de <sup>141</sup>).

Cette théorie ne laissait aucune place à tous les facteurs extérieurs à la tumeur. Au cours des quinze dernières années, au vu des nombreuses preuves accumulées sur le fait que le cancer résultait non seulement d'altérations géniques de la cellule cancéreuse mais aussi de l'influence de tout le microenvironnement les entourant, ces auteurs ont revu leur théorie. Dans une revue datant de 2011, aux six marqueurs précédents s'ajoutent d'autres marqueurs dont notamment l'influence du microenvironnement tumoral <sup>142</sup>. Ce microenvironnement, dit tumoral, est constitué notamment de toutes les cellules immunitaires entourant et infiltrant la tumeur, de fibroblastes de matrice extracellulaire assurant son soutien, et de vaisseaux sanguins apportant nutriments et oxygène. Tous ces facteurs forment un ensemble complexe où se mélangent les

## INTRODUCTION

### Le microenvironnement tumoral

effecteurs favorisant la survie et la prolifération tumorale, et des effecteurs tentant de la contenir et de la détruire.

## II.A L'immunosurveillance anti tumorale

### II.A.1 Concept théorique

Le système immunitaire est très efficace pour détecter et éliminer les cellules précurseurs de tumeur. En effet, au vu du nombre de divisions cellulaires ayant lieu chaque jour ( $1 \times 10^9$  chez l'adulte) et d'erreur(s) potentielle(s) produite(s) lors de la réplication de l'ADN (l'ADN polymérase commet une faute toute les  $1 \times 10^9$  nucléotides), si le système immunitaire n'était pas capable de détruire les cellules du « soi modifié », l'incidence des cancers serait bien supérieure à ce que l'on observe.

Cette affirmation est notamment soutenue par des expériences effectuées chez des souris mutantes présentant un déficit immunitaire. En effet, il est possible de générer des souris n'ayant ni lymphocytes B, T ni de cellules NK en inactivant le gène *RAG2* (Recombination activating gene 2) qui code pour une enzyme nécessaire aux recombinaisons somatiques ayant lieu dans ces populations. Chez ces souris, on observe une augmentation de l'incidence des tumeurs spontanées et chimiquement induites comparativement aux souris non mutées<sup>143</sup> donc immunocompétentes ce qui sous-tend le rôle anti-tumoral du système immunitaire (Figure 27).

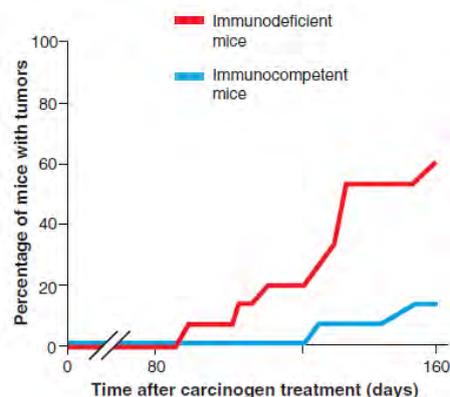


Figure 27: Courbes d'incidence des tumeurs chimiquement induites chez des souris immunodéficientes ou immunocompétentes (extrait de<sup>144</sup>).

## INTRODUCTION

### Le microenvironnement tumoral

De plus, chez des patients immunodéprimés il a été relevé une forte augmentation des cancers. Par exemple, chez les greffés, où il est nécessaire d'induire une immunodépression pour éviter tous les phénomènes de rejet des greffons, plusieurs études ont montré une augmentation de l'incidence de lymphomes non Hodgkiniens, de cancers viro-induits tels que des lymphomes de Burkitt, de mélanomes, de cancer du côlon ou du poumon <sup>145-148</sup>. De même, les patients au stade SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquis) suite à une infection au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ont une incidence plus élevée de tumeurs viro-induites telles que les sarcomes de Kaposi, des lymphomes de Burkitt ou des tumeurs non viro-induites telles que des cancers prostatiques, ovariens ou du côlon <sup>149, 150</sup>.

L'ensemble de ces données indiquent clairement que la surveillance immunitaire anti-tumorale a un rôle important dans le contrôle du soi et fait appel aussi bien aux cellules de l'immunité innée que de l'immunité acquise.

### **II.A.2 Les forces en présence dans la réaction immunitaire anti-tumorale**

La destruction de la cellule tumorale par les cellules de l'immunité nécessite en premier lieu une reconnaissance des cellules tumorales du « soi modifié » par les cellules de l'immunité. Comme dans toute réponse immunitaire, il est possible de distinguer les effecteurs selon qu'ils appartiennent à l'immunité innée ou acquise (Figure 28).

## INTRODUCTION

### Le microenvironnement tumoral

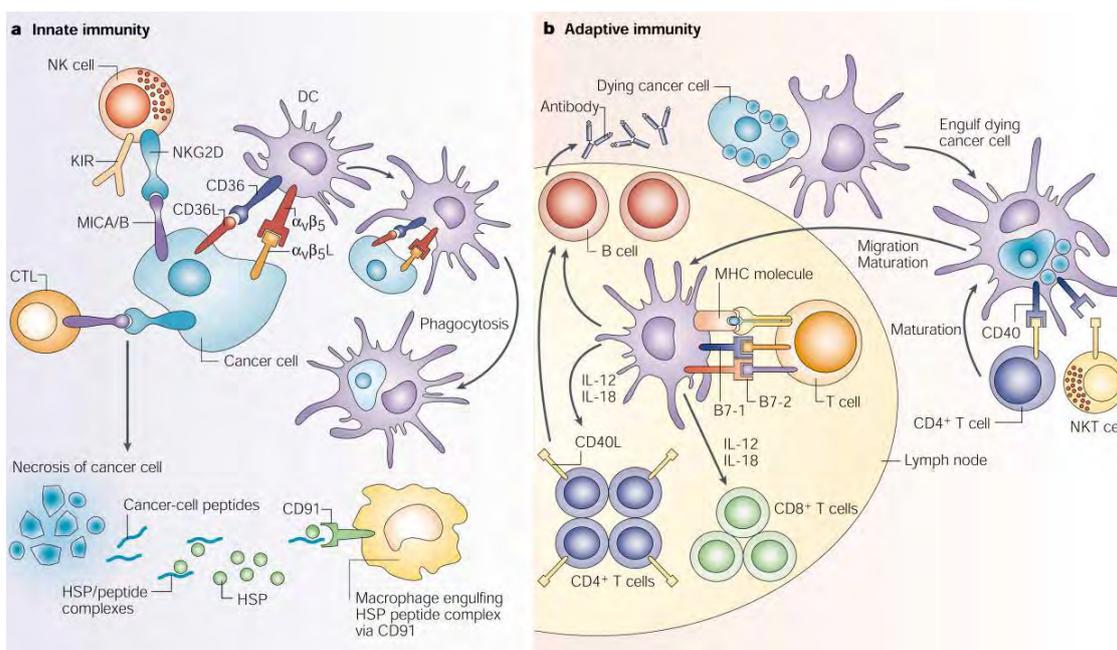


Figure 28: Représentation schématique des effecteurs de l'immunité innée (gauche) et acquise (droite) dans la réponse anti-tumorale (CTL : lymphocytes T cytotoxiques) (extrait de<sup>151</sup>).

#### II.A.2.1 Les acteurs de l'immunité innée

Les effecteurs de l'immunité innée sont les cellules NK, les polynucléaires, les cellules dendritiques (DC) et les macrophages.

Les cellules NK sont des acteurs clés dans l'immunité anticancéreuse. Elles reconnaissent les cellules tumorales car ces dernières expriment des molécules de stress comme MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) et MICB (MHC class I polypeptide-related sequence B), et présentent une faible expression des molécules de CMH de classe I<sup>152</sup>. Les cellules NK secrètent alors des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ), le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et des granules lytiques contenant de la perforine et des granzymes A et B qui induisent de manière directe ou indirecte la mort des cellules cancéreuses. De plus, elles se fixent sur les cellules cancéreuses *via* TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) ou de FasL (Fas ligand) et induisant ainsi une lyse des cellules cancéreuses<sup>153, 154</sup>. Enfin, *via* la production d'IL-4 (interleukine 4) et d'IFN $\gamma$ , elles aident à l'activation d'autres partenaires du système immunitaire.

Dans le même temps, les granulocytes vont aussi intervenir dans la réponse anti-tumorale<sup>155, 156</sup>. Les neutrophiles expriment TRAIL et FasL et produisent des espèces réactives de l'oxygène

(ROS) qui vont induire la mort directe des cellules tumorales. Au contact des cellules tumorales, ils sécrètent de nombreuses cytokines et chimiokines comme le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , l'IL-8, CXCL1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1) et CCL3, qui sont impliquées dans l'apoptose, le recrutement et l'activation des autres cellules du système immunitaire<sup>195,157</sup>. Les éosinophiles sécrètent une très grande quantité de granules lytiques contenant de la MBP (Major Basic Protein) ou l'EPO (eosinophil peroxidase) cytotoxiques pour les cellules cancéreuses, ainsi que des ROS (Reactive Oxygen Species). Ils expriment des molécules du CMH II et les molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 et peuvent donc servir de CPA (Cellules Présentatrices de l'Ag) pour les lymphocytes T. Enfin, ils produisent aussi des cytokines et des chimiokines caractéristiques des réponses immunitaires Th1 comme l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$ <sup>196</sup>.

Les DC et les macrophages reconnaissent les cellules tumorales par leur PRR (Pattern Recognition Receptors) qui se lient à des molécules transformées à la surface des cellules cancéreuses et les phagocytent<sup>151</sup>. C'est donc tout naturellement qu'elles avaient été décrites comme étant anti-tumorales<sup>158 159</sup> bien qu'aujourd'hui il paraît évident que ces cellules sont détournées par la cellule tumorale à son profit et jouent un rôle pro-tumoral (voir III. Les macrophages associés aux tumeurs). De plus, ces cellules sont capables d'endocyter des peptides tumoraux tels que les alarmines par l'intermédiaire de récepteurs scavengers comme le CD91<sup>151</sup>. Elles sont aussi capables de présenter des peptides modifiés issus des cellules cancéreuses aux lymphocytes T CD8 afin de les activer.

### II.A.2.2 Les acteurs de l'immunité adaptative

Les effecteurs de l'immunité acquise lors de la réponse au « soi-modifié » sont les lymphocytes B et les lymphocytes T CD8. Cette réponse est plus tardive que celle de l'immunité innée mais est plus spécifique et plus puissante.

Les lymphocytes B sont activés lorsqu'ils rencontrent l'Ag spécifique de leur Ig de surface. Suite à cette activation, le complexe BCR/Ag est internalisé, l'Ag sera ensuite associé aux molécules de CMH de classe II puis présenté aux lymphocytes T. Parallèlement, ils sont capables de se différencier en plasmocytes pour produire des Ac anti-tumoraux<sup>160</sup>.

Les lymphocytes T CD8 nécessitent pour être activés, d'être stimulés par des CPA telles que les macrophages, les DC et les lymphocytes B qui leurs présentent les Ag associés au CMH de

## INTRODUCTION

### Le microenvironnement tumoral

classe I ou II <sup>159, 161</sup>. Une fois activés les T CD8 expriment TRAIL, produisent de l'IFN $\gamma$  et des granules lytiques contenant de la perforine et du granzyme B et ont donc un effet cytolytique direct sur les cellules tumorales <sup>159</sup>.

La réponse immunitaire anti-tumorale est donc un mécanisme complexe impliquant les cellules de l'immunité innée et acquise et peut être résumée par la Figure 29.

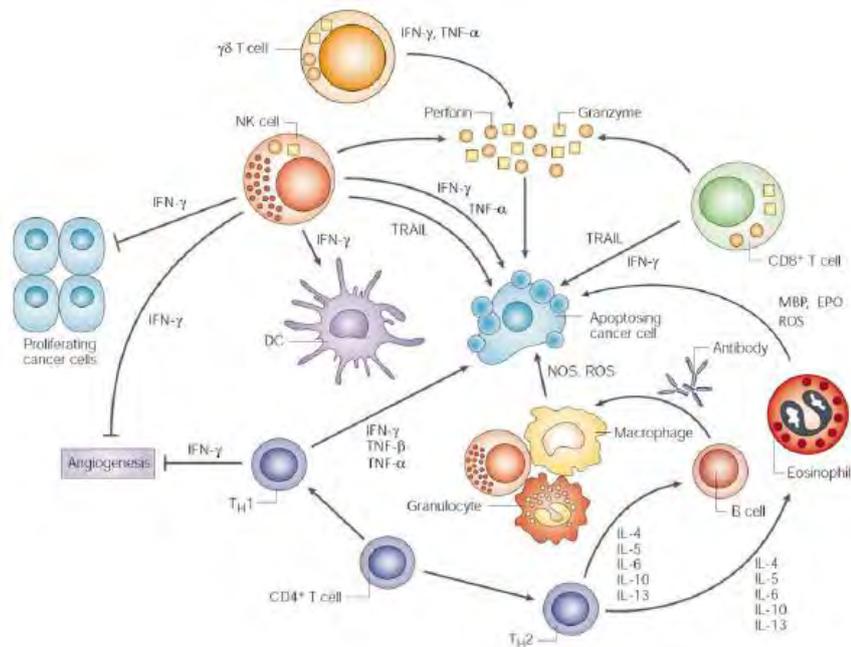


Figure 29: Représentation schématique de la réponse immunitaire anti-tumorale (extrait de <sup>151</sup>).

## II.B Immunoédition et les acteurs du microenvironnement tumoral

Malgré les efforts déployés par le système immunitaire pour contrer le développement tumoral, l'incidence des cancers n'est pas nulle. Ce simple fait sous-entend que les cellules tumorales, soumises à la pression de sélection du système immunitaire, développent des capacités d'échappement qui leurs permettent de survivre et de proliférer.

### II.B.1 Concept théorique

Le concept d'immunoédition a été formulé au cours de la dernière décennie par Scriber et *al.* Il explique comment le système immunitaire façonne la tumeur en étant tour à tour pro et anti-tumoral<sup>144, 162, 163</sup>. Selon cette théorie, la tumeur résulte d'une interaction complexe entre cellules immunitaires et cellules tumorales. En effet, les altérations des cellules tumorales proviennent non seulement d'elles même mais aussi des stimuli du microenvironnement.

Cette théorie a été confirmée par des expériences menées chez la souris et résumée dans la Figure 30. L'expérience, simple et brillante à la fois, consistait à induire chez des souris immunocompétentes ou immunoincompétentes des tumeurs *via* un traitement par des carcinogènes. Quand ces tumeurs furent cliniquement détectables, les souris furent sacrifiées et les tumeurs prélevées pour être ré-injectées dans des souris immunocompétentes. Le résultat fut saisissant : les tumeurs provenant de souris immunocompétentes induisaient des tumeurs chez 100 % des souris « réceptrices » tandis que les tumeurs provenant de souris immunoincompétentes ne se développaient que dans 50 % des cas. Grâce à ces expériences, ces auteurs ont pu montrer que chez les souris immunocompétentes le système immunitaire en induisant une pression de sélection avait façonné la tumeur qui était devenue « résistante » au système immunitaire tandis que chez les souris immunoincompétentes cette pression n'existant pas, les cellules tumorales n'eurent pas besoin de muter pour y échapper. Ainsi, lorsque ces deux types de tumeurs furent mises en contact avec un système immunitaire « compétent », les premières, dites immunoéditées et progressives, étant déjà habituées échappèrent facilement. Les secondes subirent de plein fouet la réponse anti-tumorale, certaines y échappèrent et furent alors appelées non immunoéditées et progressives, d'autres non et furent alors appelées non

## INTRODUCTION

### Le microenvironnement tumoral

immunoéditées et non progressives. Cette théorie explique qu'il y ait d'un côté 100 % de prise de greffe tandis que de l'autre on observe seulement 50 %<sup>143, 144</sup>.

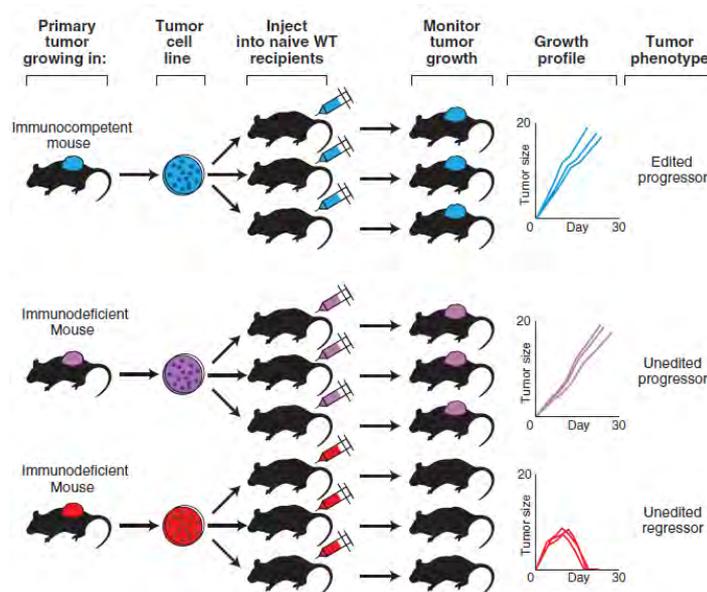


Figure 30: Les tumeurs provenant de souris immunocompétentes sont qualitativement différentes des tumeurs provenant de souris immunodéprimées (extrait de<sup>144</sup>).

## II.B.2 Les grandes phases de l'immunoédition des tumeurs

L'immunoédition peut être séparée en trois phases selon la nature des éléments qui s'y déroulent, le moment où ils surviennent et les Ag présents à la surface des cellules tumorales<sup>144, 164</sup>. Ces phases sont résumées dans la Figure 31. La première se produit lorsque le système immunitaire rencontre des cellules transformées potentiellement tumorales et conduit soit à l'élimination de ces cellules soit à une phase d'équilibre. Durant cette phase d'équilibre, la tumeur est soumise à la pression de sélection du système immunitaire, elle commence à acquérir des mécanismes d'échappement et devient de plus en plus hétérogène ou au contraire se fait éliminer par le système immunitaire. A ce stade, la tumeur est encore infraclinique mais pas à pas la tumeur prend le dessus sur le système immunitaire pour finalement aboutir à l'immunoéchappement. Durant cette dernière phase, on observe une forte croissance tumorale jusqu'à ce qu'elle devienne cliniquement détectable. De plus, la tumeur devient de plus en plus hétérogène et corrompt activement les cellules du système immunitaire censées les combattre en les retournant pour son propre compte.

## INTRODUCTION

### Le microenvironnement tumoral

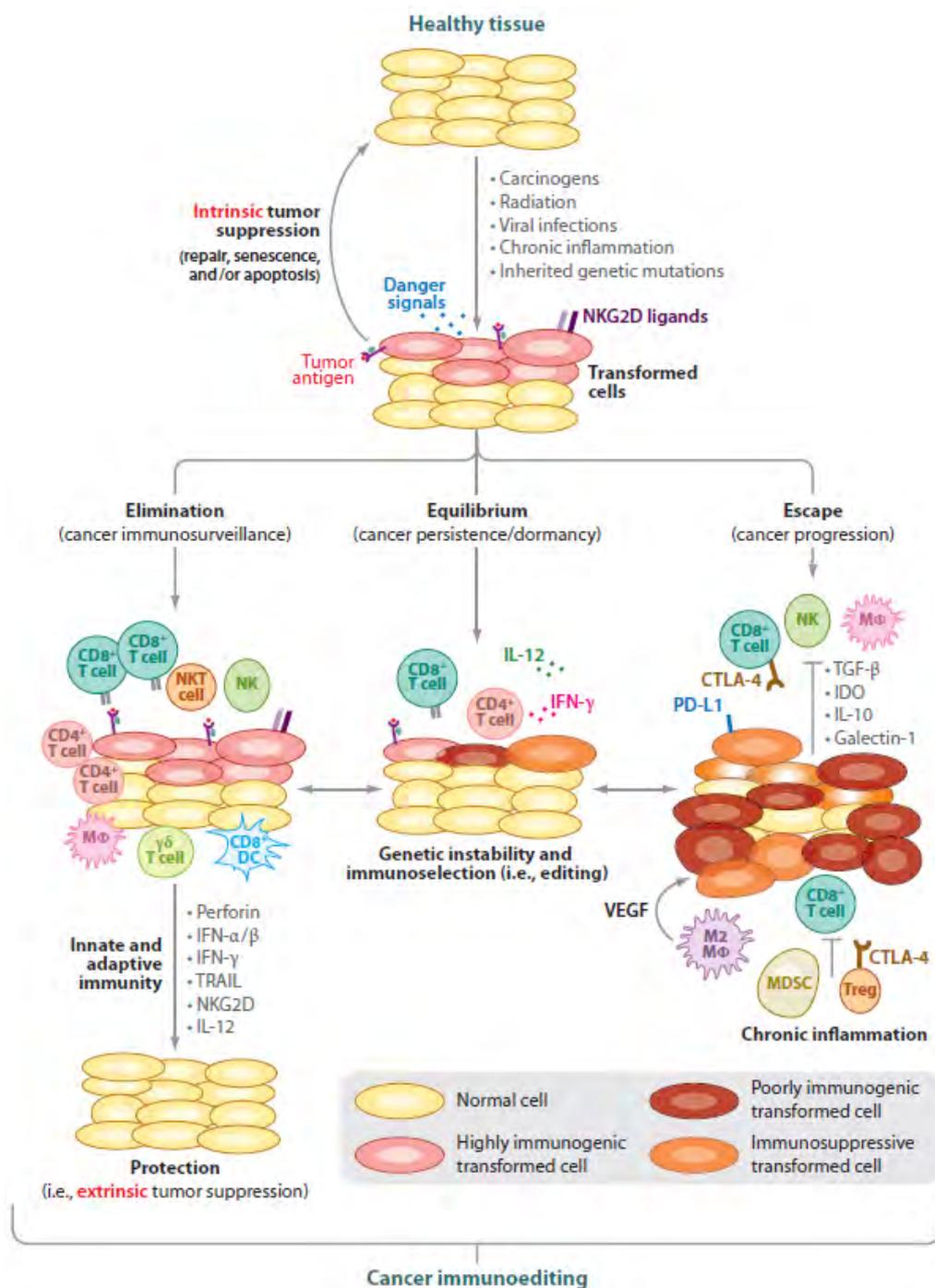


Figure 31: Représentation schématique de l'immunoédition des tumeurs (extrait de <sup>164</sup>).

L'étude de ces trois phases nous permet de tirer plusieurs conclusions. i) L'élimination des cellules transformées ou tumorales est la règle générale et le développement tumoral est l'exception. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, au vu du nombre de divisions cellulaires ayant lieu par jour et du nombre d'erreurs potentielles dans la réplication si ce système, n'était pas efficace l'incidence des cancers serait énorme. ii) Lors de la phase d'équilibre, le système immunitaire sélectionne involontairement les clones les plus malins et

## INTRODUCTION

### Le microenvironnement tumoral

les plus aptes à l'éviter. iii) Lors de la dernière phase, quand le diagnostic de cancer est posé, la situation est souvent désastreuse. D'une part, la tumeur est très hétérogène donc la possibilité qu'il y ait d'ores et déjà des clones potentiellement résistants aux traitements est forte. D'autre part, le microenvironnement tumoral est clairement pro-tumoral en délivrant des signaux pro-survie aux cellules cancéreuses et en les protégeant physiquement des attaques du système immunitaire et des traitements. iv) Même durant la phase d'échappement, il peut parfois arriver que le système immunitaire éradique la tumeur provoquant ainsi des cas de rémission spontanée.

### **II.B.3 Les acteurs du microenvironnement tumoral**

Comme nous l'avons vu précédemment, le microenvironnement tumoral est un milieu complexe qui peut être séparé en deux grands groupes : le premier englobe tous les acteurs ayant un rôle anti-tumoral tandis que le second englobe tous les acteurs ayant un rôle pro-tumoral. Les acteurs anti tumoraux regroupe les lymphocytes T, les cellules dendritiques matures et les cellules NK, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages de type I. Les acteurs anti tumoraux regroupent quant à eux les macrophages associés aux tumeurs (TAM), les cellules dendritiques immatures, les lymphocytes T régulateurs (Treg), les cellules suppressives de la moelle et les fibroblastes associés aux tumeurs. L'ensemble de ces acteurs est résumé dans la Figure 32.

## INTRODUCTION

### Le microenvironnement tumoral

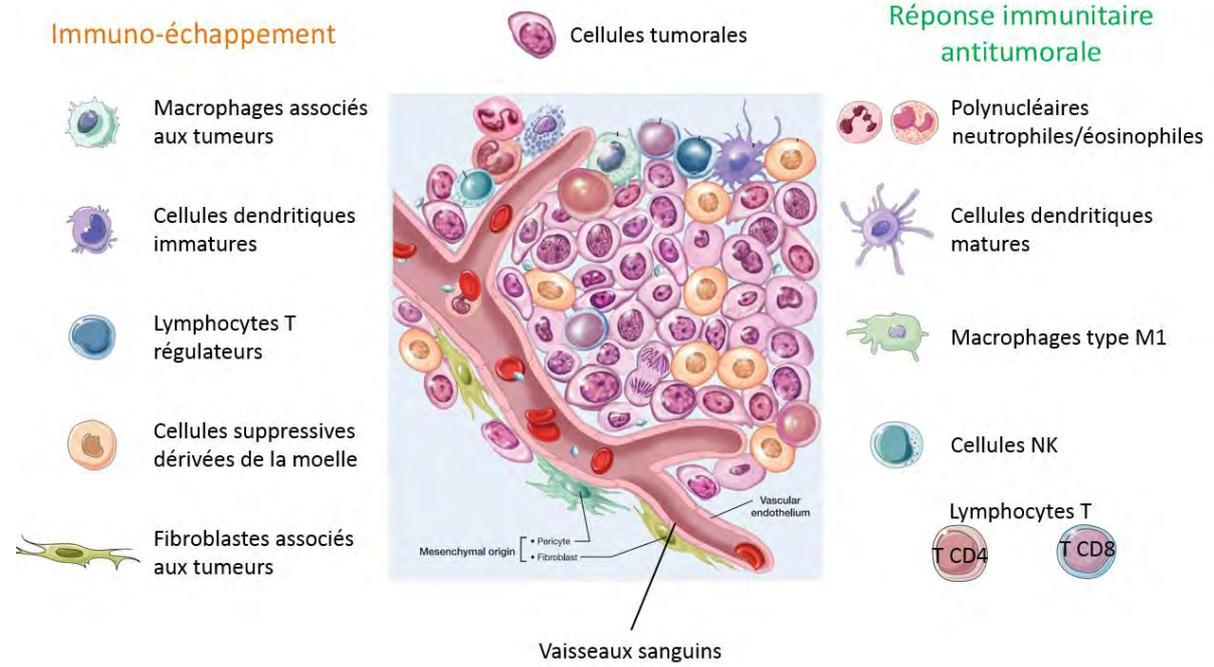


Figure 32: Le microenvironnement tumoral (extrait de <sup>165</sup>).

Au cours de ce manuscrit nous nous focaliserons seulement sur les TAM, une population macrophagique des acteurs anti tumoraux.

### III. Les macrophages associés aux tumeurs

Pour comprendre les TAM, il est nécessaire de s'intéresser tout d'abord aux macrophages.

#### III.A Les macrophages

Les macrophages (littéralement les gros mangeurs du grec makros « gros » et phagein « mangeur ») sont des cellules myéloïdes retrouvées dans les tissus provenant de la différenciation des monocytes circulants après leur extravasation <sup>166</sup>. Acteurs de l'immunité innée, les macrophages exercent leur activité phagocytaire en captant des particules opsonisées ou non telles que des débris cellulaires ou des bactéries, qu'ils endocytent puis dégradent. De plus, les macrophages sont des CPA et sont donc capables de présenter les Ag aux acteurs de l'immunité adaptative <sup>166</sup>.

Classiquement les macrophages sont divisés en deux grandes catégories suivant leurs effets pro ou anti-inflammatoires définissant respectivement les macrophages de type 1 (M1) et les macrophages de type 2 (M2). Cette différenciation n'est pas définitive, un M1 pouvant se différencier en M2 et inversement suivant les stimuli qu'il reçoit.

##### III.A.1 Les macrophages de type I et de type II

Les M1 sont pro-inflammatoires et ont une très forte activité antimicrobienne et anti-tumorale. Ils sont caractérisés par un fort niveau de production de TNF- $\alpha$  et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-23 <sup>167</sup> (Figure 33). La différenciation des monocytes en M1 est classiquement induite par l'INF- $\gamma$ , les LPS (lipopolysaccharides) ou les agonistes des TLR <sup>168</sup>. Ils promeuvent ainsi les réponses T et sont physiologiquement retrouvés dans les phases d'inflammation. Ce sont également de très bons CPA, car ils expriment de forts niveaux des molécules du CMH de classe I ou de classe II, et de molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86 <sup>168</sup>.

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

A l'opposé, les M2 ou macrophages activés alternativement, sont caractérisés par une forte capacité phagocytaire, un fort niveau d'expression de protéines « scavengers » et par la production de fortes quantités de prostaglandines, de TGF- $\beta$  et de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10<sup>167</sup> (Figure 33). Physiologiquement, ils sont retrouvés dans les phases de résolution de l'inflammation. Il existe différentes sous-populations de M2, les TAM étant souvent associés aux M2d<sup>168-170</sup>.

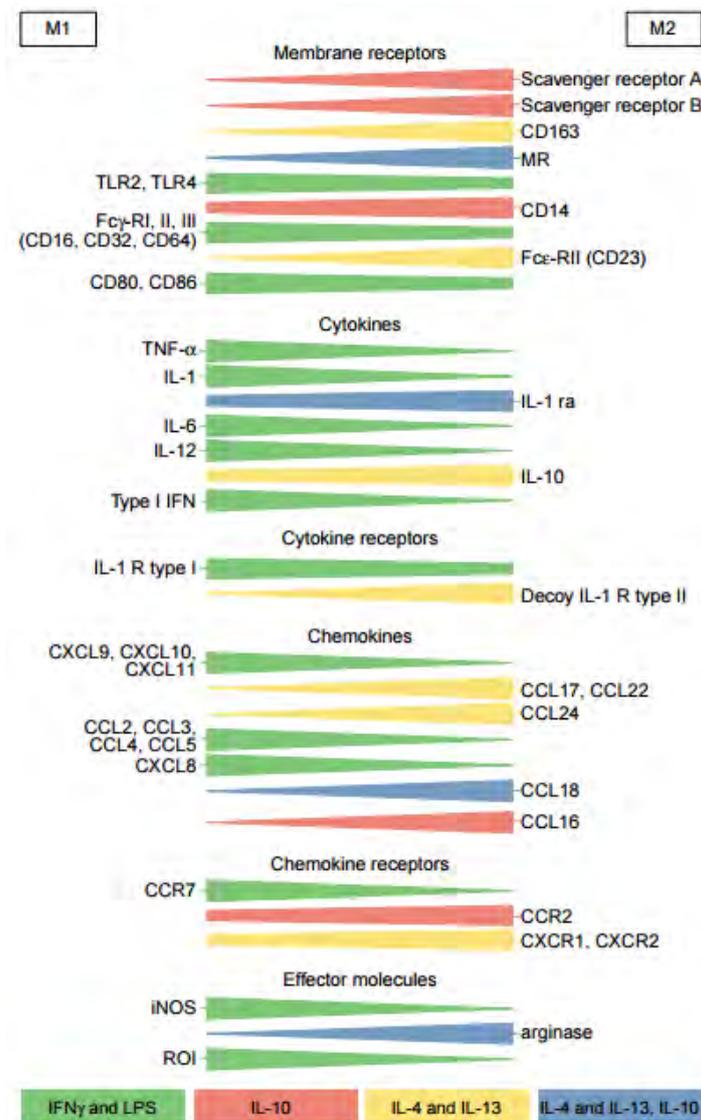


Figure 33: Phénotype des macrophages suivant leurs états de polarisation (extrait de<sup>167</sup>).

## **III.B Les macrophages et les tumeurs**

### **III.B.1 Définition des macrophages associés aux tumeurs**

Les TAM sont des macrophages retrouvés au sein du microenvironnement tumoral. Cette large définition, comprend aussi bien des M1 anti-tumoraux que des M2 pro-tumoraux. De plus, il a été montré que le « switch » entre M1 et M2 au sein du microenvironnement est associé à la progression cancéreuse<sup>171-173</sup>. Ainsi, si durant la phase d'équilibre ou d'élimination les M1 contribuent à l'activation T et à la réponse anti-tumorale, ils adopteront un phénotype M2 et faciliteront la progression tumorales aux stades plus tardifs<sup>144</sup>. Actuellement, environ 80 % des études montrent que les TAM ont un effet pro-tumoral et seulement 10 % démontrent un effet anti-tumoral<sup>174</sup>.

### **III.B.2 Recrutement et différenciation**

Les TAM dérivent de précurseurs monocytiques circulants et non pas d'une prolifération macrophagique au sein de la tumeur chez l'homme<sup>175</sup>.

#### **III.B.2.1 Le recrutement des monocytes**

Le recrutement des monocytes au sein des tumeurs est régulé principalement par des cytokines, des chémokines et des facteurs de croissance produits par les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement<sup>175, 176</sup>. En effet, les tumeurs sécrètent de manière constitutive des chémokines inflammatoires<sup>177</sup>, la plus fréquente étant probablement CCL2. Elle est retrouvée aussi bien dans des sarcomes, des gliomes, des mélanomes, des cancers pulmonaires, du sein, ou de l'ovaire<sup>167, 175</sup>, au point qu'elle fut appelée le facteur chémoattractant des tumeurs. Ainsi, sa neutralisation par un Ac anti-CLL2 réduit significativement la croissance tumorale chez la souris<sup>178</sup>. De nombreuses autres chémokines sont aussi produites afin d'attirer ces monocytes. Ainsi, l'IL-4 et l'IL-13 rendent les monocytes

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

extrêmement sensibles à des attractants tels que CXCL8 et CXCL1<sup>179</sup>. En plus des facteurs précédemment cités, le CSF-1 (colony stimulating factor 1) et le PDGF (platelet-derived growth factor) qui des facteurs de croissance, participent aussi à ce recrutement,<sup>180-182</sup>.

Certaines molécules de la matrice extracellulaire (MEC) ainsi leurs fragments protéolytiques permettent aussi le recrutement des monocytes. Ainsi, les fragments générés suite au clivage de l'élastine par MMP9 (matrix metalloprotéinase) et MMP12 ou des fragments dénaturés de collagène de type I, peuvent attirer des monocytes<sup>183</sup>. Enfin, le VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) produit lors de situations hypoxiques au sein de la tumeur, est aussi un attractant des monocytes. En effet, on retrouve au sein des zones hypoxiques un grand nombre de TAM<sup>184</sup>.

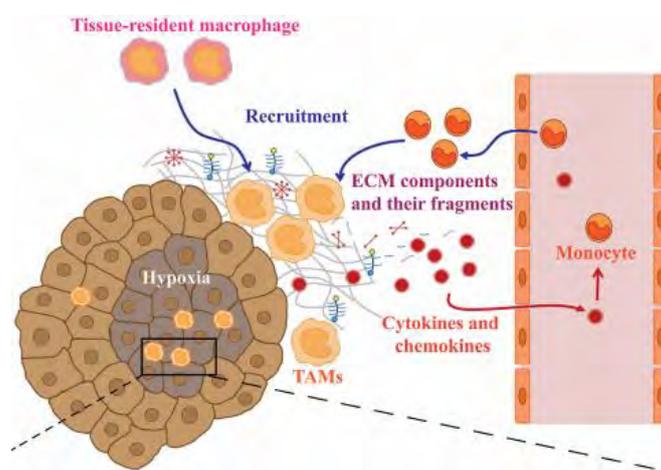


Figure 34: Mécanismes de recrutement des monocytes au sein des tumeurs (extrait de<sup>168</sup>).

### III.B.2.2 Différenciation

La différenciation des monocytes mobilisés en TAM est un mécanisme complexe et encore mal élucidé. Là encore, l'environnement cytokinique produit par les cellules tumorales et leur microenvironnement semble capital. Ainsi, CCL2 en plus de son rôle d'attractant, permet la polarisation des monocytes recrutés en M2<sup>185, 186</sup>. L'IL-6 souvent reportée comme étant présente dans les fluides tumoraux et sécrétée par les cellules tumorales, provoque, dans la plupart des cas avec d'autres facteurs, la différenciation *in vitro* de monocytes en TAM,<sup>187-190</sup>. CSF-1, lui aussi, permet cette différenciation *in vitro*<sup>191</sup>. Les COX-2 (cyclooxygénase 2) *via* leur production de PGE-2 (prostaglandin E2) induisent aussi cette différenciation<sup>187, 192</sup>. De plus, dans le cancer du poumon, lorsque les COX-2 sont surexprimées on retrouve une

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

production accrue d'IL-6<sup>193</sup>. L'IL-10 produite notamment par les cellules tumorales promeut elle aussi la différenciation en TAM. HSP-27 (heat shock protein 27), produite et relargée par de nombreuses cellules tumorales<sup>194</sup>, induit une différenciation de ces monocytes en macrophages immunotolérants et pro-angiogéniques<sup>195</sup>.

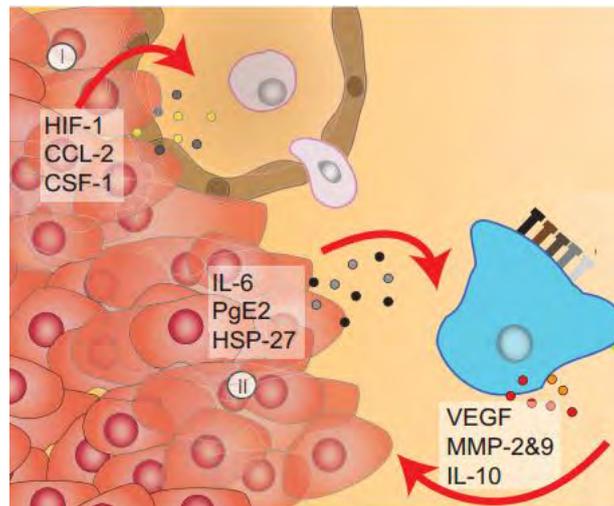


Figure 35: Mécanismes de différenciation des monocytes en TAM au sein des tumeurs (extrait de<sup>196</sup>).

En conclusion, les médiateurs inflammatoires attirent au sein de la tumeur des monocytes et provoquent leur différenciation en TAM. La plupart de ces facteurs peuvent être produits par les TAM, suggérant un rétrocontrôle positif.

### III.B.3 Phénotype

Bien que leurs phénotypes soient étroitement liés aux signaux de différenciation qu'ils reçoivent, la majorité des TAM sont proches des M2<sup>197</sup>. Actuellement, il n'existe ni de marqueur unique permettant leur caractérisation ni de liste exhaustive de tous leurs marqueurs. Ainsi, comme toutes cellules myéloïdes, ils expriment le CD14, le CD11b et comme les M2 ils expriment des faibles taux de CD64, de molécules du CMH de classe I et II, et des molécules de co-stimulation telles que CD80, CD86. Dans de nombreuses publications, les TAM sont assimilés aux cellules CD68<sup>+</sup><sup>198-200</sup>, bien que le CD68 puisse être exprimé par des cellules non myéloïdes<sup>201</sup>. De plus, il a été montré que des cellules CD68<sup>+</sup> n'étaient pas positives pour le CSF-1R ou le CD45, deux autres marqueurs utilisés en combinaison pour la caractérisation des TAM. Le CD163 et le CD204, deux récepteurs scavengers, ainsi que le CD206 un récepteur au mannose, sont aussi utilisés pour mettre en évidence les TAM<sup>196</sup>, avec une spécificité qui

## INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

semble plus forte que le CD68 dans le cancer du sein, de l'ovaire et du pancréas<sup>202-204</sup>. Les TAM peuvent également être caractérisés par leur production cytokinique *via* le TGF- $\beta$ , le VEGF ou l'IL-10 par exemple<sup>205</sup>.

Aujourd'hui, il est communément admis que pour caractériser efficacement les TAM au sein de coupes histologiques, un co-marquage est nécessaire. CD68 et CD163 sont les plus couramment utilisés pour caractériser les TAM.

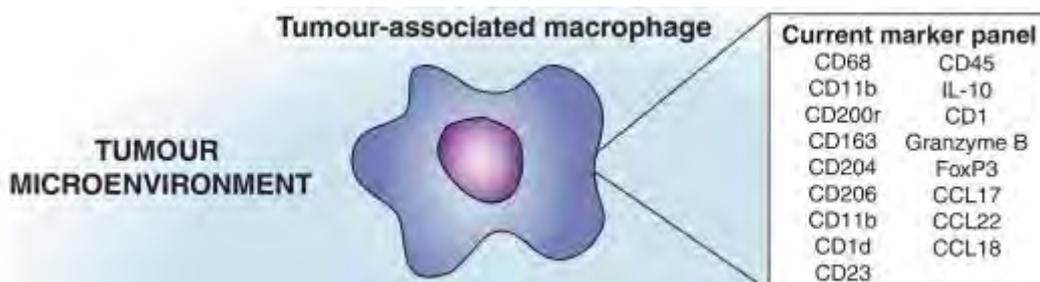


Figure 36: Exemple de phénotype de TAM (extrait de<sup>205</sup>).

### III.B.4 Fonctions

#### III.B.4.1 Immunosuppression

Il existe de nombreux mécanismes d'immunosuppression médiés par les TAM qui inhibent les réponses anti-tumorales et favorisent les réponses pro-tumorales comme détaillés dans la Figure 37. Tout d'abord, les TAM, étant très proches des M2, sont de très mauvais CPA et donc n'activent pas la réponse anti-tumorale. *Via* l'expression de molécules de CMH I non classiques telles que HLA-E et HLA-G, ils inhibent l'activation des cellules NK<sup>206</sup>. Ils inhibent aussi l'activation des lymphocytes T CD8 dans les ganglions sentinelles en inhibant l'activation des cellules NK au sein de la tumeur, qui ne migrent plus et n'activent donc plus les DC qui activent à leur tour ces lymphocytes<sup>207</sup>.

Ensuite, les TAM expriment des récepteurs inhibiteurs ligands de PD-1 (Programmed Cell Death 1) et CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocytes associated protein 4) présents sur les lymphocytes B et T. Ainsi, l'expression de PD-L1 (programm cell death ligand 1) est induite à la surface des TAM, par CSF-1, l'IL-4, INF- $\gamma$  ou encore l'hypoxie<sup>208, 209</sup>. La fixation de ces ligands sur leurs récepteurs respectifs induit une inhibition directe de la signalisation liée à

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

l'activation du TCR (T cell receptor) et du BCR et donc une absence de réponse anti-tumorale B et T.

Les TAM sécrètent aussi de nombreuses cytokines, chémokines et enzymes qui inhibent les réponses T CD4 et CD8 telles que l'IL-10, TGF- $\beta$  et PGE-2<sup>210, 211</sup>. De plus, ils induisent la différenciation et le recrutement des T en Treg *via* notamment la production d'IL-10, de TGF- $\beta$ <sup>212</sup>, de CCL22<sup>213</sup> dans le cancer ovarien ou *via* CCL20 dans le cancer colorectal<sup>214</sup>.

Enfin, en métabolisant la L-arginine du microenvironnement tumoral, *via* la sécrétion d'arginase I, ils inhibent encore une fois la réponse anti-tumorale T<sup>215</sup>.

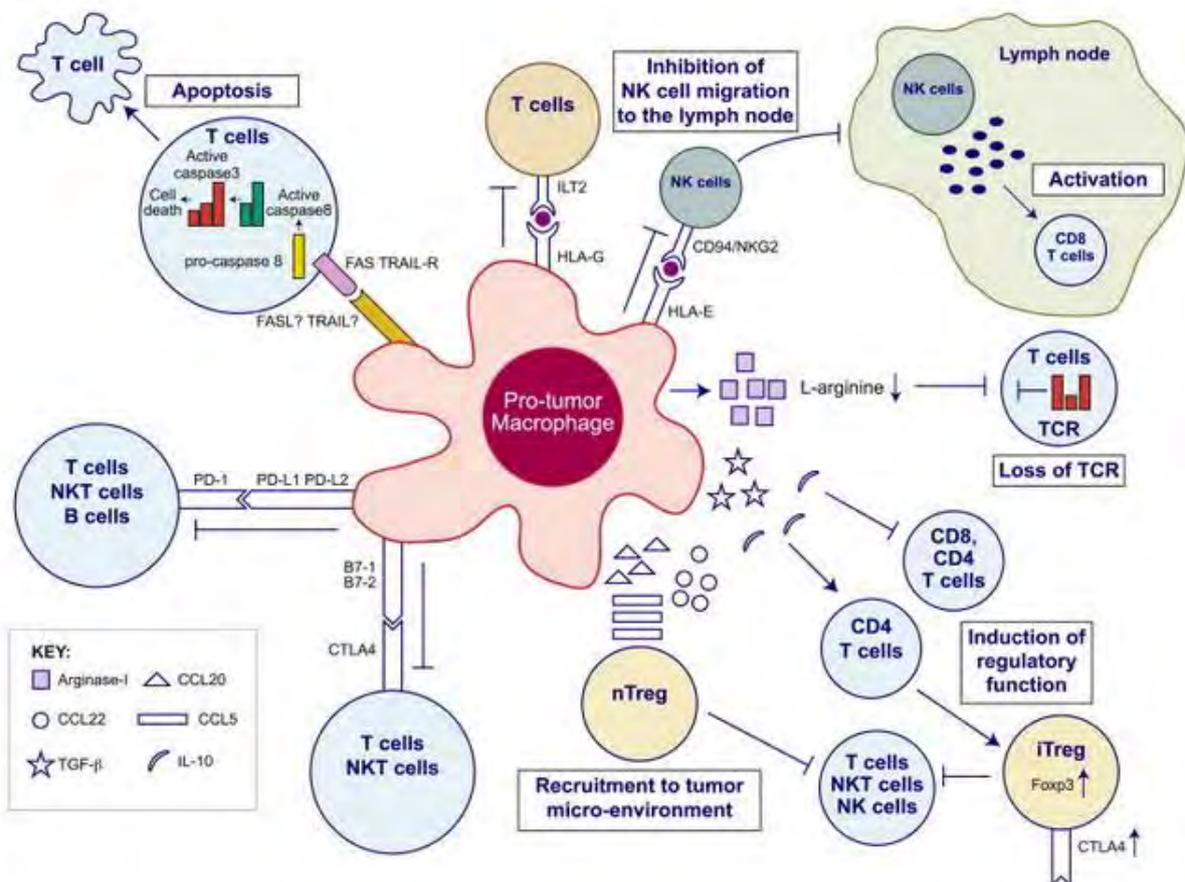


Figure 37 : Mécanismes d'immunosubversion médiés par les TAM (extrait de<sup>216</sup>).

### III.B.4.2 Rôle pro-angiogénique

La néovascularisation des tumeurs dépend en partie de l'infiltration macrophagique<sup>217-219</sup>. Ainsi, au cours d'expériences de déplétion des macrophages *via* des liposomes contenant du clonadronate chez la souris, on observe une réduction de l'angiogénèse dans les tumeurs<sup>220</sup>.

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

Les TAM sécrètent en effet de nombreux facteurs pro-angiogéniques tels que le bFGF (basic fibroblast growth factor), l'uPA (urokinase-type plasminogen activator), l'ADM (adrénomedulline). Par exemple, l'ADM augmente la prolifération des cellules endothéliales et la formation vasculaire en stimulant l'oxyde nitrique synthase <sup>221</sup>.

Les TAM retrouvés dans les zones hypoxiques sont aussi capables de sécréter du VEGF-A *via* une activation de HIF-1 $\alpha$  <sup>222-224</sup>. Au sein de ces zones, ils sécrètent des enzymes protéolytiques telles que MMP-1 <sup>225</sup> et MMP-7 <sup>226</sup> ce qui favorise l'angiogenèse en libérant le VEGF séquestré dans la MEC.

### III.B.4.3 Rôle dans l'invasion et la dissémination tumorale

Il existe au sein des TAM une sous-population, appelée Tie2<sup>+</sup> TAM (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains) qui sont capables de réguler l'intravasation des cellules tumorales au sein de la circulation <sup>227</sup>. Ils sont alignés sur la face externe des vaisseaux sanguins où Tie2 se lie à son récepteur ANG2 (Angiopoéitine 2) exprimé par les cellules endothéliales <sup>228</sup>. En fait, la cellule tumorale sécrète du CSF-1 et les TAM de l'EGF (epidermal growth factor), ce qui provoque un déplacement de ces deux types cellulaires le long des fibres de collagène jusqu'aux vaisseaux <sup>229</sup>. Les macrophages sont alors capables de former une brèche dans la paroi vasculaire permettant à la cellule tumorale de passer au sein de la circulation ce qui augmente ainsi le nombre de cellules tumorales circulantes et les risques métastatiques (Figure 38). Ainsi la déplétion des TAM induit une diminution du nombre de ces cellules circulantes et une diminution des métastases <sup>227</sup>. Preuve supplémentaire, chez la femme, une structure histologique particulière le TMEM (tumor microenvironment for metastasis), composée de macrophages, de cellules endothéliales et de cellules cancéreuses, est prédictive du potentiel métastatique dans le cancer du sein <sup>230</sup>.

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

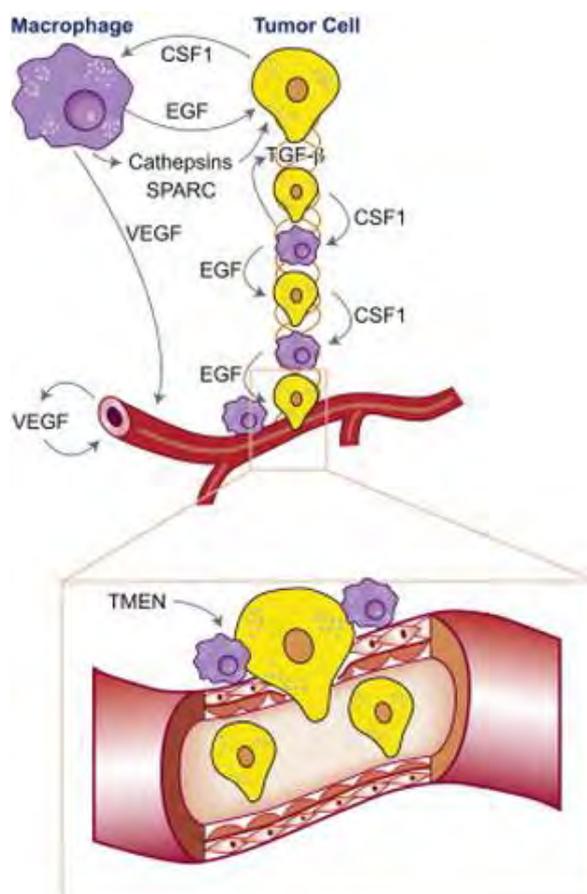


Figure 38: Les TAM contribuent au potentiel invasif des cellules tumorales (extrait de <sup>216</sup>).

Les TAM produisent aussi des molécules telles que l'ostéonectine, le TGF-β ou la cathepsine impliquées dans le phénotype invasif des cellules tumorales. En produisant de l'ostéonectine ou du TGF-β, ils favorisent la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales <sup>231, 232</sup>. La cathepsine permet, quant à elle, la dégradation de la MEC et le relargage des facteurs de croissance solubles qui y étaient séquestrés <sup>233, 234</sup> et favorise donc la croissance tumorale.

### III.B.5 Impact pronostique

Il existe de multiples études associant l'infiltration tumorale par des TAM et l'évolution de la maladie. Une partie de ces études est présentée dans la Table 6. Il faut néanmoins différencier deux types d'études : celles réalisées avec un marqueur pan macrophagique tel que le CD68 et celles réalisées avec des marqueurs plus spécifiques des TAM comme le CD163 ou le CD204. A ce jour, il n'existe pas de référentiel précis pour la mise en évidence des TAM dans des coupes histologiques, les études étant contradictoires, chacune définit son seuil de positivité et choisit son marqueur.

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

Organ	Cancer type	Number of patients analyzed	Markers	Link to course disease
Lymph node	Hodgkins lymphoma	265	CD68 CD163	No link
		130 and 166	CD68 MMP11	High CD68+ macrophages or high MMP-11 expression correlates with poor disease specific survival
		105	CD68	High infiltration correlates with higher age and poor survival (also in the younger patients)
Colon	colorectal cancer	17	CCL2 CD68 IL-8	Tumor cell produced CCL2 correlates to macrophages count and advanced disease stage
		478	CD68	High macrophages count at tumor front associates with better prognosis
		118	CD68 MMP-2 MMP-9	Intratumoral TAM correlate with invasion, LN status and staging
		40	CD68 S100 CD163	Significant better survival for patient with high DC count and trend for high CD163 count.
		159	CD68 CD206 CD3	High peritumoral CD68 better prognosis; low intratumoral M1/M2 ratio more recurrent disease
Intestinal tract	gastro intestinal stroma tumor	47 (19 metastatic)	CD68 CD163 CD14 CD1a CD20 S100 HLA-DR CD3 CD8 FoxP3 CD33	Presence of M2 is correlated with FoxP3 positive infiltrate
	gastric cancer	105	hypoxia CD68 CD34 VEGF MMP2 +9	Hypoxia and more macrophages correlates with shorter survival
Lung	non squamous cells lung cancer	100	CD68 HLA-DR CD163	Patients with long survival have higher number of M1 type macrophages

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

		50	CD68 IL-10	High IL-10 positive macrophages in advanced disease and therefore correlated to poor prognosis
		40	CD68 CD163 VEGF TNFa iNOS	More macrophages in tumor islets correlate with better prognosis
		20	CXCR-1,2,3 CCL-1	Higher CXCR-2, CXCR-3 and CCL-1 expression in patients with extended survival
<b>Mesothelioma</b>	pleural mesothelioma	52	CD68 CD163 CD206 CD124	High macrophages number in non-epithelial tumors is associated with bad prognosis
<b>Breast</b>	breast cancer	110 + 106	CD68 anti-PCNA	High number of proliferating macrophages associated with decreased survival
		127	CD68 CD163 MAC387	High CD163 correlates with more distant disease recurrence
<b>Ovarian and Peritoneum</b>	epithelial ovarian carcinoma	40 (21 serous, 19 mucinous)	CD68 CD163 CD204 CSF-1	High M2 correlates with disease stage
<b>Uterus</b>	endometrioid carcinoma	64	CD163 CD31 HIF-1A	In paired LN metastatic lesion same pattern for CD163 and CD31 is found
	endometrioid adeno cancer	61	MMP-12 CD68	Higher MMP-12 and macrophages in advanced disease
<b>Skin</b>	stage 1/2 melanoma	227 blood 190 tumors	CD68 CD163	High CD163 in tumor front or stroma correlates with poor survival
<b>Eye</b>	eye melanoma	43	CD68 CD163	Less macrophages is associated with better survival
	intra-hepatic cholangiocarcinoma	39	CD68 CD163 CD34 FoxP3	High CD163+ correlates to poor disease free survival
<b>Brain</b>	glioma	79	CD68 CD163 CD204 M-CSF	More CD163+CD204+ macrophages and high M-CSF in advanced stages
<b>Pancreas</b>	pancreatic head cancer invasive ductal cancer	76	CD68 CD163 CD204	High M2 infiltration associated with LN metastasis

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

<b>Soft tissues</b>	leiomyosarcoma	76 gynecologic and 73 non- gynaecologic	CD68 CD163	In non-gynecologic tumors, high CD163+ number correlate with poor prognosis
<b>Peripheral Lymphoma</b>	angioimmunoblastic T cell lymphoma	42	CD68 CD163	CD163/CD68 ratio correlates to overall survival

Table 6: Relation entre TAM et pronostic dans différents cancers (adapté de <sup>187</sup>).

Il est intéressant de noter que le CD163, peut être retrouvé sous forme soluble. Ce sCD163 (soluble CD163) est même corrélé aux stades pathologiques dans le lymphome de Hodgkin <sup>235</sup>. D'autres études doivent être menées afin de définir si ce facteur soluble est ou non un facteur pronostique dans d'autres cancers tels que la LLC.

## III.B.6 Influence des macrophages associés aux tumeurs sur les traitements

### III.B.6.1 Chimiothérapie

Les TAM peuvent moduler l'effet des chimiothérapies en augmentant ou au contraire en diminuant leur efficacité.

Le doxetaxel, un taxane, provoque une déplétion des TAM immunosuppresseurs et une activation ainsi qu'une expansion des TAM M1 favorisant la réponse T anti-tumorale dans des tumeurs de sein greffées chez la souris <sup>236</sup>. La trabectedine, elle aussi, déplete les monocytes et les TAM aussi bien chez la souris que chez les patients atteints de sarcome des tissus mous levant ainsi l'inhibition des effets pro-tumoraux qu'ils avaient <sup>236, 237</sup>.

A l'opposé, les TAM peuvent limiter l'action de ces agents. Ainsi, lorsque l'on déplete les TAM par un Ac anti CSF-1, on augmente l'efficacité du cyclophosphamide, du méthotrexate et du 5 fluorouracile dans des xéno greffes de tumeurs mammaires <sup>238</sup>. La chimiothérapie peut aussi augmenter le recrutement et la différenciation des monocytes en TAM limitant par la même leur efficacité. Ainsi, le paclitaxel, provoque une augmentation de sécrétion de CSF-1 au sein du microenvironnement tumoral, provoquant ainsi une augmentation des TAM <sup>239, 240</sup>. De plus, ces TAM sécrètent alors des facteurs chémoprotectifs telles que les cathepsines B et S qui protègent les cellules tumorales contre le paclitaxel. Enfin, les TAM peuvent protéger les cellules souches initiatrices du cancer contre des chimiothérapies. En effet dans le cancer du

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

côlon, elles relarguent du MFG-E8 (milk fat globule-epidermal growth factor 8 protein) qui protège ces cellules souches du cis-platine <sup>241</sup>.

En conclusion, les chimiothérapies induisent des effets vis-à-vis des TAM très différents dépendants à la fois de la tumeur et de la drogue utilisée, bien que dans la majorité des cas ces effets semblent plutôt aller contre l'efficacité des chimiothérapies.

### III.B.6.2 Thérapies ciblées

Comme avec les chimiothérapies, les TAM peuvent moduler l'efficacité des thérapies ciblées. Ainsi, au vu de leur rôle dans l'angiogénèse, leur déplétion *via* le clodrolip ou un inhibiteur de CSF-1R augmente l'effet des thérapies anti-angiogéniques telles que les Ac anti VEGF ou VEGF2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2) dans des modèles de tumeurs greffées chez la souris <sup>242, 243</sup>.

Les TAM expriment à leur surface le récepteur au fragment Fc des Ig et sont donc capables de médier des réactions d'ADCP (phagocytose dépendante des anticorps) ou d'ADCC. Ainsi, l'action du trastuzumab, un Ac monoclonal anti HER-2, passe aussi par une activation de la cytotoxicité des macrophages et augmente la capacité de ces cellules à présenter les Ag aux lymphocytes T <sup>244, 245</sup>. De même, dans des xénogreffes de cellules issues de lymphomes, l'ADCP médiée par les macrophages participe à la réponse anti-tumorale <sup>246, 247</sup>, à tel point qu'un fort nombre de TAM est synonyme de meilleur pronostic chez les patients atteints de lymphome folliculaire <sup>248</sup>. A l'opposé, l'engagement de ces récepteurs sur les TAM lors de thérapies à base de cétuximab, un Ac anti-EGFR (epidermal growth factor receptor), peut augmenter les fonctions immunosuppressives, pro-angiogéniques et pro-tumorales des TAM <sup>249, 250</sup>.

Là encore, les TAM ont un rôle dual, intimement lié à leur phénotype à la fois M1 et M2, et pouvant selon les thérapies, agir comme des agents pro ou anti-tumoraux.

### III.C Les « nurses-like cells » : les macrophages associés aux tumeurs de la leucémie lymphoïde chronique

Pour comprendre les NLC, il est tout d'abord nécessaire de comprendre une caractéristique importante des cellules leucémiques. Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules leucémiques sont très résistantes à l'apoptose *in vivo*. Paradoxalement, elles meurent rapidement lorsqu'elles sont cultivées seules *in vitro*<sup>251, 252</sup>. Rapidement, l'hypothèse selon laquelle cette mort *in vitro* ne serait pas due à des caractéristiques intrinsèques des cellules leucémiques mais à une perte des signaux pro-survie délivrés par les cellules du microenvironnement tumoral a été formulée<sup>253</sup>. Ainsi, dès 1989, Lagneaux et son équipe ont montré que les cellules stromales de moelle osseuse sont capables d'empêcher l'apoptose des cellules leucémiques *in vitro*<sup>40</sup>. Ce mécanisme, contact dépendant, est spécifique des cellules leucémiques, la mort des lymphocytes B normaux n'étant pas inhibée par ces cellules stromales. Depuis, d'autres publications ont décrit que cette apoptose *in vitro* pouvait être inhibée par des fibroblastes surexprimant CD31 et/ou CD40L (CD40 ligand)<sup>254</sup>, des cellules endothéliales<sup>254</sup>, des lignées de cellules dendritiques<sup>255</sup> ou par les NLC (Figure 39)<sup>42</sup>.

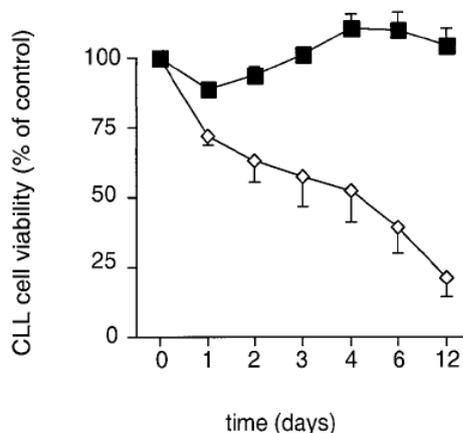


Figure 39: Les NLC protègent les cellules leucémiques de l'apoptose *in vitro* (courbe noire: co-culture de NLC et de cellules leucémiques, courbe blanche: cellules leucémiques cultivées seules) (extrait de<sup>42</sup>).

Les NLC furent caractérisées *in vitro* en 2000 par l'équipe de Burger. Morphologiquement, ce sont soit des cellules larges, rondes et adhérentes ou soit des cellules ressemblant à des fibroblastes, toutes de caryotype normal (Figure 40). Le nom de « nurse-like » provient de la similarité que ces cellules partagent avec les « nurses cells » présentes dans

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

le thymus qui délivrent des signaux pro-survie aux précurseurs des lymphocytes T lors de leur différenciation <sup>43</sup>.

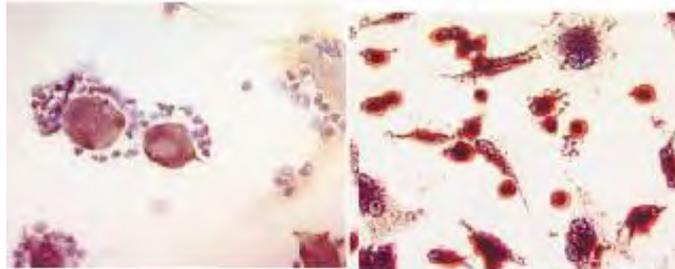


Figure 40: Morphologie des NLC (extrait de <sup>42</sup>).

Les NLC expriment un grand nombre de marqueurs phénotypiques mais malheureusement il n'existe aucun marqueur qui leur est spécifique. Elles expriment des marqueurs de la lignée macrophagique tels que le CD14, CD68, le CD11b le CD80, CD86 <sup>256</sup> et le CD163 <sup>257</sup>. Elles n'expriment pas le CD3 ou le CD19 ce qui permet de les exclure des lignées B et T <sup>42, 256</sup>. On retrouve aussi sur les NLC des marqueurs de cellules stromales tels que la vimentine et STRO-1 à faible niveau <sup>42</sup>. Enfin, elles expriment faiblement le CD33 et sont CD1a négatives <sup>256</sup>.

### III.C.1 Localisation tissulaire chez le patient

Longtemps observées seulement *in vitro*, les NLC commencent à être bien caractérisées *in vivo* chez le patient atteint de LLC. En 2011, une coupe histologique de ganglion lymphatique de patient montre qu'il existe dans ce tissu une population cellulaire CD163<sup>+</sup> au sein et autour des pseudo-follicules <sup>257</sup> (Figure 41), résultat confirmé plus tard dans une autre étude <sup>258</sup>. Depuis de nombreuses études ont montré qu'il existait au sein des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse des cellules présentant tous les marqueurs caractéristiques des NLC obtenues *in vitro* <sup>259 427</sup>. Ainsi, il existe dans ces deux tissus des cellules CD68<sup>+</sup> et indoleamine 2-3 dioxygénase (IDO) positives <sup>259, 260</sup>, semblable aux NLC obtenues *in vitro* <sup>259</sup>.

Néanmoins, aucun de ces marqueurs, lorsqu'il est utilisé seul, n'est spécifique des NLC. De nouvelles études sur des coupes histologiques avec des co-marquages CD68 et CD163 semblent

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

nécessaires afin de prouver que ces cellules observées *in vivo* correspondent bien aux NLC *in vitro*.

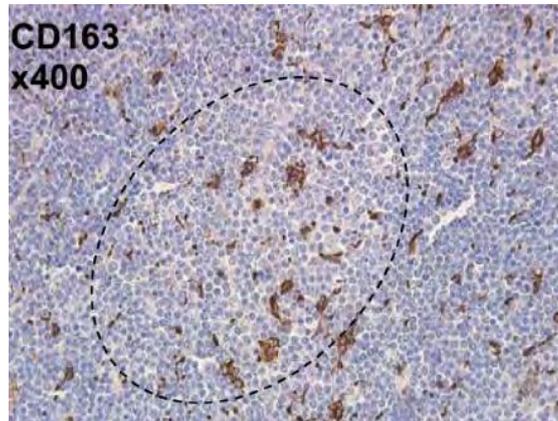


Figure 41: Cellules CD163<sup>+</sup> (marron) au sein d'un ganglion de patient (la zone entourée correspond au pseudo-follicule) (extrait de <sup>257</sup>).

### III.C.2 Les macrophages associés aux tumeurs de la leucémie lymphoïde chronique

Phénotypiquement les NLC présentent tous les marqueurs caractéristiques des TAM. Elles sont CD14 positives et expriment ainsi de fortement le CD68, CD163 et le CD206 <sup>42, 256-258</sup>. Tout comme les TAM, elles présentent un faible niveau d'expression des molécules de CMH de classe II telles que HLA-DRA et CD74 suggérant un défaut de leurs capacités de présentation de l'Ag <sup>261</sup>. On retrouve aussi une forte transcription du gène *FCGR2B* (Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor) ce qui indique que les NLC ont un défaut de leur capacité d'obsonisation <sup>261</sup>. De plus, elles présentent de faibles niveaux de transcription de gènes typiques de M1 tels que *LYZ* codant pour le lysozyme, impliqué dans la dégradation des bactéries gram positives <sup>261</sup>. Typiquement les NLC ont un phénotype M2d tout comme les TAM. Comme chez les TAM le lénalidomide, agent immunomodulateur, est capable de transformer ces NLC en M1, en restaurant leurs capacités de CPA, de phagocytose, et leur production cytokinique pro-inflammatoire <sup>262</sup>.

Les NLC présentent aussi d'autres points communs avec les TAM comme l'expression de l'IDO <sup>259</sup>. Cette enzyme, impliquée dans le métabolisme du tryptophane, est connue pour moduler l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Les NLC ont aussi un chémokine de M2/TAM avec une forte production de TGF- $\beta$ , d'IL-10 de CCL17 et de CCL22 <sup>257, 259</sup>. Tout comme les TAM, elles peuvent produire du VEGF <sup>263</sup>.

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

Enfin, la meilleure preuve que les NLC sont les TAM de la LLC est sans doute l'étude transcriptomique réalisée par L. Ysebaert. Lors de cette étude, l'analyse par PCA (principal component analysis) comparant des monocytes, des M1, des M2 et des NLC a en effet révélé que les NLC avaient un profil transcriptomique de TAM like<sup>257</sup> (Figure 42).

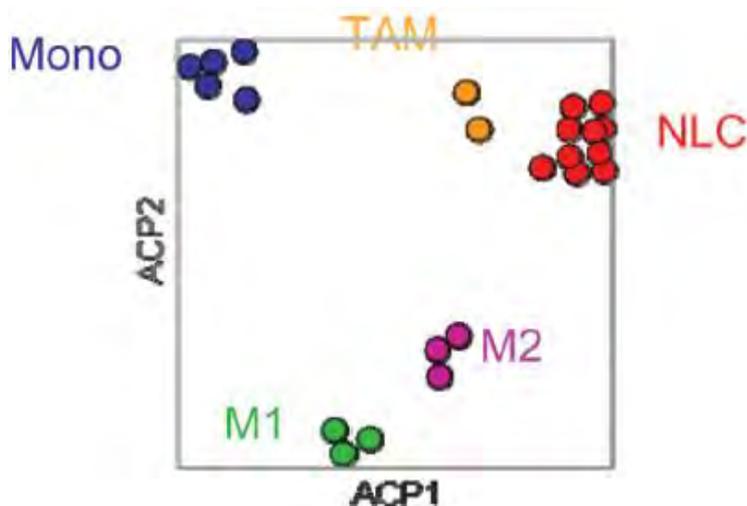


Figure 42: Les NLC ont un profil transcriptomique de TAM like (extrait de<sup>257</sup>).

### III.C.3 Origine et différenciation

Les NLC proviennent de la différenciation des cellules  $CD14^+$  du sang périphérique, en contact avec des cellules leucémiques<sup>256, 264</sup>. Cliniquement, on retrouve une corrélation entre la monocytémie chez le patient et la différenciation des cellules  $CD14^+$  en NLC *in vitro*<sup>263</sup>. De plus, le taux de différenciation des NLC est indépendant de la plupart des paramètres clinico-biologiques de la LLC mis à part la concentration en  $\beta 2m$ <sup>263</sup>. Une autre publication indiquait que les monocytes provenant de patients IgHV non mutés se différencieraient moins en NLC *in vitro*, mais cette étude n'a pas pris en compte la monocytémie, qui pourrait expliquer ces différences<sup>265</sup>. Si les premières études montraient que les NLC étaient différenciées après quinze jours de culture avec les cellules leucémiques<sup>42, 256, 264</sup>, il apparaît aujourd'hui que leur différenciation *in vitro* se fait en huit jours<sup>263</sup>.

Le profil transcriptomique des monocytes de patients LLC étant différent de celui de monocytes de donneurs sains, notamment au niveau de leurs capacités phagocytiques et pro-inflammatoires<sup>266</sup>, l'hypothèse selon laquelle les NLC ne proviendraient pas d'une différenciation active mais d'une prédisposition des monocytes de patients a été émise. En mettant en contact *in vitro* des monocytes de donneurs sains avec des cellules leucémiques de

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

patients, Bhattacharya a montré que ces monocytes « sains » étaient capables de se différencier en NLC dites hétérologues. Ces NLC « hétérologues » ont un profil transcriptomique très proche des NLC différenciées à partir de monocytes de patients avec une faible expression de HLA-DR, de lysozyme et une forte expression de FCGR2B <sup>261</sup>. De plus, ces NLC « hétérologues » sont aussi capables d'inhiber l'apoptose des cellules leucémiques *in vitro* <sup>267</sup>. L'ensemble de ces résultats prouvent que la différenciation des NLC est bien un phénomène actif et non pas une prédisposition des monocytes de patients.

Les mécanismes de différenciation sont quant à eux peu clairs mais deux mécanismes sont d'ores et déjà décrits. Le premier implique l'enzyme NAMPT (nicotinamide phosphotibosyltransferase) mais pas par son activité enzymatique. Cette enzyme est présente dans le surnageant de lymphocytes activés et est en fait une adipokine présentant des effets insuline like <sup>268, 269</sup>. Elle est retrouvée en concentration plus importante dans le plasma de patients que dans celui des donneurs sains. Le NAMPT extracellulaire sécrété par les cellules leucémiques, active les cellules leucémiques qui produisent, suite à ce stimulus du CCL3 capable d'attirer les monocytes et de provoquer leur différenciation en cellules CD163<sup>+</sup> et CD206<sup>+</sup>. De plus, le NAMPT agit directement sur les monocytes selon un mécanisme mal élucidé. Enfin, le NAMPT induit une production de cytokines anti-inflammatoires par les NLC telles que l'IL-6, l'IL-10 et CCL-3, ce qui indique que cette enzyme participe au maintien du phénotype M2 des TAM <sup>258</sup>.

Le second mécanisme de différenciation des NLC est dépendant de sHMGB1 (soluble high mobility group box 1). HGMB1, une alarmine, est une protéine nucléaire très conservée, qui peut être sécrétée par les cellules de l'immunité innée ou relarguée passivement par les cellules lors d'une mort nécrotique <sup>270, 271</sup>. sHMGB1, tout comme NAMPT, est présente en plus forte quantité dans le sérum des patients que dans celui des donneurs sains. Le mécanisme d'action indique qu'au début de la culture *in vitro*, la mort de certaines cellules leucémiques induit un relargage de sHMGB1. Cette molécule se lie alors à ses récepteurs TLR9 et RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) sur les monocytes et induit la différenciation en NLC *via* une activation de phospho STAT-3 et de NF-KB dans la cellule leucémique.

Aujourd'hui, tous les mécanismes de différenciation décrits pour la différenciation des monocytes en NLC impliquent des facteurs solubles, or il a été prouvé que cette différenciation est contact-dépendante <sup>256</sup>. D'autres études sont donc nécessaires pour mettre en évidence les mécanismes par lesquels le contact permet la différenciation des NLC.

### III.C.4 Fonctions

#### III.C.4.1 Attraction des cellules leucémiques

Afin de protéger les cellules leucémiques contre l'apoptose, les NLC commencent par les attirer vers elles. Pour cela, elles produisent une grande variété de cytokines et de chémokines qui agissent comme des chémoattractants pour les cellules leucémiques.

La première décrite fut CXCL12, une chémokine qui est normalement produite par les cellules stromales dans la moelle, plus précisément au site de la différenciation B précoce où elle permet leur survie et empêche leur sortie précoce<sup>272-274</sup>. Dans la LLC, CXCL12 est notamment produite par les NLC et les cellules stromales<sup>42, 275</sup>. CXCL12 est ainsi relargué dans le milieu intercellulaire selon un gradient qui attire ainsi les cellules leucémiques *via* leur récepteur, le CXCR4. Une fois en contact avec les NLC, ces cellules diminuent leur expression de CXCR4 afin de rester en contact avec les NLC<sup>43</sup>. Il est intéressant de noter que les cellules leucémiques CD38<sup>+</sup> et ZAP-70<sup>+</sup> migrent plus en réponse à CXCL12 malgré un même taux d'expression de CXCR4 sur les cellules ZAP-70<sup>+</sup> ou ZAP-70<sup>-</sup><sup>276</sup>. On retrouve ainsi dans les cellules leucémiques une activation plus longue de la voie de signalisation d'ERK en réponse au CXCL12 chez les cellules ZAP-70<sup>+</sup><sup>277</sup>. Enfin, lors de la chémoattraction des cellules leucémiques *via* CXCL12, et une fois celles-ci en contact avec les NLC, on observe sur les clones leucémiques une diminution de la S1PR1 (sphingosine-1-phosphate receptor 1) et une diminution de leur migration induite par S1P (sphingosine-1-phosphate)<sup>278</sup>. La S1P est un sphingolipide bioactif, contrôlant la sortie ganglionnaire des lymphocytes<sup>279,280</sup>. La diminution de son récepteur à la surface des cellules leucémiques permet à ces dernières de rester en contact avec les NLC afin de recevoir leurs signaux pro-survie<sup>278</sup>.

Le même type de mécanisme existe avec d'autres chémokines telles que CXCL13, exprimées par les NLC, qui attirent les cellules leucémiques *via* son récepteur CXCR5<sup>281</sup>. Là encore, il s'agit d'un détournement d'un phénomène normal, car cette chémokine permet normalement le recrutement des lymphocytes B dans les follicules<sup>282,283</sup>.

Enfin, le couple CX3CR1 et son ligand CX3CL1 est impliqué dans un double chémoattractisme<sup>284</sup> car ces molécules sont exprimées à la fois par les NLC et les cellules leucémiques. Ainsi, les cellules leucémiques migrent selon le gradient de CX3CL1 afin d'atteindre les NLC. De plus, la fixation de son ligand sur CX3CR1 sur le clone malin induit une surexpression de CXCR4 favorisant encore ce chémoattractisme<sup>284</sup>.

### III.C.4.2 Protection contre l'apoptose des cellules leucémiques *in vitro*

Les NLC protègent les cellules leucémiques de l'apoptose *in vitro*, c'est même ainsi qu'elles furent caractérisées<sup>42</sup>. Cette protection complexe passe à la fois par des facteurs solubles et des interactions contact-dépendantes.

#### III.C.4.2.1 Protection *via* les facteurs solubles

Concernant les facteurs solubles il est possible de différencier les cytokines des autres facteurs solubles. La première cytokine décrite est CXCL12. Elle est produite par les NLC et les protègent les cellules leucémiques de l'apoptose. On observe, suite à la fixation de CXCL12 sur CXCR4, une activation des voies de signalisation d'Akt et d'ERK au sein de la cellule leucémique. L'ajout de CXCL12 dans une culture de cellules leucémiques augmente leur survie, ce mécanisme ne passant pas par une augmentation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1<sup>42, 264</sup>. On peut aussi noter que CXCL13 et CX3CL1, les deux autres cytokines impliquées dans le chimiotactisme des cellules leucémiques n'ont, quant à elles, aucun effet sur la survie de ces cellules<sup>281, 284</sup>.

Les NLC, comme les cellules leucémiques, sont capables de produire de l'HGF (hepatocyte growth factor) lorsque les deux types cellulaires sont en co-culture. L'HGF a un rôle dual ; il permet de maintenir le phénotype M2 des NLC et favorise la survie des B leucémiques car les deux types cellulaires expriment aussi c-Met, le récepteur de l'HGF. Le clone leucémique favorise ainsi les NLC qui les protègent en retour<sup>259</sup>.

#### III.C.4.2.2 Protection *via* des interactions contact-dépendantes

Concernant les mécanismes contact-dépendants, leur influence sur la survie des cellules leucémiques est plus incertaine. Les NLC, comme les cellules leucémiques, expriment BAFF (B-cell activating factor) et APRIL (A proliferation-inducing ligand) deux molécules de la famille du TNF, impliquées dans la survie des lymphocytes B<sup>285</sup>. La fixation de ces molécules sur leurs récepteurs induit dans la cellule tumorale une surexpression de Mcl-1 *via* une activation de la voie canonique de NF-KB et non *via* les voies ERK et Akt. Malheureusement,

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

l'expérience consistant à bloquer directement BAFF et APRIL afin de démontrer que ces molécules sur les NLC favoriseraient la survie des cellules leucémiques n'a pas été réalisée, ce qui laisse un doute sur leur rôle dans ces effets. De plus, l'expression de BAFF et APRIL semble dépendante de l'ancrage des NLC à la MEC. Ainsi, lorsque que l'on diminue l'expression de la galectine 1, une lectine liant le  $\beta$  galactoside, on inhibe l'expression de BAFF et APRIL<sup>286</sup>. On peut noter qu'il existe un effet additif entre BAFF, APRIL et CXCL12 sur la survie des cellules leucémiques mais que l'ensemble de ces facteurs ne suffit pas à expliquer la totalité de l'effet pro-survie des NLC<sup>264</sup> (Figure 43).

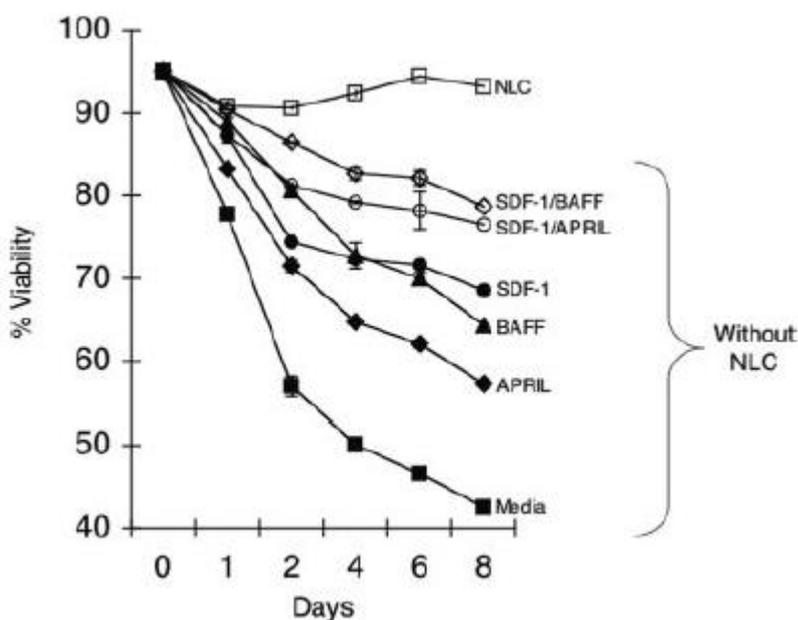


Figure 43: BAFF, APRIL et CXCL12 sont moins efficaces que les NLC pour protéger les cellules leucémiques de l'apoptose (extrait de<sup>264</sup>).

Les NLC exprimeraient un ligand du BCR, bien que cela n'ai jamais été démontré, ce qui favoriserait la survie des cellules leucémiques. Ainsi, une étude transcriptomique comparant des cellules leucémiques avant et après co-culture avec des NLC, montre que les cellules leucémiques en contact avec les NLC expriment plus CLL3 et CCL4, CCL3 étant un facteur de mauvais pronostic comme nous le verrons plus loin (III.C.5 Impact pronostique). Ce mécanisme est dépendant de l'activation du BCR mais, comme les expériences d'induction de la production de ces cytokines et d'inhibition de l'apoptose n'ont été réalisées qu'en stimulant les cellules leucémiques par des IgM, la preuve formelle de l'implication des NLC n'existe pas. En effet, malgré le fait que ces facteurs solubles soient retrouvés en quantité croissante lors de la co-culture NLC et cellules leucémiques, la preuve directe que les NLC activeraient le BCR des cellules leucémiques n'est pas claire. De plus, les gènes correspondant aux protéines de la

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

signalisation du BCR ne sont pas surexprimés dans le transcriptome suite à la co-culture avec les NLC <sup>287</sup>. Néanmoins, CCL3 et CCL4 étant des chémoattractants pour les lymphocytes <sup>288, 289</sup>, on peut tout à fait émettre l'hypothèse que les cellules leucémiques en contact avec les NLC secrèteraient ces facteurs solubles ce qui permettrait une attraction supplémentaire des cellules leucémiques vers les NLC et favoriseraient leur survie par un autre mécanisme.

Les NLC expriment aussi CD31 <sup>290</sup>. En interagissant avec son récepteur CD38 présent sur les cellules leucémiques, il délivrerait ainsi un signal de survie aux cellules leucémiques <sup>290, 291</sup>. Actuellement, le rôle du couple CD31/CD38 pour inhiber l'apoptose des cellules leucémiques fait encore débat, certaines publications ayant montré que ce couple n'avait aucune influence <sup>292</sup>. La rencontre de CD31 et de CD38 provoque aussi au sein de la cellule leucémique une surexpression de CD100 et une sous-expression de CD72, deux ligands de Plexin-B1, respectivement de forte et de faible affinité. L'interaction forte de Plexin-B1 et de CD100, délivrerait ainsi un signal pro-survie aux cellules leucémiques <sup>290, 293</sup>.

Les cellules leucémiques de patients IgHV non mutés sont plus sensibles à l'apoptose *in vitro* bien que ces malades aient un plus mauvais pronostic <sup>294</sup>. En effet, ces cellules quand elles sont cultivées seules, présentent un plus faible niveau de Bcl-2 et une inactivation de la voie NF-KB <sup>294</sup>. Cependant, cette apoptose accrue peut être inhibée par des signaux du microenvironnement. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, ces cellules sont plus attirées par les chémoattractants sécrétés par les NLC <sup>277</sup>. L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules leucémiques de patients IgHV non mutés ne sont pas plus résistantes intrinsèquement, mais plus dépendantes de leur microenvironnement. On peut émettre l'hypothèse que la gravité des patients IgHV non mutés pourrait être expliquée par ce même microenvironnement et par la capacité des cellules leucémiques à rester en contact avec celui-ci, tout du moins en partie.

#### III.C.4.3 Favorisation de l'immunoéchappement

Les NLC, tout comme les TAM dans les autres cancers, favorisent l'immunoéchappement.

*Via* leur production de cytokines telles que l'IL-10, le TGF- $\beta$ , on observe ainsi que le surnageant provenant de la coculture NLC/ cellules leucémiques de patients Binet stade A, provoque l'expansion des lymphocytes Treg. L'ensemble Treg et facteurs solubles de coculture inhibent

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

ainsi l'expansion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> <sup>257</sup>. De manière similaire, une expansion des Treg a été observée chez tous les patients indépendamment du stade de Binet avec une implication supposée des facteurs solubles. Les NLC *via* la production et l'expression d'IDO et l'IL-10 ont en elles-même une activité immunosuppressive capable de moduler la prolifération et l'activation des lymphocytes T <sup>295</sup>. De plus, les lymphocytes T en contact avec des NLC expriment de plus forts taux de PD-1, molécule délivrant des signaux inhibiteurs aux cellules T, lorsque cette coculture est faite avec du NAMPT <sup>258</sup>. Ce résultat nous montre que les cellules leucémiques qui favorisent les cellules pro-tumorales, favorisent en même temps leur survie de manière indirecte, car les NLC inactivent les lymphocytes T.

De manière paradoxale, les NLC attirent et activent aussi des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *via* CXCL12. Cependant lorsque les cellules leucémiques sont en contact avec ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, on observe une augmentation de leur prolifération *in vitro* indiquant que dans ce cas les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont un effet pro-tumoral <sup>296</sup>.

L'ensemble de ces mécanismes nous permet de soumettre un schéma général : au sein du ganglion, les NLC exercent leurs effets pro-tumoraux de manière directe et indirecte, mais recrutent des effecteurs censés être anti-tumoraux. Ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> producteurs d'IFN $\gamma$  favorisent l'inflammation au sein du tissu permettant le recrutement de nouveaux partenaires de l'immunité qui seront détournés au profit de la LLC. En parallèle, ces lymphocytes T peuvent être corrompus par les NLC et pourraient se transformer en Treg favorisant ainsi la tumeur. On est alors en présence d'un rétrocontrôle positif, le microenvironnement devenant de plus en plus pro-tumoral.

### III.C.4.4 Rôle dans la pathogénèse et dans l'évolution de la leucémie lymphoïde chronique

A ce jour, il n'existe que peu de preuves de l'implication des NLC dans la pathogénèse et dans l'évolution de la LLC. Par exemple, aucune étude n'a tenté d'observer des NLC dans les MBL. Néanmoins, quelques informations fournies par un modèle murin E $\mu$ TCL1 (T-cell Leukemia 1) peuvent nous éclairer sur ce sujet.

Le modèle appelé E $\mu$ TCL1 repose sur la surexpression de TCL1 dans la lignée B en le plaçant sous la dépendance de la région régulatrice « enhancer » des Ig (E $\mu$ ). Régulateur de la voie PI3K/Akt, chez l'Homme, la surexpression de TCL1 dans les cellules leucémiques est associé au statut IgHV muté et ZAP-70<sup>+</sup> <sup>297</sup>. Les souris E $\mu$ TCL1 montrent une accumulation

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

progressive de lymphocytes B CD5<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> avec un BCR stéréotypique et réactif contre des auto-Ag et des Ag microbiens <sup>298</sup>. Cliniquement, on observe une infiltration de ces cellules au niveau du péritoine, de la rate puis de la moelle osseuse pour aboutir à une maladie symptomatique et agressive avec adénopathies et hépato/splénomégalie vers 20 mois <sup>298</sup>.

Afin de confirmer le rôle des macrophages dans la LLC, les souris E $\mu$ TCL1 furent croisées avec des souris MIF<sup>-/-</sup> (macrophage migration inhibitor factor). MIF est une cytokine pro-inflammatoire principalement sécrétée par les macrophages suite à divers stimuli <sup>299</sup>. Elle permet notamment une activation des lymphocytes B et le recrutement des cellules myéloïdes pour maintenir les B matures au sein de la moelle osseuse <sup>300, 301</sup>. Chez les souris E $\mu$ TCL1<sup>+/wt</sup> MIF<sup>-/-</sup>, on observe une augmentation de la survie globale avec une diminution de l'hépatosplénomégalie sans modification de la lymphocytose. Au sein de la rate, on observe une diminution des cellules CD68<sup>+</sup> décrites comme TAM dans cette publication <sup>302</sup>. Cette diminution semble être due à une diminution du potentiel migratoire des macrophages, notamment *via* CCL4 connu pour être produite par les cellules leucémiques <sup>302</sup>.

Les souris E $\mu$ TCL1 furent aussi croisées avec des souris RhoH<sup>-/-</sup>. RhoH est un membre de la famille des GTPases spécifique de la lignée hématopoïétique et est impliqué dans les hémopathies malignes B <sup>303-306</sup>. Chez les souris E $\mu$ TCL1<sup>Tg</sup> RhoH<sup>-/-</sup>, les cellules leucémiques migrent moins bien suite aux stimuli délivrés par CXCL12 et CXCL13 et il s'établit un mauvais contact de ces cellules avec les NLC de souris CD68<sup>+</sup>. Cliniquement, on observe une diminution de l'infiltration médullaire, une diminution de la lymphocytose et une diminution de la splénomégalie, associées à une meilleure survie des souris <sup>307</sup>.

L'ensemble de ces résultats, nous permettent de tirer quelques conclusions indirectes sur l'effet des NLC dans la pathogénèse et l'évolution de la LLC. Lorsque l'on a une diminution du nombre de NLC, ou un mauvais recrutement des cellules leucémiques au sein des organes lymphoïdes secondaires, chez la souris, on observe une diminution de la taille des organes lymphoïdes secondaires avec une maladie plus indolente et une survie plus longue des animaux. Les NLC semblent donc augmenter l'agressivité de la maladie.

### III.C.5 Impact pronostique

Il existe très peu d'informations sur l'impact pronostique chez l'Homme des NLC dans la LLC. On peut néanmoins relever deux études qui traitent de l'impact des NLC de manière plus ou moins claire.

La première publication concerne CCL3<sup>308</sup>. Dans la LLC, la production de CCL3 est augmentée lorsque les cellules leucémiques sont co-cultivées avec des NLC ou lorsqu'elles sont activées comme nous l'avons vu précédemment<sup>309-311</sup>. La concentration plasmatique de CCL3 est augmentée chez les patients comparés aux donneurs sains<sup>309, 312</sup>. De plus, en séparant les patients en deux groupes, l'un pour une concentration sérique de CCL3 inférieure à 10 pg/mL et l'autre supérieur à ce taux, Burger et son équipe ont montré que les patients avec un taux élevé de CCL3 étaient de plus mauvais pronostic. En effet, cette forte concentration est associée à une maladie avancée, les patients présentant des stades de Rai élevés, des statuts IgHV non mutés, une positivité du CD38 et de ZAP-70, de fortes concentrations de  $\beta$ m et des caryotypes avec des délétions 11q22-23 et 17p13. Enfin, ils ont montré que ce fort taux est corrélé à une durée avant traitement réduite<sup>308</sup>. Burger et *al* nous fournissent ainsi une preuve indirecte de l'impact des NLC sur la durée avant traitement, une forte infiltration par les NLC induisant la production de fort taux de CCL3.

La seconde publication concerne sHMGB1<sup>260</sup>. Ce facteur permet la différenciation des monocytes en NLC, et est augmenté chez les patients Binet B et C ce qui pourrait indiquer qu'il y a plus de NLC aux stades tardifs de la maladie. Des études sur des tissus « micro-arrays » de ganglions lymphatiques de patients ont montré qu'une forte infiltration (supérieure à 10 %) est associée à une survie globale des patients plus courte. Néanmoins, deux critiques majeures peuvent être émises à propos de ces résultats. Tout d'abord, en effectuant un simple marquage CD68<sup>+</sup> sur ces coupes, les auteurs ont probablement surestimé le nombre de NLC, car comme nous l'avons vu précédemment, il existe des cellules CD68<sup>+</sup> non myéloïdes<sup>201</sup>. Ensuite, cette étude a été réalisée sur des tissus « micro-arrays » et peuvent ne pas être totalement représentatifs de l'ensemble du ganglion.

Même si l'impact pronostique des NLC semble aujourd'hui se dessiner, on peut regretter qu'il l'absence d'étude plus précise des NLC avec un co-marquage CD68 et CD163 sur coupe ganglionnaire entière.

### III.C.6 Effets sur les thérapies utilisées dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique

Si l'impact pronostique des NLC semble probable, ses effets sur les traitements de la LLC sont pour le moins peu décrits.

#### III.C.6.1 Effets sur les thérapies classiques

Concernant les thérapies classiques de la LLC, deux publications seulement traitent de l'impact des NLC sur ces thérapies.

La première montre que les NLC ne protègent pas les cellules leucémiques de la fludarabine<sup>313</sup>. Ces expériences, montrent que la fludarabine à 50  $\mu\text{M}$  tue les cellules CD14<sup>+</sup> précurseurs de NLC. De même, lorsque l'on traite des NLC par la même drogue à la même concentration, on induit leur mort. Enfin, lors de la coculture de NLC et de cellules leucémiques, on observe le même niveau d'apoptose de cellules leucémiques que dans la condition où ces dernières sont cultivées seules, indiquant que les NLC ne peuvent protéger les cellules leucémiques de la fludarabine<sup>313</sup>. La seule critique que l'on peut faire à cette étude est qu'elle fut réalisée sur un très faible nombre de patients.

La seconde concerne l'effet des NLC sur un traitement à la dexaméthasone et au chlorambucil (Chloraminophène®)<sup>314</sup>. La dexaméthasone est un corticoïde utilisé notamment dans le traitement des patients avec de forte atteintes ganglionnaires ou lors de complications auto-immunes. Le chlorambucil quant à lui est une moutarde à l'azote, utilisé chez le patient très âgé ou en rechute après plusieurs lignes. Ces deux thérapies ont une efficacité modeste mais significative dans la LLC. Filip et *al* ont observé que ces deux thérapies n'ont que peu d'effets sur la survie des NLC<sup>314</sup>. De plus, les NLC permettent de protéger partiellement les cellules leucémiques contre ces drogues, notamment *via* CXCL12<sup>314</sup>.

Les NLC semblent donc pouvoir protéger, ou non de certains médicaments utilisés dans le traitement de la LLC.

### III.C.6.2 Effets sur l'efficacité des petites molécules

L'ibrutinib, perturbe les interactions du clone leucémique avec son microenvironnement<sup>315</sup>. Les cellules leucémiques sont ainsi moins sensibles aux stimuli délivrés par CXCL12 et CXCL13 et leurs capacités d'adhésion sont elles aussi diminuées<sup>128</sup>. De même, la survie de ces cellules induite par BAFF est diminuée, à des doses très élevées et non pertinentes cliniquement<sup>126</sup>. Enfin, en bloquant la signalisation du BCR, l'ibrutinib permet d'induire l'apoptose de cellules leucémiques, malgré le contact avec les NLC<sup>127</sup>.

L'idélalisib, perturbe lui aussi les interactions entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement<sup>315</sup>. Il induit un défaut de migration des cellules leucémiques *via* CXCL12 et CXCL13, une diminution de la production de CCL3 et CCL4 par ces mêmes cellules grâce à un blocage de la signalisation dépendante du BCR<sup>316</sup>. Enfin, concernant les NLC, le traitement par l'idélalisib induit une apoptose des cellules leucémiques<sup>316</sup>.

Une étude semble donc nécessaire pour savoir si les NLC pourraient favoriser la survie des cellules leucémiques, même à un faible niveau quand ces cellules sont traitées par de l'ibrutinib ou de l'idélalisib à des concentrations pertinentes, similaires à celles observées *in vivo* chez le patient traité.

### III.C.7 Cibler les « nurse-like cells » : le nouvel Eldorado de la leucémie lymphoïde chronique ?

Au vu de leur rôle aussi bien dans la physiopathologie que sur le pronostic des patients, deux stratégies ont d'ores et déjà été utilisées pour cibler les effets des NLC.

La première consiste à promouvoir la différenciation des monocytes en M1 anti-tumoraux plutôt qu'en NLC, grâce au légalidomide, qui permet notamment de restaurer les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T dans la LLC<sup>317-319</sup>. Ainsi, *in vitro*, cette drogue permet non seulement d'augmenter l'adhésion des cellules CD14<sup>+</sup> lors de co-culture avec des cellules leucémiques mais aussi de diminuer la migration de ces monocytes suite à des stimuli cytokiniques tels que CCL2 et CCL3. Le profil transcriptomique de ces cellules traitées par légalidomide montre une activation des gènes codant pour des protéines impliquées dans les réponses immunitaires, l'activation et la prolifération des cellules T et les mécanismes de présentation de l'Ag. Phénotypiquement, ces cellules ont un phénotype de M1 avec une plus

## INTRODUCTION

### Les macrophages associés aux tumeurs

forte expression de marqueurs spécifiques tels que MAC-1 (Macrophage-1 antigen) et CD11b et une plus faible expression de marqueurs de M2 tel que le CD163. Les capacités de ces cellules traitées sont aussi modifiées. On observe que ces cellules sont de nouveau capables de stimuler la prolifération T indiquant que leurs capacités de CPA sont restaurées. De plus, leurs capacités phagocytiques sont elles aussi augmentées. Enfin leur profil cytokinique est proche de celui des M1, avec une forte expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 et s'éloigne de celui des M2 avec une diminution de la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10<sup>262</sup>. L'ensemble de ces résultats indique que les monocytes de LLC peuvent, lors du traitement par légalidomide, devenir des M1.

L'autre stratégie vise le récepteur CXCR4 qui se lie à CXCL12, la chémokine produite par les NLC est impliquée dans la migration et la survie des cellules leucémiques<sup>42</sup>. Ainsi les deux antagonistes de CXCR4, l'AMD3100 et le T41 qui sont de petits peptides, diminuent la migration des cellules leucémiques induite par CXCL12<sup>320</sup>. Parallèlement, on observe une diminution de l'activation des voies de signalisation dépendantes de Erk au sein de ces cellules conduisant à un antagonisme des effets pro-survie des cellules du microenvironnement telles que les NLC *via* une diminution de l'expression de Mcl-1 et de FLIP, deux protéines anti-apoptotiques<sup>320, 321</sup>. L'ensemble de ces travaux indiquent clairement qu'en inhibant la migration et les effets pro-survie de CXCL12, les antagonistes de CXCR4 permettent de combattre les effets pro-survie des NLC. L'AMD3100 ou PERIXAFOR® est actuellement en essai clinique de phases I et II notamment dans le traitement de la LLC en rechute en association au rituximab (NCT00694590), en association avec le légalidomide (NCT01373229), ou dans la mobilisation des cellules souches en pré-greffe de moelle osseuse (NCT01076270, NCT01408043, NCT01097057, NCT01610999, NCT00241358, NCT01068301). Les résultats des études de phase II permettront de connaître l'efficacité de cette molécule et donc son intérêt futur dans le traitement de la LLC.

Aujourd'hui aucun travail n'a ciblé directement les NLC ou leurs interactions avec les cellules leucémiques afin de contrer leurs effets pro-survie. Un tel travail serait intéressant à réaliser.

### III.C.8 Les « nurse-like cells », des cellules spécifiques de la leucémie lymphoïde chronique ?

Cette question, volontairement provocatrice, s'appuie sur deux publications. Dans la première, Bhattacharya et son équipe ont montré qu'il existait au sein des ganglions de donneurs sains des cellules CD14<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup> tout comme les NLC chez le patient <sup>267</sup>. De même, leur étude montre qu'*in vitro*, les cellules CD14<sup>+</sup> de donneurs sains en contact avec des lymphocytes B normaux peuvent se différencier en cellules NLC « like », appelées NLC « saines », exprimant BAFF, APRIL et CD31. Ces cellules sont capables de promouvoir la survie des lymphocytes B, tout comme les NLC promeuvent la survie des cellules leucémiques <sup>267</sup>. Les NLC ne seraient en fait que des macrophages similaires à ceux observés chez les donneurs sains et donc absolument non spécifiques de la LLC. Néanmoins dans une deuxième publication parue la même année, ces mêmes auteurs ont montré que les NLC diffèrent de ces NLC « saines » notamment à cause d'une diminution de l'expression des molécules de CMH de classe II telles que HLA-DR et CD74, une diminution de la production de lysozyme et une augmentation de l'expression de FCGR2B <sup>322</sup>. Au niveau transcriptomique, les NLC sous-expriment différentes voies de signalisation par rapport aux NLC « like » notamment celle de la présentation de l'Ag, de la dégradation des bactéries gram<sup>+</sup> et celle de la captation des particules opsonisées <sup>322</sup>. Ces voies de signalisation étant typiques des M1, on peut raisonnablement penser que les NLC sont des M2 tandis que les NLC « saines » sont plus des M1. Les critiques majeures de ces publications sont : i) les méthodes de culture *in vitro* ne sont absolument pas pertinentes de ce que l'on observe chez le patient. En effet, les auteurs ont utilisé un ratio de deux lymphocytes B/cellules leucémiques pour un monocyte ce qui n'est jamais observé chez le patient. ii) Les auteurs n'ont pas observé si les NLC pouvaient ou non promouvoir la survie des lymphocytes B normaux et inversement si les NLC « saines » favorisaient la survie des cellules leucémiques. Une étude déterminant si, à un ratio entre lymphocytes B/cellules leucémiques et monocytes identique à celui observé chez le patient, les NLC et les NLC « like » pourraient promouvoir la survie des cellules leucémiques et des lymphocytes B semble nécessaire afin de déterminer la spécificité des NLC dans la LLC. Enfin, il serait intéressant d'effectuer des co-marquages CD68 et CD163 sur des ganglions de donneurs sains afin d'observer si ces cellules CD14<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup> partagent ou non ce marqueur plus spécifique des TAM, avec les NLC.

## OBJECTIFS DE LA THESE

Malgré les avancées thérapeutiques de la dernière décennie, la LLC reste toujours une maladie incurable. Si le caryotype ou les mutations récurrentes des cellules leucémiques ont des impacts pronostiques bien définis dans la maladie et permettent une prise en charge personnalisée des patients, l'influence du microenvironnement tumoral de la LLC, notamment des TAM, reste encore peu étudié. Les NLC, qui sont bel et bien les TAM de la LLC, ont ainsi un impact pronostique incertain. En effet, les NLC résident dans les ganglions lymphatiques et ne sont pas présentes dans le sang périphérique. Or, ces ganglions ne sont que très rarement prélevés dans la LLC, ce qui peut expliquer en partie le faible nombre de publications les étudiant. D'autre part, cet impact pronostique ne fut observé que *via* des marqueurs indirects de NLC, tel que CCL3<sup>308</sup> et sHMGB1<sup>260</sup> produits par les cellules leucémiques, ou par une étude de tissus « micro-arrays » de ganglions, peu représentatifs du ganglion entier, marqués au CD68, peu spécifique de TAM<sup>260</sup>. Une étude s'intéressant clairement à l'impact pronostique des NLC manque donc cruellement.

L'objectif principal de mon travail de thèse a été de déterminer l'impact pronostique des NLC dans la LLC. Pour cela, nous avons corrélé l'infiltration ganglionnaire par des NLC à la progression de la maladie sur 27 ganglions. Afin de conforter cette corrélation, nous avons observé si les facteurs solubles relargués par les NLC pouvaient être associés à des marqueurs pronostiques précédemment établis dans la LLC et si ces marqueurs pouvaient prédire l'évolution de cette pathologie, afin de trouver un marqueur pronostique simple d'accès, potentiellement réalisable en routine hospitalière, reflétant les NLC et leurs effets sur l'agressivité de la LLC.

Le rôle chimioprotecteur des NLC est lui aussi peu clair notamment vis-à-vis des nouvelles thérapies. Ainsi, si les NLC peuvent protéger *in vitro* de la dexaméthasone et du chlorambucil<sup>323</sup>, elles n'ont en revanche aucun effet protecteur lors du traitement par fludarabine<sup>313</sup>.

Nous avons donc voulu connaître les effets potentiels de l'ibrutinib, l'une des nouvelles thérapies dans le traitement de la LLC, sur les NLC. Nous avons donc étudié si, lorsque les patients sont traités, il y avait une modification de la localisation, de la différenciation ou du

## OBJECTIFS DE LA THESE

phénotype des NLC. Puis nous nous sommes intéressés aux potentiels effets chimioprotecteurs des NLC sur les cellules leucémiques, lorsque celles-ci sont traitées *in vitro* par les agents classiquement utilisés dans le traitement de la LLC.

## MATERIELS ET METHODES

### Culture et préparation cellulaire

Les prélèvements sanguins ont été obtenus après un consentement éclairé et ils ont été stockés dans la bibliothèque HIMP. En accord avec la loi française, la bibliothèque HIMP est déclarée au Ministère de l'Education Supérieure et de la Recherche (DC 2008-307 collection 1). Elle a aussi obtenu un agrément de transfert après l'approbation du « Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II ». Les données biologiques et cliniques de ces prélèvements ont été déclarées à la CNIL (Comité National Informatique et Libertés).

Les PBMC (Peripheral Mononuclear Cells) sont isolées après centrifugation par gradient de densité à partir des prélèvements sanguins provenant de patients, traités ou non, ou de donneurs sains. Les PBMC sont cultivées à forte densité ( $10 \cdot 10^6/\text{mL}$  dans des plaques de culture 6 puits, 4mL par puits) pendant quinze jours à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans du RPMI-1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé (Gibco BRL, Rockville, MD, USA), de la pénicilline à 100U/mL, de la streptomycine à 100µg/mL (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et 2mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA).

Les NLC « saines » sont obtenues après quinze jours de culture de PBMC de donneurs sains.

Les NLC sont obtenues après quinze jours de culture de PBMC de patients.

Les NLC « hétérologues » sont obtenues par coculture de cellules CD14<sup>+</sup>, purifiées à partir de PBMC de donneurs sains (Dynabead Untouched Human Monocytes Kit, Invitrogen, France), avec les PBL (peripheral blood lymphocytes) de patients à un ratio de 0.7% de monocytes et de 99.3% de PBL.

Les PBL sont séparés des NLC par de multiples pipetages vigoureux. Les cellules adhérentes (NLC, NLC « hétérologues » et NLC « saines ») sont obtenues après décrochage en utilisant un « cell scraper ».

## Détermination du statut IgHV, des anomalies caryotypiques et des mutations récurrentes

La détection de toutes ces anomalies est effectuée au laboratoire de cytogénétique du CHU de Toulouse Purpan.

Le statut IgHV est déterminé en séquençant les produits de PCR générés par la combinaison des peptides « leader » de la famille VH avec des primers spécifiques (FKS\_LS\_VH1 à FKS\_LS\_VH6) contenant la séquence consensus JH (B2\_JHcons).

Le caryotype est obtenu à partir des cellules du sang périphérique cultivées 72h avec des oligonucléotides CpG DSP30 (250nM) et de l'IL-2 (20UI/mL). La FISH est réalisée sur les noyaux cellulaires en interphase et en métaphase *via* la méthode du marquage en bandes R.

Les « hotspots » mutationnels des gènes *TP53* (exons 4-9, RefSeq NM\_000546.5), *SF3B1* (exons 14-16, RefSeq NM\_012433.2), *NOTCH1* (exon 34, RefSeq NM\_017617.2), *MYD88* (exon 5, RefSeq NM\_002468.4) et *BRAF* (exon 15, RefSeq NM\_004333.4) sont analysés par PCR dans un LightCycler LC 480 (Roche, Basel, Suisse). Les séquences des primers sont fournies dans la Table 7. Pour *TP53*, *SF3B1*, *MYD88* et *BRAF* les mutations sont validées par séquençage par la méthode de Sanger des amplicons retrouvés positifs par PCR (3130 XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Pour les patients présentant une délétion 17p, le séquençage de *TP53* est systématiquement réalisé. Les mutations *TP53* et les délétions *TP53* sont regroupées et appelées altérations de *TP53*. La mutation *NOTCH1* est validée par électrophorèse capillaire des amplicons.

Gene	Exon	Details
<b>TP53</b>	Exon 4	S : CTGCACCAGCAGCTCCTACA AS : CAGGCATTGAAGTCTCATGGAA
	Exon 5	S : CAACTCTGTCTCCTTCCTCCTCCTAC AS : GTCGTCTCTCCAGCCCCAGC
	Exon 6	S : CCTCTGATTCTCACTGATTGC AS : CTTAACCCTCCTCCCAGAG
	Exon 7	S : CCTCATCTTGGGCCTGTGTTA AS : GCTTCTTGTCTGCTTGCTT
	Exon 8	S : TTGCTTCTCTTTTCTATCCTGA AS : GCTTCTTGTCTGCTTGCTT
	Exon 9	S : CCTTTCCTTGCCTCTTTCT AS : CCACTTGATAAGAGGTCCCAAG
	Exon 10	S : TCCCCCTCCTCTGTTGCT AS : GAATCCTATGGCTTTCCAACCTAG
<b>SF3B1</b>	Exon 14	S : GTCTGGCTACTATGATCTCTACCATGA AS : GATGTGGCAAGATGGCACAG
	Exon 15	S : TGAATAGTTGATATATTGAGAGAATCTGGA AS : AGGTAATTGGTGGATTTACCTTTCC
	Exon 16	S : TGTGTTAAAGCCTTTATGGAAGGGTAT AS : ACATATCCAGTTTACATTAACAAATCTGGA
<b>NOTCH1</b>	Exon 34	S : GTGACCGCAGCCCAGTTC AS : GGCGATCTGGGACTGCAT
<b>MYD88</b>	Exon 5	S : GGGGGATGGCTGTTGTT AS : TGGACAGGCAGACAGAT
<b>BRAF</b>	Exon 15	S : CTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAG AS : TGGATCCAGACAACCTGTTCAA

Table 7: Détails des amorces utilisées pour le séquençage des mutations récurrentes (S : séquence « sens », AS : séquence « antisens »).

## Cytométrie en flux

Les Ac monoclonaux utilisés sont : Ac anti-CD5 (PC7), Ac anti-CD14 (ACP-Cy7), Ac anti-CD68 (PE), AC anti-CD163 (APC), Ac anti-APRIL (PE), Ac anti-BAFF (PE) et leurs contrôles isotypiques respectifs, obtenues chez Biologend (Ozyme, France) ; Ac anti-CD11b, Ac anti-CD16 (APC-Cy7), Ac anti-CD31 (Alexa fluor 647), Ac anti-CD86 (APC), Ac anti-CD163 (PE), Ac anti-CD33 (FITC) et leurs contrôles isotypiques respectifs obtenues chez BD Biosciences (France).

Pour les marquages extracellulaires, les cellules sont incubées avec 5µg/mL d'Ac ou d'isotype contrôle pendant 20 minutes à 4°C dans du PBS (phosphate buffer saline) supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal inactivé, puis lavées et analysées avec un cytomètre en flux BD LSR II (BD Biosciences, Pont de Claix, France).

Pour les marquages intracellulaires, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 2% et perméabilisées avec de la saponine 1%. Ensuite, les cellules sont incubées 30 minutes à 4°C

avec les Ac spécifiques ou leurs contrôles isotypiques respectifs, lavées puis analysées avec le même cytomètre.

Les données de cytométrie sont traitées en utilisant le logiciel BD Diva ®.

## Viabilité cellulaire

Les PBL de donneurs sains ou de patients sont cultivés à 1M/mL avec des NLC, des NLC « hétérologues », des NLC « saines » ou seuls pendant 12 jours. La viabilité des cellules leucémiques ou des lymphocytes B est évaluée tous les deux jours *via* leur capacité à exclure l'iodure de propidium.

## Expression génique

Les ARN totaux des NLC et des NLC « hétérologues » sont isolés en utilisant du TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). La qualité de ces ARN est contrôlée avec un Agilent Bioanalyser (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) après une dénaturation à 70°C pendant deux minutes. Les analyses transcriptomiques sont réalisées en utilisant 1 à 3 µg d'ARN totaux, amplifiés et marqués suivant le protocole « one-Cycle Target labeling » (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Les ARN complémentaires marqués de ces échantillons sont ensuite fragmentés et hybridés à une puce Affymetrix GeneChip arrays HG-U133 2.0. Les puces sont ensuite lavées, scannées et analysées avec le logiciel GeneChip Operating Software ® (Version 1.1, Affymetrix) au sein de l'institut de recherche en biothérapie de Montpellier (CHRU-INSERM-UM1 Montpellier). Les données brutes de transcriptomique (fichier Affymetrix CEL) de NLC et de NLC « hétérologues » sont normalisées avec le logiciel RMA et les 54676 probset sont réduits à 20606 gènes en utilisant le logiciel GSEA (GSEA, <http://www.broadinstitute.org/gsea>), puis les NLC furent comparées aux NLC « hétérologues » avec un test de Student avec une correction de Welsh et un fold change de 1.5.

## **Immunohistochimie et microscopie confocale**

Les échantillons de ganglions lymphatiques de patients ou d'amygdales réactives fixés dans 10% de formaline, proviennent de la banque de tissus du service d'anatomopathologie de l'hôpital Toulouse Purpan collectés entre 2000 et 2011.

Pour l'immunohistochimie, des sections de 3µm d'épaisseur furent marquées avec de l'hématoxyline et de l'éosine, un Ac anti-CD163 (clone 10D6 dilué au centième, Dako) et par un Ac anti-Ki67 (clone MIB-1 dilué au centième, Dako). Les coupes ainsi marquées furent scannées avec un 20X/NA0.80 Zeiss Plan-Apochromat et les images furent acquises par une caméra couleur de trois CCD de deux mégapixels (CIS Cam ref VCC-F52U25C1, CIS America, Tokyo, Japon). Après avoir délimités manuellement les centres de proliférations au sein de chaque ganglion de patient *via* le marquage Ki67, les cellules CD163<sup>+</sup> de chaque ganglion furent comptées par une anatomopathologiste du CHU de Toulouse.

Pour la microscopie confocale, les échantillons furent prétraités dans un bain de citrate de sodium (0.1M, pH=6) puis perméabilisés avec de la saponine 1%. Ensuite, ils furent marqués par un Ac anti-CD68 (clone PGM1 dilué au vingtième, Dako) et un Ac anti-CD163 (clone 10D6 dilué au dixième). Un marquage en double couche fut effectué avec des Ac de chèvre anti-souris (Ac couplé à l'Alexa fluor 488 ou à l'Alexa 555) ou leurs contrôles isotypiques respectifs pendant deux heures à température ambiante. Les lames furent ensuite montés et analysés en utilisant un microscope confocal Zeiss LSM710 (Carl Zeiss, Marly le Roi, France).

## **Collection de sérums et ELISA**

Les sérums furent obtenus par centrifugation des prélèvements sanguins des patients lors de leurs première visite dans notre centre et furent stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

Les ELISA (enzyme linked immusorbent assay) pour détecter le sCD163 (RD systems, UK), le sHMGB1 (Cusabio, Wuhan, Chine), et le sCD68 (Wuhan, EIAb Science, Wuhan, Chine) furent réalisés selon les instructions des fournisseurs respectifs sur les sérums de patients ou de donneurs sains.

## Numération formule sanguine

Les NFS furent réalisées par le laboratoire d'hématologie du CHU Toulouse Purpan par cytométrie en flux.

## Drogues

L'ibrutinib, l'idélalisib et le dasatinib furent obtenues chez Selleckchem® (Houston, Texas, USA). Le rituximab fut acheté chez Roche® (Basel, Suisse). La bendamustine fut obtenues chez Sigma-Aldrich® (Saint-Louis, Missouri, USA). Toutes ces drogues furent utilisées à des concentrations mimant les concentrations maximales observées chez les patients lors des essais cliniques.

## Analyses statistiques

Les variables continues sont résumées avec des statistiques descriptives telles que la moyenne, la déviation standard et la médiane. Les variables catégorielles sont résumées *via* leur fréquence et leur pourcentage. Un test de Fisher exact est utilisé pour comparer deux variables catégorielles et un test de Wilcoxon est utilisé pour les variables continues. La corrélation de Spearman est utilisée pour évaluer la corrélation entre deux variables continues.

Le temps avant premier traitement (TTFT) est défini comme le temps depuis le diagnostic jusqu'à la première ligne de traitement si le patient en a reçu une, ou censurée à sa dernière visite. Le temps jusqu'à retraitement (TTNT) est défini comme la durée entre la première et la deuxième ligne de traitement, s'il en a reçu une, ou censuré à sa dernière visite. La survie globale (OS) est définie comme la durée depuis le diagnostic jusqu'au décès du patient, s'il décède, ou censurée à sa dernière visite. L'OS post-traitement est défini comme la durée depuis la première ligne de chimiothérapie jusqu'au décès du patient, s'il décède ou censurée à sa dernière visite. La survie sans progression (PFS) est définie comme la durée entre la première ligne de traitement et la rechute ou la mort du patient, si ces événements arrivent, ou censuré à sa dernière visite. Tous ces paramètres furent estimés par la méthode de Kaplan Meyer et un test de log-rank fut utilisé pour comparer les différences entre les groupes.

## MATERIELS ET METHODES

Les analyses statistiques furent réalisées avec les logiciels Prism ® et Statistica ®. Pour l'ensemble de ces tests, les différences sont considérées comme significatives si elles sont inférieures à 0.05 (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

## RESULTATS

### I. Le taux de sCD163 est un facteur pronostique dans la leucémie lymphoïde chronique

Si le rôle des NLC *in vitro* est aujourd'hui clairement défini, leur impact pronostique reste peu clair. En effet, CCL3 et sHMGB1, bien qu'ayant un impact pronostique, ne sont reliés qu'indirectement aux NLC car ils sont produits ou relargués par les cellules leucémiques<sup>260, 308</sup>. De plus la seule étude histologique réalisée sur des ganglions lymphatiques de malade a été réalisée avec un marquage CD68, peu spécifique, et sur des tissus « micro-arrays », peu représentatifs des ganglions entiers<sup>260</sup>. Nous avons donc voulu déterminer clairement l'impact pronostique des NLC dans la LLC. Pour cela, nous avons cherché quel pourrait être le marqueur le plus spécifique des NLC *in vitro* et *in vivo*. A l'aide de ce marqueur, nous avons ensuite sur des coupes histologiques de ganglions de patients, regardé s'il existait une corrélation entre NLC et progression de la maladie. Puis, nous avons étudié si les facteurs solubles relargués par les NLC et retrouvés dans le sérum, pouvaient être associés à des facteurs pronostiques précédemment établis dans la LLC et si leur taux pouvaient être reliés à l'évolution de la LLC.

#### I.A Caractéristiques des patients de l'étude

Toutes les caractéristiques clinico-biologiques des 94 patients de l'étude sont présentées dans la Table 8 et la Table 9. Il s'agit d'une population de patients jamais traités. Le sex-ratio est respecté, la majorité des patients sont Binet stade A. On observe une plus forte proportion de patients IgHV non mutés que dans la population générale. Concernant les anomalies caryotypiques dans notre cohorte, nous avons, par rapport à la population générale, peu de délétion 13q14, un taux normal de délétion 11q22-23, 17p13, 6q, et de trisomie 12. Pour ce qui est des mutations récurrentes, nous avons dans notre cohorte, plus d'altérations de *TP53*, un taux normal de mutations *NOTCH1*, *SF3B1*, *BRAF* et un faible taux de mutation *MYD88* par rapport à la population générale des patients (Table 8).

Characteristics	Category	n (%)
<b>Sex</b>	Female	29 (30.9)
	Male	65 (69.1)
<b>Binet Stage</b>	A	38 (40.4)
	B	29 (30.9)
	C	22 (23.4)
<b>IgHV statuts</b>	Mutated	44 (46.8)
	Unmutated	38 (40.4)
<b>Cytogenetics</b>	Normal FISH	12 (12.8)
	Trisomy 12	13 (13.9)
	Deletion 13q	29 (30.9)
	Deletion 6q	4(4.2)
	Translocation IgH-Bcl2	4 (4.2)
	Deletion 11q	11 (11.7)
	Deletion 17p	6 (6.4)
	Complex karyotype	15 (15.9)
<b>Recurrents mutations</b>	<i>SF3B1</i>	5 (5.3)
	<i>NOTCH1</i>	14(14.9)
	<i>TP53</i>	8 (8.5)
	<i>MYD88</i>	1 (1.1)
	<i>BRAF</i>	1(1.1)

Table 8: Caractéristiques cliniques des 94 patients (variables catégoriques).

La Table 9 est typique d’une population hétérogène de LLC, avec une lymphocytose et une monocytose élevées.

Characteristics	Mean (SD)	Median (range)
<b>Age</b>	66 (8.38)	66 (41-86)
<b>Lymphocytosis (G/L)</b>	60.81 (40.13)	55.3 (6.5-159.8)
<b>Monocytosis (G/L)</b>	1.27 (0.93)	1.02 (0-4.2)

Table 9: Caractéristiques cliniques des 94 patients (variables continues).

## I.B L’analyse phénotypique révèle que les NLC sont proches mais distinctes des NLC « hétérologues »

Afin de déterminer le marqueur le plus spécifique des NLC, nous avons comparé les niveaux d’expression des marqueurs phénotypiques sur des NLC, des NLC « hétérologues » et des NLC « saines » générées préalablement par la méthode expliquée dans la Figure 44a. Brièvement, les NLC et les NLC « saines » ont été générées après 14 jours de culture de PBMC de patients atteints de LLC ou de donneurs sains respectivement. Les NLC « hétérologues » sont obtenues après co-culture de monocytes de donneurs sains triés et de cellules leucémiques de patients, le ratio monocytes/ cellules leucémiques étant choisi pour mimer celui observé chez les patients. En se basant sur le phénotype des NLC ( $CD14^{low}$ ,  $CD86^{low}$ ,  $CD68^{high}$  et  $CD163^{high}$ ), nous avons émis l’hypothèse que l’un de ces marqueurs pourrait être spécifique des NLC

comparativement aux autres types de NLC. Notre analyse a révélé que les NLC « hétérologues » présentent un profil d'expression semblable à celui des NLC, tandis que ces deux types cellulaires diffèrent très fortement des NLC « saines ». En effet, si les NLC et les NLC « hétérologues » présentent un profil phénotypique proche des TAM avec une forte expression du CD68 et du CD163, les NLC saines présentent quant à elles un profil proche des M1 avec une forte expression de CD14 et CD86 (Figure 44b). Le seul marqueur différenciant les NLC des NLC « hétérologues », sur les onze étudiés, est le CD163, qui est plus fortement exprimé sur les NLC. Cela indiquerait que le meilleur marqueur de NLC différenciées *in vitro* est le CD163. De plus, nous avons réalisé une étude transcriptomique de trois NLC « hétérologues » et de trois NLC. Par analyse supervisée, nous avons mis en évidence que ces deux types cellulaires étaient très proches avec seulement 0.13% de gènes différentiellement exprimés (avec un fold change de 1.5) (Figure 44c). Ces expériences nous démontrent que le phénotype des NLC provient majoritairement d'une corruption des cellules CD14<sup>+</sup> par les cellules leucémiques et non pas d'une prédisposition des monocytes de patients.

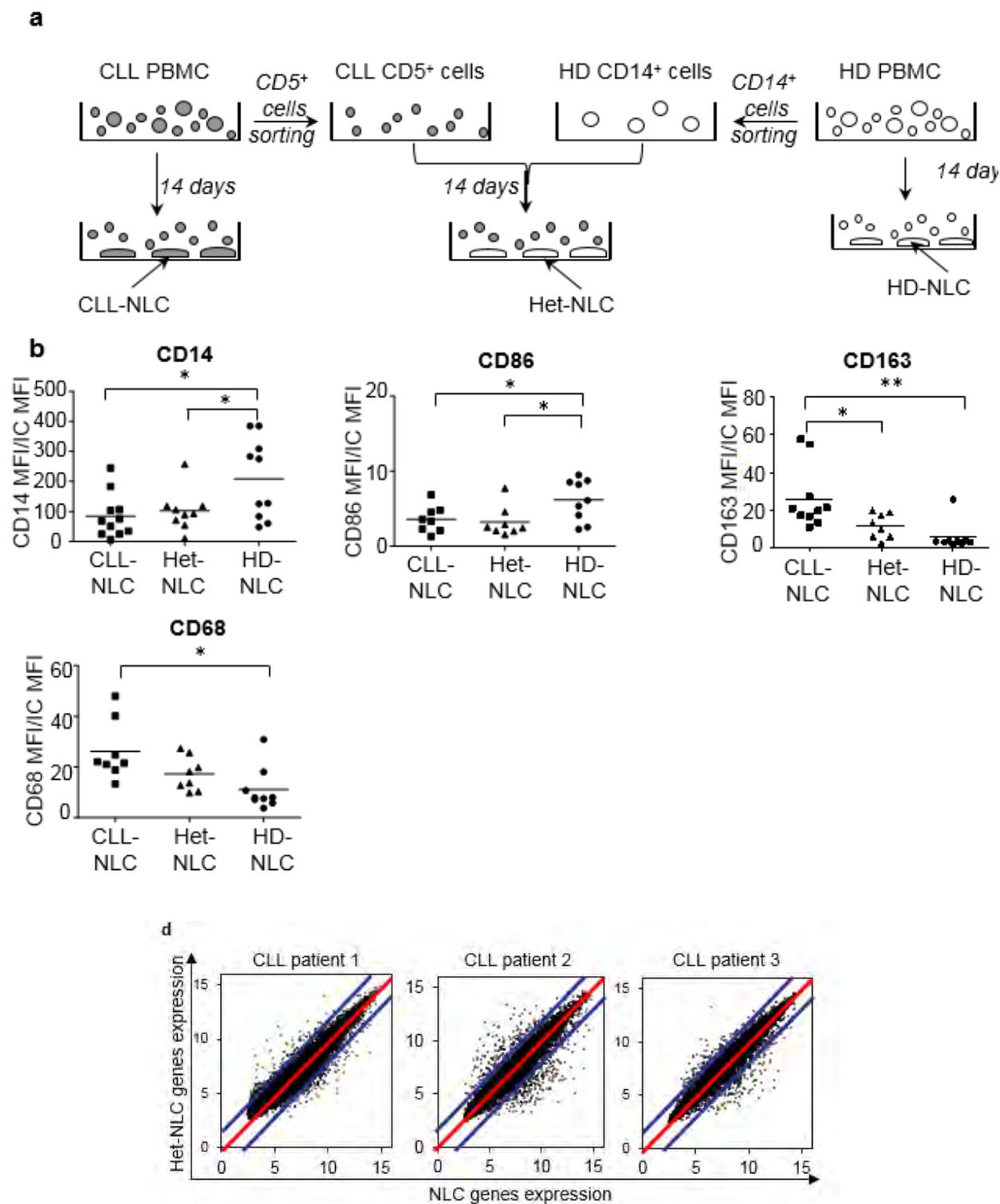


Figure 44 : Les NLC ont un profil d'expression phénotypique proche mais distinct des NLC « hétérologues » et des NLC « saines ». (a) Les PBMC de patients (gauche) ou de donneurs sains (droite) sont cultivés pendant 14 jours, ou les monocytes purifiés de donneurs sains sont cultivés 14 jours avec des cellules leucémiques (centre) (CLL NLC : NLC, Het-NLC : NLC « hétérologues », HD-NLC : NLC « saines »). (b) Analyse de l'expression de différents marqueurs (MFI (moyenne d'intensité de fluorescence) (marqueur/ MFI contrôle) à la surfaces des NLC (■), des NLC « hétérologues » (▲), ou des NLC « saines » (●) après 14 jours de culture (9 expériences indépendantes). (d) Analyse transcriptomique supervisée des transcriptomes de NLC et de NLC « hétérologues ». (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ).

## I.C LES NLC et les NLC « hétérologues » favorisent la survie des cellules leucémiques mais pas les NLC « saines »

Nous nous sommes ensuite intéressés aux capacités fonctionnelles des trois types cellulaires. Pour cela, nous avons comparé leurs capacités à favoriser la survie de cellules leucémiques ou de lymphocytes B normaux. Comme précédemment décrit, les taux d'expression de CD31, BAFF et APRIL sur les trois types de NLC <sup>267</sup> sont identiques (Figure 45 :a). Par un test de survie, nous avons mis en évidence que seules les NLC et les NLC « hétérologues » étaient capables de favoriser la survie des cellules leucémiques (Figure 45 :b). En effet, en présence de NLC ou de NLC « hétérologues », la survie des cellules leucémiques est significativement augmentée par rapport aux cellules leucémiques cultivées seules, tandis que la co-culture avec des NLC « saines » ne provoque pas de variation de cette survie. Enfin, aucun des types de NLC n'est capable de promouvoir la survie des lymphocytes B normaux (Figure 45 :c).

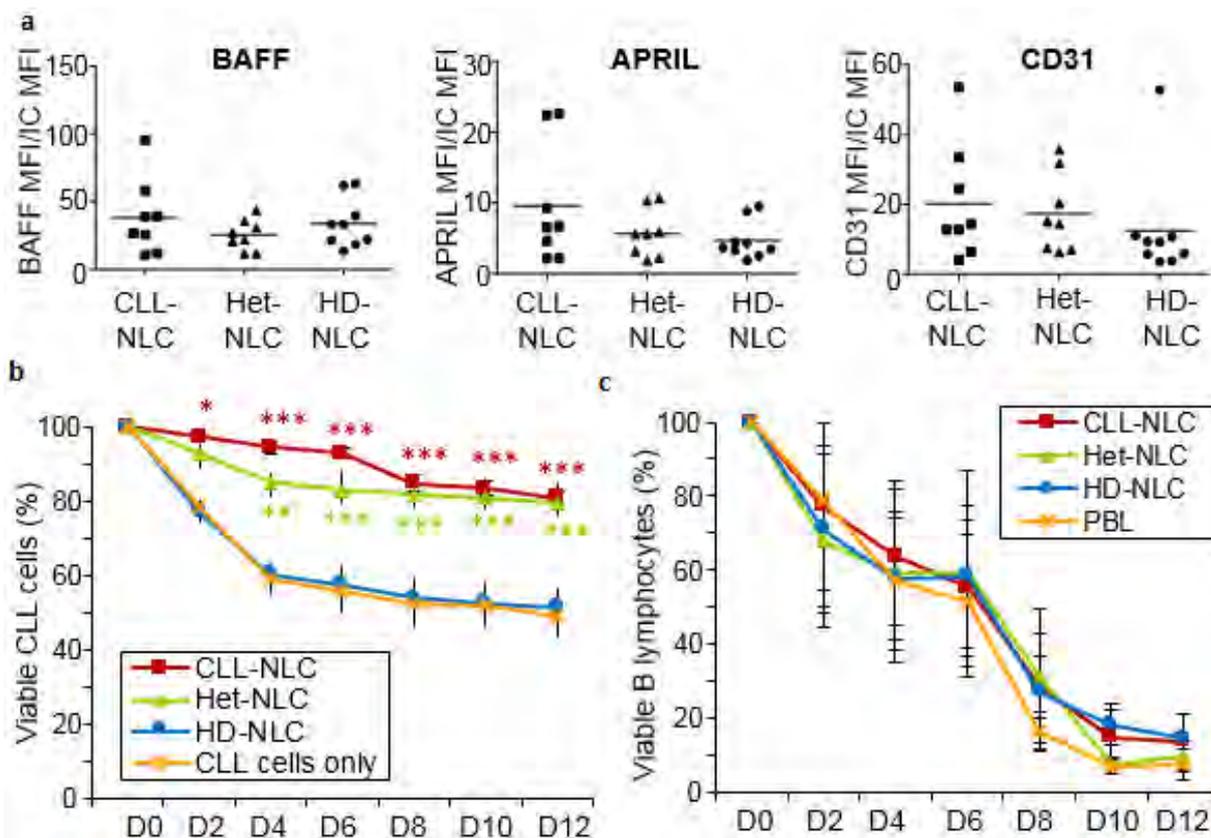


Figure 45 : Les NLC et les NLC « hétérologues » favorisent la survie des cellules leucémiques. (a) Analyse de l'expression de différents marqueurs (MFI (moyenne d'intensité de fluorescence) marqueur/ MFI contrôle) à la surface des NLC (■), des NLC « hétérologues » (▲), ou des NLC « saines » (●) (3 expériences indépendantes). (b) Pourcentage de viabilité des cellules leucémiques cultivées seules (x), ou avec des NLC (■), des NLC « hétérologues » (▲), ou des NLC « saines » (●) pendant 12 jours (3 expériences indépendantes). (c) Pourcentage de viabilité des lymphocytes B cultivés seuls (x), ou avec des NLC (■), des NLC « hétérologues » (▲), ou des NLC « saines » (●) pendant 12 jours (3 expériences indépendantes). (\*\*\*) : p<0.001).

Ces résultats, en contradiction apparente avec une publication précédente qui décrivait que les NLC « saines » pouvaient favoriser la survie des lymphocytes B<sup>267</sup>, peuvent s'expliquer par les différentes méthodes de culture. Nous avons voulu utiliser un ratio monocytes/ cellules leucémiques plus proche de celui observé en clinique, alors que dans cette publication, les auteurs se sont placés à un ratio artificiel d'un monocyte pour deux cellules leucémiques ou deux lymphocytes B. Nos résultats suggèrent quant à eux que l'effet pro-survie des NLC ou des NLC « hétérologues » est spécifique et résulte de l'éducation des monocytes par les cellules leucémiques.

### **I.D L'infiltration ganglionnaire par des cellules CD163<sup>+</sup> est associée à une maladie progressive**

Après avoir déterminé qu'*in vitro*, le CD163 semble être le marqueur le plus spécifique des NLC, nous avons ensuite recherché si *in vivo*, il pourrait aussi être le marqueur le plus spécifique des NLC et quel pouvait être l'impact pronostique de ces cellules chez le patient.

Nous avons donc examiné *in vivo* l'infiltration des ganglions de donneurs sains (amygdales réactives) ou des 27 ganglions de patients (Figure 46 :a). Chez les donneurs sains, les macrophages CD163<sup>+</sup> sont confinés dans les zones sous-capsulaires, le long des sinus lymphatiques et sont absents des zones B (Figure 46 :a1). Chez les patients, on observe deux profils d'infiltration ganglionnaire par les cellules CD163<sup>+</sup>. Le premier montre une infiltration présinusoidale (Figure 46 :a2), le second, une infiltration plus diffuse dans le parenchyme ganglionnaire (Figure 46 :3). Pour confirmer qu'il s'agissait bien de NLC, nous avons effectué un co-marquage CD68, CD163 sur ces mêmes ganglions. Cette étude histologique a révélé que ces cellules CD163<sup>+</sup> étaient toutes CD68<sup>+</sup>, tandis que les cellules CD68<sup>+</sup> n'étaient pas toujours CD163<sup>+</sup>, ce qui semble indiquer qu'*in vivo*, le CD163 est un meilleur marqueur de NLC (Figure 46 :b).

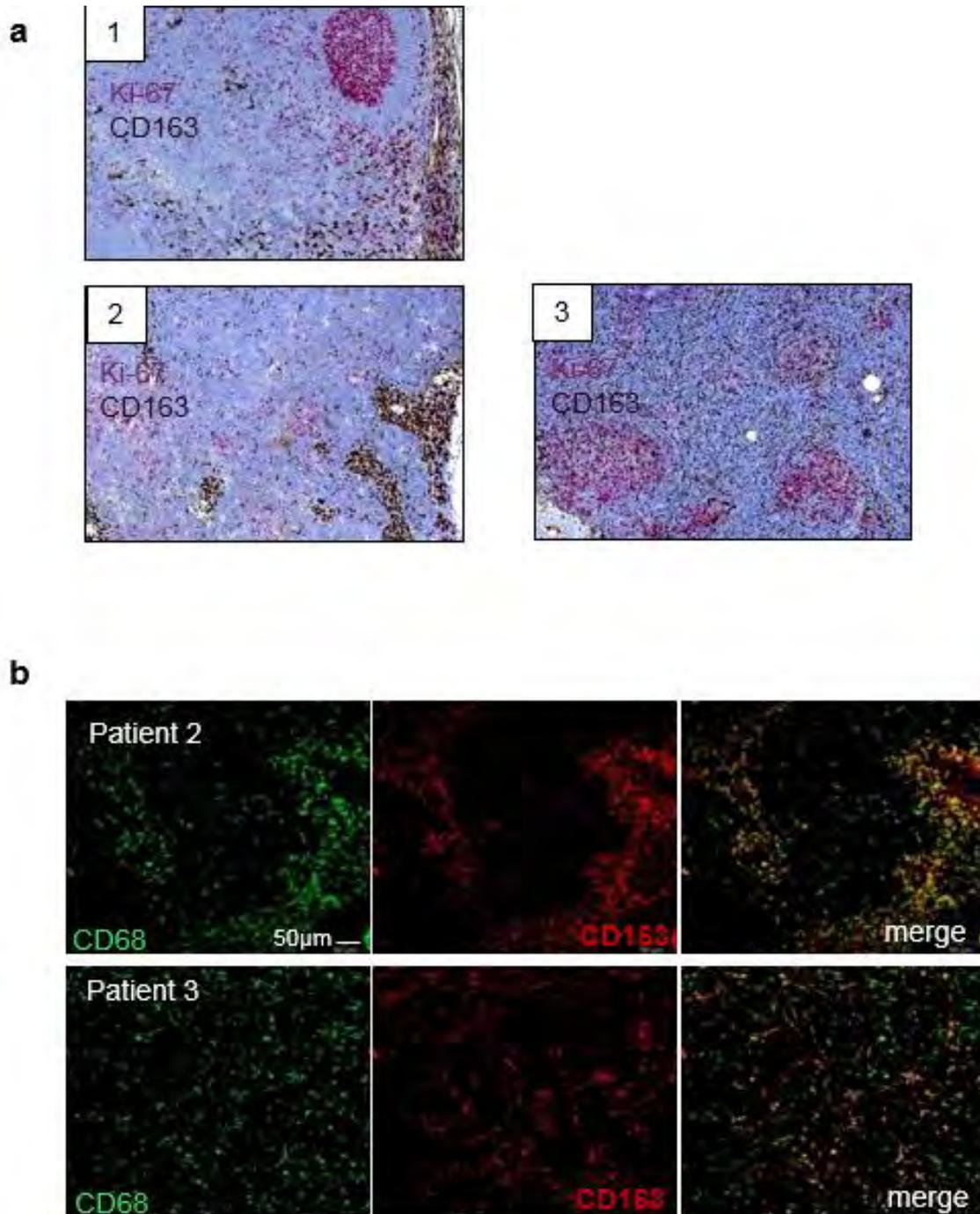


Figure 46 : Infiltration des NLC au sein des ganglions lymphatiques. (a) Marquage CD163 (marron) sur des ganglions sains (1) ou de patients (2-3) (x200). (a1) Les cellules CD163<sup>+</sup> sont présentes dans les sinus et sont exclues des centres germinatifs (rose) dans les ganglions de donneurs sains. (a2) Les cellules CD163<sup>+</sup> sont majoritairement présentes le long des sinus et exclues des centres de prolifération dans les ganglions de patients. (a3) Les cellules CD163<sup>+</sup> sont présentes dans tout le ganglion de patient, aussi bien dans qu'en dehors des centres de prolifération. (b) Co-marquage CD68 (vert), CD163 (rouge) sur des sections ganglionnaires de patients.

De plus, ces deux profils d'infiltration sont corrélés à la progression de la maladie. En effet, lorsque la maladie est progressive, une forte prolifération des cellules leucémiques au sein des ganglions lymphatiques est mise en évidence par un fort marquage Ki67<sup>+</sup>. Chez tous ces patients, on observe une forte infiltration ganglionnaire par les NLC aussi bien dans qu'en

dehors des pseudofollicules tandis que chez les patients pour lesquels on observe une faible prolifération, les cellules CD163<sup>+</sup> restent confinées dans la zone sous-capsulaire (Figure 47 : a-b).

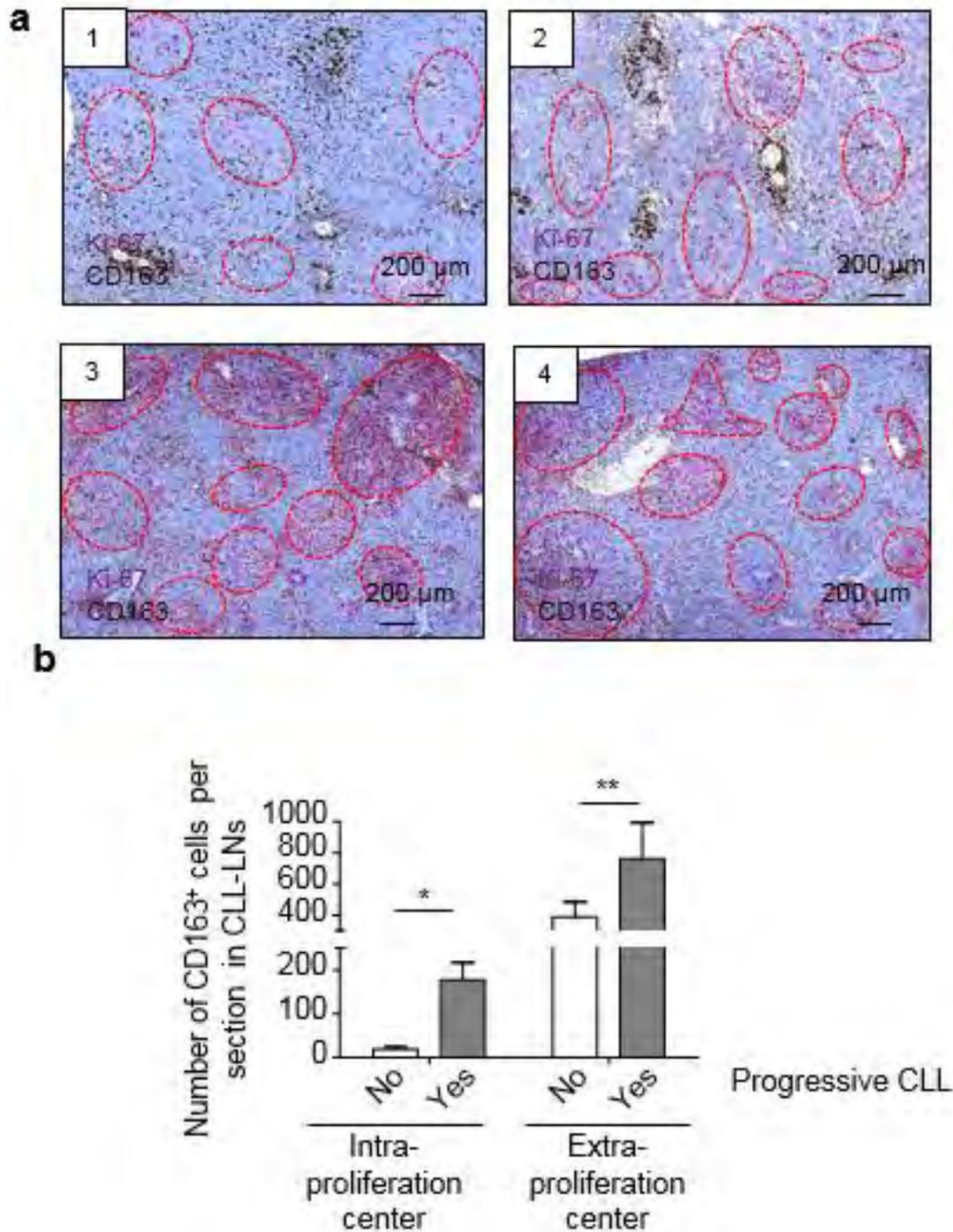


Figure 47 : La distribution et la densité des cellules CD163<sup>+</sup> dans les ganglions de patients sont associées à la progressivité de la maladie. (a) Images représentatives de la distribution et de la densité des cellules CD163<sup>+</sup> dans les ganglions de patients (x100). (1-2) Infiltration périsinusoïdale, (3-4) infiltration diffuse. Les NLC sont marquées par le CD163 en marron et les centres de proliférations par le KI67<sup>+</sup> en rose. (b) Quantifications relatives des cellules CD163<sup>+</sup> dans et en dehors des centres de prolifération en fonction de la progressivité de la maladie.

Ces résultats indiquent clairement qu'il existe, au sein des ganglions lymphatiques de patients, une population CD68<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> ressemblant aux NLC *in vitro*. De plus, l'infiltration de ces cellules au sein des ganglions semble liée à l'agressivité de la maladie.

### I.E Les concentrations de sCD163, sCD68 et sHMGB1 sont augmentées dans les sérums de patients comparés aux sérums de donneurs sains

Comme les prélèvements ganglionnaires ne sont pas réalisés en routine dans la LLC, nous avons cherché s'il existait des marqueurs solubles dans le sérum pouvant être le reflet des NLC présentes dans les ganglions. Notre attention s'est portée sur deux marqueurs de NLC pouvant être retrouvés sous forme soluble, le sCD68 et le sCD163. Nous avons décidé d'étudier aussi le sHMGB1, qui favorise la différenciation des monocytes en NLC. Comme montré dans la Figure 48 :, ces trois marqueurs sont significativement augmentés dans le sérum de patients comparés à celui de donneurs sains.

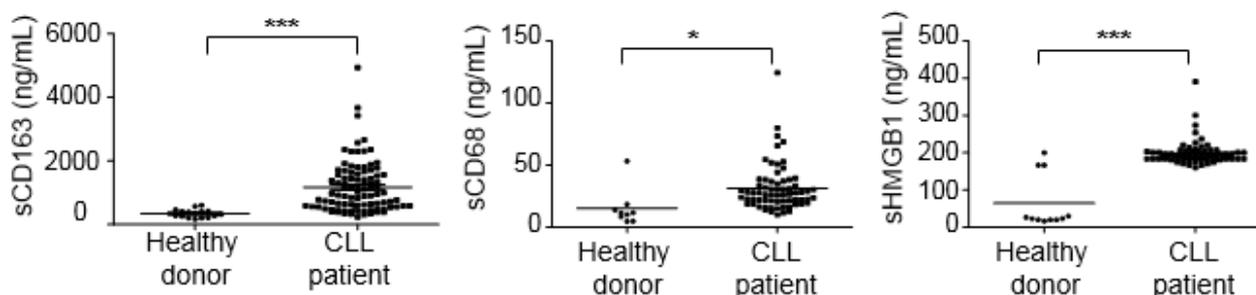


Figure 48 : Les concentrations en sCD163, sCD68 et sHMGB1 sont significativement augmentées dans le sérum des patients par rapport au sérum de donneurs sains.

### I.F La concentration en sCD163 est corrélée au statut IgHV, au caryotype complexe et aux altérations de TP53

Pour l'analyse de la corrélation entre sCD163, sCD68 et sHMGB1 et les marqueurs pronostiques préétablis dans la LLC, nous avons tout d'abord séparé en deux groupes les patients en fonction de leurs taux de sCD163, sCD68 et sHMGB1 en se basant sur la médiane de chaque facteur soluble (1000ng/mL pour le sCD163, 25ng/mL pour le sCD68 et 150ng/mL pour le sHMGB1). Les forts niveaux de sCD163 sont corrélés à des marqueurs de mauvais pronostic déjà connus dans la LLC tels que le statut IgHV non muté, le caryotype complexe et

RESULTATS

les altérations de *TP53* (Table 10). Il semblerait qu'il existe aussi une corrélation entre de forts taux de sCD163 et la délétion 17p13 ( $p=0.074$ ) ou la mutation *NOTCH1* ( $p=0.055$ ). Les forts ou faibles taux de sCD68 ou sHMGB1, quant à eux, ne sont associés à aucun facteur pronostique connu (Table 10).

Characteristics	Category	Median sCD163 (range)	p (CD163)	Median sCD68 (range)	p (CD68)	Median sHMGB1 (range)	p (HMGB1)
Age	<65y	887,4 (326.4-2312)		26,54 (10.1-26.5)		192,3 (167.3-390.7)	
	>65y	985 (302-4944)	0.6619	28.14 (11.6-124.6)	0.1918	190.7 (160.7-274.0)	0.482
Sex	Female	686 (375.2-3427)		28.30 (15.9-73.5)		190.7 (160.7-274.0)	
	Male	1098 (235-4944)	0.2586	26.16 (10.1-124.6)	0.3106	190.7 (167.3-390.7)	0.4563
IgHV status	Mutated	669 (302-4944)		22.3 (11.6-124.6)		190.7 (160.7-274)	
	Unmutated	1308 (235-2662)	<0.05	28.1 (12.7-73.5)	0.3858	194 (167.3-390.7)	0.5336
Cytogenetics	Normal FISH	799 (326-1845)	0.1822	24.6 (19.0-54.6)	0.7868	184 (160.7-204)	0.0861
	Trisomy 12	1227 (376-1558)	0.1152	25.2 (12.7-28.4)	0.8279	180.7 (174.0-197.3)	0.2823
	Deletion 13q	946 (375.2-2359)	0.7053	30.4 (15.9-68.9)	0.1632	190.7 (174.0-214.0)	0.9749
	Deletion 11q	597 (565-4944)	0.6617	31.1 (15.9-52.9)	0.5963	200.7 (174-390.7)	0.4194
	Deletion 17p	1775 (995-1922)	0.0743	17.5 (15.5-19.4)	0.2142	187.3 (184.0-190.7)	0.4897
	Complex karyotype	1845 (1162-1922)	<0.05	18.4 (15.5-19.4)	0.0799	189.0 (184.0-190.7)	0.1658
Recurrents mutations	<i>SF3B1</i>	1308 (621.1-2298)	0.2611	32.3 (18.2-68.9)	0.5839	185.7 (167.3-204.0)	0.3607
	<i>NOTCH1</i>	1562 (416-4944)	0.0555	32.8 (12.7-52.9)	0.1399	197.3 (184.0-254.0)	0.0718
	<i>TP53</i>	1764 (995-4944)	<0.01	35.1 (15.5-80.0)	0.4309	190.7 (180.7-204.0)	0.9766

Table 10 : Concentrations du sCD163, sCD68 et du sHMGB1 en fonction de marqueurs pronostiques préexistants dans la LLC.

## RESULTATS

D'autre part, aucun de ces marqueurs solubles n'est relié à la lymphocytose, la monocytose ou au statut de Binet des patients (Figure 49). Enfin, il n'existe aucune association entre les différents marqueurs solubles (Figure 49).

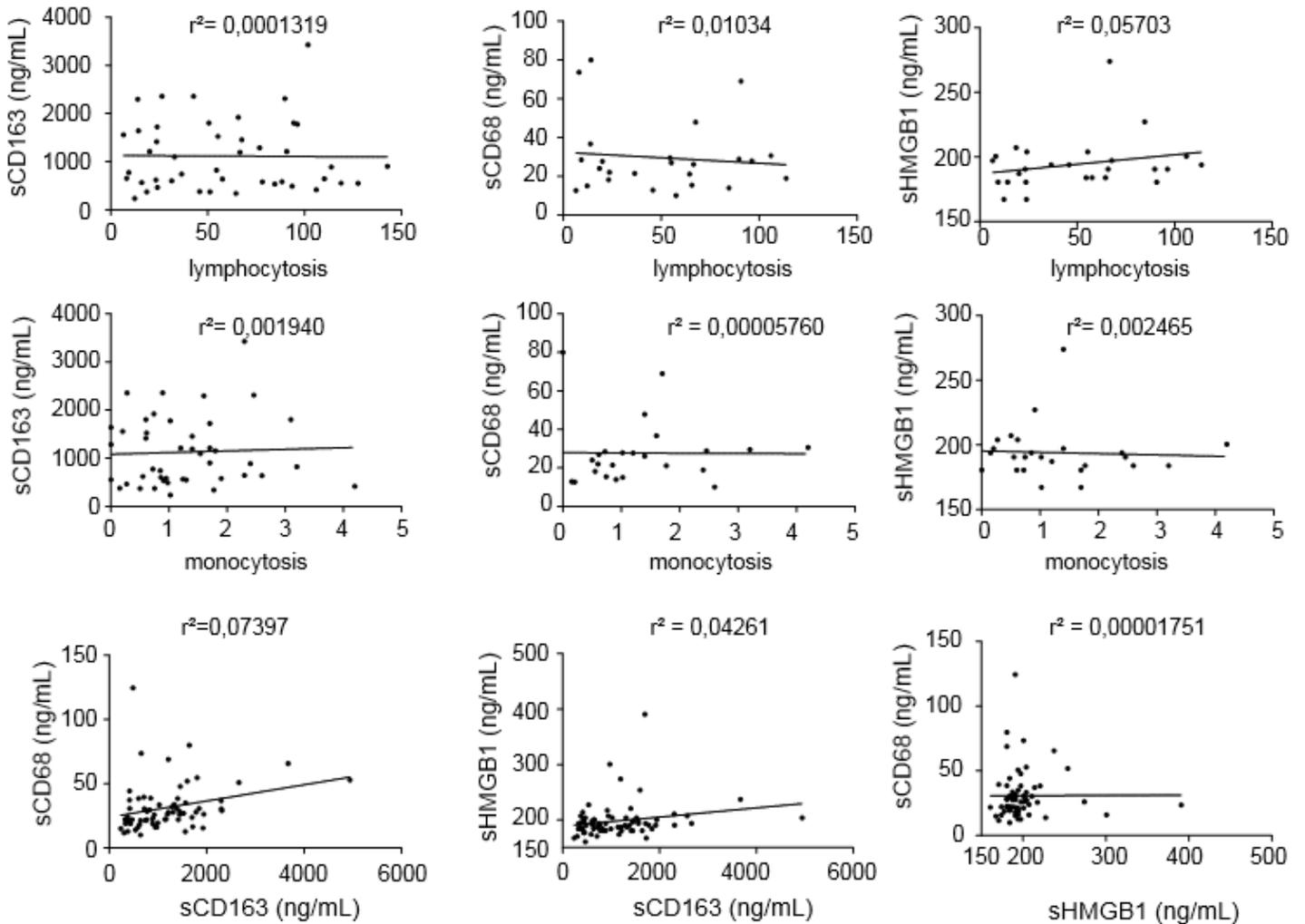


Figure 49 : Corrélation entre sCD163, sCD68 ou sHMGB1 et la lymphocytose, la monocytose et entre les différents marqueurs solubles.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggèrent pour la première fois qu'une LLC agressive est aussi reliée à une augmentation de son microenvironnement tumoral *via* une augmentation des NLC et de sCD163.

## I.G Le taux de sCD163, mais pas celui de sCD68 ni celui de sHMGB1 est associé à la l'évolution de la LLC

Sur les 94 patients de l'étude, 78 ont été traités par les protocoles détaillés dans la Table 11. Le temps avant le premier traitement (TTFT) pour la population globale est de 36 mois. Comme montré dans la Table 12, la médiane du TTFT dans les principaux sous-groupes varie peu, le statut de Binet avancé étant le seul facteur pour lequel le TTFT est diminué. En effet, un stade de Binet avancé est la principale indication de traitement. Le fait que les autres facteurs pronostiques n'influencent pas le TTFT peut être expliqué par la taille relativement faible de la cohorte.

Received treatment	Patients treated (%)
All	78 (100%)
Rituximab + fludarabine + cyclophosphamide	40 (51.29)
Rituximab + fludarabine	11 (14.11)
Rituximab + cyclophosphamide + dexamethasone	8 (10.27)
Rituximab + cyclophosphamide + pentostatine	5 (6.41)
Rituximab + bendamustine	3 (3.84)
Gemcitabine + alemtuzumab	3 (3.84)
Fludarabine + cyclophosphamide + alemtuzumab	2 (2.56)
Rituximab + chlorambucil	1 (1.28)
Rituximab + mini CHOP (cyclophosphamide + hydroxyadriamycine + vincristine + predinsone)	1 (1.28)
Rituximab mini CHV (cyclophosmamide + hydroxyadriamcycine + etoposide)	1 (1.28)
Chlorambucil	1 (1.28)
Fludarabine + cyclophosphamide	1 (1.28)
Mini CHOP	1 (1.28)

Table 11: Traitements reçus par les patients lors de la première cure de chimiothérapie.

Characteristics	Category	Total	Patients treated	Median TTFT, mo	p
	All patients	94	78	36	-
<b>Binet Stage</b>	A	38	27	54	
	B	29	26	30	<b>&lt;0.001</b>
	C	22	22	22.5	<b>&lt;0.001</b>
<b>IgHV status</b>	Mutated	38	31	43.5	
	Unmutated	44	38	25	0.1208
<b>Cytogenetics</b>	Normal FISH	12	9	76	0.0579
	Trisomy 12	13	13	30	0.2778
	Deletion 13q	29	26	32	0.4268
	Deletion 6q	4	-	-	-
	Translocation IgH-Bcl2	4	-	-	-
	Deletion 11q	11	10	20	0.6592
	Deletion 17p	6	3	60	0.2814
	Complex karyotype	15	14	27	0.5433
<b>Recurrents mutations</b>	<i>SF3B1</i>	5	5	13	0.0510
	<i>NOTCH1</i>	14	13	38	0.6337
	<i>TP53</i>	8	6	24	0.1606
	<i>MYD88</i>	1	-	-	-
	<i>BRAF</i>	1	-	-	-

Table 12: Temps avant le premier traitement en fonction des différents facteurs pronostiques connus dans la LLC.

Durant cette étude, 24 patients sont décédés. La survie globale (OS) des patients n'est significativement diminuée que lors des altérations de *TP53* (Table 13). Là encore, la majorité des marqueurs pronostiques classiques ne peut prédire l'évolution des malades, du fait de la taille de cette cohorte et de la lente évolutivité de la maladie.

Characteristics	Category	Total	Patients deceased	p
	All patients	94	24	
<b>Binet Stage</b>	A	38	7	
	B	29	5	0.3463
	C	22	6	0.5925
<b>IgHV status</b>	Mutated	38	9	
	Unmutated	44	6	0.423
<b>Cytogenetics</b>	Normal FISH	12	5	0.2609
	Trisomy 12	13	3	0.7697
	Deletion 13q	29	9	0.466
	Deletion 6q	4	-	-
	Translocation IgH-Bcl2	4	-	-
	Deletion 11q	11	2	0.7761
	Deletion 17p	6	3	0.0556
	Complex karyotype	15	4	0.8566
<b>Recurrents mutations</b>	<i>SF3B1</i>	5	1	0.9768
	<i>NOTCH1</i>	14	3	0.8057
	<i>TP53</i>	8	5	<b>&lt;0.01</b>
	<i>MYD88</i>	1	-	-
	<i>BRAF</i>	1	-	-

Table 13: Survie globale en fonction des différents marqueurs pronostiques connus de la LLC.

Afin d'observer si les facteurs solubles reflétant les NLC dans le ganglion, pourraient prédire l'évolution de la maladie, nous avons séparé notre population en deux groupes suivant les concentrations de sCD163, sCD68 et sHMGB1 en fonction de leurs médianes respectives. Comme montré dans la Figure 50 :a, les patients avec de fortes concentrations de sCD163 ont un TTFT significativement plus court que ceux avec une concentration faible (30 mois *versus* 42 mois  $p=0.0457$ ). De plus, les patients avec de fortes concentrations de ce même facteur ont aussi un temps avant le retraitement (TTNT) plus court que ceux avec de faibles concentrations (31 mois *versus* 61  $p=0.0394$ ) (Figure 50 :b). Enfin, de fortes concentrations de sCD163 sont associées à une survie globale diminuée ( $p=0.0319$ ) (Figure 50 :c) et il semble qu'une forte concentration soit associée à une diminution de la survie globale après traitement ( $p=0.1207$ ) (Figure 50 :d). Concernant la PFS, là encore, une forte concentration de sCD163 semble

## RESULTATS

corrélée à une PFS plus courte ( $p=0.0961$ ) (Figure 50 : e). De forts ou de faibles taux de sCD68 ou de sHMGB1 ne sont pas associés à des modifications de l'évolution de la maladie, que ce soit pour la TTFT, la TTNT, l'OS ou la PFS (Figure 50 : a, b, c, d et e respectivement).

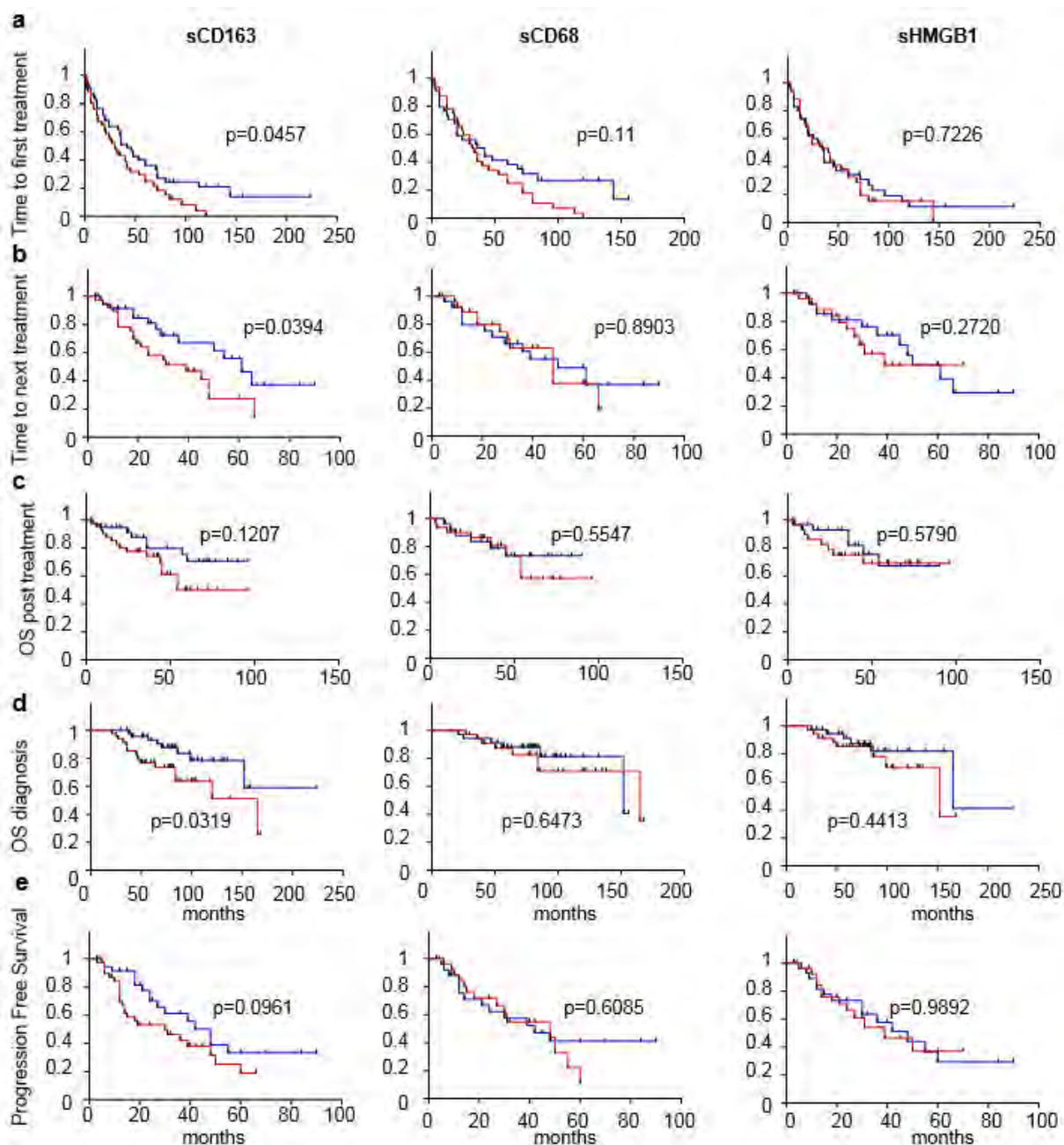


Figure 50 : Association entre la concentration en sCD163 (gauche), sCD68 (centre) ou sSMGB1 (droite) et l'évolution de la LLC. (a) Courbes de Kaplan-Meier du TTFT depuis le diagnostic en fonction du taux des différents marqueurs solubles. (b) Courbes de Kaplan-Meier du TTNT depuis le premier traitement en fonction du taux des différents marqueurs solubles. (c) Courbes de Kaplan-Meier de l'OS post-traitement depuis le premier traitement en fonction du taux des différents marqueurs solubles. (d) Courbes de Kaplan-Meier de l'OS depuis le diagnostic en fonction du taux des différents marqueurs solubles. (e) Courbes de Kaplan-Meier de la PFS depuis le diagnostic en fonction du taux des différents marqueurs solubles. (Courbe rouge : concentration en facteur soluble supérieure à la médiane, courbe bleue : concentration en facteur soluble inférieure à la médiane).

## II. L'ibrutinib n'a pas d'impact sur les effets pro-survie des NLC

Au cours de l'étude précédente, nous avons montré que les NLC ont un impact pronostique chez les patients traités par chimiothérapie classique. Or, comme nous l'avons vu précédemment, de nouvelles thérapies ciblées ont été développées dans le traitement de la LLC (I.E.4.1 L'ibrutinib (Imbruvica®) et I.E.4.2 Idélalisib (Zydelig®)). De plus, dans la majorité des cas, les patients traités finissent par rechuter, cela ne pouvant pas seulement s'expliquer par l'émergence de clones mutants résistants à l'ibrutinib. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette rechute pouvait, en partie, être expliquée par les effets protecteurs du microenvironnement sur les cellules leucémiques.

Dans ce travail, nous avons étudié si le traitement par ibrutinib modifie la différenciation et le phénotype des NLC. De plus, *in vitro*, nous avons observé si les NLC avaient des effets chimioprotecteurs sur les cellules leucémiques vis-à-vis des principales thérapies utilisées dans la LLC à savoir le rituximab, le dasatinib, la bendamustine, l'idélalisib et l'ibrutinib.

### II.A Les NLC ne sortent pas des ganglions durant le traitement par ibrutinib

Le traitement par l'ibrutinib provoque chez les patients une sortie rapide des cellules leucémiques des ganglions lymphatiques vers le sang périphérique. Les NLC résidant au sein de ces ganglions et étant absentes de la circulation sanguine, nous avons voulu savoir si ces cellules pouvaient elles aussi être relocalisées dans le sang périphérique lors de ce traitement. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié la variation de la monocytose chez les patients traités par ibrutinib à 15 et 30 jours de traitement. Notre hypothèse était qu'une relocalisation des NLC augmenterait la population des cellules CD14<sup>+</sup> dans le sang périphérique et conduirait à une augmentation de la monocytose. Comme montré dans la Figure 51, la monocytose chez les patients traités ne varie pas, tandis que, comme attendu, la lymphocytose augmente fortement.

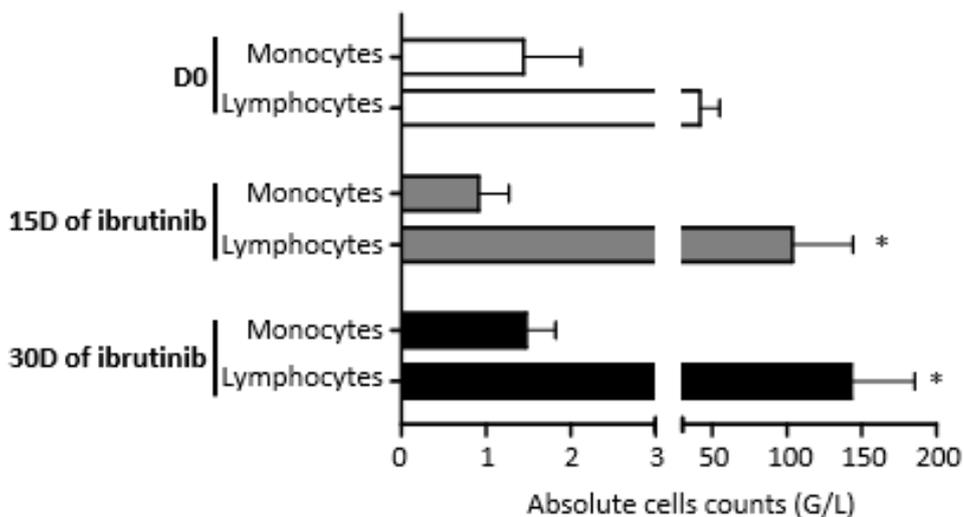


Figure 51 : Evolution de la monocytose et de la lymphocytose à 15 et 30 jours de traitement par ibrutinib. (11 expériences indépendantes).

Afin de confirmer que les NLC ne sortaient pas des ganglions au cours du traitement, nous avons recherché si au moment du prélèvement, nous pouvions détecter des NLC par cytométrie en flux *via* un marquage spécifique CD14<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup>. Que ce soit à 15 ou à 30 jours de traitement, nous n'avons pas pu mettre en évidence de NLC dans le sang périphérique (Figure 52), comme précédemment observé pour des patients non traités.

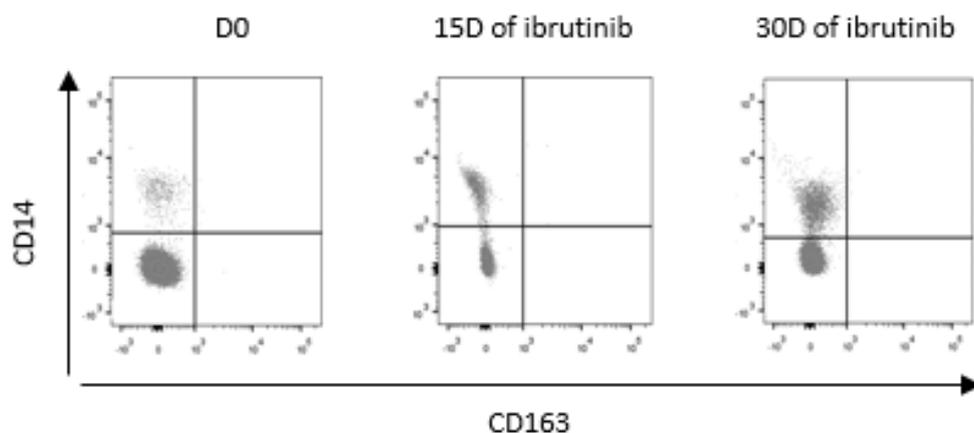


Figure 52: Les NLC ne sont pas présentes dans le sang périphérique au moment du prélèvement lors du traitement par ibrutinib. (Expérience représentative pour 5 échantillons).

Ces résultats suggèrent que l'ibrutinib ne provoque pas une relocalisation des NLC différenciées. Celles-ci restent dans leur niche ganglionnaire où elles peuvent donc toujours interagir avec les cellules leucémiques résiduelles et potentiellement délivrer des signaux pro-survie à ces dernières.

## **II.B Les cellules CD14<sup>+</sup> de patients traités par ibrutinib se différencient en NLC**

Les NLC n'étant pas relocalisées dans le sang, nous avons voulu connaître si les capacités de différenciation et le phénotype des NLC *in vitro* pouvaient être modifiés par le traitement par ibrutinib.

Pour cela, nous avons donc cultivé des PBMC de patients traités par ibrutinib. Après 15 jours de culture de ces PBMC, nous avons recherché d'éventuelles différences morphologiques et phénotypiques entre les NLC provenant de patients traités ou non par ibrutinib. Au niveau morphologique, il n'existe aucune différence observable entre les NLC provenant de patients traités ou de patients non traités (Figure 53a). De plus, au niveau phénotypique, le niveau d'expression de multiples marqueurs tels que le CD11b, CD14, CD33, CD68 et CD163 est comparable sur les NLC, qu'elles proviennent de la différenciation de cellules CD14<sup>+</sup> de patients traités ou non (Figure 53b).

## RESULTATS

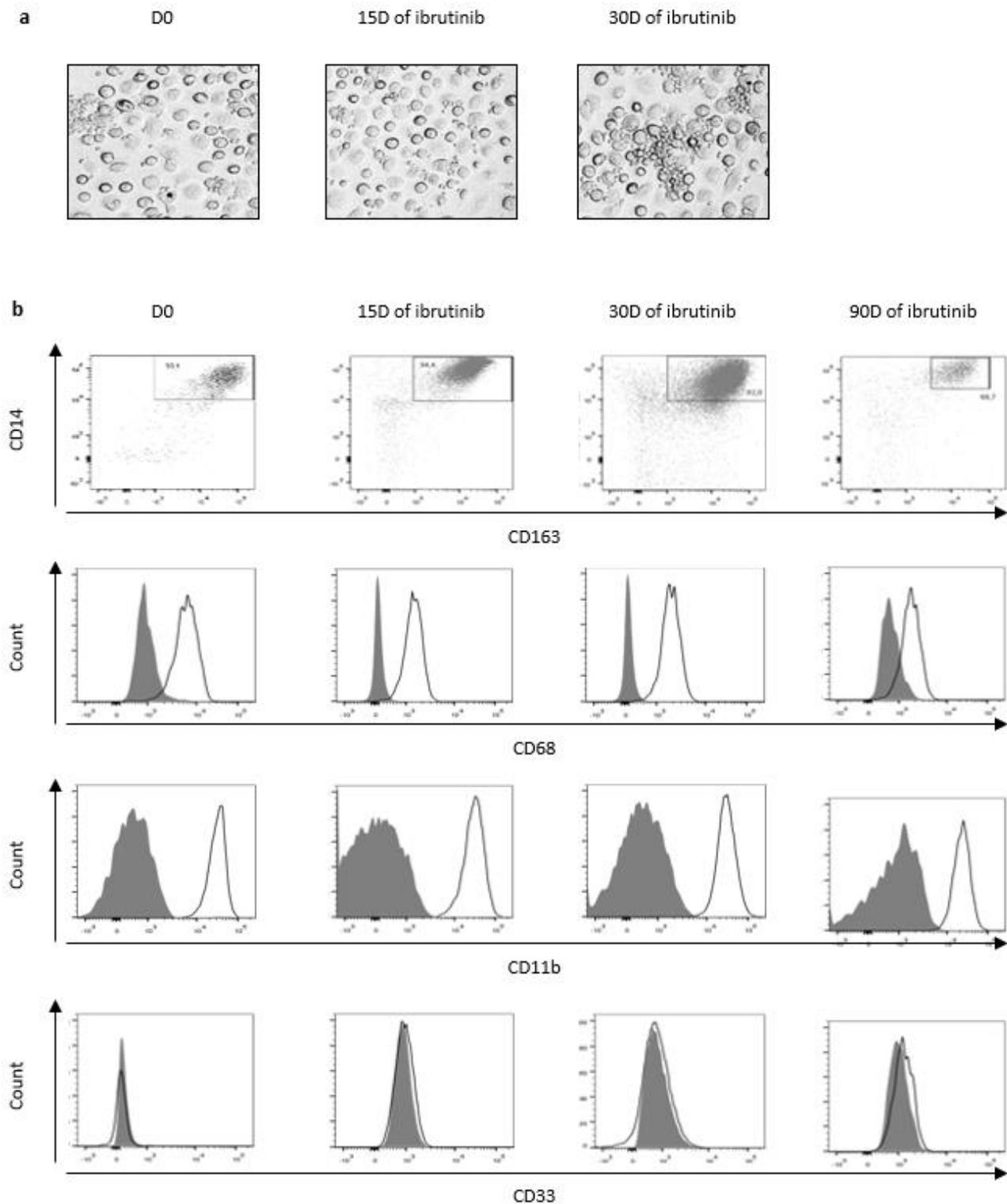


Figure 53: La différenciation et le phénotype des NLC ne sont pas modifiés par le traitement par ibrutinib. (a) Photographies de NLC après 15 jours de culture, avant ou au cours du traitement par ibrutinib (x100). (b) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de différents marqueurs (ligne noire) sur les NLC, après 15 jours de culture, avant ou au cours du traitement par ibrutinib comparé au contrôle isotypique (histogramme grise). (Expérience représentative de 5 patients).

L'ensemble de ces résultats indique que le traitement par ibrutinib ne modifie pas les capacités des cellules leucémiques à générer des NLC à partir de cellules CD14<sup>+</sup>, ce qui suggère un processus BTK et donc BCR indépendant. De plus, les cellules leucémiques conservent ces capacités jusqu'à 90 jours après l'initiation du traitement.

L'ensemble de ces résultats indique que lors du traitement par ibrutinib, même à des temps longs, les cellules leucémiques conservent la capacité de générer un microenvironnement qui leur est favorable.

## **II.C *In vitro* les NLC protègent les cellules leucémiques de l'ibrutinib**

Après l'étude phénotypique des NLC de patients traités par ibrutinib, nous avons étudié les effets chimioprotecteurs des NLC sur les cellules leucémiques vis-à-vis des différentes chimiothérapies utilisées classiquement dans le traitement de la LLC : le rituximab (10µg/mL), la bendamustine (10µM), le dasatinib (30 nM), l'idélalisib (4µM) ou l'ibrutinib (0.5µM). Ces concentrations *in vitro* ont été choisies de telle sorte qu'elles représentent la concentration maximale observée *in vivo* chez les patients lors des essais cliniques. Afin d'évaluer l'effet pro-survie des NLC sur les cellules leucémiques lors des traitements, nous avons comparé la viabilité de ces dernières après sept jours de culture, lorsqu'elles sont traitées et qu'elles sont en contact, ou non, avec des NLC.

Comme attendu, on retrouve une augmentation de la viabilité des cellules leucémiques lorsqu'elles sont cultivées avec les NLC indiquant que les NLC protègent les cellules leucémiques de l'apoptose lorsqu'elles ne sont pas traitées (Figure 54). De plus, aux doses utilisées, toutes les drogues induisent une apoptose des cellules leucémiques observée ici par une diminution de la viabilité des cellules leucémiques (Figure 54). Cependant, lors du traitement par ibrutinib, l'apoptose des cellules leucémiques est significativement diminuée lorsque celles-ci sont cultivées avec les NLC. Cet effet protecteur n'est pas observé avec le rituximab, la bendamustine, le dasatinib et l'idélalisib (Figure 54).

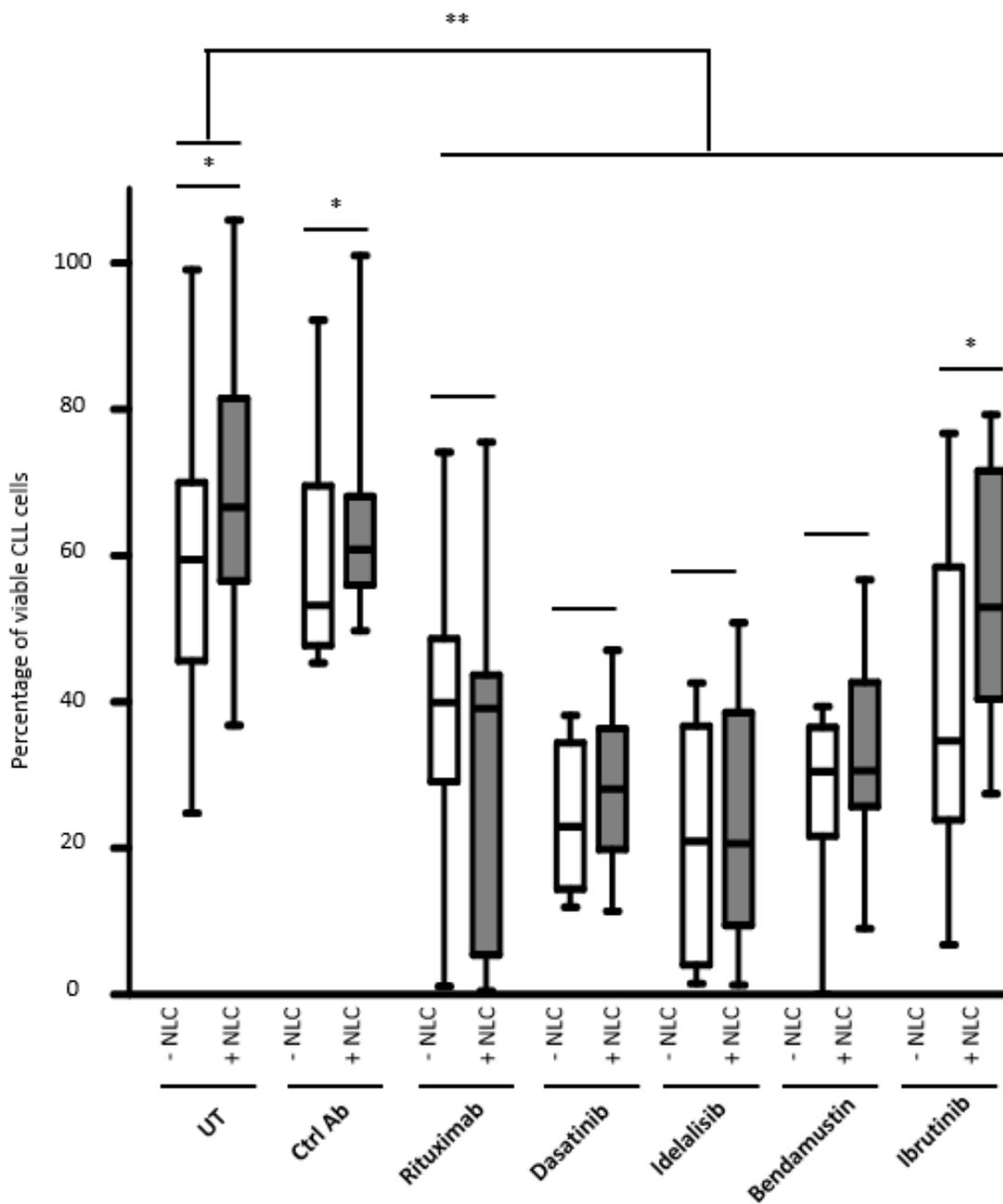


Figure 54 : Les NLC protègent les cellules leucémiques *in vitro* de l'ibrutinib. Pourcentage de viabilité des cellules leucémiques après 7 jours de culture, seules ou en présence de NLC, traitées ou non (UT) par la drogue indiquée (8 expériences indépendantes pour chaque drogue).

L'ensemble de ces résultats nous indique que, bien qu'ayant une grande efficacité clinique, l'ibrutinib ne perturbe pas le dialogue entre la cellule leucémique et sa NLC.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de nos travaux, nous avons tout d'abord montré l'impact pronostique des NLC dans la LLC. Si des études avaient déjà mis en évidence de manière indirecte l'implication des NLC dans la progression de cette pathologie<sup>260,308</sup>, nous avons, pour la première fois, démontré qu'au sein du ganglion lymphatique, il existait des cellules CD68<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup> pouvant être la contrepartie *in vivo* des NLC observées *in vitro*. De plus, au sein de ces mêmes ganglions, ces cellules CD163<sup>+</sup> ont un profil d'infiltration différent selon l'état de la maladie. Lorsque cette dernière est progressive, le ganglion est très fortement infiltré par ces cellules, tandis que lorsque le ganglion n'est que peu infiltré la maladie est stable. En démontrant que le sCD163, relargué dans le sang périphérique par les NLC, est un facteur pronostique aussi bien du TTFT que du TTNT, de la PFS et de l'OS, nous avons mis en évidence le rôle des NLC dans la progression de la maladie. Il est intéressant de noter que ce facteur pronostique indépendant est en corrélation avec des facteurs de mauvais pronostic préétablis dans la LLC tels que le statut IgHV non muté, le caryotype complexe ou la mutation *TP53*.

La corrélation entre le sCD163 et les facteurs de mauvais pronostic pose la question des différences éventuelles au sein du microenvironnement tumoral en fonction de l'agressivité du clone leucémique. Ce lien, très peu étudié aujourd'hui, est en effet établi au vu de nos résultats. Dans la littérature, il semble que chez les patients IgHV non muté, les cellules leucémiques soient plus sensibles aux signaux pro-survie du microenvironnement bien que chez ces patients, on retrouve moins de NLC que chez les patients IgHV muté<sup>265,276</sup>. De plus, au sein du laboratoire, des études transcriptomiques de NLC provenant de la différenciation *in vitro* de cellules CD14<sup>+</sup> de patients révèlent une hétérogénéité de profils en fonction du statut IgHV mais pas en fonction du caryotype (Figure 55). Des études supplémentaires semblent nécessaires afin de comprendre les différences qui pourraient exister au sein du microenvironnement tumoral, notamment au sein des NLC, en fonction du statut IgHV, du caryotype et de la présence de mutations récurrentes des cellules leucémiques. Enfin, nos résultats nous questionnent sur la causalité entre clone leucémique et microenvironnement tumoral : est-ce le clone leucémique qui se crée un microenvironnement tumoral en fonction de son agressivité ou est-ce le microenvironnement qui fournit un environnement plus favorable ce qui induit un clone plus agressif ? Ces questions à l'heure actuelle, sont difficilement élucidables.

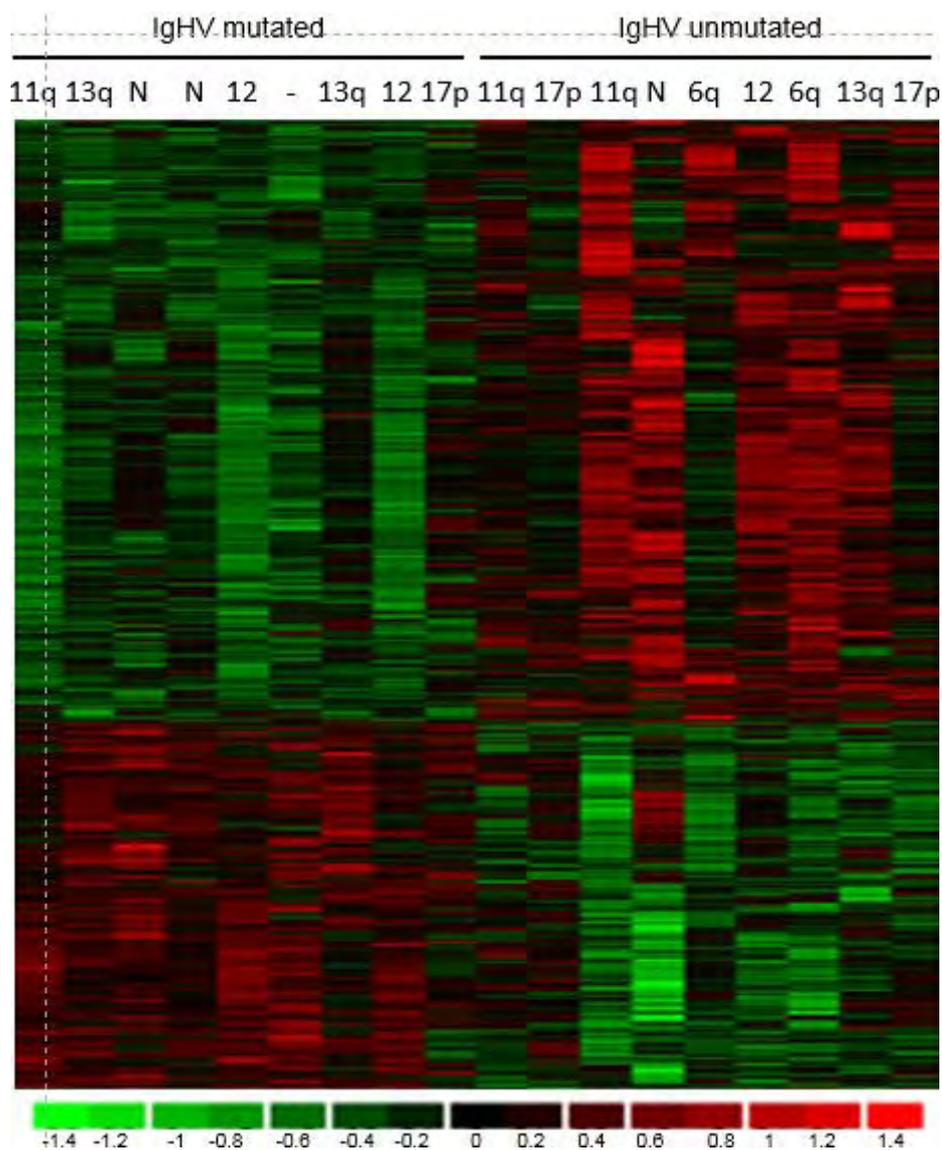


Figure 55: Profil transcriptomique de 19 NLC en fonction du statut IgHV et du caryotype des cellules leucémiques.

Pour valider le sCD163 comme marqueur pronostique dans la LLC et sa puissance pronostique dans la LLC, une étude sur un nombre de patients plus élevé est nécessaire afin de démontrer sa réelle utilité. Notre étude réalisée sur 94 patients seulement ouvre ainsi une piste que nous allons tenter d’approfondir avec le « German CLL Study Group », qui possède une banque de plus de 800 sérums de patients traités par FCR ou par FC. Grâce à ce groupe qui permettra de faire des statistiques plus poussées, nous allons tout d’abord pouvoir affiner les corrélations entre sCD163 et les facteurs pronostiques préétablis tels que la délétion 17p13 ou la mutation *NOTCH1* pour lesquels nous observons dans notre cohorte des corrélations fortes mais non significatives. Nous pourrions également confirmer si le sCD163 est bel et bien un facteur pronostique indépendant de la LLC. De plus, grâce à cette collaboration, nous allons

pouvoir observer si, dans des populations recevant un traitement plus homogène, le sCD163 est un facteur pronostic aussi bien chez les patients traités par le gold standard de la LLC, le FCR que chez ceux traités seulement par FC. En effet, comme dans le cas du lymphome folliculaire, l'impact pronostique des TAM peut être gommé par l'ajout aux chimiothérapies classiques de rituximab <sup>324</sup>.

A moyen terme, la même étude permettrait toujours en collaboration avec le « German CLL Study Group », de déterminer si l'impact pronostique du sCD163 est toujours relevant chez les patients recevant des cures de BR, traitement des populations âgées ou en mauvais état général.

Une étude analysant le taux de sCD163 chez des patients atteints de MBL semble aussi intéressante. En effet, le taux de sCD163 pourrait, ou non, prédire l'évolution en LLC et son agressivité. Néanmoins, cette étude est difficilement réalisable en France car le suivi de ces patients est effectué par les médecins traitants et les laboratoires de biologie médicale de « ville ». En plus de la difficulté du recueil de ces prélèvements, seulement 1 à 2% de ces patients seulement évoluent vers une LLC par an, il faudrait donc un nombre très important de patients pour une étude prospective. Une collaboration est néanmoins envisageable, car des études de grandes échelles ont déjà été réalisées sur des MBL <sup>21, 22</sup>.

Enfin, avec l'émergence des nouvelles thérapies, il faudrait réaliser le dosage du sCD163 chez des patients avant traitement par ibrutinib ou idélalisib afin de confirmer ce rôle pronostique dans la survie de ces patients avec ces nouveaux traitements, notamment sur le TTNT et l'OS.

Pour terminer, si le sCD163 se révèle bien être le marqueur pronostique indépendant qu'il semble être, toute la validation de méthode restera à faire pour que ce dosage puisse être utilisé en routine hospitalière dans le suivi des patients atteints de LLC. Tout en ayant un coût diminué par rapport au marqueur cytogénétique classique, il permettrait ainsi un suivi personnalisé, avec une prise en charge plus régulière des patients avec de fortes concentrations en sCD163, tandis que le suivi serait moins fréquent chez les patients avec des faibles taux.

Au cours de ma thèse, nous avons également étudié l'impact direct des NLC sur les traitements utilisés dans la LLC, qu'il s'agisse, des chimiothérapies classiques, des Ac monoclonaux ou des nouvelles thérapies. Nous avons mis en évidence que les NLC étaient capables *in vitro* de protéger les cellules leucémiques seulement contre l'ibrutinib. A partir de prélèvements de patients traités par ibrutinib, nous avons mis en évidence que ce traitement ne modifie ni la localisation, ni la différenciation, ni même le phénotype des NLC qui peuvent

toujours délivrer des signaux pro-survie aux cellules leucémiques. L'ensemble de nos résultats met en lumière le rôle du microenvironnement dans la résistance à l'ibrutinib ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, que la majorité de ces patients rechutent lors de cette thérapie <sup>129</sup>. Une autre explication de ces rechutes pourrait être d'ordre pharmacocinétique. En effet, l'absorption de l'ibrutinib est augmentée lors de la prise pendant les repas. De même, il est métabolisé par le cytochrome C 3A4 et dans une moindre mesure par le cytochrome C 2D6. Les patients étant des personnes âgées traitées pour de multiples pathologies, tous les inducteurs ou les inhibiteurs enzymatiques pourraient ainsi modifier la biodisponibilité de cette molécule.

Néanmoins, à l'avenir, ces thérapies ciblées ne seront plus utilisées en monothérapie, des essais cliniques tentent d'ores et déjà de prouver la supériorité d'une association vis-à-vis des monothérapies. Ainsi, les essais comparant l'efficacité de l'ibrutinib *versus* l'association ibrutinib + rituximab (NCT02007044) et celui comparant l'efficacité de l'ibrutinib *versus* ibrutinib + bendamustine (NCT01886872) ont d'ores et déjà commencé et sont respectivement en phase II et III. Il faudrait donc regarder si, *in vitro*, les NLC ont encore cet impact pro-survie sur les cellules leucémiques avec ces associations.

De plus, pour confirmer que les NLC ne sortent effectivement pas du ganglion chez les patients traités par ibrutinib, une étude histologique de ces tissus avant et au cours du traitement pourrait être réalisée afin de mettre en évidence la présence de cellules CD163<sup>+</sup> et CD68<sup>+</sup>.

Enfin, il serait intéressant d'observer si, à moyen ou à long terme chez les patients n'ayant pas rechuté sous ibrutinib, le phénotype et la différenciation des NLC ne sont toujours pas modifiés.

L'ensemble de nos résultats montre le rôle clé des NLC que ce soit dans le pronostic de la maladie ou dans la résistance à l'ibrutinib. De nouvelles thérapies ciblant les NLC ou leurs interactions avec les cellules leucémiques semblent être une piste prometteuse dans le traitement de la LLC. Ainsi, au laboratoire, nous avons démontré que la survie des cellules leucémiques en coculture avec les NLC est dépendante du contact. De plus, ces interactions fortes entre cellules leucémiques et NLC impliquent le couple LFA-3/CD2, et son inhibition par un Ac bloquant contre totalement les effets pro-survie des NLC *in vitro* alors qu'il n'a aucun effet sur les lymphocytes B et T. Le développement d'un Ac humanisé pour le traitement de la LLC ciblant LFA-3 ou CD2 pourrait ainsi cibler ces interactions et permettre de contrecarrer les effets pro-survie des NLC chez le patient.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Caligaris-Cappio F, Gottardi D, Alfarano A, Stacchini A, Gregoret MG, Ghia P, *et al.* The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* 1993; **19**(3): 601-613.
2. Barbier N. BC, Chaini P., Cruveillier-Boch C., Cymbalista F., Delubac H., Dupas B., Jacob L., Kornmann V., Leveque M, Levy M., Pauly J.M., Petregne F., Puppinck F., Zini J.M., De Montbel M., Mazeau Moynar V., Hittinger M.C, Alliot C, Arnoulet C., Bene M.C., Birge J., Blettner B., Blondel J.M., Bouhana S., Brossard A.M, Cazin B, Charra C., Choquet S., Colledani S., Cony-Makhoul P., Couderc A.L., Cretel E., Desandes C., Dilhuydy M.S., Dorvaux V., Durr J.F., Durrieu F., Etienne G., Farge T., Ferrant E., Ferry E., Fuzibet J.G., Garidi R., Gravey A., Grosbois B., Guerin O., Henry A., Jaubert D., De Kerviler E., Kind M., Larmat F., Laurent R., Leblond V., Lecompte T., Leleu X., Lepeu G., Lesesve J.F., Letestu R., Merad-Boudia Z., onco-hematologie, lyon - Merle-Beral H., Moreaud P., Pautas E., Pavic M. , Philippe P, Pollet B., Ponsin A., Ranguet C., Rispal P, Rodon P., Rosati F., Rouge-Bugat M.E., Schlaifer D., Seve P., Siegrist S., Stillmunkes A., Sutton L., Teillet L., Thinus L., Thomas O., Tournebize T., Tournilhac O., Troussard X., Vial J.J., Ysebaert L., Zirnhelt J., Zitoli J.L. guide - Affection de longue durée : Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Leucémie lymphoïde chronique. 2011
3. Monnereau A RL, Maynadié M, Binder-Foucard F, Belot A, Troussard X, Bossard N. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. Partie 2 – Hémopathies malignes. Synthèse. Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire ; 2013. 8 p. Disponible à partir de l'URL : [http:// www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr).
4. Clarke CA, Glaser SL, Gomez SL, Wang SS, Keegan TH, Yang J, *et al.* Lymphoid malignancies in U.S. Asians: incidence rate differences by birthplace and acculturation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011 Jun; **20**(6): 1064-1077.
5. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, *et al.* Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010 Nov; **116**(19): 3724-3734.
6. Rushton L, Schnatter AR, Tang G, Glass DC. Acute myeloid and chronic lymphoid leukaemias and exposure to low-level benzene among petroleum workers. *Br J Cancer* 2014 Feb; **110**(3): 783-787.
7. Brown LM, Blair A, Gibson R, Everett GD, Cantor KP, Schuman LM, *et al.* Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res* 1990 Oct 15; **50**(20): 6585-6591.
8. Blair A, White DW. Leukemia cell types and agricultural practices in Nebraska. *Arch Environ Health* 1985 Jul-Aug; **40**(4): 211-214.
9. Baumann Kreuziger LM, Tarchand G, Morrison VA. The impact of Agent Orange exposure on presentation and prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014 Jan; **55**(1): 63-66.
10. Reborá P, Lee M, Czene K, Valsecchi MG, Reilly M. High risks of familial chronic lymphatic leukemia for specific relatives: signposts for genetic discovery? *Leukemia* 2012 Nov; **26**(11): 2419-2421.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

11. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2009 May; **94**(5): 647-653.
12. Berndt SI, Skibola CF, Joseph V, Camp NJ, Nieters A, Wang Z, *et al.* Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2013 Aug; **45**(8): 868-876.
13. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Di Bernardo MC, Dobbins SE, Torres M, Mansouri M, *et al.* Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat Genet* 2010 Feb; **42**(2): 132-136.
14. Speedy HE, Di Bernardo MC, Sava GP, Dyer MJ, Holroyd A, Wang Y, *et al.* A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2014 Jan; **46**(1): 56-60.
15. Ghia P, Ferreri AM, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007 Dec; **64**(3): 234-246.
16. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008 Jun; **111**(12): 5446-5456.
17. V. Leblond. La leucémie lymphoïde chronique et la maladie de Waldenström. Edn. John Libbey Eurotext - Hématologie-collection FMC. 2009.
18. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995 Oct; **333**(16): 1052-1057.
19. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, *et al.* World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999 Dec; **17**(12): 3835-3849.
20. D'Arena G, Musto P. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Transl Med UniSa* 2014 Jan; **8**: 75-79.
21. Rossi D, Sozzi E, Puma A, De Paoli L, Rasi S, Spina V, *et al.* The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol* 2009 Jun; **146**(1): 64-75.
22. Morabito F, Mosca L, Cutrona G, Agnelli L, Tuana G, Ferracin M, *et al.* Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features. *Clin Cancer Res* 2013 Nov; **19**(21): 5890-5900.
23. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Apr; **100**(7): 3983-3988.
24. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997 Jul; **3**(7): 730-737.
25. Kikushige Y, Miyamoto T, Akashi K. [Hematopoietic stem cells are primarily involved in pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia]. *Rinsho Ketsueki* 2010 Aug; **51**(8): 679-684.
26. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, *et al.* Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2011 Aug; **20**(2): 246-259.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

27. Chu CC, CATERA R, HATZI K, YAN XJ, ZHANG L, WANG XB, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood* 2008 Dec 15; **112**(13): 5122-5129.
28. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C, *et al.* Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008 Feb; **111**(3): 1524-1533.
29. Seiler T, Woelfle M, Yancopoulos S, CATERA R, LI W, HATZI K, *et al.* Characterization of structurally defined epitopes recognized by monoclonal antibodies produced by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2009 Oct; **114**(17): 3615-3624.
30. Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* 2012 Sep; **489**(7415): 309-312.
31. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005 Feb; **352**(8): 804-815.
32. Chappell CP, Draves KE, Giltiay NV, Clark EA. Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. *J Exp Med* 2012 Sep; **209**(10): 1825-1840.
33. Pepper C, Hoy T, Bentley DP. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer* 1997; **76**(7): 935-938.
34. Buggins AG, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2010 Jul; **34**(7): 837-842.
35. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993 Sep; **82**(6): 1820-1828.
36. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Sep 27; **102**(39): 13944-13949.
37. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008 Mar; **371**(9617): 1017-1029.
38. Aguilar-Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M. Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *Int J Cancer* 1996 Apr 22; **69**(2): 114-119.
39. Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, *et al.* Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 2008 Nov; **112**(9): 3807-3817.
40. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 1998 Apr; **91**(7): 2387-2396.
41. Giannoni P, Scaglione S, Quarto R, Narcisi R, Parodi M, Balleari E, *et al.* An interaction between hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) prolongs the survival of chronic lymphocytic leukemic cells through STAT3 phosphorylation: a potential role of mesenchymal cells in the disease. *Haematologica* 2011 Jul; **96**(7): 1015-1023.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

42. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000 Oct; **96**(8): 2655-2663.
43. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005 Mar; **115**(3): 755-764.
44. Sellmann L, de Beer D, Bartels M, Opalka B, Nüchel H, Dührsen U, *et al.* Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Hematol* 2011 Jan; **93**(1): 74-82.
45. Véronèse L, Tournilhac O, Callanan M, Prie N, Kwiatkowski F, Combes P, *et al.* Telomeres and chromosomal instability in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2013 Feb; **27**(2): 490-493.
46. Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, Tobin G, Aleskog A, Thunberg U, *et al.* Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005 Jun; **105**(12): 4807-4812.
47. Rampazzo E, Bonaldi L, Trentin L, Visco C, Keppel S, Giunco S, *et al.* Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *Haematologica* 2012 Jan; **97**(1): 56-63.
48. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, *et al.* Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 2004 Jan; **103**(2): 375-382.
49. Giné E, Martinez A, Villamor N, López-Guillermo A, Camos M, Martinez D, *et al.* Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* 2010 Sep; **95**(9): 1526-1533.
50. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Jan; **117**(2): 563-574.
51. Mittal AK, Chaturvedi NK, Rai KJ, Gilling-Cutucache CE, Nordgren TM, Moragues M, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells in a lymph node microenvironment depict molecular signature associated with an aggressive disease. *Mol Med* 2014; **20**(1): 290-301.
52. Sic H, Kraus H, Madl J, Flittner KA, von Münchow AL, Pieper K, *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis. *J Allergy Clin Immunol* 2014 Mar.
53. Avalos AM, Meyer-Wentrup F, Ploegh HL. B-cell receptor signaling in lymphoid malignancies and autoimmunity. *Adv Immunol* 2014; **123**: 1-49.
54. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* 2014 Apr; **14**(4): 219-232.
55. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001 Dec; **194**(11): 1639-1647.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

56. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001 Dec; **194**(11): 1625-1638.
57. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, *et al.* Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Dec 15; **100**(13): 4609-4614.
58. Bossard N, Velten M, Remontet L, Belot A, Maarouf N, Bouvier AM, *et al.* Survival of cancer patients in France: a population-based study from The Association of the French Cancer Registries (FRANCIM). *Eur J Cancer* 2007 Jan; **43**(1): 149-160.
59. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987 Mar; **69**(3): 929-936.
60. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol* 1989 Jun; **72**(2): 141-149.
61. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981 Jul; **48**(1): 198-206.
62. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975 Aug; **46**(2): 219-234.
63. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Sep; **94**(6): 1848-1854.
64. Aurran-Schleinitz T, Arnoulet C, Ivanov V, Coso D, Rey J, Schiano JM, *et al.* [Chronic lymphocytic leukaemia: current management]. *Rev Med Interne* 2008 May; **29**(5): 424-435.
65. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol* 2011 Jan; **8**(1): 38-47.
66. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010 Jan; **17**(1): 28-40.
67. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010 Jan; **10**(1): 37-50.
68. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000 Dec; **343**(26): 1910-1916.
69. Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, Schröder M, Schlegelberger B, Fischer K, *et al.* Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Oct; **93**(21): 11837-11841.
70. Gunn SR, Hibbard MK, Ismail SH, Lowery-Nordberg M, Mellink CH, Bahler DW, *et al.* Atypical 11q deletions identified by array CGH may be missed by FISH panels for prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009 May; **23**(5): 1011-1017.
71. Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, Göransson H, Cahill N, Jansson M, *et al.* Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011 Aug; **96**(8): 1161-1169.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

72. Gardiner A, Parker H, Glide S, Mould S, Robinson H, Tracy I, *et al.* A new minimal deleted region at 11q22.3 reveals the importance of interpretation of diminished FISH signals and the choice of probe for ATM deletion screening in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2012 Mar; **36**(3): 307-310.
73. Hallek M. Therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010 Mar; **23**(1): 85-96.
74. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, *et al.* TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010 Oct; **28**(29): 4473-4479.
75. Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL. Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 1987 May; **316**(21): 1289-1294.
76. Bevan S, Catovsky D, Marossy A, Matutes E, Popat S, Antonovic P, *et al.* Linkage analysis for ATM in familial B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 1999 Oct; **13**(10): 1497-1500.
77. Dierlamm J, Michaux L, Criel A, Wlodarska I, Van den Berghe H, Hossfeld DK. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their clinical and prognostic implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1997 Mar; **94**(1): 27-35.
78. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, *et al.* Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996 Feb; **92**(2): 382-388.
79. Bertilaccio MT, Scielzo C, Muzio M, Caligaris-Cappio F. An overview of chronic lymphocytic leukaemia biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010 Mar; **23**(1): 21-32.
80. Zenz T, Benner A, Döhner H, Stilgenbauer S. Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer: the role of the p53 pathway. *Cell Cycle* 2008 Dec; **7**(24): 3810-3814.
81. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, *et al.* Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008 Oct; **112**(8): 3322-3329.
82. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, *et al.* Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002 Aug; **100**(4): 1177-1184.
83. Valgañón M, Giraldo P, Agirre X, Larráyoz MJ, Rubio-Martinez A, Rubio-Felix D, *et al.* p53 Aberrations do not predict individual response to fludarabine in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia in advanced stages Rai III/IV. *Br J Haematol* 2005 Apr; **129**(1): 53-59.
84. Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini F, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 2004 Mar; **18**(3): 476-483.
85. Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, Russo Rossi A, De Angeli C, Tiseo R, *et al.* Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol* 2008 Aug; **142**(4): 529-537.
86. Woyach JA, Lozanski G, Ruppert AS, Lozanski A, Blum KA, Jones JA, *et al.* Outcome of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated with flavopiridol: impact of genetic features. *Leukemia* 2012 Jun; **26**(6): 1442-1444.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

87. Jaglowski SM, Ruppert AS, Heerema NA, Bingman A, Flynn JM, Grever MR, *et al.* Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2012 Oct; **159**(1): 82-87.
88. **Thompson PA.** Complex Karyotype, Rather Than Del(17p), Is Associated with Inferior Outcomes in Relapsed or Refractory CLL Patients Treated with Ibrutinib-Based Regimens. In: *Wierda WG*, editor.: Oral and Poster Abstracts, ASH 2014; 2014.
89. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011 Jul; **475**(7354): 101-105.
90. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, *et al.* Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 2009 Dec; **114**(26): 5307-5314.
91. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Famà R, *et al.* Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014 Apr; **123**(14): 2139-2147.
92. Wickremasinghe RG, Prentice AG, Steele AJ. p53 and Notch signaling in chronic lymphocytic leukemia: clues to identifying novel therapeutic strategies. *Leukemia* 2011 Sep; **25**(9): 1400-1407.
93. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, *et al.* Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* 2014 May; **123**(21): 3247-3254.
94. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, *et al.* Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011 Jul; **208**(7): 1389-1401.
95. .
96. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, *et al.* Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 2009 Jan; **113**(4): 856-865.
97. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, Del Papa B, Bonifacio E, Ciurnelli R, *et al.* NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol* 2010 Nov; **151**(4): 404-406.
98. Rossi D, Rasi S, Spina V, Fangazio M, Monti S, Greco M, *et al.* Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2012 Aug; **158**(3): 426-429.
99. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, *et al.* SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011 Dec; **365**(26): 2497-2506.
100. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, *et al.* Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011 Dec; **118**(26): 6904-6908.
101. Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, *et al.* Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013 Feb; **121**(8): 1403-1412.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

102. Gunnarsson R, Mansouri L, Rosenquist R. Exploring the genetic landscape in chronic lymphocytic leukemia using high-resolution technologies. *Leuk Lymphoma* 2013 Aug; **54**(8): 1583-1590.
103. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, *et al.* Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012 Mar; **119**(12): 2854-2862.
104. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, *et al.* Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Mar; **93**(5): 1732-1737.
105. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005 Mar; **90**(3): 391-399.
106. Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1999 Feb; **62**(2): 117-122.
107. Källander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1984 Dec; **54**(11): 2450-2455.
108. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, *et al.* Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996 Aug; **22**(5-6): 439-447.
109. Matthews C, Catherwood MA, Morris TC, Kettle PJ, Drake MB, Gilmore WS, *et al.* Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur J Haematol* 2006 Oct; **77**(4): 309-317.
110. Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S, Emmerich B. Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann Hematol* 1992 Jul; **65**(1): 1-5.
111. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, *et al.* Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010 Oct; **376**(9747): 1164-1174.
112. Mahipal A, Weiss M. The addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide improves progression-free survival in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Curr Oncol Rep* 2010 Nov; **12**(6): 352-354.
113. Robak T. Rituximab for chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Biol Ther* 2012 Apr; **12**(4): 503-515.
114. Capietto AH, Keirallah S, Gross E, Dauguet N, Laprévotte E, Jean C, *et al.* Emerging concepts for the treatment of hematological malignancies with therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Drug Targets* 2010 Jul; **11**(7): 790-800.
115. Amoroso A, Hafsi S, Militello L, Russo AE, Soua Z, Mazzarino MC, *et al.* Understanding rituximab function and resistance: implications for tailored therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011; **16**: 770-782.
116. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 2007 Sep; **44**(16): 3823-3837.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

117. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2008 Aug; **359**(6): 613-626.
118. García-Escobar I, Sepúlveda J, Castellano D, Cortés-Funes H. Therapeutic management of chronic lymphocytic leukaemia: state of the art and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011 Oct; **80**(1): 100-113.
119. Pettitt AR. Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003 Jun; **121**(5): 692-702.
120. Johnson SA. Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies. *Expert Opin Pharmacother* 2001 Jun; **2**(6): 929-943.
121. Chang BY, Huang MM, Francesco M, Chen J, Sokolove J, Magadala P, *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells. *Arthritis Res Ther* 2011; **13**(4): R115.
122. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, *et al.* Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 2013 Jan; **31**(1): 88-94.
123. Pan Z, Scheerens H, Li SJ, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, *et al.* Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* 2007 Jan; **2**(1): 58-61.
124. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Jul; **107**(29): 13075-13080.
125. Burger JA, Buggy JJ. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765). *Leuk Lymphoma* 2013 Nov; **54**(11): 2385-2391.
126. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, *et al.* Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011 Jun; **117**(23): 6287-6296.
127. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 2012 Feb; **119**(5): 1182-1189.
128. de Rooij MF, Kuil A, Geest CR, Eldering E, Chang BY, Buggy JJ, *et al.* The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012 Mar; **119**(11): 2590-2594.
129. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Jul; **369**(1): 32-42.
130. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2013 Aug; **369**(6): 507-516.
131. Burger JA. Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors in clinical trials. *Curr Hematol Malig Rep* 2014 Mar; **9**(1): 44-49.
132. Furman RR, Cheng S, Lu P, Setty M, Perez AR, Guo A, *et al.* Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014 Jun; **370**(24): 2352-2354.
133. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2014 Feb; **13**(2): 140-156.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

134. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 2010 Feb; **28**(6): 1075-1083.
135. Puri KD, Gold MR. Selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase delta: modulators of B-cell function with potential for treating autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Front Immunol* 2012; **3**: 256.
136. Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, Piekorz R, Chao JR, Wang D, *et al.* Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* 2002 Dec; **22**(24): 8580-8591.
137. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, *et al.* The phosphoinositide 3-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Sep; **118**(13): 3603-3612.
138. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase- $\delta$  inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 2010 Sep; **116**(12): 2078-2088.
139. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, *et al.* Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014 Mar; **370**(11): 997-1007.
140. Keating GM. Idelalisib: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia and indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Target Oncol* 2015 Feb.
141. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan; **100**(1): 57-70.
142. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar; **144**(5): 646-674.
143. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, *et al.* IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001 Apr; **410**(6832): 1107-1111.
144. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011 Mar; **331**(6024): 1565-1570.
145. Gatti RA, Good RA. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 1971 Jul; **28**(1): 89-98.
146. Sodemann U, Bistrup C, Marckmann P. Cancer rates after kidney transplantation. *Dan Med Bull* 2011 Dec; **58**(12): A4342.
147. Fernberg P, Edgren G, Adami J, Ingvar A, Bellocco R, Tufveson G, *et al.* Time trends in risk and risk determinants of non-Hodgkin lymphoma in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2011 Nov; **11**(11): 2472-2482.
148. Weiss NS. Risk of breast cancer after renal or cardiac transplantation. *Lancet* 1995 Nov; **346**(8987): 1422; author reply 1423.
149. Carbone A, Vaccher E, Gloghini A, Pantanowitz L, Abayomi A, de Paoli P, *et al.* Diagnosis and management of lymphomas and other cancers in HIV-infected patients. *Nat Rev Clin Oncol* 2014 Apr; **11**(4): 223-238.
150. Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2002 May; **2**(5): 373-382.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

151. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 Jan; **4**(1): 11-22.
152. Iannello A, Raulet DH. Immune surveillance of unhealthy cells by natural killer cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2013; **78**: 249-257.
153. Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res* 2013 Sep; **62**(9): 823-834.
154. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006 Oct; **6**(10): 715-727.
155. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 2013 Nov; **218**(11): 1402-1410.
156. Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S, Capron M. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunol Immunother* 2012 Sep; **61**(9): 1527-1534.
157. Tecchio C, Scapini P, Pizzolo G, Cassatella MA. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Semin Cancer Biol* 2013 Jun; **23**(3): 159-170.
158. Whitworth PW, Pak CC, Esqro J, Kleinerman ES, Fidler IJ. Macrophages and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1990 Feb; **8**(4): 319-351.
159. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 2006; **90**: 1-50.
160. Abbas AK, Lichtman, A.H. & Pillai, S. Cellular and molecular immunology 6th edition. Saunders Elsevier, Philadelphia; 2010.
161. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev* 2008 Apr; **222**: 129-144.
162. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006 Nov; **6**(11): 836-848.
163. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002 Nov; **3**(11): 991-998.
164. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 235-271.
165. Shaked Y, McAllister S, Fainaru O, Almog N. Tumor dormancy and the angiogenic switch: possible implications of bone marrow- derived cells. *Curr Pharm Des* 2014; **20**(30): 4920-4933.
166. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005 Dec; **5**(12): 953-964.
167. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002 Nov; **23**(11): 549-555.
168. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 2014; **6**(3): 1670-1690.
169. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* 2012; **2012**: 948098.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

170. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012 Mar; **122**(3): 787-795.
171. Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Polosukhin VV, Han W, Ausborn JA, McLoed AG, *et al.* A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis. *J Immunol* 2011 Dec; **187**(11): 5703-5711.
172. Gordon S, Mantovani A. Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. *Eur J Immunol* 2011 Sep; **41**(9): 2470-2472.
173. Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013 Jul; **33**(7): 1478-1483.
174. Alahari SV, Dong S, Alahari SK. Are Macrophages in Tumors Good Targets for Novel Therapeutic Approaches? *Mol Cells* 2015 Feb; **38**(2): 95-104.
175. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992 Jul; **13**(7): 265-270.
176. .
177. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999 Jun; **20**(6): 254-257.
178. Mizutani K, Sud S, McGregor NA, Martinovski G, Rice BT, Craig MJ, *et al.* The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia* 2009 Nov; **11**(11): 1235-1242.
179. Bonecchi R, Facchetti F, Dusi S, Luini W, Lissandrini D, Simmelink M, *et al.* Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J Immunol* 2000 Apr; **164**(7): 3862-3869.
180. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001 Mar; **193**(6): 727-740.
181. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004 Jul; **4**(7): 540-550.
182. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009 Nov; **86**(5): 1065-1073.
183. Chiodoni C, Colombo MP, Sangaletti S. Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2010 Jun; **29**(2): 295-307.
184. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004 Oct; **104**(8): 2224-2234.
185. Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, Barroso R, Sánchez-Mateos P, Puig-Kroger A, *et al.* CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J Immunol* 2014 Apr; **192**(8): 3858-3867.
186. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 2000 Mar; **404**(6776): 407-411.
187. Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, Welters MJ, *et al.* M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol* 2011 Aug; **187**(3): 1157-1165.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

188. Avila-Moreno F, Lopez-Gonzalez JS, Galindo-Rodriguez G, Prado-Garcia H, Bajana S, Sanchez-Torres C. Lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines use different mediators to induce comparable phenotypic and functional changes in human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006 May; **55**(5): 598-611.
189. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 2007 Dec; **110**(13): 4319-4330.
190. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 2011 Nov; **11**(11): 750-761.
191. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 2006 Feb; **79**(2): 285-293.
192. Herfs M, Herman L, Hubert P, Minner F, Arafa M, Roncarati P, *et al.* High expression of PGE2 enzymatic pathways in cervical (pre)neoplastic lesions and functional consequences for antigen-presenting cells. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Apr; **58**(4): 603-614.
193. Dalwadi H, Krysan K, Heuze-Vourc'h N, Dohadwala M, Elashoff D, Sharma S, *et al.* Cyclooxygenase-2-dependent activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-6 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005 Nov; **11**(21): 7674-7682.
194. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2007 Jan; **81**(1): 15-27.
195. Banerjee S, Lin CF, Skinner KA, Schiffhauer LM, Peacock J, Hicks DG, *et al.* Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res* 2011 Jan; **71**(2): 318-327.
196. Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med* 2011; **9**: 216.
197. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010 Oct; **11**(10): 889-896.
198. Eiró N, Pidal I, Fernandez-Garcia B, Junquera S, Lamelas ML, del Casar JM, *et al.* Impact of CD68/(CD3+CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. *PLoS One* 2012; **7**(12): e52796.
199. Faber TJ, Japink D, Leers MP, Sosef MN, von Meyenfeldt MF, Nap M. Activated macrophages containing tumor marker in colon carcinoma: immunohistochemical proof of a concept. *Tumour Biol* 2012 Apr; **33**(2): 435-441.
200. Kurahara H, Shinchu H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, *et al.* Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* 2011 May; **167**(2): e211-219.
201. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Müller A, *et al.* Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 2008 May; **67**(5): 453-463.
202. Kurahara H, Shinchu H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, *et al.* Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* May 15; **167**(2): e211-219.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

203. Lan C, Huang X, Lin S, Huang H, Cai Q, Wan T, *et al.* Expression of M2-polarized macrophages is associated with poor prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Technol Cancer Res Treat* Jun; **12**(3): 259-267.
204. Medrek C, Ponten F, Jirstrom K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*; **12**: 306.
205. Cook J, Hagemann T. Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2013 Aug; **13**(4): 595-601.
206. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 1998 Mar; **187**(5): 813-818.
207. Kelly GL, Strasser A. The essential role of evasion from cell death in cancer. *Adv Cancer Res* 2011; **111**: 39-96.
208. Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Apr; **100**(9): 5336-5341.
209. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, *et al.* PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med* 2014 May; **211**(5): 781-790.
210. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 1998 Sep; **64**(3): 275-290.
211. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, *et al.* B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 2006 Apr; **203**(4): 871-881.
212. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol* 2013; **4**: 190.
213. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004 Sep; **10**(9): 942-949.
214. Liu J, Zhang N, Li Q, Zhang W, Ke F, Leng Q, *et al.* Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. *PLoS One* 2011; **6**(4): e19495.
215. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, *et al.* Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res* 2010 Oct; **70**(19): 7465-7475.
216. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014 Jul; **41**(1): 49-61.
217. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008 Aug; **8**(8): 618-631.
218. Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, Ueda S, Kimura YN, Hamano S, *et al.* Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest* 2005 Nov; **115**(11): 2979-2991.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

219. Etoh T, Shibuta K, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiogenin expression in human colorectal cancer: the role of focal macrophage infiltration. *Clin Cancer Res* 2000 Sep; **6**(9): 3545-3551.
220. Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, Koyama H, Kitazawa M, Takeoka M, *et al.* Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res* 2010 Sep; **70**(18): 7073-7083.
221. Chen P, Huang Y, Bong R, Ding Y, Song N, Wang X, *et al.* Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. *Clin Cancer Res* 2011 Dec; **17**(23): 7230-7239.
222. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol* 2000 Oct; **192**(2): 150-158.
223. Laoui D, Van Overmeire E, Di Conza G, Aldeni C, Keirsse J, Morias Y, *et al.* Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res* 2014 Jan; **74**(1): 24-30.
224. Guruvayoorappan C. Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? *Integr Cancer Ther* 2008 Jun; **7**(2): 90-95.
225. Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, *et al.* Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol* 2003 Oct; **163**(4): 1233-1243.
226. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passequé E, *et al.* HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008 Mar; **13**(3): 206-220.
227. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER, *et al.* Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 2007 Mar; **67**(6): 2649-2656.
228. Mazzieri R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Raghetti A, Berti A, *et al.* Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell* 2011 Apr; **19**(4): 512-526.
229. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006 Jan; **124**(2): 263-266.
230. Rohan TE, Xue X, Lin HM, D'Alfonso TM, Ginter PS, Oktay MH, *et al.* Tumor microenvironment of metastasis and risk of distant metastasis of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014 Aug; **106**(8).
231. Sangaletti S, Di Carlo E, Gariboldi S, Miotti S, Cappetti B, Parenza M, *et al.* Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res* 2008 Nov; **68**(21): 9050-9059.
232. Bonde AK, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer* 2012; **12**: 35.
233. Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van den Bossche J, Schoupe E, Mommer C, *et al.* Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol* 2011; **55**(7-9): 861-867.
234. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013 Nov; **19**(11): 1423-1437.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

235. Jones K, Vari F, Keane C, Crooks P, Nourse JP, Seymour LA, *et al.* Serum CD163 and TARC as disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 2013 Feb; **19**(3): 731-742.
236. Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY. A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res* 2010 Sep; **16**(18): 4583-4594.
237. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Liguori M, *et al.* Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* 2013 Feb; **23**(2): 249-262.
238. Paulus P, Stanley ER, Schäfer R, Abraham D, Aharinejad S. Colony-stimulating factor-1 antibody reverses chemoresistance in human MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2006 Apr; **66**(8): 4349-4356.
239. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* 2011 Jun; **1**(1): 54-67.
240. Shree T, Olson OC, Elie BT, Kester JC, Garfall AL, Simpson K, *et al.* Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev* 2011 Dec; **25**(23): 2465-2479.
241. Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, Masutomi K, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, *et al.* Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Jul; **108**(30): 12425-12430.
242. Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AH, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer* 2006 Aug; **95**(3): 272-281.
243. Priceman SJ, Sung JL, Shaposhnik Z, Burton JB, Torres-Collado AX, Moughon DL, *et al.* Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood* 2010 Feb; **115**(7): 1461-1471.
244. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000 Apr; **6**(4): 443-446.
245. Park S, Jiang Z, Mortenson ED, Deng L, Radkevich-Brown O, Yang X, *et al.* The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell* 2010 Aug; **18**(2): 160-170.
246. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, *et al.* Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 2010 Sep; **142**(5): 699-713.
247. Minard-Colin V, Xiu Y, Poe JC, Horikawa M, Magro CM, Hamaguchi Y, *et al.* Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV. *Blood* 2008 Aug; **112**(4): 1205-1213.
248. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Nyman H, Eerola LM, Leppä S. A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clin Cancer Res* 2007 Oct; **13**(19): 5784-5789.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

249. Andreu P, Johansson M, Affara NI, Pucci F, Tan T, Junankar S, *et al.* FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell* 2010 Feb; **17**(2): 121-134.
250. Pander J, Heusinkveld M, van der Straaten T, Jordanova ES, Baak-Pablo R, Gelderblom H, *et al.* Activation of tumor-promoting type 2 macrophages by EGFR-targeting antibody cetuximab. *Clin Cancer Res* 2011 Sep; **17**(17): 5668-5673.
251. Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* 1989 Mar; **71**(3): 343-350.
252. McConkey DJ, Aguilar-Santelises M, Hartzell P, Eriksson I, Mellstedt H, Orrenius S, *et al.* Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 1991 Feb; **146**(3): 1072-1076.
253. Munk Pedersen I, Reed J. Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma* 2004 Dec; **45**(12): 2365-2372.
254. Hamilton E, Pearce L, Morgan L, Robinson S, Ware V, Brennan P, *et al.* Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2012 Sep; **158**(5): 589-599.
255. Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, Zapata JM, Karras JG, Tsukada N, *et al.* Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* 2002 Sep; **100**(5): 1795-1801.
256. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Feb; **99**(3): 1030-1037.
257. Ysebaert L, Fournié JJ. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011 Jul; **52**(7): 1404-1406.
258. Audrito V, Serra S, Brusa D, Mazzola F, Arruga F, Vaisitti T, *et al.* Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2015 Jan; **125**(1): 111-123.
259. Giannoni P, Pietra G, Travaini G, Quarto R, Shyti G, Benelli R, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica* 2014 Jun; **99**(6): 1078-1087.
260. Jia L, Clear A, Liu FT, Matthews J, Uddin N, McCarthy A, *et al.* Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014 Mar; **123**(11): 1709-1719.
261. Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, Rauen J, Habe S, Busch H, *et al.* Nurse-like cells show deregulated expression of genes involved in immunocompetence. *Br J Haematol* Aug; **154**(3): 349-356.
262. Fiorcari S, Martinelli S, Bulgarelli J, Audrito V, Zucchini P, Colaci E, *et al.* Lenalidomide interferes with tumor-promoting properties of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2015 Feb; **100**(2): 253-262.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

263. Filip AA, Ciseł B, Koczkodaj D, Wąsik-Szczepanek E, Piersiak T, Dmoszyńska A. Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages? *Blood Cells Mol Dis* 2013 Apr; **50**(4): 263-270.
264. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, *et al.* Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* 2005 Aug; **106**(3): 1012-1020.
265. Coscia M, Pantaleoni F, Riganti C, Vitale C, Rigoni M, Peola S, *et al.* IGHV unmutated CLL B cells are more prone to spontaneous apoptosis and subject to environmental prosurvival signals than mutated CLL B cells. *Leukemia* 2011 May; **25**(5): 828-837.
266. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Bertoncelli L, Martinelli S, Guarnotta C, *et al.* The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica* 2013 Jul; **98**(7): 1115-1123.
267. Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, Barth TF, Rauen J, Habermann A, *et al.* Non-malignant B cells and chronic lymphocytic leukemia cells induce a pro-survival phenotype in CD14+ cells from peripheral blood. *Leukemia* 2011 Apr; **25**(4): 722-726.
268. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994 Feb; **14**(2): 1431-1437.
269. Chang YH, Chang DM, Lin KC, Shin SJ, Lee YJ. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes Metab Res Rev* 2011 Sep; **27**(6): 515-527.
270. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, *et al.* The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 2002 Oct; **3**(10): 995-1001.
271. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazzon M, *et al.* HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* 2004 Aug; **5**(8): 825-830.
272. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Mar; **91**(6): 2305-2309.
273. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996 Sep; **184**(3): 1101-1109.
274. Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999 Apr; **10**(4): 463-471.
275. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999 Dec 1; **94**(11): 3658-3667.
276. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, *et al.* CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007 Dec 1; **110**(12): 4012-4021.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

277. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, *et al.* ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2006 May 1; **107**(9): 3584-3592.
278. Borge M, Remes Lenicov F, Nannini PR, de los Ríos Alicandú MM, Podaza E, Ceballos A, *et al.* The expression of sphingosine-1 phosphate receptor-1 in chronic lymphocytic leukemia cells is impaired by tumor microenvironmental signals and enhanced by piceatannol and R406. *J Immunol* 2014 Sep; **193**(6): 3165-3174.
279. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2012; **30**: 69-94.
280. Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther* 2007 Jul; **115**(1): 84-105.
281. Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007 Nov 1; **110**(9): 3316-3325.
282. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 1998 Feb; **391**(6669): 799-803.
283. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, *et al.* A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 2000 Jul; **406**(6793): 309-314.
284. Ferretti E, Bertolotto M, Deaglio S, Tripodo C, Ribatti D, Audrito V, *et al.* A novel role of the CX3CR1/CX3CL1 system in the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and tumor microenvironment. *Leukemia* 2011 Aug; **25**(8): 1268-1277.
285. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 231-264.
286. Croci DO, Morande PE, Dergan-Dylon S, Borge M, Toscano MA, Stupirski JC, *et al.* Nurse-like cells control the activity of chronic lymphocytic leukemia B cells via galectin-1. *Leukemia* 2013 Jun; **27**(6): 1413-1416.
287. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Bürkle A, Wierda WG, Keating MJ, *et al.* High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009 Mar; **113**(13): 3050-3058.
288. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 1993 Apr; **260**(5106): 355-358.
289. Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 1993 Jun; **177**(6): 1821-1826.
290. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, Bonello L, Horenstein AL, Tamagnone L, *et al.* CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005 Apr; **105**(8): 3042-3050.
291. Poggi A, Prevosto C, Catellani S, Rocco I, Garuti A, Zocchi MR. Engagement of CD31 delivers an activating signal that contributes to the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2010 Nov; **151**(3): 252-264.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

292. Tonino SH, Spijker R, Luijks DM, van Oers MH, Kater AP. No convincing evidence for a role of CD31-CD38 interactions in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008 Aug 1; **112**(3): 840-843.
293. Granziero L, Circosta P, Scielzo C, Frisaldi E, Stella S, Geuna M, *et al.* CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes. *Blood* 2003 Mar; **101**(5): 1962-1969.
294. Coscia M, Pantaleoni F, Riganti C, Vitale C, Rigoni M, Peola S, *et al.* IGHV unmutated CLL B cells are more prone to spontaneous apoptosis and subject to environmental prosurvival signals than mutated CLL B cells. *Leukemia* May; **25**(5): 828-837.
295. Giannoni P, Pietra G, Travaini G, Quarto R, Shyti G, Benelli R, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica* Jun; **99**(6): 1078-1087.
296. Borge M, Nannini PR, Morande PE, Jancic C, Bistmans A, Bezares RF, *et al.* CXCL12 is a costimulator for CD4+ T cell activation and proliferation in chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Immunol Immunother* 2013 Jan; **62**(1): 113-124.
297. Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ, *et al.* TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* 2006 Feb; **20**(2): 280-285.
298. Pekarsky Y, Zanesi N, Aqeilan RI, Croce CM. Animal models for chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Biochem* 2007 Apr; **100**(5): 1109-1118.
299. Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune responses to microbes. *Scand J Infect Dis* 2003; **35**(9): 573-576.
300. Talos F, Mena P, Fingerle-Rowson G, Moll U, Petrenko O. MIF loss impairs Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ* 2005 Oct; **12**(10): 1319-1328.
301. Sapozhnikov A, Pewzner-Jung Y, Kalchenko V, Krauthgamer R, Shachar I, Jung S. Perivascular clusters of dendritic cells provide critical survival signals to B cells in bone marrow niches. *Nat Immunol* 2008 Apr; **9**(4): 388-395.
302. Reinart N, Nguyen PH, Boucas J, Rosen N, Kvasnicka HM, Heukamp L, *et al.* Delayed development of chronic lymphocytic leukemia in the absence of macrophage migration inhibitory factor. *Blood* 2013 Jan; **121**(5): 812-821.
303. Dallery-Prudhomme E, Roumier C, Denis C, Preudhomme C, Kerckaert JP, Galiegue-Zouitina S. Genomic structure and assignment of the RhoH/TTF small GTPase gene (ARHH) to 4p13 by in situ hybridization. *Genomics* 1997 Jul; **43**(1): 89-94.
304. Preudhomme C, Roumier C, Hildebrand MP, Dallery-Prudhomme E, Lantoine D, Lai JL, *et al.* Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene* 2000 Apr; **19**(16): 2023-2032.
305. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Küppers R, *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001 Jul; **412**(6844): 341-346.
306. Hiraga J, Katsumi A, Iwasaki T, Abe A, Kiyoi H, Matsushita T, *et al.* Prognostic analysis of aberrant somatic hypermutation of RhoH gene in diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia* 2007 Aug; **21**(8): 1846-1847.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

307. Troeger A, Johnson AJ, Wood J, Blum WG, Andritsos LA, Byrd JC, *et al.* RhoH is critical for cell-microenvironment interactions in chronic lymphocytic leukemia in mice and humans. *Blood* 2012 May; **119**(20): 4708-4718.
308. Sivina M, Hartmann E, Kipps TJ, Rassenti L, Krupnik D, Lerner S, *et al.* CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Feb; **117**(5): 1662-1669.
309. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Burkle A, Wierda WG, Keating MJ, *et al.* High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009 Mar 26; **113**(13): 3050-3058.
310. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, *et al.* CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 2009 May; **69**(9): 4001-4009.
311. Palacios F, Moreno P, Morande P, Abreu C, Correa A, Porro V, *et al.* High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* 2010 Jun; **115**(22): 4488-4496.
312. Hamed H, Zaki S. Role of CCL3 protein (monocyte inflammatory protein-1 alpha) in lymphoid malignancy. *Egypt J Immunol* 2007; **14**(1): 63-72.
313. Martinez-Lostao L, Briones J, Martinez-Gallo M, Forne I, Sierra J, Rodriguez-Sanchez JL, *et al.* Fludarabine-induced apoptosis in CD19+/CD5+B-CLL cells is a direct and nurse-like-cell independent effect. *Leuk Lymphoma* 2004 Nov; **45**(11): 2307-2314.
314. Filip AA, Ciseł B, Wąsik-Szczepanek E. Guilty bystanders: nurse-like cells as a model of microenvironmental support for leukemic lymphocytes. *Clin Exp Med* 2013 Dec.
315. ten Hacken E, Burger JA. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia--focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res* 2014 Feb; **20**(3): 548-556.
316. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, *et al.* The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* Sep 29; **118**(13): 3603-3612.
317. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgün G, Le Dieu R, Blum W, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 2008 Jul; **118**(7): 2427-2437.
318. Ramsay AG, Gribben JG. Immune dysfunction in chronic lymphocytic leukemia T cells and lenalidomide as an immunomodulatory drug. *Haematologica* 2009 Sep; **94**(9): 1198-1202.
319. Ramsay AG, Evans R, Kiaii S, Svensson L, Hogg N, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce defective LFA-1-directed T-cell motility by altering Rho GTPase signaling that is reversible with lenalidomide. *Blood* 2013 Apr; **121**(14): 2704-2714.
320. Burger M, Hartmann T, Krome M, Rawluk J, Tamamura H, Fujii N, *et al.* Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005 Sep 1; **106**(5): 1824-1830.
321. Stamatopoulos B, Meuleman N, De Bruyn C, Pieters K, Mineur P, Le Roy C, *et al.* AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments. *Haematologica* 2012 Apr; **97**(4): 608-615.
322. Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, Rauen J, Häbe S, Busch H, *et al.* Nurse-like cells show deregulated expression of genes involved in immunocompetence. *Br J Haematol* 2011 Aug; **154**(3): 349-356.
323. Filip AA, Ciseł B, Wąsik-Szczepanek E. Guilty bystanders: nurse-like cells as a model of microenvironmental support for leukemic lymphocytes. *Clin Exp Med* 2015 Feb; **15**(1): 73-83.
324. Sander B, de Jong D, Rosenwald A, Xie W, Balagué O, Calaminici M, *et al.* The reliability of immunohistochemical analysis of the tumor microenvironment in follicular lymphoma: a validation study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Haematologica* 2014 Apr; **99**(4): 715-725.

## **SERMENT DE GALIEN**

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

## **Etude de l'impact des « nurse-like » cells sur la survie des patients et la résistance aux traitements dans la leucémie lymphoïde chronique**

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie à progression hétérogène dont l'évolution peut être prédite par différents marqueurs pronostiques dépendant du clone leucémique. Cependant, le microenvironnement tumoral prend une part croissante dans la physiopathologie et le pronostic de la LLC. A ce jour, il n'existe que peu de travaux sur l'impact des « nurse-like » cells (NLC), les macrophages associés aux tumeurs de la LLC, que ce soit au niveau du pronostic ou de la résistance aux traitements. Nous avons donc étudié différents marqueurs solubles de NLC dans le sérum de patients et avons montré que le CD163 soluble est un marqueur pronostique de la LLC, que ce soit pour le temps avant traitement, le temps avant retraitement ou la survie globale. De plus, nous avons exploré l'impact de l'ibrutinib sur la différenciation, la morphologie, le phénotype et les capacités pro-survie des NLC. Aucune de ces caractéristiques des NLC n'est modifiée par ce traitement indiquant que cette drogue ne perturbe pas les interactions entre cellules leucémiques et NLC. L'ensemble de ces travaux démontre l'impact pronostique des NLC chez les patients et leurs rôles dans la résistance aux traitements cela justifie de nouveaux travaux sur les NLC afin de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques dans la LLC.

---

**Mots-clés : « Nurse-like » cells, leucémie lymphoïde chronique, soluble CD163, ibrutinib, pronostic**

---

## **Study of the impact of « nurse-like » cells on overall survival and resistance to chemotherapies in chronic lymphocytic leukemia**

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is an hemopathy characterized by an heterogeneous progression which can be predicted by prognostic markers from the leukemic cells. However, microenvironment in this pathology takes now a large part of the physiopathology and the prognostic. Today, only few publications described the impact of « nurse-like » cells (NLC), the tumor associated macrophages of CLL, on prognostic or on the chemoresistance. We studied some soluble markers from NLC and showed that soluble CD163 is a prognostic marker in CLL for time to first treatment, time to next treatment and overall survival. Moreover, we studied the impact of ibrutinib treatment on NLC's differentiation, phenotype and pro-survival capacities and showed that none of these characteristics were modified. These results indicate that ibrutinib does not disturb interaction between leukemic cells and NLC. Taking together, these results demonstrated the impact of NLC in CLL and their effects on chemoresistance and justify new researches to find news therapeutic targets in CLL.

---

**DISCIPLINE administrative : PHARMACIE – INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

**Directeur de thèse : Dr. Mary POUPOT, Dr. Loïc YSEABERT**

Immunociblage des Tumeurs à Cellules B, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse,  
UMR 1037 INSERM-UPS, ERL CNRS 5294.  
2 avenue Hubert Curien, Oncopole entrée C 31100 TOULOUSE - FRANCE