



Étude de la voie métabolique UGT2B17 et son rôle dans le pronostic et la réponse au traitement de la leucémie lymphoïde chronique.

Thèse

Eric Allain

Doctorat en sciences pharmaceutiques
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Eric Allain, 2020

**Étude de la voie métabolique UGT2B17 et son rôle dans le pronostic et la
réponse au traitement de la leucémie lymphoïde chronique.**

Thèse

Eric P. Allain

Sous la direction de :

Chantal Guillemette, Directrice de recherche

Éric Lévesque, Co-directeur

Résumé

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la forme adulte la plus fréquente dans le monde occidental. Les patients atteints présentent un parcours clinique très variable. Il s'avère important d'identifier de nouveaux marqueurs pronostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'optimiser à la fois la prise en charge du patient et le traitement. Une étude antérieure de notre groupe révèle une surexpression en ARN du marqueur *UGT2B17* dans les lymphocytes d'un sous-groupe de patients LLC. Les niveaux d'expression *UGT2B17* élevés sont associés à un mauvais pronostic et une réponse réduite aux traitements utilisant la fludarabine (FC/FCR). Bien que les UGT soient connus pour leur rôle important dans l'inactivation et l'élimination des médicaments, ces enzymes régulent aussi l'équilibre de molécules endogènes, notamment les hormones stéroïdiennes. L'hypothèse du projet de doctorat stipule qu'*UGT2B17* module des fonctions cellulaires favorisant la progression de la LLC et la résistance aux médicaments. Ces effets peuvent être médiés via sa fonction enzymatique **i**) en modifiant certains substrats endogènes, entraînant un effet sur les voies cellulaires, influençant le profil oncogénique des cellules LLC et **ii**) en inactivant les composés pharmacologiques, entraînant ainsi une réponse réduite au traitement anti-leucémique.

Une première étude a permis d'établir les liens entre les niveaux d'expression d'*UGT2B17*, l'exposition hormonale, et la survie des patients leucémiques (n=156). Nos travaux révèlent une perturbation des niveaux hormonaux chez les patients atteints de LLC comparés aux sujets sains. De plus, les niveaux de certaines hormones stéroïdiennes sont associés à la survie des patients et ce, de manière différente selon le sexe. Cela suggère un dimorphisme sexuel quant à l'influence des voies hormonales sur la progression de la maladie. Toutefois, ces effets semblent indépendants du statut génétique et d'expression d'*UGT2B17*, l'UGT prédominante dans les lymphocytes B.

Conformément à la signature pronostique défavorable associée à *UGT2B17 in vivo*, sa surexpression dans des modèles cellulaires est associée à une prolifération accrue des lymphocytes B. Les analyses transcriptomiques révèlent qu'un taux élevé d'*UGT2B17* est associé à une altération de gènes liés à la prostaglandine E2 (PGE_2), à la fois dans les modèles et dans une cohorte de 448 patients LLC. Les analyses fonctionnelles montrent que le PGE_2 favorise l'apoptose des cellules leucémiques de patients et réduit la prolifération des modèles cellulaires. Son effet est partiellement aboli par l'expression élevée d'*UGT2B17*. Les analyses enzymatiques démontrent qu'*UGT2B17* inactive PGE_2 par sa conjugaison à l'acide glucuronique (GlcA), ce qui entraîne la formation de deux glucuronides (G). Ceci est soutenu par l'inactivation efficace de PGE_2 en PGE_2 -G dans les cellules de patients atteints de LLC exprimant *UGT2B17*. Pour cette seconde étude, nous concluons que la glucuronidation du PGE_2 par l'enzyme *UGT2B17* altère les effets anti-oncogéniques de PGE_2 dans les cellules leucémiques, contribuant possiblement à la progression de la maladie chez les patients atteints de LLC présentant des niveaux élevés d'*UGT2B17*.

Nous avons par la suite étudié l'implication de l'enzyme *UGT2B17* dans l'inactivation de la fludarabine et de thérapies ciblées émergentes, et si cette voie affecte la réponse au traitement. Des niveaux élevés d'*UGT2B17* sont associés à une sensibilité réduite à la fludarabine, l'ibrutinib et l'idelalisib dans deux modèles cellulaires lymphoïdes. Comme chez

les patients atteints de LLC traités à la fludarabine, l'exposition des modèles à la l'ibrutinib et l'idelalisib induit l'expression d'UGT2B17. Nos résultats révèlent que l'UGT2B17 affecte possiblement la signalisation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) et que son expression est régulée par un promoteur alternatif. Outre la fludarabine, l'ibrutinib et l'idelalisib, nous avons démontré la formation de glucuronides par spectrométrie de masse pour un nombre important de médicaments utilisés en LLC. La majorité de ces antileucémiques sont conjugués par UGT1A4, alors que la fludarabine, le venetoclax, le cerdulatinib et le chlorambucil sont également conjugués par UGT2B17. Les glucuronides de la fludarabine et de l'ibrutinib sont détectés en circulation des patients LLC traités. Ces données supportent un mécanisme spécifique pour la modification de la réponse au médicament par UGT2B17 impliquant l'inactivation directe du médicament dans les cellules B néoplasiques, contribuant ainsi à la réponse au traitement chez les patients atteints de LLC présentant des niveaux élevés d'UGT2B17. Cependant, nos résultats suggèrent des mécanismes additionnels pour les molécules qui ne sont pas des substrats de l'enzyme UGT2B17.

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent adult form in the western world. It is a highly heterogeneous disease, with a considerable number of patients developing progressive disease or resistance to therapy. New biomarkers and therapeutic targets have recently emerged which help to partly explain some of this clinical variability. However, some cases still progress without explanation. New discoveries will help to manage patients and choose the right therapeutic options. Previous work by our group has revealed reduced survival and lack of response to fludarabine-containing regimens in a subset of CLL patients exhibiting high UGT2B17 mRNA expression in leukemic lymphocytes. We sought to explain this observation by further characterizing the role of UGT2B17 in CLL. UGTs are well-known for their role in the metabolism of xenobiotics, but they can also conjugate small endogenous effectors which can influence cancer biology, most notably steroid hormones. Our hypothesis was that UGT2B17 may alter molecular functions in leukemic cells via its enzymatic function in a way which promotes disease progression by **i**) modification of endogenous small molecules important for cancer progression or **ii**) through inactivation of drugs targeting CLL cells, which would subsequently change drug response.

Our first study aimed to explore possible associations between UGT2B17 expression, circulating hormone levels, and patient survival. This study examined 156 CLL patients and revealed sex-specific associations between levels of certain hormones and time to treatment. These associations differed between men and women, suggesting differing biological pathways between sexes. Furthermore, these effects seemed to be independent of UGT2B17 expression or deletion polymorphism, suggesting that UGT2B17 is not linked to the effects of hormones on survival in the studied cohort.

Previous work by our research group and others has shown that elevated UGT2B17 is associated with poor prognosis in CLL, independently of treatment, indicating that this enzyme may potentially influence CLL pathophysiology. In line with these clinical observations, we showed an increased proliferation in malignant B lymphocytes engineered to overexpress UGT2B17. Genomic analyses revealed an altered expression of genes related to prostaglandin E2 (PGE₂) signaling associated with high UGT2B17 expression. This expression profile was also observed in public data from 448 untreated CLL patients. In mononuclear cells from CLL patients, treatment with PGE₂ favored apoptosis, while cell line treatments with PGE₂ inhibited proliferation in a UGT2B17-dependent manner. Examination of PGE₂ and other prostaglandins by mass spectrometry revealed PGE₂ to be a novel anti-oncogenic substrate for UGT2B17. Elevated expression of UGT2B17 in CLL cells may therefore contribute to subverting the anti-oncogenic effects of PGE₂.

Apart from the effects of UGT2B17 on endogenous effectors in CLL, we also studied drug elimination by glucuronidation in CLL. Cytotoxicity assays showed that treatment of malignant cells overexpressing UGT2B17 displays diminished sensitivity to fludarabine (a cytotoxic purine analog) or ibrutinib and idelalisib (B-cell receptor inhibitors). Furthermore, treatment with these compounds strongly induced UGT2B17 *in vitro*. RNA-sequencing experiments and subsequent clustering analyses showed that UGT2B17 in lymphoid cells affects AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and is regulated by NF- κ B through an alternative promoter. Mass spectrometry analyses confirmed fludarabine, venetoclax, cerdulatinib and duvelisib to be UGT2B17 substrates. Other drugs used to treat CLL such as

ibrutinib, idelalisib, bendamustine, chlorambucil and acalabrutinib were also metabolized by UGT enzymes, mostly by UGT1A4. These results support alteration of drug response through direct drug metabolism by UGT2B17 in some cases, while there may be alternate mechanisms at play in mediating a differential response to non-substrate drugs.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iv
Table des matières.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
Remerciements	xi
Introduction.....	1
<i>Pathophysiologie moléculaire.....</i>	<i>2</i>
<i>Facteurs de risque et diagnostic</i>	<i>7</i>
<i>Critères diagnostiques.....</i>	<i>8</i>
<i>Stratification clinique et moléculaire</i>	<i>9</i>
<i>Traitement.....</i>	<i>13</i>
<i>La voie métabolique de glucuronidation par les enzymes UDP-glucuronosyltransferases</i>	<i>19</i>
<i>L'enzyme UGT2B17.....</i>	<i>23</i>
Hypothèses et objectifs	28
<i>Objectif 1 : Étudier le rôle d'UGT2B17 dans la biologie de la LLC.....</i>	<i>29</i>
<i>Objectif 2 : Évaluer l'implication d'UGT2B17 dans la réponse aux agents anti-leucémiques utilisés dans le traitement de la LLC.....</i>	<i>30</i>
Chapitre 1 : « Sex-dependent association of circulating sex steroids and pituitary hormones with treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients.».....	37
<i>Résumé</i>	<i>37</i>
<i>Abstract</i>	<i>40</i>
Chapitre 2: « Inactivation of prostaglandin E₂ as a mechanism for UGT2B17-mediated adverse effects in chronic lymphocytic leukemia ».....	78
<i>Résumé</i>	<i>78</i>
<i>Abstract</i>	<i>81</i>
Chapitre 3 : « UGT2B17 modifies drug response in chronic lymphocytic leukemia ».....	113
<i>Résumé</i>	<i>113</i>
<i>Abstract</i>	<i>115</i>
Discussion	151
<i>Les hormones et la LLC.....</i>	<i>152</i>
<i>L'interaction entre UGT2B17 et le PGE₂ dans la LLC</i>	<i>156</i>
<i>Le rôle de l'enzyme UGT2B17 dans la réponse aux médicaments.....</i>	<i>161</i>
Conclusion	166
Bibliographie	167

Liste des figures

Figure 1 : Schémas des principales voies signalétiques dans la pathophysiologie de la LLC.....	5
Figure 2 : Origine cellulaire de la LLC.....	7
Figure 3 : Fréquence des mutations somatiques et anomalies cytogénétiques dans la LLC	13
Figure 4 : Développement des thérapies en LLC depuis 1960 et taux de réponse.....	14
Figure 5 : Présentation de l'un des algorithmes de traitement de première intention en LLC.....	18
Figure 6. Structure des gènes de la grande famille des UGT	21
Figure 7 : Réaction de glucuronidation.....	22
Figure 8 : L'épissage alternatif du gène <i>UGT2B17</i>	24
Figure 9 : Schéma des voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes	26
Figure 10 : <i>UGT2B17</i> : un marqueur pronostique en LLC	29

Liste des tableaux

Tableau 1 : La gradation pronostique des patients atteints de LLC selon les échelles Rai et Binet	10
Tableau 2 : Principaux essais cliniques pour l'évaluation de l'efficacité des traitements pour la LLC sans traitement antérieur	15
Tableau 3: Sommaire de certaines caractéristiques pharmacologiques de médicaments utilisés pour le traitement de la LLC.....	19
Tableau 4 : Échantillons utilisés dans le cadre de ce projet de recherche provenant de la cohorte de patients LLC autrichiens	32
Tableau 5 : Principales données publiques utilisées pour l'étude d'UGT2B17.....	35

Liste des abréviations

15d-PGJ ₂	15-desoxy prostaglandin J ₂
16 α OHE ₁	16 α -hydroxyestrone
16epiE ₃	16-epiestriol
16ketoE ₂	16-ketoestradiol
16OH-CE	16-hydroxy catechol estrogen
2MeOE ₁	2-methoxyestrone
2/4OH-CE	Hydroxy catechol estrogen
2OHE ₁	2-hydroxyestrone
3 α -diol-17G-androstane	3 α , 17 β -diol-17-glucuronide
3 α -diol-3G-androstane	3 α , 17 β -diol 3-glucuronide
3 β -diol-androstane	3 β -17 β -diol
4-dione	4-androstenedione
4MeOE ₁	4-methoxyestrone
4OHE ₁	4-hydroxyestrone
5-diol	5-androsten-3 β , 17 β -diol
AA	Arachidonic acid
ADT	Androsterone
ADT-G	Androsterone glucuronide
CD	Cluster of differentiation
CE	Catechol estrogen
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CI	Confidence interval
CLL	Chronic lymphocytic leukemia
CpG-ODN	CpG oligonucleotide
CV	Coefficient of variation

CXCL12	CXC motif chemokine 12
DHEA	Dehydroepiandrosterone
DHEA-S	Dehydroepiandrosterone sulfate
DHT	Dihydrotestosterone
E ₁	Estrone
E ₁ -S	Estrone sulfate
E ₂	Estradiol
E ₃	Estriol
ENCODE	Eyclopedia of DNA elements
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FC	Fludarabine-Cyclophosphamide
FCR	Fludarabine – Cyclophosphamide - Rituximab
HR	Hazard ratio
MeO-CE	Methoxy catechol estrogen
OS	Overall survival
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PG	Prostaglandin
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
Prog	Progesterone
Testo	Testosterone
TFS	Treatment-free survival
TTFT	Time to first treatment
VH	Immunoglobulin variable region heavy chain

Remerciements

De près ou de loin, plusieurs individus ont contribué à la complétion de ce projet de doctorat. L'une des qualités les plus importantes que l'on puisse avoir en tant que scientifique c'est l'autonomie, mais j'estime que cette autonomie ne se développe pas sans l'aide essentielle de nos collègues et des professionnels qui nous encadrent. Avant tous, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Chantal Guillemette, pour m'avoir accueilli dans son équipe. Elle avait toujours à cœur mon développement professionnel tout au long de mon doctorat et savait bien m'orienter, tout en étant réceptive à mes idées. Elle n'hésitait jamais à m'envoyer à des congrès et des formations, surtout lorsque ceux-ci étaient en lien avec mes propres intérêts de recherche. Chantal a aussi un talent incroyable pour le recrutement, car elle a su générer un environnement de travail qui est très agréable, rempli de personnes motivées et productives. J'aimerais aussi remercier mon co-directeur, Éric Lévesque, pour son feedback essentiel tout au long de mon cheminement et son point de vue en tant que clinicien. Son enthousiasme hors pair est tellement contagieuse qu'une discussion de 15 minutes avec Éric peut renouveler notre passion pour la recherche scientifique comme si ce serait notre première journée dans le laboratoire. Je dois aussi remercier Michèle Rouleau, Lyne Villeneuve, Patrick Caron, Véronique Turcotte, Sylvie Desjardins et Andréa Fournier qui m'ont supporté aux niveaux technique, organisationnel, moral et administratif. Sans eux, mon doctorat n'aurait sûrement pas été autant productif. Un énorme merci se doit aux autres étudiants de l'équipe de Chantal, particulièrement à Yannick Audet-Delage, Adrien Labriet et Sandra Gauque. Nos collègues sont réellement les seules personnes à partager les défis, les victoires et les moments inoubliables de notre parcours. Au-delà d'être nos collègues, ces individus deviennent et demeureront des amis. Je leur souhaite tous une très bonne continuité dans leurs vies personnelles, ainsi que pour leurs carrières.

Je remercie mon père Pierre et ma mère Yvette, qui ont supporté mes choix de carrière au fil des ans, et ce malgré la nature parfois complexe et inhabituelle du cheminement professionnel en recherche scientifique.

Finalement, aucun geste, parole ou texte ne peut être suffisant pour exprimer ma gratitude envers Danica, mon épouse. Depuis 2008, elle a été ma partenaire dans tous les aspects de la vie. C'est ma meilleure amie, celle qui a soulagé mes craintes, mes peurs et mon stress lors des moments plus difficiles. Elle a su démontrer une patience incroyable pendant mon doctorat et je suis très content d'être capable de finalement la rejoindre, pour continuer à créer de beaux moments ensemble.

Avant-propos

Les chapitres suivants correspondent aux manuscrits scientifiques préparés dans le cadre de ma formation doctorale pour insertion à cette thèse intitulée : « Étude de la voie métabolique UGT2B17 et son rôle dans le pronostic et la réponse au traitement dans la leucémie lymphoïde chronique ». Trois manuscrits ont été rédigés pour soumission à divers journaux scientifiques. Le premier chapitre est intitulé « *Sex-dependent association of circulating sex steroids and pituitary hormones with treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients* », dont je suis l'auteur principal. Ma contribution à ce projet fut surtout au niveau de l'analyse statistique, l'interprétation et l'illustration des résultats et la rédaction du manuscrit. J'estime ma contribution à 60 %. Ce manuscrit fut soumis au journal *Annals of Hematology* (facteur d'impact = 2.85) le 23 mars 2018 et accepté pour publication le 28 avril 2018. Patrick Caron et Véronique Turcotte ont effectué les extractions, la chromatographie et les analyses par spectrométrie de masse des échantillons. David Simonyan a révisé les analyses statistiques. Michaela Gruber et Trang Le ont contribué au recrutement et au suivi des patients, ainsi qu'à la collecte et l'organisation des données cliniques. Karin Venzl a généré les données d'expression génique pour cette étude. Éric Lévesque et Katrina Vanura ont participé à l'interprétation des résultats et à la révision du manuscrit. Tous les auteurs ont révisé l'article. Ma directrice, Chantal Guillemette, a conceptualisé l'étude, effectué l'analyse et l'interprétation des résultats, la rédaction et la révision du manuscrit.

Le deuxième chapitre est intitulé « *Inactivation of prostaglandin E2 as a mechanism for UGT2B17-mediated adverse effects in chronic lymphocytic leukemia* » dont je suis l'auteur principal. J'ai effectué la majorité des expériences (essais de croissance cellulaire, essais de migration, cytométrie, analyses bioinformatiques, traitements *in vitro*) et l'ensemble des analyses statistiques. J'ai participé à l'interprétation des données et à la rédaction. Ce travail fut soumis pour publication au journal *Frontiers in Oncology* (facteur d'impact = 4.42) le 29 mars 2019 et accepté pour publication le 19 juin 2019. J'estime ma contribution à 80 %. Katrina Vanura et Trang Le ont participé au recrutement des patients, à la récolte des échantillons et des données cliniques et nous ont accompagnés dans le design des expériences avec les spécimens de patients. Lyne Villeneuve a participé aux expériences de cytométrie et de spectrométrie de masse réalisées par Patrick Caron et Véronique Turcotte. Ces derniers ont développé les méthodes de bioanalyse et effectué toutes les analyses de spectrométrie de masse. Éric Lévesque et Michèle Rouleau ont participé à l'interprétation des résultats, la révision du manuscrit et à sa rédaction. Tous les auteurs ont révisé l'article. Ma directrice, Chantal Guillemette, a conceptualisé l'étude, effectué l'analyse et l'interprétation des résultats, la rédaction et la révision du manuscrit. À noter que le matériel supplémentaire (Tableaux S2, S3 et S4) qui présente les résultats détaillés d'analyse génomique ont été omis de cette thèse afin de ne pas alourdir le texte, mais sont disponibles en ligne.

Le troisième et dernier chapitre « *UGT2B17 modifies drug response in chronic lymphocytic leukemia* », dont je suis auteur principal, fut soumis pour publication. Ma contribution à ce projet fut surtout au niveau de l'analyse bioinformatique et statistique ainsi que ma participation à l'interprétation des résultats et la rédaction du manuscrit. J'estime ma contribution à 60 %. Avec la contribution de Lyne Villeneuve, j'ai effectué plusieurs des expériences, incluant l'analyse des données de séquençage, l'analyse des données de PCR quantitatif et les essais de cytotoxicité. Patrick Caron et Véronique Turcotte ont développé

les méthodes de bioanalyse et effectué toutes les analyses de spectrométrie de masse. Joanie Vaillancourt a effectué des expériences de PCR quantitatif. Vincent Bat a validé l'expression de variants d'épissage par PCR et Adrien Labriet a participé au clonage de promoteurs. Katrina Vanura et Trang Le ont participé au recrutement des patients, des spécimens et des données cliniques. Medhat Shehata, Susanne Schnabl, Dita Demirtas, Rainer Hubmann, Ulrich Jäger et Philipp Staber ont fourni des données d'expression génique ainsi que des données cliniques, et ont participé à la révision du manuscrit. Charles Joly-Beauparlant et Arnaud Droit ont collaboré aux analyses bioinformatiques. Éric Lévesque et Michèle Rouleau ont participé à l'interprétation des résultats, ainsi qu'à la rédaction et la révision du manuscrit. Tous les auteurs ont révisé l'article. Ma directrice, Chantal Guillemette, a conceptualisé l'étude, effectué l'analyse et l'interprétation des résultats, la rédaction et la révision du manuscrit. Tous les auteurs mentionnés ci-dessus ont donné leur approbation avant la soumission des manuscrits présentés dans cette thèse.

Introduction

En 2013, une première étude de notre groupe de recherche a démontré un lien entre la voie métabolique de l'UDP-glucuronosyltransferase 2B17 (UGT2B17) et la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (1). Dans cette première cohorte de 320 patients LLC autrichiens, une forte expression d'ARN messager du gène *UGT2B17* dans les cellules mononucléées du sang a été associée à une survie sans traitement (TFS) et une survie globale (OS) réduites. Une tendance à développer une maladie progressive a été notée pour les individus ayant un génotype de délétion du gène *UGT2B17*, un polymorphisme fréquent entraînant la perte complète de ce gène (1). Les patients ayant une forte expression ont nécessité un traitement plus précoce que ceux ayant peu ou pas d'expression de ce gène. De plus, UGT2B17 se révèle être un marqueur indépendant des marqueurs reconnus en LLC, alors que son expression corrèle partiellement avec la présence de certaines anomalies cytogénétiques défavorables (1). Une 2^e étude portant sur une cohorte suédoise, publiée en 2016, supporte les conclusions tirées de l'étude de notre groupe et démontre que *UGT2B17* est un marqueur pronostic indépendant (2). Cette étude démontre aussi que l'expression d'*UGT2B17* peut être utilisé en combinaison avec d'autres biomarqueurs afin de mieux identifier les patients ayant une maladie progressive, même quand ceux-ci ont un profil cytogénétique favorable (2). Globalement, ces deux études indiquent que le niveau d'expression d'UGT2B17 dans les cellules leucémiques constitue un nouveau marqueur moléculaire pour la LLC, favorisant la progression de la maladie par un mécanisme toujours inconnu (3). Mes travaux visaient à élucider ce(s) mécanisme(s). Les approches retenues visaient à caractériser les conséquences phénotypiques et transcriptionnelles d'une forte expression UGT2B17 au niveau leucémique, en lien avec la fonction catalytique de l'enzyme. Nos résultats ont fait l'objet de trois manuscrits originaux combinant l'étude de patients LLC à celle de modèles cellulaires.

Les cancers hématologiques sont une classe de cancers affectant les cellules hématopoïétiques, lymphoïdes et myéloïdes. Lorsqu'un cancer est issu de ces types cellulaires, il peut se manifester en tant que tumeur solide (lymphomes) ou bien sous la forme de cellules circulantes qui peuvent envahir le sang et la moelle osseuse (leucémie). Les sous-types de leucémies se distinguent selon ces deux types cellulaires et selon le stade de maturité des cellules. Les leucémies aiguës se développent à partir des précurseurs lymphoïdes et myéloïdes immatures, et ce très rapidement. Les leucémies chroniques se développent à partir

de cellules beaucoup plus matures et ce, à un taux très variable. Cette variabilité fait de sorte que le pronostic, le choix du traitement et le moment d'initiation du traitement peuvent être difficiles à estimer sur la base du diagnostic et de certaines caractéristiques du patient et de sa maladie. Malgré la découverte de plusieurs biomarqueurs moléculaires importants, les marqueurs connus n'expliquent qu'une fraction de la variabilité clinique et des mécanismes pathophysiologiques en lien avec la progression de la LLC. La découverte de nouveaux biomarqueurs moléculaires pronostiques pourrait aider à mieux évaluer le parcours du patient. Certains biomarqueurs prédictifs pourraient aussi aider à guider le choix de traitement et maximiser son efficacité. Les marqueurs connus seront discutés ci-dessous.

La LLC est une maladie lymphoproliférative des cellules B $CD5^+/CD23^+$ qui s'accumulent dans le sang périphérique et les organes lymphoïdes du patient. C'est la leucémie adulte la plus fréquente dans le monde occidental, et une des leucémies les plus prévalentes, représentant plus de 34 % des cas de leucémie adulte (4). C'est aussi un cancer ayant un grand fardeau économique, car l'efficacité accrue des nouveaux traitements entraîne une augmentation importante du nombre de patients vivant avec la LLC. Ces patients ont une survie améliorée comparativement aux anciens régimes thérapeutiques, mais ils nécessitent des traitements réguliers et coûteux, ce qui augmente la charge financière à l'état et au patient (5). Les patients ayant une maladie symptomatique au diagnostic nécessitent une intervention thérapeutique, tandis que la majorité requiert une surveillance active. Une proportion importante des patients sous surveillance développe une maladie progressive et reçoit un traitement. Par contre, plusieurs individus ne répondent pas au régime de traitement ou bien développent une résistance acquise à la thérapie pendant le traitement.

Pathophysiologie moléculaire

Comme les cellules B saines, les lymphocytes néoplasiques se développent à partir des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Pendant leur maturation, ils subissent la recombinaison VDJ, un processus de recombinaison aléatoire des multiples segments V, D et J de l'immunoglobuline qui existent dans le génome de l'individu. Une séquence parmi chacune de ces classes (V, D et J) est choisie aléatoirement, et les trois sont combinées afin de générer un gène d'immunoglobuline complet capable de donner naissance à un récepteur des cellules B (BCR) fonctionnel. Ce processus vise à créer une vaste diversité de molécules

d'immunoglobuline, afin d'offrir un maximum de reconnaissance antigénique au système immunitaire. Chaque lymphocyte ayant complété la recombinaison productive de ce gène aura une séquence VDJ qui lui est propre, ce qui mène au développement d'un grand bassin polyclonal de lymphocytes B naïfs. Dans les cellules leucémiques, ce processus est biaisé, car il y a une utilisation préférentielle de certaines combinaisons VDJ. Cela signifie que certains gènes V sont fortement sur-représentés dans les cas de LLC comparativement à ce que l'on retrouverait dans la population générale (6,7). On nomme ce phénomène la stéréotypie du BCR. Certaines classes de gènes V sont fortement corrélées aux autres marqueurs pronostiques et peuvent avoir une valeur pronostique inhérente. D'un point de vue mécanistique, les combinaisons VDJ associées à une LLC agressive mènent à des molécules d'immunoglobuline pouvant interagir entre elles ou avec d'autres peptides endogènes, ce qui favorise une signalisation aberrante (8). Ce défaut de stimulation BCR favorise la prolifération ou l'anergie, ce qui prévient ultimement l'apoptose des cellules leucémiques et peut causer leur accumulation (8).

La deuxième étape importante de maturation des lymphocytes B se déroule au niveau du ganglion lymphatique à la suite d'une exposition aux antigènes. Ceux-ci se dirigent vers le ganglion où ils subissent une hypermutation somatique du gène IGHV, ce qui permet d'augmenter l'affinité de l'immunoglobuline exprimée par les cellules envers l'antigène étranger. Ce processus stochastique génère des mutations aléatoirement dans la séquence IGHV, ce qui change la séquence d'acides aminés et l'affinité du récepteur résultant, afin d'optimiser la réponse à l'antigène. Comme la recombinaison VDJ, ce processus d'hypermutation donne parfois naissance à des clones non productifs ou autoréactifs. Dans ces cas, les cellules dysfonctionnelles entament normalement l'apoptose. Seulement les clones ayant des réponses immunitaires adéquates seront permis de recirculer et de survivre. On nomme ce phénomène la réaction du centre germinal (CG).

Lorsque la cellule pré-leucémique subit une transformation oncogénique avant d'entamer la réaction CG, il y a l'apparition de cellules leucémiques que l'on nomme pré-centre germinal (Pré-CG) qui n'ont pas entamées l'hypermutation somatique (IGHV non-muté) (9,10). Ces cellules peuvent être identifiées par une séquence IGHV germinale et mènent généralement à une maladie plus agressive, tandis que les LLC plus indolentes auront des cellules

leucémiques post-centre germinale (Post-CG) ayant une séquence IGHV mutée. Cependant, contrairement aux leucémies aiguës, même les cellules leucémiques des LLC très agressives ont un statut de maturation très avancé, ressemblant énormément à celui d'une cellule B mémoire (11,12). Cependant, il faut noter que les lymphocytes B leucémiques d'un patient ayant la LLC ne sont pas immunocompétents et ne peuvent alors pas participer à la défense de l'hôte dans le cas d'une infection.

Les cellules cancéreuses circulantes sont majoritairement bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire et ne représentent donc pas une source importante de nouvelles cellules malignes (13-15). Par contre, ces cellules leucémiques sont attirées à la moelle osseuse et aux organes lymphoïdes secondaires par le CXCL12, une cytokine libérée par les cellules résidentes de ces tissus (16). Une fois rendus à ces sites anatomiques, ils reçoivent des signaux provenant des cellules T auxiliaires, cellules stromales, cellules endothéliales ou des « *Nurse-like cells* » qui favorisent la division cellulaire et la survie (Figure 1A) (17). Cette signalisation entre la cellule de LLC et les cellules résidentes des centres prolifératifs altère drastiquement le profil d'expression des cellules leucémiques, favorisant la croissance cellulaire (18,19). De plus, la cascade de signalisation du BCR semble jouer un rôle central permettant aux cellules leucémiques de se diviser et d'assurer la survie de ces cellules (Figure 1B) (18). Cette dépendance environnementale fait en sorte que les cellules leucémiques entrent spontanément en apoptose *ex vivo*, ce qui complexifie leur utilisation en recherche. Cette signalisation provenant des cellules avoisinantes peut cependant être simulée par coculture ou en ajoutant certains réactifs au milieu de culture, tels que le CD40 soluble et le CpG-ODN (20-25).

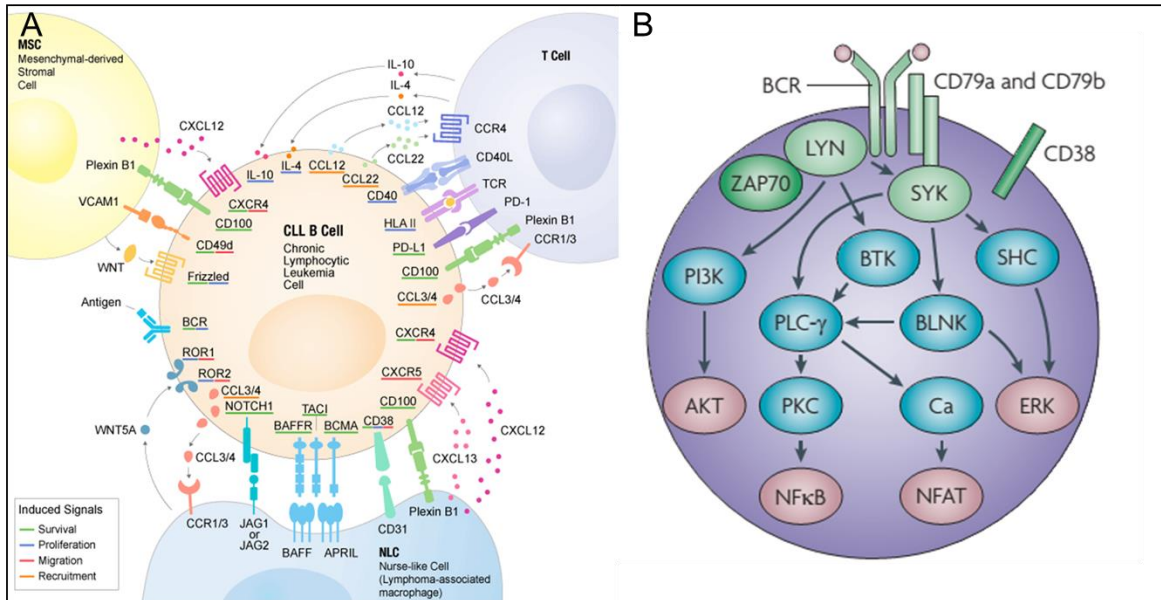


Figure 1 : Schémas des principales voies signalétiques dans la pathophysiologie de la LLC (A) Le microenvironnement des cellules leucémiques fournit une variété de signaux menant à la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. (B) Cascade de signalisation du BCR. (B) Tiré de Zenz *et al.* 2010, *Nat Rev Cancer* (27) et (A) <https://www.abnova.com/>.

L'origine cellulaire de la LLC est un sujet controversé, mais quelques observations importantes fournissent des indices quant à la (ou les) cellule leucémique fondatrice (26,27). Les familles de patients ayant la LLC ont plus souvent tendance à développer des bassins oligoclonales ou monoclonaux de cellules B que la population générale. Environ 3 à 6 % des adultes en santé sans historique familiale de leucémie développent une lymphocytose (MBL), tandis que ce chiffre s'élève à 13 % pour la famille d'un individu ayant développé la LLC (28). Les LLC qui se développent dans une même famille n'ont par contre pas toutes les mêmes caractéristiques moléculaires, ce qui indique que d'autres facteurs peuvent sans doute influencer le moment de leukemogénèse et les traits moléculaires malgré la présence de cette susceptibilité familiale commune. De plus, les sous-groupes moléculaires bien définis par certaines étapes discrètes de la maturation des cellules B agissent très différemment face à la stimulation antigénique (29). Cela soulève la possibilité que le type cellulaire d'origine puisse être différent d'un patient à l'autre, selon l'étape de maturation où la lésion est apparue.

Il est probable que les familles ayant ce trait héritable génétique ou épigénétique développent des clones pré-leucémiques plus aisément que les cas de LLC sporadiques. Ces clones comportent un avantage de survie, mais nécessitent une altération génétique ou signalétique supplémentaire afin d'entamer une transformation leucémique complète. Pour les cas de LLC familiale, ces clones peuvent être présents dès la naissance, tandis que pour les cas sporadiques, cet avantage de survie est possiblement acquis lors d'une des étapes du développement de la cellule B (26).

Il n'est pas clair si l'événement oncogénique survient à l'une des étapes discrètes de la maturation des cellules B ou bien en tout moment, de façon aléatoire. Dans tous les cas, il semble y avoir un consensus que les cellules LLC ont un profil correspondant à une cellule B ayant subi un contact antigénique, peu importe la nature endogène ou exogène du ligand (30). Des analyses comparatives ont établi certains parallèles entre les cellules B mémoires, les cellules B spléniques (MZ), les cellules B CD5⁺ humaines et la LLC, mais ce sans conclusion définitive quant à l'origine cellulaire de la maladie (Figure 2) (11,31,32).

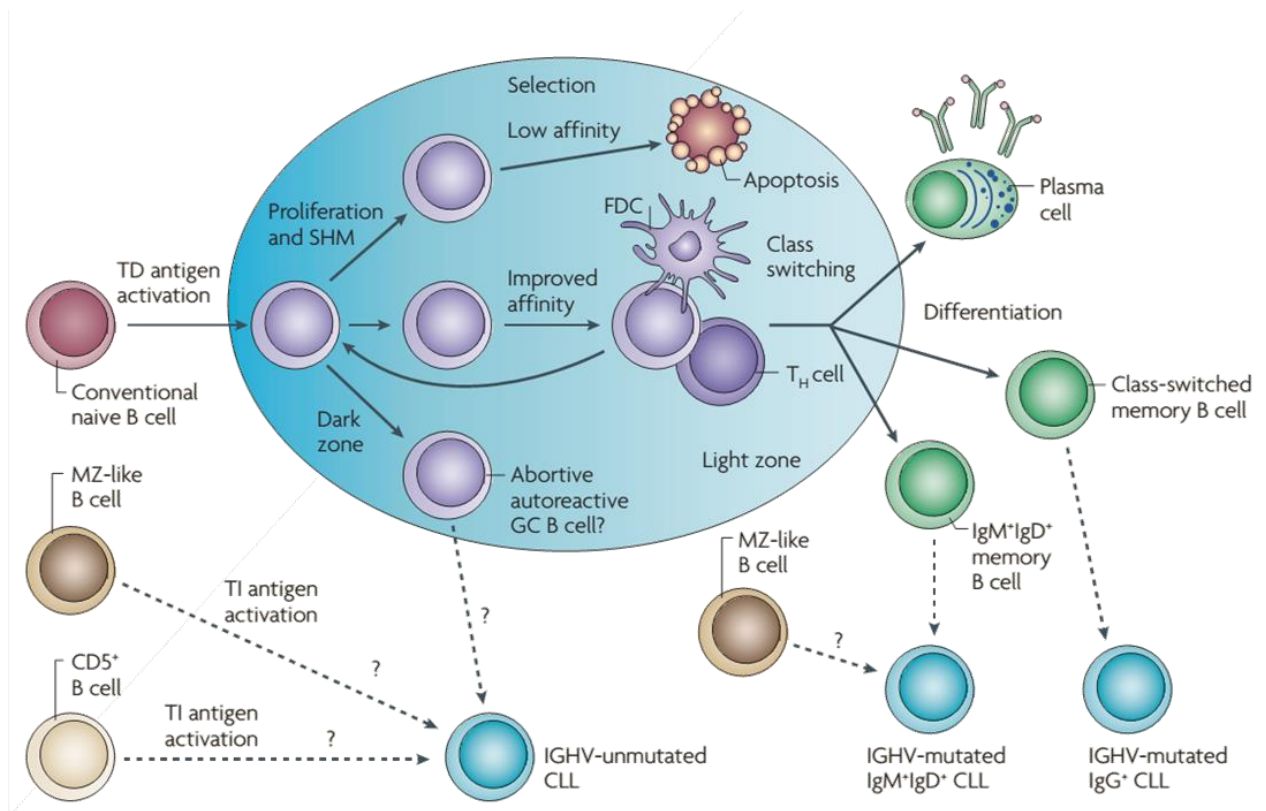


Figure 2 : Origine cellulaire de la LLC. Plusieurs classes de cellules B humaines ont été proposées comme contreparties non-cancéreuses de la LLC. Les cellules de la zone marginale (MZ), les cellules CD5+ humaines et les cellules B post-centre germinatif (GC) peuvent toutes être à l'origine de la maladie. TI/TD : cellule T-indépendante et dépendante, SHM : hypermutation somatique. Adapté de Zenz *et al.* 2010, *Nat Rev Cancer* (27).

Facteurs de risque et diagnostic

Le niveau d'incidence pour la LLC varie selon plusieurs facteurs, tels que l'âge, le sexe, l'ethnicité et l'histoire familiale. L'âge est le facteur de risque le plus important pour la LLC (33,34). L'âge moyen au diagnostic est d'environ 70 ans, et cette maladie est très rare dans les populations de moins de 40 ans, et quasi inexistante chez les jeunes (34). Toutefois, plus de 30 % des patients ont moins de 60 ans au diagnostic. Il y a aussi une composante génétique importante dans l'incidence de la LLC. Plusieurs cas de LLC familiale ont été documentés. On estime qu'environ 5 % des cas de LLC ont un historique familial de leucémie (35).

Pour ce qui est de l'ethnicité, plusieurs études ont conclu que les populations asiatiques ont un taux d'incidence de la LLC nettement inférieur aux autres groupes ethniques (36). De

plus, ce phénomène est très probablement de nature génétique, car ce faible taux d'incidence persiste même pour les immigrants asiatiques aux États-Unis (37,38). Le sexe est aussi un facteur de risque considérable pour la LLC, avec les hommes ayant un taux d'incidence environ deux fois plus élevé que les femmes (39). Cela est reflété dans la majorité des lymphomes et leucémies, car ce dimorphisme sexuel se manifeste non seulement dans ce cas, mais pour plusieurs autres néoplasmes lymphoïdes (39). De plus, plusieurs études ont démontré un taux de survie inférieur pour les hommes ayant la LLC (40-42).

Quelques études ont aussi montré que les hommes ont tendance à développer des LLC agressives plus fréquemment et peuvent héberger des cellules leucémiques ayant des lésions génétiques défavorables plus souvent que les femmes (42-44). Cela suggère que les mécanismes biologiques qui influencent le développement de la maladie pourraient être différents selon le sexe. Les femmes vont aussi mieux répondre au traitement pharmacologique que les hommes, ce qui appuie davantage une biologie différentielle de la maladie selon le sexe (42). Ce phénomène peut être attribué aux fonctions de certains gènes situés au niveau des chromosomes sexuels, à des différences pharmacodynamiques entre les sexes, ou aux hormones.

Critères diagnostiques

Le diagnostic de la LLC est établi lorsqu'il y a un taux de lymphocytes B supérieur ou égal à 5×10^9 lymphocytes B clonaux/L dans le sang périphérique de l'individu, maintenu pendant une période de trois mois (45). La clonalité des lymphocytes B et la présence des marqueurs de surface typiques d'une LLC (CD5, CD19, CD20, CD23) sont mesurées par cytométrie et peuvent aider à confirmer le diagnostic. Les adénopathies et l'infiltration de la moelle osseuse sont aussi des symptômes de la LLC, et peuvent souvent indiquer une maladie plus avancée ou plus agressive. Les patients ayant une manifestation plutôt nodale de la LLC avec des atteintes majoritairement au niveau des ganglions peuvent parfois recevoir un diagnostic de SLL « *small lymphocytic lymphoma* », car la pathophysiologie et les caractéristiques moléculaires de la SLL et LLC sont identiques. Ce sont deux manifestations de la même maladie.

Les individus n'ayant pas de symptômes typiques d'une LLC ou qui ont un taux de lymphocytes B inférieur à 5×10^9 lymphocytes/L, mais qui subissent tout de même une

augmentation de lymphocytes B clonaux sont classifiés comme ayant la lymphocytose monoclonale de type B (MBL). Le taux de la MBL dans la population générale est largement supérieur à l'incidence de la LLC. On estime qu'environ 5 % de tous les adultes âgés de 40 ans ou plus ont la MBL (46). Les personnes ayant la MBL ont des cellules B ayant un immunophénotype identique aux cellules de patients ayant la LLC (47). Bien que tous les cas de LLC soient systématiquement précédés par une MBL, seulement une fraction des cas de MBL progressent en LLC. D'ailleurs, des études récentes en MBL ont bien démontré que l'on peut diviser les cas de MBL en divers groupes pronostiques selon le nombre de lymphocytes clonaux en circulation (46,48,49). Comme avec la LLC, il y a une forte composante génétique qui prédispose les individus ayant un historique familial de LLC à développer la MBL (50). La LLC est aussi associée à la maladie de Richter, une transformation qui a lieu lors des cas de LLC très avancés, où la maladie se transforme d'une LLC vers un type de lymphome non-Hodgkinien agressif.

Stratification clinique et moléculaire

La gradation de la sévérité de la LLC est traditionnellement établie selon les échelles de Binet et Rai (51,52). Ces échelles utilisent des résultats de laboratoire médical et d'examen physiques afin de déterminer l'ampleur de la maladie et la nécessité de traiter. Ces échelles ne sont pas basées sur des sous-groupes moléculaires, mais plutôt sur le taux de lymphocytes sanguin et la présence d'adénopathies, splénomégalie ou de dysfonctions hématologiques (Tableau 1).

Tableau 1 : La gradation pronostique des patients atteints de LLC selon les échelles de Rai et Binet. Adapté de Gribben. 2009, *Blood*, (53).

Systeme	Grade	Symptômes
Rai	0	Lymphocytose
	I/II	Adénopathies, splénomégalie ou hépatomégalie
	III/IV	Anémie (III) – thrombocytopénie (IV)
Binet	A	< 3 régions d’adénopathies
	B	> 3 régions d’adénopathies sans anémie ou thrombocytopénie
	C	Anémie ou thrombocytopénie

Au fil des années, plusieurs découvertes ont permis de reconnaître les anomalies moléculaires et les voies de signalisation qui sont associées au pronostic de la LLC. Les échelles de Binet et Rai peuvent donc bénéficier d’une bonification d’information cytogénétique ou moléculaire, ce qui permet de mieux choisir les options thérapeutiques et de raisonnablement distinguer une LLC très agressive d’une maladie plus indolente. Bien que les effets des lésions génétiques décrites ci-dessous soient parfois attribuables en partie à des mécanismes ou des gènes précis, il y a probablement des gènes candidats affectés par ces lésions qui ne sont toujours pas caractérisés, et qui pourraient avoir une pertinence clinique.

La **délétion 13q** est une perte partielle du long bras du chromosome 13 affectant environ 50 % des patients ayant la LLC. Cette lésion est associée à la perte des micro-ARNs miR-15a et miR-16-1, qui ciblent tous les deux le transcrite *BCL2*, un gène codant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (54). Cependant, la délétion 13q englobe les micro-ARNs à un taux variable, donc la perte de ces molécules n’explique pas totalement l’effet de la délétion 13q. Cette aberration, lorsqu’elle comprend l’unique lésion génétique dans la LLC, représente une forme indolente de la maladie et les individus ayant ce profil ont généralement un bon taux de survie. Cette anomalie est aussi parmi les événements génétiques initiaux dans la LLC (55).

La **trisomie 12** a souvent été considérée comme un marqueur de risque intermédiaire (56). Les patients ayant des cellules portant cette forme de trisomie ont un parcours clinique hétérogène. Les gènes spécifiques pouvant promouvoir un phénotype pro-oncogénique sont plus difficiles à identifier dans le cas de la trisomie 12 que pour les autres lésions, vu que l'ensemble du chromosome est affecté. De plus, des effets gène-dose ont été notés avec cette aberration (57). Il y a des associations entre la trisomie 12 et d'autres marqueurs moléculaires pronostiques tels que les mutations du gène *NOTCH1* ou l'expression CD38, ce qui pourrait partiellement expliquer le parcours clinique de certains individus portant cette anomalie (58). Comme la délétion 13q, cette anomalie semble apparaître très tôt dans le parcours de la LLC (55).

La mutation ou la perte du gène *TP53* via la **délétion 17p** est aussi une lésion affectant environ 7 % des individus ayant la LLC (56,59,60). Cependant, cette délétion est parmi les lésions les plus fréquentes induites suite au traitement, et est donc retrouvée dans environ 30 % des patients réfractaires à la fludarabine, un traitement de première intention (61,62). *TP53* est un oncogène bien connu que l'on retrouve fréquemment muté dans une grande variété de cancers, et qui régule normalement la réparation de l'ADN. Cette lésion est alors associée à un pronostic défavorable et à une survie réduite. Les cellules ayant cette lésion génétique ont très fréquemment une délétion bi-allélique ou bien une délétion accompagnée d'une mutation *TP53* sur le deuxième allèle. On retrouve moins fréquemment des atteintes au gène *TP53* où le deuxième allèle est intact (63). Ce marqueur est aussi prédictif de la réponse au traitement à base de fludarabine (64,65). Plusieurs des nouvelles lignes directrices publiées pour la LLC recommandent le traitement à base d'inhibiteurs de kinases en première intention pour les patients ayant des cellules qui hébergent la délétion 17p. L'ibrutinib en est un exemple, ayant reçu l'approbation de Santé Canada en 2016 pour le traitement de patients ayant des lésions génétiques défavorables et n'ayant pas reçu de traitements antérieurs.

La **délétion 11q** est associée à la perte de plusieurs gènes : *RDX*, *FRDX1*, *RAB39*, *CUL5*, *ACAT*, *NPAT*, *KDELC2*, *EXPH2*, *MRE11*, *H2AX*, *BIRC3* et *ATM*. Le gène *ATM* est celui qui a été le mieux étudié, car ce gène joue un rôle important dans la réparation de l'ADN. Cette lésion est aussi liée à un pronostic défavorable et à une survie réduite (66). Les atteintes au gène *BIRC3* sont aussi liées à cette délétion, mais ces atteintes sont plutôt rares au diagnostic.

Cependant, 24 % des patients réfractaires à la fludarabine ont des mutations *BIRC3*, ce qui indique que le traitement de chimiothérapie peut induire l'apparition de cette lésion, comme la délétion 17p, (67). Les études examinant l'évolution des clones leucémiques dans la LLC suggèrent que ces lésions sont présentes avant le traitement et que la pression évolutive induite par le médicament cause une émergence des clones qui hébergent ces anomalies (68). Malgré le rôle important des gènes *ATM* et *BIRC3*, ceux-ci ne sont pas toujours affectés par la délétion 11q, ce qui suggère un rôle important pour les autres gènes délétés dans la pathophysiologie de cette anomalie cytogénétique.

L'analyse du gène codant la région variable de la chaîne lourde de l'**immunoglobuline** (*IGHV*) demeure un des meilleurs marqueurs pronostiques pour la discrimination des cas LLC indolents ou agressifs, à ce jour (43). L'immunoglobuline est une composante essentielle du BCR, un récepteur qui joue un rôle central dans la pathophysiologie de la LLC. Une séquence *IGHV* germinale de ce gène est associée à une survie réduite dans la LLC, tandis qu'une homologie inférieure à 98 % de la séquence germinale *IGHV* est associée à un pronostic favorable (10). Comme la délétion 17p, il est recommandé de considérer de traiter les patients ayant cette lésion avec des inhibiteurs de kinases.

Des études génomiques examinant l'évolution clonale de la LLC ont identifié des mutations fréquentes dans certains gènes pouvant affecter la biologie des cellules leucémiques. La LLC est une maladie où les cellules subissent une évolution clonale importante lors de la progression de la maladie, et surtout pendant le traitement. Des mutations somatiques des gènes *MYD88* et *NOTCH1* ont été documentées et représentent des lésions très fréquemment retrouvées dans les clones leucémiques fondateurs (55,68). La trisomie 12 et la délétion 13q hétérozygote semblent aussi être parmi les événements génétiques initiaux (68). Des mutations aux gènes *ATM*, *TP53* et *SF3B1* sont des lésions fréquentes, mais semblent être plutôt associées avec des populations de sous-clones qui apparaissent plus tardivement et probablement à la suite d'une forme de sélection telle que l'initiation du traitement (69,70). Les niveaux d'expression de certains gènes et de certaines protéines ont aussi été identifiés comme ayant une utilité pronostique. Les protéines LPL, CD38, ZAP70 et ROR1 en sont de bons exemples (71-75). Les principales anomalies cytogénétiques, ainsi que les mutations somatiques les plus importantes sont résumées à la Figure 3.

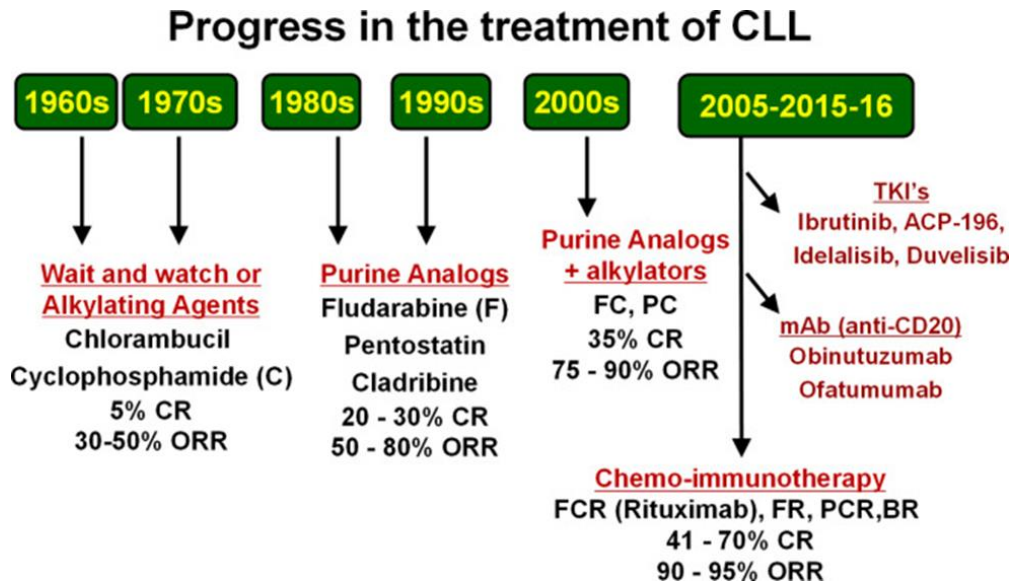


Figure 4 : Développement des thérapies en LLC depuis 1960 et taux de réponse. CR : Réponse complète; ORR : Réponse globale. Tiré de Rai et Jain. 2016, *Am J Hematol*.

Les **agents alkylants** sont des petites molécules réactives qui peuvent former des liens croisés entre les molécules d'ADN, ce qui cause ultimement une inhibition de la réplication, ainsi que l'accumulation de radicaux libres ou des dommages à l'ADN qui entraînent l'apoptose. Le cyclophosphamide, la bendamustine et le chlorambucil sont des agents alkylants utilisés pour le traitement de la LLC. Ces molécules sont utilisées dans les régimes de combinaison chimio-immunothérapie, mais ont des taux de réponse clinique relativement faibles en monothérapie. Le chlorambucil était parmi les premières thérapies pour la LLC. La bendamustine en monothérapie démontre une augmentation significative de la réponse comparativement au chlorambucil, sans changer la qualité de vie du patient (Tableau 2) (76). Les **analogues de nucléotides** agissent en s'incorporant à l'intérieur de l'ADN lors de la réplication. La fludarabine est un analogue de purine qui est utilisé depuis longtemps pour le traitement de la LLC, mais qui demeure toujours un élément important des régimes de traitement modernes (77). En monothérapie, cette molécule entraînait une réponse supérieure aux agents alkylants et a été incluse pour le traitement de la LLC. Des études pré-cliniques ont démontré une synergie possible entre la fludarabine et les anticorps anti-CD20 monoclonaux (78). Ces résultats ont mené à l'inclusion des anti-CD20 dans les régimes à base d'analogues de purines, ce qui a amélioré la réponse clinique à la thérapie (Tableau 2). Par contre, des analyses multivariées ont révélé que certaines lésions génétiques défavorables

telles que la délétion 17p et IGHV non-hypermutée peuvent avoir un effet significatif sur le taux de réponse à ce régime (79).

Tableau 2 : Principaux essais cliniques pour l'évaluation de l'efficacité des traitements pour la LLC sans traitement antérieur. CR : Réponse complète; ORR : Réponse globale (partielle et complète).

<i>Composés</i>	<i>ORR</i>	<i>CR</i>	<i>Ref</i>
<i>Monothérapies</i>			
<i>Chlorambucil (Clb)</i>	31-47 %	4-10 %	Knauf <i>et al.</i> 2012 <i>Br. J Haematol</i>
<i>Bendamustine (B)</i>	56 %	21 %	Rai <i>et al.</i> 2000 <i>NEJM</i> Goede <i>et al.</i> 2014 <i>NEJM</i>
<i>Fludarabine (F)</i>	56-63 %	5-20 %	Rai <i>et al.</i> 2000 <i>NEJM</i> Flinn <i>et al.</i> 2007 <i>J Clin Oncol</i>
<i>Rituximab (R)</i>	36 %	0 %	O'Brien <i>et al.</i> <i>J Clin Oncol</i>
<i>Ofatumumab (Of)</i>	4-24 %	1 %	Byrd <i>et al.</i> 2014 <i>NEJM</i>
<i>Idelalisib (Idel)</i>	81 %	0 %	Zelenetz <i>et al.</i> 2014 <i>Blood</i>
<i>Ibrutinib (Ibru)</i>	63-89 %	2-11 %	Byrd <i>et al.</i> 2015 <i>Blood</i> Byrd <i>et al.</i> 2014 <i>NEJM</i>
<i>Combinaisons</i>			
<i>FC</i>	74-80 %	22-46 %	Flinn <i>et al.</i> 2007 <i>J Clin Oncol</i> Robak <i>et al.</i> 2010 <i>J Clin Oncol</i> Fischer <i>et al.</i> 2016 <i>Blood</i>
<i>Cladribine - Clb</i>	-	47 %	Robak <i>et al.</i> 2010 <i>J Clin Oncol</i>
<i>FCR</i>	90-98 %	41-80 %	Keating <i>et al.</i> 2005 <i>J Clin Oncol</i> Hallek <i>et al.</i> 2010 <i>The Lancet</i> Fischer <i>et al.</i> 2016 <i>Blood</i> Eichhorst <i>et al.</i> 2014 <i>Blood</i>
<i>BR</i>	31 %	98 %	Eichhorst <i>et al.</i> 2014 <i>Blood</i>
<i>Obinutuzumab - Clb</i>	78 %	21 %	Goede <i>et al.</i> 2014 <i>NEJM</i>
<i>R - Clb</i>	65 %	7 %	Goede <i>et al.</i> 2014 <i>NEJM</i>
<i>Venetoclax - obinutuzumab</i>	100 %	78 %	Flinn <i>et al.</i> 2019 <i>Blood</i>
<i>Ibru-BR</i>	93 %	12 %	Brown <i>et al.</i> 2015 <i>Blood</i>
<i>Idel-R</i>	97 %	14 %	O'Brien <i>et al.</i> 2015 <i>Blood</i>

Dans la dernière décennie, plusieurs nouvelles thérapies ont été développées qui ciblent les lymphocytes B directement via des voies de signalisation ou des marqueurs spécifiques aux cellules leucémiques. Les **anti-CD20 monoclonaux** ciblent préférentiellement les cellules B humaines via la reconnaissance de la molécule de surface CD20, qui est fortement exprimée

uniquement sur ce type cellulaire (80,81). Le rituximab est l'anti-CD20 le plus fréquemment utilisé, mais il existe aussi l'ofatumumab et l'obinatuzumab, deux nouveaux anti-CD20 ayant des propriétés semblables au rituximab. L'alemtuzumab est un anti-CD52 ayant un mécanisme d'action similaire aux anti-CD20, mais qui est plutôt utilisé pour des cas réfractaires (82). Le **venetoclax** est une molécule qui inhibe la protéine anti-apoptotique Bcl-2, qui est fortement surexprimée dans les cellules leucémiques (83). Elle cible directement ce défaut d'apoptose et peut mener à des taux de réponse favorables, mais cette molécule est plutôt utilisée pour traiter des patients réfractaires aux autres thérapies. Comme la fludarabine, elle a un mécanisme d'action cytotoxique. La **lenalidomide** est un dérivé de la thalidomide ayant un effet immunomodulateur pléiotropique qui semble inhiber les interactions entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement. Malgré l'utilité de cette thérapie, son profil de toxicité, ainsi que l'efficacité équivalente d'autres thérapies disponibles limite son utilisation pour le traitement de la LLC (84). L'**idelalisib** est une petite molécule qui inhibe l'isoforme delta de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K). PI3K δ est une isoforme PI3K qui est exprimée dans seulement quelques tissus et qui est l'isoforme prédominante dans les lymphocytes B (85). Elle est généralement utilisée pour des patients réfractaires aux autres thérapies, mais présente souvent des effets indésirables, elle n'est alors pas recommandée en première ligne (86). Elle cible une kinase de la cascade du BCR, une composante importante de la pathophysiologie de la LLC. Les taux de réponse à ce composé sont très bons, mais cette molécule ne démontre pas d'avantage lorsque comparée à l'ibrutinib et induit un plus grand nombre de toxicités. L'**ibrutinib** est un inhibiteur de la kinase Bruton's Tyrosine Kinase (BTK), un second messager lors de la stimulation du récepteur BCR (87). L'importance de cette voie signalétique dans la pathophysiologie de la LLC est mise en évidence par les multiples composés en développement pour cibler les kinases du BCR (87). La réponse clinique à ce composé est très bonne, surtout pour les sous-groupes moléculaires ayant un pronostic défavorable. C'est un médicament administré par voie orale qui est bien toléré et qui démontre une très bonne efficacité pour la LLC, indépendamment des traitements antérieurs du patient. Cette molécule fut homologuée pour l'utilisation en première intention au Canada en 2016.

En pratique, les patients ayant une LLC de grade Rai 0 ou Binet A et qui sont asymptomatiques, ne sont souvent pas traités, dû au fait que certaines études ont conclu que

le traitement précoce de la LLC n'amène pas de bénéfices cliniques (88). Habituellement, le traitement est initié lorsqu'il y a des preuves concrètes de maladie progressive ou 'active', telle que définie dans les lignes directrices pour le diagnostic et le traitement de la LLC (45). En bref, le traitement peut être initié lorsque le patient développe un des symptômes suivants : anémie, thrombocytopénie, des adénopathies, splénomégalie, lymphocytose ayant une croissance rapide, fatigue, perte de poids, fièvre, sueurs froides et des atteintes de tissus non-lymphoïdes (45). Le choix du traitement varie selon l'âge et les comorbidités du patient, ainsi que selon la présence ou l'absence de lésions génétiques prédictives (Figure 5). L'efficacité des traitements pour la LLC est souvent mesurée lors des essais cliniques avec le taux de réponse globale (ORR – overall response rate), le taux de réponse complète (CR), la réponse partielle (PR) et la maladie résiduelle minimale (MRD). Ces termes sont bien définis selon les lignes directrices pour la LLC (45) et l'efficacité rapportée pour chacun des principaux régimes de traitement est présentée au Tableau 2. Cependant, il est important de considérer que les mesures de réponse au médicament dépendent du nombre de patients dans l'étude, ainsi que du moment où la réponse fut mesurée.

Généralement, les patients plus jeunes ayant peu de comorbidités sont éligibles pour de la chimio-immunothérapie, qui entraîne souvent plus de toxicités que d'autres thérapies. Des anticorps monoclonaux anti-CD20 ou anti-CD52 sont souvent utilisés pour traiter les patients ayant plusieurs comorbidités ou qui sont plus âgés, car ce traitement est généralement bien toléré. Les patients ayant la délétion 17p ou un statut IGHV non-muté sont souvent traités avec de l'ibrutinib en première ligne, car ce traitement s'est avéré efficace pour ce sous-groupe de patients (45,89).

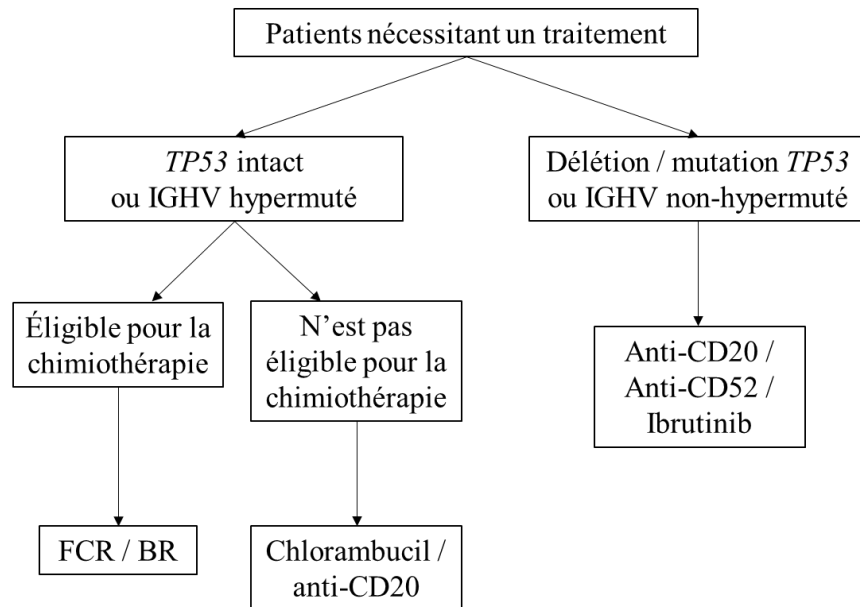


Figure 5 : Présentation de l'un des algorithmes de traitement de première intention en LLC. Adapté de Jain et O'Brien. 2015, *Blood*; Parikh et al. 2018, *Blood Cancer J.* (90,91).

Le seul traitement curatif actuel pour la LLC c'est la transplantation de moelle osseuse allogénique (92). Cette option est de moins en moins populaire, car certaines stratégies pharmacologiques modernes sont bien tolérées et très efficaces, tandis que peu de patients sont éligibles pour la transplantation (93). Globalement, le nombre grandissant de médicaments disponibles pour la LLC permet de mieux adapter le régime thérapeutique au profil moléculaire afin de maximiser l'efficacité du traitement. En ce qui concerne la pharmacologie de ces médicaments, il est probable que des mécanismes n'ayant pas été étudiés lors du développement du médicament puissent influencer l'élimination de celui-ci (Tableau 3). Par contre, la contribution des UGT dans ce métabolisme demeure toujours inconnue.

Tableau 3: Sommaire de certaines caractéristiques pharmacologiques de médicaments utilisés pour le traitement de la LLC. C_{Trough} : concentration plasmatique du médicament à la fin du premier cycle de traitement. C_{max} : concentration maximale atteinte suite à l'administration du traitement. Tiré de Marostica *et al.* 2015, *Cancer Chemother. Pharmacol.*; Ghandi et Plunkett. 2002, *Clin. Pharmacokinet.*; Boogaerts *et al.* 2001, *J. Clin. Oncol.*; Byrd *et al.* 2013, *NEJM*; Jin *et al.* 2015, *J. Clin. Pharmacol.*; Ramanathan *et al.* 2016, *Clin. Pharmacokinet.*; Brown *et al.* 2014, *Blood* (94-100).

Composés	Fludarabine	Ibrutinib	Rituximab	Idelalisib
Administration	Infusion / oral	Oral	Infusion	Oral
Concentration plasmatique	~ 3 μ M (C_{Trough})	~0.2-0.5 μ M (C_{max})	~ 5.9-25.4 μ g/mL (C_{Trough})	~0.4 μ M (C_{Trough})
Métabolisme et excrétion	Excrétion rénale	CYP3A4 CYP2D6	Endocytose et catabolisme intracellulaire	UGT1A4 CYP3A4
Mécanisme	Cytotoxique	Inhibition de la kinase BTK	Activation du système immunitaire	Inhibition de la kinase PI3K δ
Effets secondaires	Leucopénies, infections	Arythmies cardiaques, infections	Leucopénies, infections, reactions d'infusion	Hepatotoxicité auto-immune, problèmes digestifs, infections

La voie métabolique de glucuronidation par les enzymes UDP-glucuronosyltransferases

Les enzymes UDP-glucuronosyltransférases (UGT) représentent une grande superfamille de protéines qui participent à l'équilibre homéostatique de plusieurs métabolites endogènes ainsi qu'à l'élimination de molécules exogènes et de toxines. Cette classe de protéines est divisée en plusieurs sous-familles : 1A, 2A, 2B, 3A et 8A (101). Les sous-familles 1A et 2B englobent la majorité des enzymes UGT qui participent au métabolisme des médicaments et sont alors généralement mieux étudiées que les classes 2A, 3A et 8A. Les enzymes de la

famille UGT1A sont tous issus d'épissage alternatif du même gène *UGT1* au chromosome 2q37. Les exons 2 à 5 codant le segment C-terminal des protéines UGT sont conservés dans la structure des tous les isoformes UGT1A, tandis que le gène comprend plusieurs exons 1 alternatifs qui déterminent la séquence d'acides aminés du domaine N-terminal de l'isoenzyme résultant (Figure 6). Ces exons 1 alternatifs déterminent aussi la spécificité de substrats de l'enzyme résultant. Contrairement aux UGT1A, les enzymes de la famille UGT2B sont tous issus de leurs propres gènes individuels au chromosome 4q13 (Figure 6). L'expression génique des isoformes UGT est complexe et prédomine dans les tissus métaboliques (foie, colon, reins). L'expression des isoformes UGT est aussi tissu spécifique (102). Il n'y a pas de structure tridimensionnelle résolue des UGT humaines jusqu'à présent. Cependant, les protéines UGT comportent plusieurs régions qui peuvent être associées à certaines fonctions. Il y a un domaine de liaison au substrat, un domaine de liaison au cosubstrat (UDP-acide glucuronique, UDP-GlcAc), ainsi qu'un domaine transmembranaire. Généralement, les enzymes UGT se retrouvent encrées au côté luminal de la membrane du réticulum endoplasmique, bien que certains transcrits alternatifs ou certains contextes biologiques puissent favoriser une localisation cytoplasmique ou périnucléaire des UGT (Figure 7) (103). Les UGT catalysent la réaction de glucuronidation, un processus par lequel un groupement UDP-GlcAc électrophile est greffé à un substrat par une attaque nucléophile de type SN2 (Figure 7). Dans la grande majorité des cas, l'activité biologique ou pharmacologique du substrat est réduite ou abolie par cette réaction. Une grande variété de médicaments sont des substrats UGT, ce qui s'élève à plus de 55 % des 200 médicaments les plus prescrits (102). La réaction de conjugaison est possible sur différents groupements fonctionnels nucléophiles dans la structure chimique des substrats, tels que des groupes alcools, amines, acides carboxyliques et thiols (Figure 7).

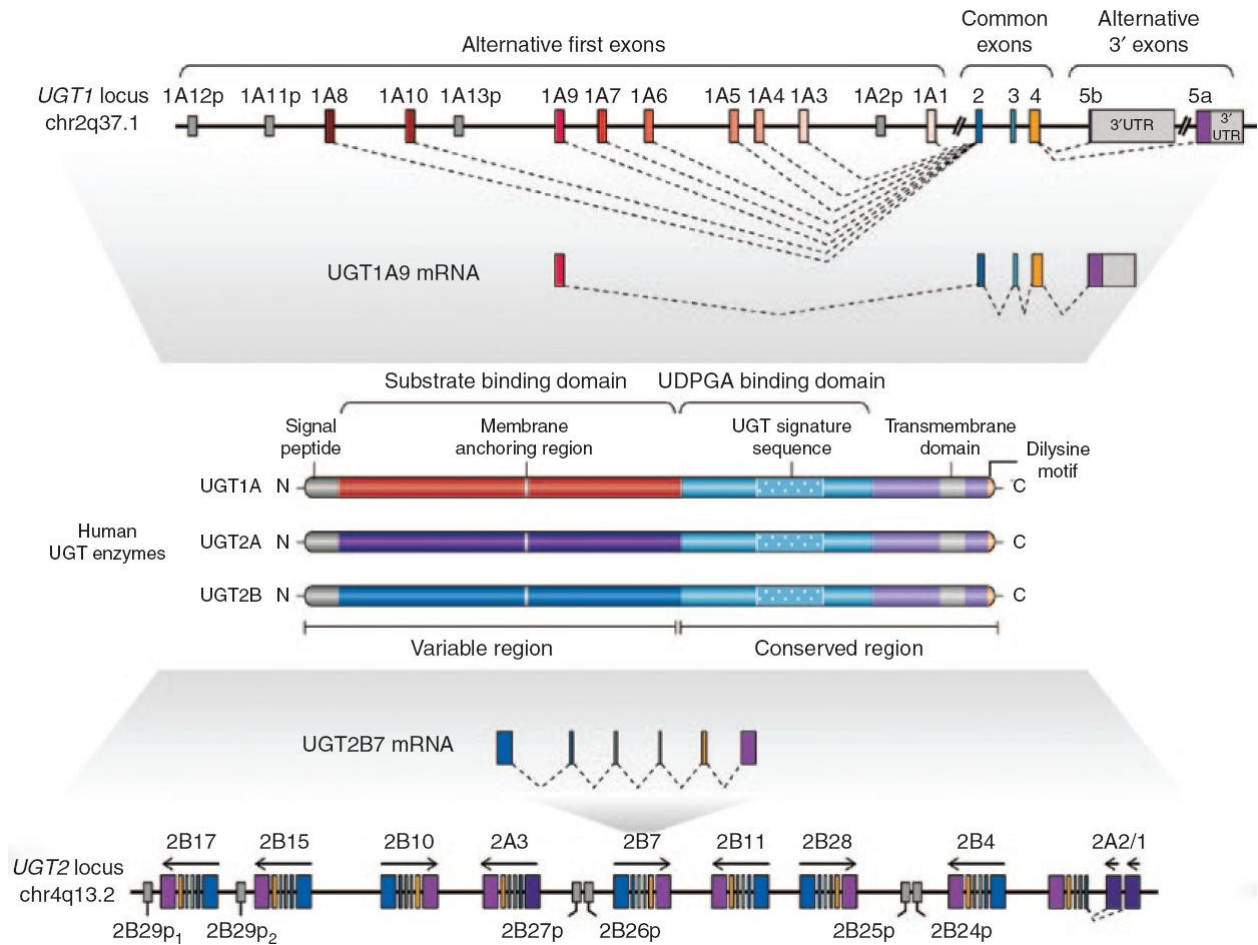


Figure 6. Structure des gènes de la grande famille des *UGT* (102).

Cette voie enzymatique représente une étape importante de la phase II de la détoxification des agents pharmacologiques et contribue également au maintien de l'équilibre des petites molécules bioactives endogènes, telles que les hormones stéroïdiennes (Figure 7). Tiré de Guillemette *et al.* 2014, *Clin. Pharmacol. Ther* (11).

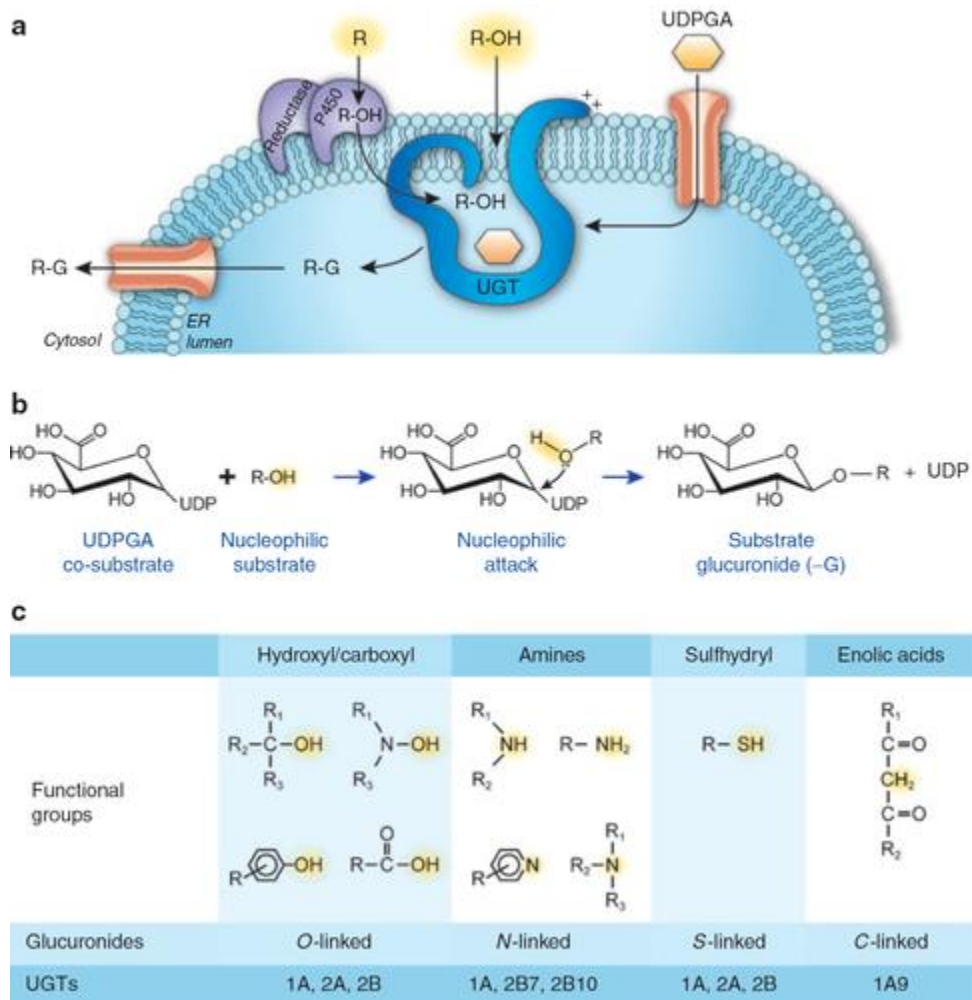


Figure 7 : Réaction de glucuronidation. (A) Schématisation prototypique d'une enzyme UGT à la membrane du réticulum endoplasmique. (B) Réaction de glucuronidation nécessitant le cosubstrat (UDP-GlcAc) à partir du substrat (R) présentant un groupement fonctionnel (OH). (C) Groupes fonctionnels dans la structure des substrats ciblés par les UGT pouvant être conjugués (102). Tiré de Guillemette *et al.* 2014, *Clin. Pharmacol. Ther* (11).

L'enzyme UGT2B17

UGT2B17 est une enzyme de la famille UGT2B issue du gène *UGT2B17* composé de six exons à l'intérieur d'une région de 25 kb au locus 4q13.3 (104). Ce gène partage un grand degré de similarité avec les autres isoformes du groupe 2B, ce qui atteint jusqu'à 95 % de similarité de séquence avec le gène *UGT2B15* (104). UGT2B17 est fortement exprimé dans les cellules du tractus gastro-intestinal, le foie et la prostate, mais on le retrouve aussi au niveau du tissu adipeux, le poumon, le thymus, les testicules, le sein, le rein, les ovaires, l'utérus, la peau, les leucocytes ainsi que dans la rate (1,105-109). L'expression de ce gène varie selon l'âge et le sexe de l'individu au niveau hépatique (110). Son expression est régulée au niveau transcriptionnel par une multitude de facteurs de transcription. Certains parmi ces facteurs ont été vérifiés expérimentalement tels que le récepteur aux estrogènes, et les récepteurs aux androgènes, FOXA1, HNF1 α , Pbx2-Prep1, AP-1, c-Jun et Fra-2 (111-114). Toutefois, il existe plusieurs autres sites consensus dans la séquence promotrice d'*UGT2B17*. D'ailleurs, on y retrouve des sites pour NF- κ B, Pbx-1, C/EBP, Oct-1 et ROR- α (104,115,116). De plus, l'expression UGT2B17 est altérée suite au traitement 17 β -estradiol dans les cellules de cancer du sein et suite au traitement aux androgènes dans les cellules du cancer de la prostate, ce qui appuie le rôle des signaux hormonaux dans la régulation de ce gène (114,117-119). Ce gène est aussi négativement régulé au niveau post-transcriptionnel par le micro-ARN miR-376c dans les cellules du cancer de la prostate, ce qui mène à une réduction de l'activité de glucuronidation dans ce tissu (120,121). Le gène *UGT2B17* est aussi assujéti à l'épissage alternatif, menant à une grande diversité de transcrits, mais jusqu'à présent il n'y a pas eu d'études exhaustives examinant lesquels parmi ces transcrits sont exprimés dans les lymphocytes B ou dans les cellules leucémiques (Figure 8).

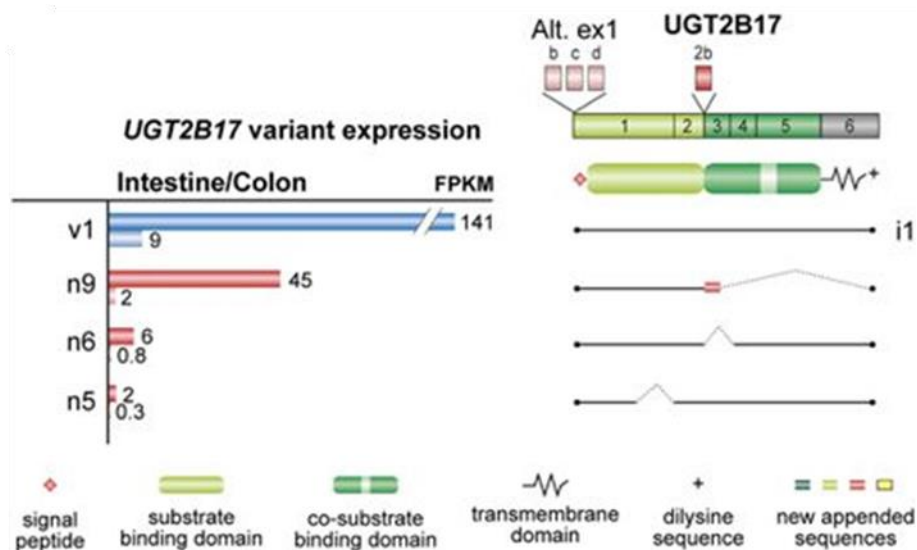


Figure 8 : L'épissage alternatif du gène *UGT2B17*. Tiré de Tourancheau *et al.* 2018, *Pharmacogenomics J.* (107).

Il y a aussi des polymorphismes génétiques importants au niveau du gène *UGT2B17*. Par exemple, il existe aussi un polymorphisme dans le promoteur proximal du gène *UGT2B17* à la position -155 (rs59678213) affectant particulièrement l'expression du gène. Les porteurs de l'allèle G à cette position ont un changement de la séquence consensus *FOXA1*, ce qui empêche la liaison de ce facteur de transcription au promoteur *UGT2B17* et qui réduit l'expression de l'enzyme (122).

UGT2B17 est parmi les gènes les plus fréquemment délétés du génome humain, avec un taux de délétion homozygote entre 14 à 92 % selon le groupe ethnique (123). Il y a une grande diversité populationnelle du taux de délétion *UGT2B17* résultant d'une sélection évolutive qui est probablement reliée à une des fonctions de l'enzyme, mais qui ne peut pas être uniquement expliquée par la dérive génétique (123). Cette délétion fait aussi d'*UGT2B17* un antigène d'histocompatibilité mineur affectant négativement les personnes recevant une transplantation lorsque la celle-ci porte la double délétion *UGT2B17* (124-126).

Cette enzyme a une forte activité envers les ligands du récepteur aux androgènes (testostérone et dihydrotestostérone) leurs métabolites, tel que l'androstérone, le androstane-3 α -diol ainsi que le 17 β -estradiol et contribue à éliminer ces hormones (108,127). *UGT2B17* conjugue d'autres petites molécules endogènes tels que l'acide 13-hydroxyoctadecadiénoic, un lipide

bioactif (128). Cette enzyme participe à l'élimination de certains médicaments tels que le vorinostat (129), le diclofenac (130), 17-dihydroexemestane (131), eslicarbazepine (132), edaravone (133), gemfibrozil (134) trans-3'-hydroxycotinine (135), 4-hydroxy-3-methoxyméthamphetamine (136), ainsi que plusieurs coumarines, anthraquinones et flavonoïdes (137). Une étude rapporte que la protéine UGT2B17 interagit avec la kinase c-Src, tel que démontré par « Proximity Ligation assay » (PLA), ce qui favorise la signalisation du récepteur aux androgènes dans les cellules de cancer de la prostate (138). Les autres partenaires d'interaction de la protéine UGT2B17 ne sont pas connus à ce jour.

Le rôle d'UGT2B17 dans l'élimination des androgènes fait de celui-ci un acteur très important dans le cancer de la prostate, car les androgènes interviennent directement dans la pathophysiologie de ce cancer. L'expression des enzymes UGT2B15 et UGT2B17 est altérée dans les cellules du cancer de la prostate (139) et le polymorphisme de délétion *UGT2B17* est un facteur de risque pour le développement et la progression de ce cancer (139,140). De plus, cette délétion est associée au grade clinique du cancer de la prostate dans des populations asiatiques (141). UGT2B17 conjugue certains composés carcinogènes retrouvés dans la fumée de cigarette tel que le 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol, alors qu'une étude suggère un rôle possible de cette enzyme dans le cancer du poumon (142). Le génotype de délétion UGT2B17 entraîne une activité de glucuronidation réduite pour ce composé, mais semble n'avoir peu ou pas d'effet sur le risque de cancer du poumon ou l'issue clinique des individus ayant ce cancer (142,143). Bien sûr, il y a aussi un lien entre l'expression UGT2B17 et la survie sans traitement des patients ayant la LLC, suggérant un rôle d'UGT2B17 dans la biologie de la leucémie, indépendamment des sous-groupes moléculaires pronostiques (1,2). Une deuxième étude indépendante dans une population suédoise a démontré que UGT2B17 était parmi les meilleurs marqueurs pronostiques capables d'identifier les leucémies progressives dans le groupe de patients ayant un gène IGHV muté, un groupe généralement considéré comme ayant un pronostic favorable (2). Les résultats de cette étude démontrent aussi que l'expression cellulaire d'UGT2B17 est très stable dans le temps, et que certains patients peuvent présenter des niveaux d'expression UGT2B17 plus élevés à la suite du traitement.

Vu l'importance des substrats stéroïdiens d'UGT2B17 dans la biologie humaine, il est important d'examiner les effets de ceux-ci dans la LLC. Les hormones stéroïdiennes ont des effets connus sur la biologie des lymphocytes et l'exposition différentielle à ces molécules peut aider à expliquer les dimorphismes observés (144,145). Le rôle important d'UGT2B17 dans le maintien de l'équilibre hormonal, ainsi que dans le cancer de la prostate, suggère que les effets possibles de cette enzyme dans la LLC soient reliés au métabolisme des hormones. Les hormones stéroïdiennes sont une grande famille de molécules ayant diverses fonctions biologiques. Ces hormones sont produites à partir du cholestérol aux gonades ou aux glandes surrénales, et peuvent être divisées en trois grandes classes : les précurseurs surrénaux, les androgènes et leurs métabolites ainsi que les estrogènes et leurs métabolites (Figure 9).

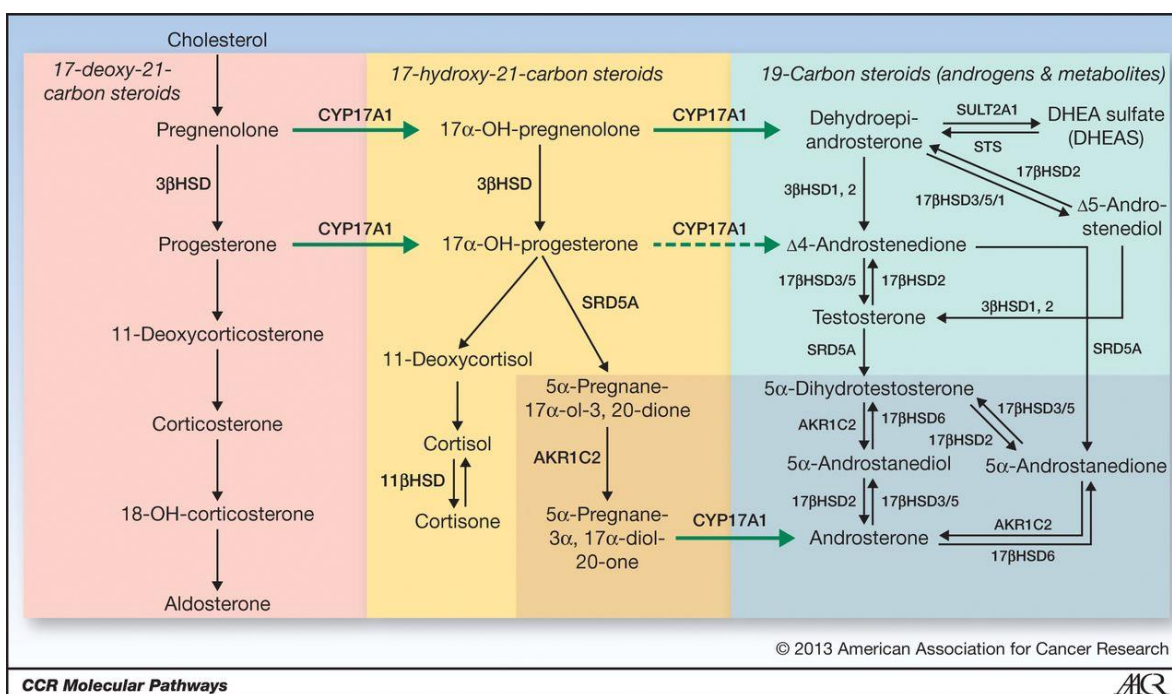


Figure 9 : Schéma des voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes. Les réactions réversibles sont annotées avec des doubles flèches. Tiré de Ferraldeschi *et al.* 2013, *Clin. Cancer Res.*

Les hormones agissent en tant qu'agonistes pour divers récepteurs nucléaires spécifiques ayant une fonction de facteur de transcription et pouvant affecter la transcription suite à l'activation. Les études ayant analysé l'expression de ces récepteurs dans les lymphocytes B

ont démontré que le récepteur aux estrogènes β (ER β) est le récepteur hormonal prédominant dans les lymphocytes B, ainsi que dans les cellules de LLC (146-148). De plus, il y a une plus forte expression du ER β dans les cellules de LLC comparativement aux lymphocytes B sains (146). L'activation de ces récepteurs induit l'apoptose dans des modèles cellulaires lymphoïdes ainsi que dans des cellules de LLC primaires, ce qui suggère que les hormones sexuelles puissent avoir des effets anti-oncogéniques dans la LLC (149). Le récepteur aux androgènes (AR) joue également un rôle important dans la biologie des lymphocytes B, tel que démontré par des études *in vivo* examinant des souris ayant subi une inactivation du gène codant ce récepteur au niveau des lymphocytes B (150). Les cellules B de ces souris démontrent une résistance à l'apoptose et une croissance anormale qui peuvent être renversées suite au traitement avec des androgènes (150,151). L'expression de ce récepteur semble être restreinte aux cellules B immatures, mais il n'y a toujours pas d'étude exhaustive examinant la fonction de ce récepteur dans la LLC (152). En général, l'expression du AR et sa fonction sont moins bien caractérisées que les récepteurs aux estrogènes dans les maladies lymphoïdes (144,153,154). Une étude précédente ayant mesuré certains stéroïdes circulants dans les patients LLC a démontré un lien entre les hormones gonadotropiques et le stade de la maladie, suggérant que certaines hormones puissent avoir une valeur pronostique dans la LLC (155). Il n'existe cependant toujours pas de profilage exhaustif des hormones dans cette population par méthodes plus modernes.

Hypothèses et objectifs

Comme présenté en introduction, une de nos études antérieures a révélé la surexpression d'*UGT2B17* dans les lymphocytes d'un sous-groupe de patients LLC (1). Les niveaux d'expression *UGT2B17* élevés sont associés à un mauvais pronostic et une réponse réduite au traitement de chimiothérapie utilisant la fludarabine (FC/FCR). Les patients ayant une forte expression *UGT2B17* ont une survie médiane deux fois moindre que le groupe ayant une faible expression (152.4 vs. 299.5 mois, $p < 0.011$). L'expression génique corrèle aussi avec l'activité enzymatique d'*UGT2B17* mesurée à partir de cellules de patients LLC. *UGT2B17* est aussi un facteur pronostique indépendant, alors que son expression corrèle aussi partiellement avec plusieurs autres biomarqueurs moléculaires défavorables (2). Pour une proportion de patients n'ayant pas reçu de traitement et ayant un pronostic défavorable (environ 40 %), l'expression d'*UGT2B17* est élevée, suggérant un rôle probable pour cette enzyme dans la biologie de la LLC. De plus, une induction de l'expression en ARN messenger *UGT2B17* a été notée 48h suivant l'initiation du traitement avec un régime à base de fludarabine (FC ou FCR). Les patients ayant une progression stable suite au traitement présentent une augmentation d'expression *UGT2B17* relative moyenne de 131 % ($n = 9$, intervalle de confiance : 106 %-167.7 %) tandis que ceux qui répondent bien au traitement présentent peu de changement (99.1 %, $n = 11$, intervalle de confiance : 84.2 %-116.7 %; $p = 0.03$). Ceci suggère la possible implication d'*UGT2B17* dans le métabolisme et l'inactivation de la fludarabine. Or, l'activité enzymatique des UGT envers les médicaments anti-leucémiques utilisés pour traiter la LLC n'est pas connue. Il existe plusieurs exemples d'induction de l'expression de gènes *UGT* suite au traitement anticancéreux, notamment dans les cancers de la peau, du sein et du côlon, ce qui indique que ce phénomène ne se limite pas à la leucémie (1,156-161).

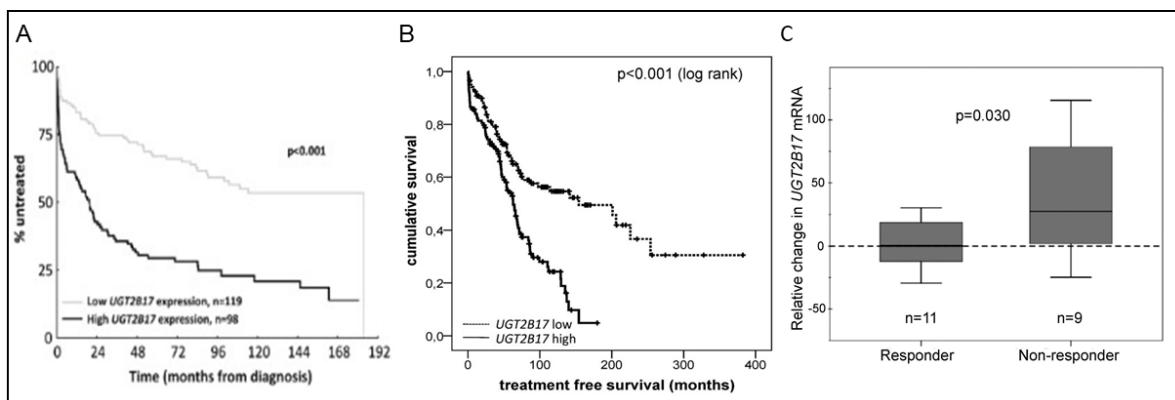


Figure 10 : UGT2B17 : un marqueur pronostique en LLC. (A-B) mesure du temps avant l'initiation d'un premier traitement (TFS/TTFT) selon le niveau d'expression *UGT2B17* dans deux cohortes LLC indépendantes. (C) Augmentation de l'expression *UGT2B17* dans les cellules LLC de patients 48h suite après avoir initié son régime de chimiothérapie. Tiré de Bhoi *et al.* 2016, *Haematologica* et Gruber *et al.* 2013, *Blood*.

L'hypothèse du projet stipule que UGT2B17 module des fonctions cellulaires favorisant la progression de la LLC (**objectif 1**) et la résistance aux médicaments (**objectif 2**): Ces effets peuvent être médiés via sa fonction enzymatique **i**) en modifiant certains substrats endogènes entraînant un effet sur les voies cellulaires influençant le profil oncogénique des cellules LLC et **ii**) en inactivant les composés pharmacologiques, entraînant ainsi une réponse réduite au traitement anti-leucémique.

Objectif 1 : Étudier le rôle d'UGT2B17 dans la biologie de la LLC.

1.1 Étude de l'influence d'UGT2B17 sur l'exposition hormonale et la progression de la LLC.

Bien que les UGT sont connus comme jouant un rôle important dans l'inactivation et l'élimination des médicaments, ces enzymes régulent aussi l'équilibre d'une vaste gamme de molécules endogènes, notamment les hormones stéroïdiennes. Par exemple, UGT2B17 est un régulateur important de l'homéostasie des androgènes, tels que la testostérone (T) et le dihydrotestostérone (DHT), deux ligands du récepteur aux androgènes (AR). De plus, les variations génétiques associées au gène *UGT2B17* ont des conséquences sur l'exposition hormonale (141), ce qui peut influencer le développement et l'évolution de certains cancers, tel que le cancer de la prostate (139,140). Les effets des hormones dans la LLC ne sont pas

très bien caractérisés, mais les quelques études récentes à ce sujet semblent indiquer un possible rôle anti-oncogénique des estrogènes (146,149). Peu d'études ont examiné les associations possibles entre les hormones circulantes et les caractéristiques cliniques de la LLC, et celles qui existent datent maintenant de plus de 20 ans (155). L'étude des hormones est un bon point de départ pour explorer le mécanisme pouvant expliquer la valeur pronostique de l'expression du gène *UGT2B17*. De plus, cette fonction de régulateur hormonal pourrait expliquer, du moins en partie, le dimorphisme sexuel quant à la progression de la LLC.

1.2 Étude des voies cellulaires affectées par l'expression UGT2B17 en lien avec la progression de la LLC.

Les conséquences phénotypiques et moléculaires d'une augmentation de l'expression d'*UGT2B17* ont été examinées dans les modèles lymphoïdes et dans les cellules de patients leucémiques. Des phénotypes tels que la prolifération, la mort cellulaire et la migration sont particulièrement d'intérêt, considérant leur importance dans la pathophysiologie de la maladie. Une analyse du transcriptome (RNA-seq) a été utilisée afin d'identifier les voies cellulaires qui sont altérées dans des cellules ayant une forte expression *UGT2B17*. Cette approche a été retenue en fonction du rôle possible d'*UGT2B17* dans la régulation de petites molécules signalétiques endogènes pouvant affecter l'expression génique. Ces molécules de type hormonal agissent par l'entremise de divers récepteurs nucléaires pouvant agir à titre de facteurs de transcription modifiant ainsi le transcriptome.

Les gènes candidats identifiés via cette approche non-ciblée pourraient aider à expliquer les changements phénotypiques observés. Suite à l'identification des sentiers affectés, des analyses plus ciblées pourraient permettre de valider si ces changements phénotypiques sont médiés par des perturbations métaboliques de substrats endogènes de l'enzyme *UGT2B17*.

Objectif 2 : Évaluer l'implication d'UGT2B17 dans la réponse aux agents anti-leucémiques utilisés dans le traitement de la LLC.

2.1 Déterminer si les médicaments utilisés dans le traitement de la LLC sont conjugués par l'enzyme UGT2B17.

L'association négative entre l'expression UGT2B17 et la réponse à la fludarabine suggère que cette voie métabolique puisse avoir un impact direct sur l'inactivation de la fludarabine. D'ailleurs, la majorité des médicaments utilisés pour le traitement de la LLC comportent des groupements fonctionnels susceptibles à la glucuronidation, suggérant que ceux-ci puissent être des substrats des UGT. L'implication des UGT dans l'inactivation enzymatique des médicaments anti-leucémiques n'a pas été évaluée jusqu'à présent et pourrait expliquer, du moins en partie, la réponse variable entre les patients observée par Gruber *et al* (2013).

2.2 Identifier les mécanismes de résistance à la thérapie potentiels en lien avec l'enzyme UGT2B17.

Au-delà du criblage du métabolisme des médicaments pour l'identification des substrats possibles d'UGT2B17, il est important de bien caractériser la sensibilité aux médicaments ainsi que les mécanismes moléculaires affectés par cette enzyme en conditions non traitées et lors d'un traitement pharmacologique. Dans cet objectif, nous avons étudié à la fois les changements transcriptionnels induits par la surexpression d'UGT2B17 et suite au traitement pharmacologique *in vitro* et *in vivo*. La mesure des changements d'expression des UGT en conditions traitées ou non et la mesure des effets globaux par des méthodes transcriptomiques permettent d'identifier les changements dynamiques au transcriptome associés aux variations d'expression d'UGT2B17. Au même titre que la mesure du transcriptome en condition non traités, cette approche pourrait permettre d'identifier certains mécanismes moléculaires en lien avec le rôle d'UGT2B17 dans la pathophysiologie de la maladie, affectant aussi la réponse au traitement. Ces informations peuvent contribuer à améliorer notre compréhension du rôle de la glucuronidation dans la réponse à la thérapie dans la LLC. De plus, les résultats peuvent révéler de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouvelles voies signalétiques importantes pour la réponse au traitement en LLC.

3. Méthodologies retenues :

3.1 Cohorte de patients LLC : ce projet de recherche s'appuie sur une collaboration existante entre notre groupe de recherche et l'équipe du Dr Ulrich Jaeger et Dr Katrina Vanura à l'Université Médicale de Vienne, en Autriche. Ce groupe de recherche a recruté une cohorte de patients pour lesquels des spécimens biologiques ainsi que les données cliniques longitudinales sont disponibles. De plus, le niveau d'expression UGT2B17 est connu pour

320 des échantillons dans cette cohorte (1). Des sous-ensembles de cette population ont permis de bonifier les objectifs 1 et 2, par l'étude d'échantillons primaires prélevés de patients.

Tableau 4 : Échantillons utilisés dans le cadre de ce projet de recherche provenant de la cohorte de patients LLC autrichiens.

Objectifs de la thèse	Nombre d'échantillons	Type d'échantillons	Données disponibles
<i>Gruber et al. 2013</i>	320	ARN de PBMC prélevés de patients.	Données RT-qPCR Analyse des données cliniques
<i>Allain et al. 2018 (Objectif 1.1)</i>	156	Sérum et ARN de PBMC prélevés de patients.	Dosages par spectrométrie de masse et immuno-essais, quantification UGT2B17 Analyse des données cliniques
<i>Allain et al., soumis. (Objectif 1.2 et 2.2)</i>	15	PBMC primaires isolés de patients leucémiques	Tests phénotypiques (mort cellulaire, migration, activation), quantification ARN <i>UGT2B17</i>
<i>Allain et al., soumis. (Objectif 1.2 et 2.2)</i>	5	Microsomes préparés à partir des PBMC de patients.	Essais enzymatiques, analyses par spectrométrie de masse
<i>Objectifs 1 et 2</i>	Variable	Diverses études transcriptomiques publiques.	Biopuce ARN (affymetrix)

3.2 Analyse des liens entre les niveaux d'expression UGT2B17, l'exposition hormonale et la survie des patients leucémiques (objectif 1): les androgènes sont des substrats bien connus d'UGT2B17 et des différences d'exposition à ces hormones influencent la progression du cancer de la prostate (139). Dans la LLC, il semble y avoir quelques publications appuyant un rôle des estrogènes dans la biologie des cellules leucémiques, tandis que le rôle des androgènes est moins bien caractérisé (146,149,153). Des méthodes validées de chromatographie liquide et gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem développées dans notre laboratoire ont permis la quantification d'une grande gamme d'hormones stéroïdiennes dans diverses matrices. Ces méthodes ont été utilisées afin de

mesurer les niveaux circulants d'hormones dans le plasma de patients provenant de la cohorte LLC autrichienne dans le cadre d'une étude rétrospective. Les données cliniques et les données d'expression de l'enzyme UGT2B17 ont été utilisées afin d'examiner les effets de cette voie métabolique sur l'exposition hormonale et les liens possibles entre les niveaux hormonaux et la progression de la maladie. Des modèles statistiques de régression de Cox univariée et multivariée ainsi que la méthode de Kaplan-Meier ont été utilisés en y incorporant des données cliniques longitudinales afin d'établir les associations entre les hormones et la progression de la maladie, et de déterminer la contribution possible d'UGT2B17 à ces associations. Ce projet m'a introduit à l'analyse rétrospective de cohortes et a contribué à l'amélioration de mes connaissances en biostatistique ainsi qu'à ma compréhension de voies hormonales et des analyses par spectrométrie de masse.

3.3 Modèles cellulaires (objectifs 1 et 2): un criblage initial de 28 lignées cellulaires non limitées aux lignées lymphoïdes a révélé une forte expression d'UGT2B17 dans les lignées cellulaires MEC-1 et JVM-2 (1,162). L'ensemble des lignées lymphoïdes et myéloïdes (n = 6) qui ont été testées au laboratoire expriment seulement l'isoforme UGT2B17, un résultat qui a été validé par l'analyse de données transcriptomiques publiques provenant de cellules leucémiques purifiées (Tableau 5). Ces données démontrent que les cellules de patients ayant la LLC ont un profil d'expression des UGT semblable aux modèles cellulaires, puisque ceux-ci expriment UGT2B17 de façon quasi exclusive. Des modèles de surexpression d'UGT2B17 stables ont été générés à partir des lignées MEC-1 et JVM-2. Les cellules MEC1 ont été isolées à partir du sang d'un homme ayant un diagnostic de LLC et n'ont pas de p53 fonctionnel. Les cellules JVM2 ont été isolées du sang d'une femme ayant un diagnostic de leucémie pro-lymphocytaire (B-PLL), mais ils comportent des anomalies cytogénétiques typiques du lymphome du manteau, telles que la translocation (t11 :14)(q13;q32) et ont un gène *TP53* intact. Ces deux lignées ont un caryotype complexe. Le développement de ces modèles était un défi important au début de ce projet, car les lignées lymphoïdes sont plutôt difficiles à transfecter. Les approches du laboratoire utilisées lors de la conception et l'étude de ces modèles représentent alors un acquis technique important dans mon parcours.

3.4 Caractérisation phénotypique des modèles cellulaires et de cellules leucémiques de patients (objectifs 1 et 2): les observations cliniques antérieures démontrent que les niveaux

d'expression d'UGT2B17 sont associés à un taux de survie réduit. C'est donc probable que les changements induits par la surexpression d'UGT2B17 soient associés à des fonctions cellulaires telles que la prolifération, la motilité cellulaire, la stimulation du récepteur antigénique, ainsi qu'à la mort cellulaire. Des essais de prolifération ont été réalisés afin de mesurer la croissance par compte cellulaire. La mort cellulaire fut mesurée à l'aide d'essais à base de tetrazolium (MTS) ainsi que par cytométrie en utilisant le marqueur annexin V. En utilisant la cytokine CXCL12 comme chimio-attractant, des chambres de Boyden ont permis de mesurer les effets d'UGT2B17 sur la migration cellulaire. L'état d'activation des cellules a été mesuré par cytométrie en utilisant des marqueurs moléculaires bien établis, tels que p-ERK, CD80 et CD86. Ces méthodes m'ont permis de perfectionner mes compétences en cytométrie de flux ainsi que d'analyser des données cytométriques tout en étayant mes compétences en laboratoire pour les analyses cellulaires.

3.5 Caractérisation du transcriptome des cellules LLC (objectifs 1 et 2):

L'étude du transcriptome par séquençage à haut débit (RNA-seq) est une méthode puissante permettant l'identification et la quantification relative des transcrits d'ARN exprimés. Les données recueillies par séquençage des modèles cellulaires ont révélé des indices quant aux perturbations cellulaires induites par l'expression d'UGT2B17. Les données transcriptomiques publiques caractérisant les profils d'expression de patients ayant la LLC ont servi à confirmer l'existence de ces perturbations *in vivo*. Ces données sont complémentaires aux résultats phénotypiques et ils ont permis d'identifier les cibles potentielles pour des analyses subséquentes. Dans le contexte de l'objectif 2, ces mêmes méthodes ont permis d'identifier les gènes affectés par le traitement et ceux coexprimés avec UGT2B17. Les données publiques de patients traités à la fludarabine, ont aussi servi à appuyer certaines observations en lien avec l'objectif 2. De cette façon, il a été possible d'identifier certaines voies cellulaires en lien avec l'enzyme UGT2B17 et la résistance à la thérapie. Lorsque possible, des données d'expression génique publiques ont été utilisées pour appuyer nos résultats expérimentaux. Les cohortes MILE (Microarray Innovations in Leukemia), ICGC (International Cancer Genome Consortium) et plusieurs autres projets ont été exploités (Tableau 5). L'analyse de ces données ont nécessité la maîtrise de diverses approches d'analyse bioinformatique, incluant l'analyse de biopuces ARN, le séquençage à

haut débit, le partitionnement des données, la réduction de la dimensionnalité, la permutation, les tests hypergéométriques et de types ‘Gene set enrichment analysis’ (GSEA), ainsi que les notions de statistique complémentaire à ces approches. J’ai aussi développé de fortes habiletés de programmation informatique avec R et Python, deux langages informatiques extrêmement utiles en biologie.

Tableau 5 : Principales données publiques utilisées pour l’étude d’UGT2B17

Étude	Base de données	Type de données et taille d’échantillon	Contexte
MILES – GSE13159	GEO	Affymetrix, n=448	Expression différentielle/profils d’expression
CLLE-ES	ICGC	RNA-seq et données cliniques, n=294	Analyses de survie/profils d’expression
GSE15490	GEO	Affymetrix et données cliniques, n=20	Analyse des profils d’expression selon la réponse au médicament
GSE21029	GEO	Affymetrix échantillons appariés (ganglion, sang, moelle), n=24	Profil d’expression par site anatomique
GSE68349	GEO	ChIP-Seq, n=2	Identification des facteurs de transcription ciblant le promoteur <i>UGT2B17</i> .
GSE100672	GEO	ATAC-Seq, n=19	Identification des sites de chromatine ouverte lors du traitement à l’Ibrutinib.
GM12865	ENCODE	ChIP-Seq	Identification des sites de chromatine ouverte.
GSE66117	GEO	RNA-seq, n=52	Expression différentielle

3.6 Inactivation des médicaments par la voie métabolique des UGT (objectif 2) : en lien avec les observations cliniques démontrant une réponse réduite associée à l’expression

UGT2B17, les médicaments les plus fréquemment utilisés pour le traitement de la LLC ont été ciblés pour déterminer si l'enzyme UGT2B17 est impliquée dans leur inactivation. Une attention particulière a été portée sur la fludarabine, l'ibrutinib et l'idelalisib, trois composés qui englobent collectivement plusieurs thérapies de première intention et divers mécanismes d'action. Des essais de glucuronidation suivis d'une analyse de spectrométrie de masse ont permis de démontrer et de quantifier la conjugaison de plusieurs médicaments dans des tissus métaboliques (foie, intestin, rein), dans nos modèles cellulaires (MEC-1, JVM-2) et de les détecter dans le sérum de patients ayant la LLC. Ceci m'a permis de perfectionner mes connaissances et compétences en enzymologie et en chimie analytique.

3.7 Évaluer si l'expression d'UGT2B17 modifie la réponse aux médicaments dans les modèles cellulaires (objectif 2) : la sensibilité de nos modèles cellulaires (MEC-1 et JVM-2) a été vérifiée afin de mieux expliquer la possible variabilité de réponse à la thérapie observée chez les patients selon le niveau d'UGT2B17. Des méthodes à base de bromure de tétrazolium (MTT/MTS) furent utilisées, car cette technique est rapide, efficace et très souvent utilisée pour la mesure de la viabilité cellulaire ou de cytotoxicité d'un composé. La quantification de la réponse aux composés anti-leucémiques sera établie en comparant l'IC50 (concentration inhibitrice médiane 50 %) des modèles ayant une forte expression UGT2B17 à celui des cellules-contrôles. Ces statistiques ont été calculées en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 5 avec un modèle linéaire à pente variable. Un minimum de 7 concentrations a été utilisé pour ce calcul.

Chapitre 1 : « Sex-dependent association of circulating sex steroids and pituitary hormones with treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients.»

Résumé

Un dimorphisme sexuel est observé pour la LLC, mais demeure à ce jour largement inexpliqué. Les hommes ont un taux d'incidence élevée et un parcours clinique défavorable comparativement aux femmes. Ces dimorphismes pourraient s'expliquer par une exposition différentielle aux hormones. Nous avons quantifié 29 stéroïdes et 2 gonadotropines par spectrométrie de masse et essai immunologique, respectivement, chez 156 patients. Les liens possibles entre niveaux hormonaux, la progression de la maladie et l'expression UGT2B17 ont été questionnés. La survie sans traitement (TFS) était réduite pour les hommes comparativement aux femmes. Le profil des hormones en circulation était différent pour les cas comparativement aux donneurs sains. De plus, les niveaux de certaines hormones étaient associés à la progression du cancer et ce, différemment selon le sexe. Nos résultats démontrent une perturbation hormonale ainsi qu'un lien entre certaines hormones et la progression de la LLC.

Sex-dependent association of circulating sex steroids and pituitary hormones with treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients.

Eric P. Allain¹, Karin Venzl², Patrick Caron¹, Véronique Turcotte¹, David Simonyan³, Michaela Gruber², Trang Le², Eric Lévesque⁴, Chantal Guillemette^{1,5*} and Katrina Vanura^{2*}

¹Pharmacogenomics Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHU de Québec) Research Center and Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada.

²Division of Hematology and Hemostaseology, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

³Statistical and Clinical Research Platform, CHU de Québec Research Center, Québec, Canada.

⁴CHU de Québec Research Centre, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada.

⁵Canada Research Chair in Pharmacogenomics.

*C.G. and K.Vanura are co-corresponding authors.

Correspondence:

Katrina Vanura, MSc PhD, Div. of Hematology and Hemostaseology, Dept. of Medicine I, Medical University of Vienna, Währinger Gürtel 18-20, 1090 Vienna, Austria, Tel: +43-1-40400 73781, Fax: +43-1-40400 73595, Email: katrina.vanura@meduniwien.ac.at, ORCID 0000-0002-2217-4998

and

Chantal Guillemette, Ph.D., CHU de Québec Research Center, R4701.5, 2705 Boul. Laurier, Québec, Canada, G1V 4G2. Tel: +1-418-654-2296, Fax: +1-418-654-2298, Email: chantal.guillemette@crchudequebec.ulaval.ca

Running title: CLL progression is associated with hormones

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, treatment free survival, hormones, mass spectrometry, steroids

Funding

This work was supported in part by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR–152986 to C.G. and E.L.) and the Canada Research Chair Program (to C.G.). E.P.A. is a PhD candidate at Laval University. This work is submitted in partial fulfillment of the requirement for the PhD. E.P.A. holds scholarships from Université Laval foundation - Leadership and sustainable development award and CHU de Québec foundation - Fernand Labrie excellence award. C.G. holds a Canada Research Chair in Pharmacogenomics (Tier I). M.G. was supported by a Marie-Curie International Outgoing Fellowship from the European Union (PIOF-2013-624924).

Acknowledgements

We would like to thank Ulrich Jäger for his support to this project and Michèle Rouleau and Philipp Staber for helpful discussions.

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is not considered a hormone-regulated cancer although sex is a recognized risk factor with men more frequently diagnosed and developing progressive disease. We hypothesized that variable hormonal exposure may have a sexually dimorphic influence on treatment-free survival (TFS). In 156 CLL cases, we quantitatively profiled 29 circulating steroids (progesterone, adrenal precursors, androgens, estrogens and catechol estrogens) as well as luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone. Median TFS was shorter for men than for women (80.7 vs. 135.0 months, $P=0.033$). Circulating hormone profiles in CLL patients were significantly different from those of healthy donors. In male CLL cases, higher LH levels were associated with shorter TFS (adjusted hazard ratio (HR_{adj}) 2.11; $P=0.004$). In female CLL cases, high levels of the potent androgens testosterone and dihydrotestosterone and the sum of methoxy estrogens were associated with an improved TFS with HR_{adj} values of 0.24 ($P=0.007$), 0.54 ($P=0.023$) and 0.31 ($P=0.034$), respectively. Reduced TFS was observed for women with CLL exhibiting high expression of the steroid inactivating UGT2B17 enzyme. This study is the first to establish a link between the outcome of CLL patients, sex steroids and pituitary hormones, revealing a sex-specific hormonal imbalance associated with disease progression.

Introduction

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most common form of adult leukemia characterized by an accumulation and clonal proliferation of mature CD5⁺ B lymphocytes in peripheral blood, bone marrow, and lymphoid organs. A significant clinical and molecular heterogeneity characterizes CLL, leading to vast differences in disease progression, response to treatment and risk of relapse, with clinical stage, cytogenetic abnormalities, and mutational status of IGHV being the most important prognostic markers [1]. To date, no curative therapy exists aside from allogeneic bone marrow transplantation, however, the development of targeting drugs and their introduction into treatment regimens in recent years portends the prolongation of overall survival (OS) which, depending on clinical stage, lies at a median of 6.5 years [1].

Sex is a risk factor with a significantly different male/female ratio (2:1) in the incidence of CLL that remains unexplained much like for other lymphoid malignancies [2, 3]. Furthermore, men develop progressive disease and resistance to treatment more frequently than women who have better prognosis independently of age and CLL stage, and respond better to therapy [2, 4]. CLL is not considered a hormone-regulated cancer but the sexual dimorphism associated with CLL incidence, prognosis and response to therapy, in addition to what is known regarding the importance of sex hormones for development and function of the immune system, led to the speculation of a potential protective role for these molecules, most particularly estrogens, in hematologic malignancies [5, 6]. As second explanation, sex-specific somatic alterations in the non-pseudoautosomal and pseudoautosomal regions on chromosomes X and Y have been discussed, [4, 7] however in-depth data are still lacking.

Sex hormones exert their influence via hormone specific receptors. For estrogens, some studies support the expression of estrogen receptors ERs in CLL but with variable results [8-10] with more recent data pointing towards a predominance of ER β [11]. Hormone receptors like ER β are ligand-regulated transcription factors activated by naturally produced steroid hormones that regulate transcription of genes controlling a wide variety of biological processes. The endogenous ligands of these hormone receptors comprise numerous steroids produced from cholesterol by the gonads and other organs such as adrenal glands (Fig. 1). Amongst C19 androgenic steroids, testosterone (Testo) and 5 α -dihydrotestosterone (DHT)

are the most potent ligands of the androgen receptor (AR), which has been sparingly studied in CLL or other B-cell malignancies [12, 13]. For ERs comprised of ER α and ER β isoforms, many endogenous ligands have been identified including parent C18 oestrogens such as estradiol that binds both receptors [14]. Data also indicate that ER α is the major ER isoform expressed in T cells whereas a co-expression of ER β splice isoforms ER β 1 and ER β 2 was reported in the majority of patients with CLL and normal lymphocytes [10, 11, 15]. Certain C19 steroids including androstenediol (5-diol) and androstenediol (3 β -diol), both of which can be synthesized from dehydroepiandrosterone (DHEA), are also highly potent ER β ligands [16]. Parent estrogens (E₂) and estrone (E₁) may be further converted into diverse catechol estrogen metabolites (CE) that display specific biological activities (mitogenic, anti-proliferative, anti-angiogenic, pro-apoptotic and genotoxic properties) [17]. A comprehensive evaluation of this array of hormones in CLL patients is still lacking.

In support of a potential effect of variable hormonal exposure on CLL progression, high expression of the androgen-inactivating UGT2B17 enzyme in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of untreated CLL patients was associated with reduced treatment-free survival (TFS) and showed promise as a biomarker for IGHV-mutated CLL cases [18, 19]. The *UGT2B17* gene encodes a uridine diphospho-glucuronosyltransferase (UGT) enzyme that conjugates small molecule substrates such as steroids to the polar sugar glucuronic acid, preventing receptor binding, leading to their inactivation and enhanced elimination through bile and urine. UGT2B17 substrates include the potent androgens Testo and DHT, and their metabolites androstane-3 α , 17 β -diol (3 α -diol) and androsterone (ADT)[20]. The *UGT2B17* gene is also highly polymorphic, with a complete gene deletion occurring at varying frequencies (14-92%) depending on ethnicity [21-23]. In healthy donors and cancer patients, altered levels of circulating steroids were reported for individuals with the UGT2B17^{null} genotype (del/del) compared to individuals carrying one or two copies of the gene [24, 25].

To provide a comprehensive evaluation of the potential effect of circulating steroids on CLL prognosis, and most particularly ligands of ER β , we established their plasma concentrations in a population of female and male CLL patients using mass spectrometry validated assays, along with androgenic precursors and biologically active estrogen metabolites. We also measured levels of gonadotropins produced by the pituitary gland that act on the gonads

including luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) by immunoassay. Our primary objective was to examine their relationship to treatment-free survival (TFS) and after adjustment for established prognostic markers. We also studied the influence of *UGT2B17* mRNA expression levels in peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) and *UGT2B17* common deletion polymorphism on circulating steroid levels of CLL patients, and their relationship to TFS.

Methods

Patients and samples

In total, 156 CLL patients (61 female and 95 male) diagnosed between 1987 and 2011 at Vienna General Hospital and 10 healthy donors (HD) recruited at the same institution were included (Fig. 2). Patient characteristics were extracted from the clinical records, including sex, age, Binet stage, CD38 expression, Coombs test, cytogenetic aberrations, IgHV gene mutation status and usage, and treatment-free and overall survival. Most patients were early stage and untreated at the time of blood sample collection. CLL diagnosis, staging and requirement for therapy were based on the NCI-WG2008 guidelines [26]. In addition, 125 HD from a Canadian cohort served as controls [27].

Patients had a median follow-up of 12.75 years and were evaluated for treatment-free survival (TFS), defined as the interval between the date of diagnosis and first therapy. The study was carried out in accordance with the Helsinki Declaration and was evaluated and approved by local Ethical Research Committees of the Medical University of Vienna (Ethics vote 1499/2015) and the Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHU) de Québec (A14-10-1205).

Real-time quantitative PCR

Unsorted frozen PBMCs were used for DNA and RNA preparation. Total RNA was analyzed for *UGT2B17* expression using described primers and conditions [18]. Expression values were normalized to the housekeeping control genes *Hprt1* and *TBP* which had been selected according to the qBase procedure [28]. Expression levels were calculated in relation to median healthy donor expression. qPCR data were analyzed using the qbase+ software, version 3.1 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium - www.qbaseplus.com).

Mass spectrometry-based quantification of adrenal precursors, androgens, oestrogens and catechol oestrogens

Profiling of 29 endogenous steroid molecules was carried out on frozen plasma samples by validated sensitive and specific gas chromatography-mass spectrometry (unconjugated steroids) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (conjugated steroids) by MS multiplex assays to quantify plasma concentrations [25, 27]. Ten unconjugated steroids were measured in a single assay using 250 μ l of plasma. Two steroid-sulphates (S) and three steroid-glucuronides (G) were measured in two independent assays using 20 μ l and 100 μ l, respectively. The lower limit of quantification (LLOQ; ratio of signal-to-noise \geq 5:1) was as follows: dehydroepiandrosterone (DHEA; 100 pg/mL); progesterone (50 pg/mL); androstenediol (5-diol) (50 pg/mL); testosterone (30 pg/mL); DHT (10 pg/mL); androsterone (ADT) (50 pg/mL); androstane-3 β , 17 β -diol (3 β -diol) (10 pg/mL); estrone (E₁) (5 pg/mL); estradiol (E₂) (1 pg/mL); androstenedione (4-dione) (50 pg/mL); ADT-glucuronide (ADT-G) (1 ng/mL); androstane-3 α , 17 β -diol 3-G (3 α -diol-G) (0.25 ng/mL); 3 α -diol-17-G (0.25 ng/mL); DHEA-S (0.075 mg/mL); E₁-S (0.075 ng/mL). Only steroid concentrations accurately measured above the lower limits of quantification (LLOQ) were considered as detectable and were reported. All hormones were detected in more than 90% of CLL cases, except 3 β -diol (detected in >65% cases) and progesterone (detected in <10% cases). All metabolite coefficients of variation (CV) were <10%.

We also measured 14 catechol oestrogens (CE), namely i) catechol 2OH: 2-hydroxyestrone (2OHE1), 2-hydroxyestradiol (2OHE2), ii) catechol 4OH: 4-hydroxyestrone (4OHE1), 4-hydroxyestradiol (4OHE2), iii) catechol 16OH: strol (E3), 16 α -hydroxyestrone (16 α OHE1), 16-ketoestradiol (16ketoE2), 16-epiestriol (16epiE3), and 17-epiestriol (17epiE3), and iv) catechol MeO: 2-methoxyestrone (2MeOE1), 2-methoxyestradiol (2MeOE2), 2-hydroxyestrone-3-methyl ether (3MeOE1), 4-methoxyestrone (4MeOE1) and 4-methoxyestradiol (4MeOE2). Their quantification was performed by stable isotope dilution LC/MS-MS based on method published by Xu [29] with some adjustments. Values of catechol oestrogens observed below LLOQ were considered as undetected. All CE metabolites coefficients of variation were below 10%.

More details regarding hormone analyses are provided in the Supplementary Material file.

Statistical analysis

Patient characteristics were portrayed by frequency for categorical variables and median with 95% confidence interval (95%CI) for continuous variables. Clinical and molecular features were compared between men and women, according to *UGT2B17* genotype and expression status, using Exact Pearson Chi Square test. We used a previously published expression threshold for dichotomization of patients into UGT2B17-high and UGT2B17-low expression groups [18]. Hormone levels were presented as means with standard error and were tested between groups with the Wilcoxon-Mann-Whitney test and analyzed as continuous variables. Sex-specific univariate and multivariate analyses of TFS were performed using Cox's proportional hazard model. The following variables significantly associated with TFS ($P \leq 0.05$) were included in the adjusted model for both sexes: IGHV, 11q deletion, CD38 expression and Binet stage. In addition, VH usage and trisomy 12 were associated with TFS for men and women, respectively. Kaplan-Meier survival curves were used to estimate TFS and the log-rank test to compare survival curves. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were performed using SAS version 9.4 and the 'survival' package for R version 3.2.2.

Results

Characteristics of CLL patients

Cytogenetic markers, IGHV usage and mutational status as well as clinical parameters are presented for men (n=95) and women (n=61) CLL cases in Table 1. Median age of CLL patients was 59.8 and 62.9 years for men and women ($P = 0.05$), respectively. Most prognostic markers had very similar frequencies between male and female cases with a slightly higher frequency of known prognostic markers in men, although statistical significance was not reached. Statistically significant differences were median treatment free survival (TFS) time of male patients, which was shorter than in women (80.7 vs. 135 months, $P=0.033$), and for the number of patients requiring treatment that was higher in men than in women (64 vs. 27, $P=0.008$).

Levels of hormones in CLL patients differ by sex and from those of healthy donors

Hormone levels below limit of quantification and detected in less than 10% of cases were excluded from the subsequent analysis. Levels of unconjugated steroids and glucuronide or sulphate conjugates differed significantly between men and women, with men presenting significantly higher concentrations of nearly every hormone, except for DHEA, which were comparable between sexes (Supplementary Material: Supplementary Table 1). The most potent androgens and oestrogens displayed the greatest disparities, with Testo, DHT and E₂ being 15.1-fold, 8-fold and 4.9-fold more abundant in men compared to women (all *P-values* <0.01). Accordingly, the sums of mean levels of ER β -ligands (E₁, E₂, 3 β -diol and 5-diol) and AR-ligands (Testo and DHT) diverged with 1.6 and 14.3-fold greater levels in men than women (all *P-values* <0.01).

We then explored differences in blood levels of steroids between CLL patients and a limited number of healthy donors recruited at the same institution (Fig. 3; Supplementary Material: Supplementary Tables 2, 3). When compared to 10 healthy donors, with an equal number of men and women, male CLL patients had lower steroid levels with significant differences noted for DHEA-S, DHEA, and ADT, female CLL cases showed a trend towards lower DHEA-S and DHEA levels (Fig. 3a, left panel). Men with CLL presented with significantly higher levels of LH and FSH compared to healthy donors whereas female cases had lower LH and FSH levels compared to healthy women (Fig. 3b, left panel). To further sustain these observations, we also compared CLL patients to a larger number of healthy donors for whom steroid levels were measured by the same MS approaches [27]. For men, most adrenal precursors and androgens were significantly less abundant in CLL cases compared to 15 healthy donors (Fig. 3a, right panel) except for oestrogens that were not significantly different and FSH levels that were higher. Compared to healthy postmenopausal women (n=110), significantly lower levels of adrenal precursors (DHEA, DHEA-S), oestrogens (E₁, E₂, and E₁-S) as well as LH and FSH were detected in female CLL cases whereas levels of Testo and 5-diol were significantly higher (*P*<0.05; Fig. 3b, right panel). Data for catechol oestrogens in the larger subset of healthy subjects were not available.

Treatment-free survival (TFS) is associated with levels of circulating hormones

In uni- and multivariate analyses, men with CLL displayed no significant differences in TFS based on high or low steroid levels (Table 2). In contrast, higher FSH and LH levels were

significantly associated with shorter TFS (univariate: FSH HR 1.42; $P=0.028$; multivariate: LH adjusted hazard ratio (HR_{adj}) of 2.11; $P=0.004$) (Table 2; Fig. 4a).

Conversely, in women with CLL, high levels of potent androgens including Testo and DHT were significantly associated with improved TFS by 126.8 and 163.3 months with HR_{adj} values of 0.24 ($P=0.007$) and 0.54 ($P=0.021$), respectively (Table 3; Fig. 4b). Accordingly, AR-ligands were significantly associated with an improved TFS ($HR_{adj}=0.27$; $P<0.01$) and ER-ligands showed the same tendency ($HR_{adj}=0.59$; $P<0.10$) in female cases. In addition, we observed that high levels of MeO-CE were significantly associated with an improved TFS with a HR_{adj} value of 0.31 ($P=0.034$) (Table 3; Fig. 4). These associations remained statistically significant upon correction for expression of the *UGT2B17* gene, encoding an androgen-inactivating enzyme and previously associated with poor prognosis in CLL patients [18, 19]. Results were also comparable in a series of analyses with sex hormone variables dichotomized at their median values into high and low groups (not shown).

UGT2B17 mRNA expression in peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) is associated with TFS

In men and women with CLL, high *UGT2B17* mRNA expression in PBMCs was associated with the adverse prognostic marker unmutated IGHV, and with high CD38 expression in female cases (Table 4). We further observed that high expression of *UGT2B17* was significantly associated with shorter TFS in CLL cases with a median of 75.5 months for cases with high *UGT2B17* expression compared to 126.3 months for cases with low *UGT2B17* expression ($P<0.01$) (Supplementary Material: Supplementary Table 4). Upon stratification by sex, this association remained significant in female cases with a median TFS of 74.1 in those with high *UGT2B17* vs. 225.9 months for low *UGT2B17* ($P<0.01$), which was slightly shorter than median TFS in men (80.7 months). Hence, male CLL cases with high *UGT2B17* expression required treatment more than cases presenting low *UGT2B17* expression. The absence of the *UGT2B17* gene (*UGT2B17*^{null} genotype) tended to be associated with an improved survival in female patients compared to carriers of at least one copy of the *UGT2B17* gene (median TFS of 254 vs. 126 months; $P<0.10$), a difference not observed in men with CLL (Supplementary Material: Supplementary Table 5).

Despite the limited number of patients, we observed that the absence of the *UGT2B17* gene in female patients (*UGT2B17*^{del/del} genotype; n=9) was associated with significantly lower levels of a direct product of the *UGT2B17* enzyme, 3 α -diol-17G ($P<0.05$; Supplementary Material: Supplementary Table 6). In male cases with the *UGT2B17*^{del/del} genotype (n=14), a trend towards increased levels of Testo and 4-dione by 26% and 19% respectively was observed ($P<0.10$), consistent with a reduced *UGT2B17* glucuronidation activity.

Discussion

Sex disparity in the development of hematological malignancies has been well documented. A genomic basis for these differences is in the occurrence of somatic mutations on the sex chromosomes [7]. Of the 6 genes for which a sex bias was found in different tumor entities [7], only *DDX2X* had been reported previously in the context of poor risk CLL and clonal evolution [30, 31]. Considering, however, the importance of sex steroids and gonadotropins for development and function of the immune system [6], we decided to focus our study on hormones and hormone metabolites.

We report a comprehensive profiling of circulating sex steroids and pituitary hormones in men and women with CLL, revealing a sex-specific association of these signaling molecules to treatment-free survival. We observed that high levels of potent androgens and biologically active estrogen metabolites are linked to an improved survival of female CLL patients whereas higher LH levels are associated with shorter survival in male CLL patients. These observations support that CLL is a hormone-responsive disease and imply different biological mechanisms associated with progression of leukemia in men and women.

We observed a significant association of high levels of testosterone and DHT, and improved TFS in women suggesting that the AR signaling axis may confer beneficial effects, potentially delaying disease progression, whether directly or indirectly acting on leukemic cells. This relationship remained similar after adjustment for prognostic factors, suggesting that effect of androgens is not dependent on these molecular changes. Testosterone is one of very few steroids present at higher concentrations in circulation of women with CLL compared to healthy postmenopausal donors, despite lower levels of adrenal precursors, suggesting a potential influence of the disease on androgen synthesis. Little is known regarding the expression and function of the AR in CLL and this information would be

essential to provide a better understanding of the potential impact of androgen signaling on CLL progression. While data denoted that androgens have immunosuppressive properties [5], some of these cellular processes may be relevant to CLL progression including the alteration of bone marrow stromal cell behavior and responses to small-molecular weight mediators such as cytokines [32, 33]. In line, recent reports suggested potential therapeutic or prognostic applications to targeting the AR axis in other lymphoid malignancies such as Mantle cell lymphoma and diffuse large B cell lymphoma [13, 34].

An alternative hypothesis to our observation in women with CLL, may involve the aromatization of testosterone to estradiol, an efficient agonist for ER β , which is the main ER expressed in lymphoid tissues also overexpressed in CLL [11, 15, 35]. Accordingly, the improved TFS in female cases may be, at least in part, the consequence of a greater local exposure of leukemic cells to oestrogens, described as tumor-suppressive molecules acting via the ER axis in cells of lymphoid origin that express ER β [36]. Concurring with this hypothesis, treatment with aromatase inhibitors blocking the conversion of androgen to estrogen was shown to enhance lymphoma growth in mice, but not androgens *per se* [37]. Also, activation of ER β was shown to induce autophagy and impair cell proliferation of Hodgkin lymphoma [38] while ER β 1 nuclear expression was exposed as an independent prognostic factor for adverse progression-free survival in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) cases [39, 40].

We also observed that higher levels of methoxylated estrogen metabolites are associated with prolonged TFS in female CLL patients compared to those with lower levels. MeO-CE corresponds to abundant endogenous estrogen derivatives that cause growth arrest of hormone-dependent and hormone-independent tumors *in vitro* and *in vivo*, consistent with their protective effect observed in female CLL cases [41]. Several studies have shown that MeO-CE exert anticarcinogenic, antiproliferative, antiangiogenic, proapoptotic and anti-inflammatory properties [42, 43]. This is in opposition to their mitogenic hydroxylated counterparts (2/4OH-CE) that can be metabolized into quinones leading to the formation of quinone adducts and oxidative DNA damage [17]. These reactive estrogen metabolites are critical in the initiation of breast and prostate cancers as well as non-Hodgkin lymphoma, and have been found in abundance in leukemia cell lines of the NCI-60 human tumor cell lines

panel [44, 45]. This may indicate that increased methylation of oestrogens could be beneficial for CLL patients by preventing the formation and accumulation of damaging catechol estrogen metabolites and/or through their intrinsic beneficial effects. In support of the later, 2MeOE₂ was recently shown to abrogate preleukemic stem cells self-renewal when maintained in a niche-like environment, inducing apoptosis and exhibiting antileukemic activity in primary human T cell acute lymphoblastic leukaemia blasts [46] concurring with the protective association for MeO-CE observed herein.

It may not be surprising to observe a more pronounced adverse effect associated with high mRNA expression of the steroid inactivating UGT2B17 enzyme in leukemic cells of female patients, where a higher systemic exposure to its androgenic substrates is linked to beneficial effects on disease progression. Besides, we could verify the ability of the UGT2B17 enzyme to conjugate MeO-CE *in vitro* (not shown). This is supported by our observation of higher levels of MeO-CE in female CLL cases with the UGT2B17^{null} genotype compared to those carrying the gene, despite the small sample size. In turns, no differences were apparent in male CLL cases notwithstanding similar circulating concentrations of MeO-CE. This may reflect sex differences in the metabolic enzymes involved in the conversion of androgen to estrogen and their subsequent biotransformation to MeO-CE by catechol-O-methyltransferase (COMT). It is thus conceivable that *UGT2B17* mRNA expression in CLL modifies exposure of leukemic cells and/or proliferation centers to these steroids with a resulting alteration of leukemic cell behavior or of the microenvironment.

For male CLL patients, we observed an association between higher levels of LH and shorter TFS. An earlier study reported higher levels of LH in male CLL patients compared to controls and an association to Rai stage [47], suggesting that men with higher levels of LH correspond to progressive cases. LH pituitary secretion is regulated by testosterone levels that decline with age with a corresponding increase in LH in aging men [48]. We did not observe a correlation between levels of these two circulating hormones in male CLL cases ($r = 0.12$; $P = 0.30$), denoting that LH may represent a biomarker in CLL. As for the underlying mechanism, a recent study presented evidence that pituitary gonadotropins may act on lymphocyte migration and that leukaemia cells recognize these hormones as chemoattractants [49]. Hematopoietic stem cells have been shown to express nearly all

hormone receptors, but it is unknown whether their expression is maintained through maturation and differentiation [50]. Evidence for the expression of LH receptor in mature B lymphocytes and CLL cells is still lacking.

Among strengths of the study is the abundance of available clinical and molecular data as well as the wide range of hormones that are reported for the first time in CLL patients. TFS was retained as the primary endpoint since it is disease-specific and not limited by competing risks of death by other conditions. In addition, whereas previous studies used radioimmunoassays to measure sex steroids, we used validated MS assays that are more specific, sensitive and accurate [27]. Our cohort of CLL patients was composed of aged men and postmenopausal women. We excluded premenopausal women to limit confounding factors such as menstrual cycle that largely affects circulating steroid levels. Some limitations of our study, exploratory in nature, also need to be considered. Body mass index was not recorded and may have affected the relationship between disease progression and steroid levels considering the association of body mass index with circulating steroids [51].

Sex differences in cytogenetic anomalies, as reported previously [4], were not statistically significant in this study cohort. We also explored potential differences in circulating hormone levels in CLL patients compared to those of healthy subjects revealing hormonal imbalances with the onset of CLL and raising the possibility that the disease may affect hormone synthesis and/or metabolism. The variations observed are unlikely to be linked to molecular events commonly associated with CLL, such as gene deletions or IGHV status, as no obvious association between these variables and hormone levels were noted (not shown).

This study reports a sex-specific hormonal imbalance and association between circulating sex steroids and pituitary hormones and treatment-free survival in CLL patients. Larger studies will need to be conducted to replicate our initial observations and to assess potential changes in hormone levels during the evolution of the disease and how drug treatment potentially affects their relationship with disease progression, both in men and women. Further work is also required to elucidate whether these effects are mediated by leukemic cells and/or affecting the dynamic interactions with the microenvironment in order to identify mediators and signaling pathways involved. Our work creates opportunities for additional

studies on the role of sex steroids and pituitary hormones that may participate in autocrine/paracrine loops affecting the survival and proliferation of CLL cells.

Author contribution

K.Venzl, P.C. and V.T. performed the experiments; T.L. and M.G. collected patient data. D.S. and E.P.A. performed statistical analyses. E.P.A., K.Venzl, E.L., K.Vanura and C.G analyzed the data. E.P.A., C.G. and K. Vanura wrote the manuscript. C.G. and K.Vanura are co-corresponding authors.

Conflict of interest

The authors have no competing interests.

Abbreviations

Testo - testosterone

DHT - dihydrotestosterone

4-dione – 4-androstenedione

DHEA - dehydroepiandrosterone

DHEA-S – dehydroepiandrosterone sulphate
5-diol – 5-androsten-3 β , 17 β -diol

E1 – Estrone

E1-S – Estrone sulfate

E2 - Estradiol

ADT – Androsterone

ADT-G – Androsterone glucuronide

Prog - progesterone

3 β -diol- androstane-3 β -17 β -diol

3 α -diol-17G - androstane-3 α , 17 β -diol-17-glucuronide

3 α -diol-3G - androstane-3 α , 17 β -diol 3-glucuronide

E3 - Estriol

16epiE3 – 16-epiestriol

16ketoE2 – 16-ketoestradiol

16 α OHE1 - 16 α -hydroxyestrone

2MeOE1 – 2-methoxyestrone

4MeOE1 – 4-methoxyestrone

2OHE1 – 2-hydroxyestrone

4OHE1 – 4-hydroxyestrone

CE – Catechol estrogen

2/4OH-CE - Hydroxy catechol estrogen

16OH-CE – 16-hydroxy catechol estrogen

MeO-CE – Methoxy catechol estrogen

CI – Confidence interval

CLL – chronic lymphocytic leukaemia

CV – Coefficient of variation

TFS – Treatment-Free Survival

VH - Immunoglobulin variable heavy chain

HR – Hazard Ratio

References

1. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, Buske C, Committee E (2015) Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 26 Suppl 5:v78-v84.
2. Catovsky D, Wade R, Else M (2014) The clinical significance of patient sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 99:1088-1094.
3. Smith A, Crouch S, Lax S, Li J, Painter D, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E (2015) Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004-2014: sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 112:1575-1584.
4. Cantú E, McGill J, Stephenson C, Hoffmann H, Tang L, Yan J, Glassman A (2013) Male-to-female sex ratios of abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization in a population of chronic lymphocytic leukemia patients. *Hematol Rep* 5(1):13-17.
5. Trigunaite A, Dimo J, Jørgensen T (2015) Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cell Immunol* 294:87-94.
6. Ladikou E, Kassi E (2017) The emerging role of estrogen in B cell malignancies. *Leuk Lymphoma* 58(3):528-539.
7. Dunford A, Weinstock D, Savova V, Schumacher S, Cleary J, Yoda A, Sullivan T, Hess J, Gimelbrant A, Beroukhim R, Lawrence M, Getz G, Lane A (2017) Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. *Nat Genet* 49:10-16.
8. Rosen S, Maciorowski Z, Wittlin F, Epstein A, Gordon L, Kies M, Kucuk O, Kwaan H, Vriesendorp H, Winter J (1983) Estrogen receptor analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 62(5):996-999.
9. Zaniboni A, Di Lorenzo D, Simoncini E, Marpicati P, Gorni F, Marini G, Marinone G (1986) Estrogen and progesterone receptor guideline for tamoxifen therapy in chronic lymphocytic leukemia: a pilot study. *Acta Haematol* 75(2):92-95.

10. Melo N, Hobday C, Dowsett M, Catovsky D, Matutes E, Morilla R, Polliack A (1990) Oestrogen receptor (ER) analysis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation of biochemical and immunocytochemical methods. *Leuk Res* 14(11-12):949-952.
11. Yakimchuk K, Norin S, Kimby E, Hägglund H, Warner E, Gustafsson J (2012) Up-regulated estrogen receptor beta2 in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 53(1):139-144.
12. Yang H, Chen C, Yan P, Huang T, Shi H, Burger M, Nimmrich I, Maier S, Berlin K, Caldwell C (2003) The androgen receptor gene is preferentially hypermethylated in follicular non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Cancer Res* 9(11):4034-4042.
13. Mostaghel E, Martin P, Mongovin S, Frayo S, Zhang A, Edlefsen K, Press O, Gopal A (2017) Androgen receptor expression in mantle cell lymphoma: Potential novel therapeutic implications. *Exp Hematol* 49:34-38.e2.
14. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson J (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87(3):905-931.
15. Phiel K, Henderson R, Adelman S, Elloso M (2005) Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* 97(1):107-113.
16. Miller K, Al-Rayyan N, Ivanova M, Mattingly K, Ripp S, Klinge C, Prough R (2013) DHEA metabolites activate estrogen receptors alpha and beta. *Steroids* 78:15-25.
17. Cavalieri E, Rogan E (2016) Depurinating estrogen-DNA adducts, generators of cancer initiation: their minimization leads to cancer prevention. *Clin Transl Med* 5:12-12.
18. Gruber M, Bellemare J, Hoermann G, Gleiss A, Porpaczy E, Bilban M, Le T, Zehetmayer S, Mannhalter C, Gaiger A, Shehata M, Fleiss K, Skrabs C, Lévesque E, Vanura K et al (2013) Overexpression of uridine diphospho glucuronosyltransferase 2B17 in high risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121:1175-1183.

19. Bhoi S, Baliakas P, Cortese D, Mattsson M, Engvall M, Smedby K, Juliusson G, Sutton L, Mansouri L (2016) UGT2B17 expression: a novel prognostic marker within IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica* 101:e63-e63.
20. Beaulieu M, Lévesque E, Hum D, Bélanger A (1996) Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a human UDP-glucuronosyltransferase active on Cv19v steroids. *J Biol Chem* 271:22855-22862.
21. McCarroll S, Hadnott T, Perry G, Sabeti P, Zody M, Barrett J, Dallaire S, Gabriel S, Lee C, Daly M, Altshuler D (2006) Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 38(1):86-92.
22. Xue Y, Sun D, Daly A, Yang F, Zhou X, Zhao M, Huang N, Zerjal T, Lee C, Carter N, Hurles M, Tyler-Smith C (2008) Adaptive evolution of UGT2B17 copy-number variation. *Am J Hum Genet* 83(3):337-346.
23. Ménard V, Eap O, Harvey M, Guillemette C, Lévesque E (2009) Copy-number variations (CNVs) of the human sex steroid metabolizing genes UGT2B17 and UGT2B28 and their associations with a UGT2B15 functional polymorphism. *Hum Mutat* 30(9):1310-1319.
24. Jakobsson J, Ekström L, Inotsume N, Garle M, Lorentzon M, Ohlsson C, Roh H, Carlström K, Rane A (2006) Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism. *J Clin Endocrinol Metabol* 91(2):687-693.
25. Nadeau G, Bellemare J, Audet-Walsh É, Flageole C, Huang S, Bao B, Douville P, Caron P, Fradet Y, Lacombe L, Guillemette C, Lévesque E (2011) Deletions of the androgen-metabolizing UGT2B genes have an effect on circulating steroid levels and biochemical recurrence after radical prostatectomy in localized prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metabol* 96:E1550-E1557.
26. Hallek M, Cheson B, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Rai K, Kipps T (2008) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111(12):5446-5456.

27. Caron P, Turcotte V, Guillemette C (2015) A chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous profiling of ten endogenous steroids, including progesterone, adrenal precursors, androgens and estrogens, using low serum volume. *Steroids* 104:16-24.
28. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8(2):R19-R19.
29. Xu X, Roman J, Issaq H, Keefer L, Veenstra T, Ziegler R (2007) Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 79:7813-7821.
30. Landau D, Carter S, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence M, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla S, Vartanov A, Fernandes S et al (2013) Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 152(4):714-726.
31. Yu L, Kim H, Kasar S, Benien P, Du W, Hoang K, Aw A, Tesar B, Improgo R, Fernandes S, Radhakrishnan S, Klitgaard J, Lee C, Getz G, Setlur S et al (2017) Survival of Del17p CLL Depends on Genomic Complexity and Somatic Mutation. *Clin Cancer Res* 23:735-745.
32. Olsen N, Gu X, Kovacs W (2001) Bone marrow stromal cells mediate androgenic suppression of B lymphocyte development. *J Clin Invest* 108:1697-1704.
33. Furman D, Hejblum B, Simon N, Jovic V, Dekker C, Thiébaud R, Tibshirani R, Davis M (2014) Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:869-874.
34. Park H, Bae J, Noh S, Kim K, Lee H, Moon W, Chung M, Kang M, Lee D, Jang K (2013) Expression of DBC1 and Androgen Receptor Predict Poor Prognosis in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Transl Oncol* 6(3):370-381.

35. Yakimchuk K, Jondal M, Okret S (2013) Estrogen receptor alpha and beta in the normal immune system and in lymphoid malignancies. *Mol Cell Endocrinol* 375:121-129.
36. Yakimchuk K, Iravani M, Hasni M, Rhönnsstad P, Nilsson S, Jondal M, Okret S (2011) Effect of ligand-activated estrogen receptor beta on lymphoma growth in vitro and in vivo. *Leukemia* 25(7):1103-1110.
37. Talaber G, Yakimchuk K, Guan J, Inzunza J, Okret S (2016) Inhibition of estrogen biosynthesis enhances lymphoma growth in mice. *Oncotarget* 7(15):20718-20727.
38. Pierdominici M, Maselli A, Locatelli S, Ciarlo L, Careddu G, Patrizio M, Ascione B, Tinari A, Carlo-Stella C, Malorni W, Matarrese P, Ortona E (2017) Estrogen receptor β ligation inhibits Hodgkin lymphoma growth by inducing autophagy. *Oncotarget* 8:8522-8535.
39. Faknuam S, Assanasen T, Ruangvejvorachai P, Hanvivadhanakul P, Intragumtornchai T, Rojnuckarin P (2017) Estrogen receptor beta expression and prognosis of diffuse large B cell lymphoma. *Hematology* <https://doi:10.1080/10245332.2017.1389508>:1-7.
40. Hasni M, Berglund M, Yakimchuk K, Guan J, Linderöth J, Amini R, Enblad G, Okret S (2017) Estrogen receptor b1 in diffuse large B-cell lymphoma growth and as a prognostic biomarker. *Leuk Lymphoma* 58(2):418-427.
41. Garcia G, Wisniewski H, Lucia M, Arevalo N, Slaga T, Kraft S, Strange R, Kumar A (2006) 2-Methoxyestradiol inhibits prostate tumor development in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate: role of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6. *Clin Cancer Res* 12:980-988.
42. Siebert A, Sanchez A, Dinda S, Moudgil V (2011) Effects of estrogen metabolite 2-methoxyestradiol on tumor suppressor protein p53 and proliferation of breast cancer cells. *Syst Biol Reprod Med* 57:279-287.
43. Chang I, Liu J, Majid S, Saini S, Zaman M, Yamamura S, Shahryari V, Chiyomaru T, Deng G, Dahiya R, Tanaka Y (2012) Catechol-O-methyltransferase-mediated metabolism of 4-hydroxyestradiol inhibits the growth of human renal cancer cells through the apoptotic pathway. *Carcinogenesis* 33:420-426.

44. Gaikwad N, Yang L, Weisenburger D, Vose J, Beseler C, Rogan E, Cavalieri E (2009) Urinary biomarkers suggest that estrogen-DNA adducts may play a role in the aetiology of non-Hodgkin lymphoma. *Biomarkers* 14:502-512.
45. Xu X, Veenstra T (2012) Concentration of endogenous estrogens and estrogen metabolites in the NCI-60 human tumor cell lines. *Genome Med* 4(4):31-31.
46. Gerby B, Veiga D, Kros J, Nourredine S, Ouellette J, Haman A, Lavoie G, Fares I, Tremblay M, Litalien V, Ottoni E, Kosic M, Geoffrion D, Ryan J, Maddox P et al (2016) High-throughput screening in niche-based assay identifies compounds to target preleukemic stem cells. *J Clin Invest* 126:4569-4584.
47. Everaus H (1992) Hormones and immune responsiveness in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 8(6):483-489.
48. Morley J, Kaiser F, Perry H, Patrick P, Morley P, Stauber P, Vellas B, Baumgartner R, Garry P (1997) Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men. *Metabolism* 46:410-413.
49. Abdelbaset-Ismail A, Borkowska S, Janowska-Wieczorek A, Tonn T, Rodriguez C, Moniuszko M, Bolkun L, Koloczko J, Eljaszewicz A, Ratajczak J, Ratajczak M, Kucia M (2016) Novel evidence that pituitary gonadotropins directly stimulate human leukemic cells-studies of myeloid cell lines and primary patient AML and CML cells. *Oncotarget* 7:3033-3046.
50. Abdelbaset-Ismail A, Suszynska M, Borkowska S, Adamiak M, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak M (2016) Human haematopoietic stem/progenitor cells express several functional sex hormone receptors. *J Cell Mol Med* 20:134-146.
51. McTiernan A, Wu L, Chen C, Chlebowski R, Mossavar-Rahmani Y, Modugno F, Perri M, Stanczyk F, Van Horn L, Wang C, Investigators W (2006) Relation of BMI and physical activity to sex hormones in postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)* 14:1662-1677.

Table 1 Characteristics of 156 male and female CLL cases

Characteristics	N^a	Men	Women
Number of patients	156	95	61
Median age (years)	138	59.8	62.9
Markers			
Binet stage B or C ^b	131	17.5%	7.8%
High CD38 expression ^b	146	31.8%	20.0%
Positive Coombs test	150	2.2%	1.7%
Cytogenetic abnormalities			
17p deletion	97	6.7%	5.4%
11q deletion ^b	149	15.4%	19.0%
Trisomy 12 ^b	149	11.0%	8.6%
13q deletion	149	58.2%	51.7%
14q aberrations	149	14.3%	12.1%
Unmutated IGHV ^b	134	50.1%	40.4%
IGHV gene usage ^b			
1-69	114	16.2%	14.6%
3-21	114	4.1%	4.9%
3-23	114	8.1%	4.9%
Treatment free survival (TFS)			
Median (months) ^c	156	80.7	135.0
Patients requiring treatment	156	67.4% (64)	44.3% (27)
Overall survival (OS)			
30 th Percentile (months) ^c	156	161.2	191.1

Significant differences ($P < 0.05$) are highlighted in bold, based on Exact Pearson Chi Square test (men vs. women)

TFS: Treatment free survival.

^aFor each characteristic, the number (N) of available individual data is indicated.

^bVariables significantly associated with TFS in both sexes were IGHV, 11q deletion, CD38 expression and Binet stage. In men and women respectively, VH usage and trisomy 12 were further associated with TFS.

^cSurvival was estimated using the Kaplan-Meier method and comparisons were done using log-rank test. For OS, the 30th percentile is reported in lieu of the median since there were too few events to estimate median survival.

Table 2 Treatment free survival (TFS) based on circulating hormone levels for men with CLL

Plasma steroid levels	HR ^c (95% CI) (n=95)	HR _{adj} ^d (95% CI) (n=84)	HR _{adj} ^e (95% CI) (n=84)
Adrenal precursors			
DHEA-S (μg/mL)	1.02 (0.80-1.31)	0.87 (0.63-1.19)	0.86 (0.63-1.19)
DHEA (ng/mL)	0.94 (0.67-1.31)	0.86 (0.60-1.12)	0.87 (0.61-1.23)
5-diol (pg/mL)	0.93 (0.71-1.21)	0.95 (0.72-1.25)	0.96 (0.73-1.26)
Androgens			
4-dione (ng/mL)	0.89 (0.55-1.44)	1.01 (0.60-1.72)	1.03 (0.61-1.75)
Testo (ng/mL)	1.14 (0.79-1.66)	0.84 (0.53-1.33)	0.85 (0.53-1.34)
DHT (pg/mL)	1.20 (0.88-1.64)	0.96 (0.68-1.37)	0.96 (0.67-1.35)
ADT (pg/mL)	1.09 (0.76-1.58)	1.05 (0.66-1.67)	1.04 (0.66-1.65)
3β-diol (pg/mL)	0.92 (0.68-1.25)	0.88 (0.60-1.29)	0.88 (0.60-1.29)
ADT-G (ng/mL)	1.22 (0.88-1.70)	<i>1.01 (0.70-1.47)</i>	<i>1.02 (0.70-1.48)</i>
3α-diol-17G (ng/mL)	1.14 (0.88-1.46)	0.71 (0.50-1.02)	0.72 (0.50-1.03)
3α-diol-3G (ng/mL)	1.12 (0.77-1.61)	0.87 (0.57-1.33)	0.87 (0.57-1.32)
Estrogens			
E ₁ -S (ng/mL)	1.06 (0.80-1.40)	0.79 (0.58-1.08)	0.78 (0.57-1.07)
E ₁ (pg/mL)	<i>0.61 (0.35-1.08)</i>	1.00 (0.51-1.99)	1.01 (0.51-2.00)
E ₂ (pg/mL)	0.86 (0.60-1.22)	0.77 (0.52-1.14)	0.76 (0.51-1.13)
Receptor ligands^a			
ER-ligands (pg/mL)	0.92 (0.66-1.29)	0.93 (0.67-1.30)	0.94 (0.67-1.31)
AR-ligands (ng/mL)	1.14 (0.78-1.67)	0.84 (0.53-1.33)	0.84 (0.53-1.34)
Catechol estrogens (CE)^b			
2/4OH-CE (pg/mL)	<i>0.77 (0.57-1.04)</i>	0.80 (0.54-1.20)	0.78 (0.52-1.17)
16OH-CE (pg/mL)	<i>1.33 (0.95-1.85)</i>	1.32 (0.86-2.02)	1.32 (0.86-2.02)
MeO-CE (pg/mL)	<i>1.56 (0.92-2.65)</i>	1.27 (0.70-2.32)	1.28 (0.65-2.49)
Pituitary gonadotropins			
LH (mIU/mL)	<i>1.35 (0.97-1.89)</i>	2.11 (1.27-3.53)	2.11 (1.26-3.53)
FSH (mIU/mL)	1.42 (1.04-1.94)	1.43 (0.91-2.23)	1.42 (0.91-2.23)

Significant HR ($P<0.05$) are highlighted in bold, trends ($P<0.10$) are in italics. Sex hormone levels were analyzed as continuous variables. Hormone levels in univariate analyses were available for all 95 male patients, except for catechol oestrogens and gonadotropins (83/95). Co-variable data for multivariate analyses were available for 84 patients, except for catechol oestrogens and gonadotropins (73/84).

^aER-ligands correspond to the sum of E₁, E₂, 5-diol, 3β-diol; AR-ligands corresponds to the sum of Testo and DHT. ER - oestrogen receptor; AR - androgen receptor.

^b2/4OH-CE corresponds to the sum of 2OHE₁ and 4OHE₁. 16OH-CE corresponds to the sum of E₃, 16epiE₃, 16ketoE₂, and 16αOHE₁. MeO-CE corresponds to the sum of 2MeOE₁ and 4MeOE₁. CE - catechol oestrogens

^cUnivariate Cox regression model.

^dMultivariate Cox regression models adjusted for IGVH status, CD38 expression, Binet stage, 11q deletion, and VH usage.

^eMultivariate Cox regression models adjusted for IGVH status, CD38 expression, Binet stage, 11q deletion, VH usage, and UGT2B17 mRNA expression.

Table 3 Treatment free survival (TFS) based on circulating hormone levels for women with CLL

Plasma steroid levels	HR ^c (95% CI) (n=61)	HR _{adj} ^d (95% CI) (n=44)	HR _{adj} ^e (95% CI) (n=44)
Adrenal precursors			
DHEA-S (µg/mL)	0.81 (0.54-1.20)	0.95 (0.51-1.78)	0.95 (0.49-1.82)
DHEA (ng/mL)	0.63 (0.41-0.97)	0.68 (0.33-1.41)	0.62 (0.27-1.42)
5-diol (pg/mL)	0.95 (0.69-1.30)	<i>0.64 (0.41-1.01)</i>	<i>0.64 (0.40-1.01)</i>
Androgens			
4-dione (ng/mL)	0.31 (0.15-0.65)	<i>0.34 (0.10-1.16)</i>	<i>0.25 (0.06-1.02)</i>
Testo (ng/mL)	0.35 (0.20-0.77)	0.24 (0.08-0.67)	0.24 (0.08-0.67)
DHT (pg/mL)	0.47 (0.31-0.72)	0.54 (0.32-0.92)	0.53 (0.31-0.91)
ADT (pg/mL)	<i>0.70 (0.48-1.01)</i>	0.79 (0.44-1.43)	0.76 (0.40-1.46)
3β-diol (pg/mL)	0.70 (0.43-1.14)	0.75 (0.31-1.79)	0.74 (0.31-1.80)
ADT-G (ng/mL)	0.51 (0.31-0.83)	0.83 (0.40-1.71)	0.81 (0.37-1.75)
3α-diol-17G (ng/mL)	0.65 (0.38-1.11)	1.09 (0.56-2.12)	1.09 (0.56-2.13)
3α-diol-3G (ng/mL)	0.73 (0.46-1.18)	0.90 (0.49-1.67)	0.89 (0.47-1.71)
Estrogens			
E ₁ -S (ng/mL)	0.82 (0.51-1.33)	1.11 (0.57-2.16)	1.12 (0.57-2.17)
E ₁ (pg/mL)	0.63 (0.37-1.05)	1.16 (0.53-2.57)	1.17 (0.52-2.62)
E ₂ (pg/mL)	0.84 (0.65-1.01)	0.61 (0.30-1.23)	0.60 (0.30-1.23)
Receptor ligands^a			
ER-ligands (pg/mL)	0.92 (0.62-1.35)	<i>0.59 (0.34-1.03)</i>	<i>0.59 (0.33-1.04)</i>
AR-ligands (ng/mL)	0.37 (0.19-0.73)	0.27 (0.10-0.70)	0.26 (0.10-0.70)
Catechol estrogens (CE)^b			
2/4-OH-CE (pg/mL)	0.80 (0.49-1.28)	0.81 (0.46-1.44)	0.68 (0.33-1.41)
16OH-CE (pg/mL)	0.97 (0.65-1.43)	0.86 (0.38-1.94)	0.87 (0.39-1.95)
MeO-CE (pg/mL)	<i>0.52 (0.26-1.04)</i>	0.31 (0.11-0.92)	0.19 (0.05-0.69)
Pituitary gonadotropins			
LH (mIU/mL)	0.81 (0.46-1.42)	1.34 (0.43-4.18)	1.35 (0.44-4.18)
FSH (mIU/mL)	1.18 (0.45-3.07)	1.10 (0.25-4.89)	1.10 (0.25-4.88)

Significant HR ($P < 0.05$) are highlighted in bold, trends ($P < 0.10$) are in italics. Sex hormone levels were analyzed as continuous variables. Hormone levels in univariate analyses were available for all 61 female patients, except for catechol oestrogens and gonadotropins (51/61). Co-variable data for multivariate analyses were available for 44 patients, except catechol oestrogens and gonadotropins (35/44).

^aER-ligands correspond to the sum of E₁, E₂, 5-diol, 3β-diol; AR-ligands corresponds to the sum of Testo and DHT. ER - oestrogen receptor; AR - androgen receptor.

^b2/4OH-CE corresponds to the sum of 2OHE₁ and 4OHE₁. 16OH-CE corresponds to the sum of E₃, 16epiE₃, 16ketoE₂, and 16αOHE₁. MeO-CE corresponds to the sum of 2MeOE₁ and 4MeOE₁. CE - catechol oestrogens.

^cUnivariate Cox regression model.

^dMultivariate Cox regression model adjusted for IGVH status, CD38 expression, Binet stage, 11q deletion, and Trisomy 12.

^eMultivariate Cox regression model adjusted for IGVH status, CD38 expression, Binet stage, 11q deletion, Trisomy 12, and UGT2B17 mRNA expression.

Table 4 Association of high or low *UGT2B17* mRNA expression in peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) with prognostic markers and treatment-free survival (TFS) in CLL patients

Characteristics	UGT2B17-high		UGT2B17-low		UGT2B17-high		UGT2B17-low	
	N ^a	% (39)	% (42)	N ^a	% (27)	% (24)		
Markers^b								
Binet stage B or C	66	16.1%	17.1%	42	13.0%	5.3%		
High CD38 expression	77	39.5%	25.6%	46	37.5%	4.5%		
Positive Coombs test	79	2.6%	2.4%	48	0.0%	4.5%		
Cytogenetic abnormalities^b								
17p deletion	49	5.0%	6.9%	30	12.5%	0.0%		
11q deletion	77	22.9%	9.5%	49	29.6%	4.5%		
Trisomy 12	77	11.4%	11.9%	49	11.1%	45.5%		
13q deletion	77	48.6%	69.0%	49	51.9%	4.5%		
14q aberrations	77	11.4%	19.0%	49	11.1%	18.2%		
Unmutated IGHV IGHV gene usage	74	69.4%	28.9%	41	66.7%	11.8%		
1-69	61	23.3%	9.7%	36	22.7%	7.1%		
3-21	61	0.0%	6.5%	36	9.1%	0.0%		
3-23	61	3.3%	16.1%	36	4.5%	7.1%		
Survival analysis^b								
TFS, median (mo) ^c		80.7	87.8		74.1	126.3		
Requiring treatment		76.9%	57.1%		59.3%	36.4%		
Survival analysis (all cases)^d								
TFS, median (mo) ^c		80.7	87.2		74.1	225.9		
Requiring treatment		76.9%	60.7%		59.3%	50.0%		

Significant differences ($P < 0.05$) are highlighted in bold, trends ($P < 0.10$) are in italics.

Based on Exact Pearson Chi Square test (high vs. low).

^aFor each characteristic, the number (N) of available individual data points is given.

^bPatients with the *UGT2B17*^{del/del} null genotype (n=14/95 male and n=9/61 female cases) were excluded from analyses based on *UGT2B17* mRNA expression as they do not carry the *UGT2B17* gene and are negative for *UGT2B17* expression.

No significant differences in *UGT2B17* expression were noted for CLL cases carrying one or two gene copies of the *UGT2B17* gene (not shown).

^cCalculated using the Kaplan-Meier Method.

^dPatients with the *UGT2B17*^{del/del} null genotype were included in the UGT2B17-low group.

^e*UGT2B17* expression was not available for one woman.

Figure legends

Fig. 1 Schematic representation of the steroidogenesis

Major steroid classes are highlighted. DHEA-S: Dehydroepiandrosterone sulphate; DHEA: dehydroepiandrosterone; 4-dione: 4-androstenedione; 5-diol: 5-androsten-3 β , 17 β -diol; Testo: testosterone; DHT: dihydrotestosterone; ADT: androsterone; 3 β -diol: androstane-3 β -17 β -diol; 3 α -diol: androstane-3 α , 17 β -diol; DHT-G: dihydrotestosterone glucuronide; ADT-G: androsterone glucuronide; 3 α -diol-17G: androstane-3 α , 17 β -diol-17-glucuronide; 3 α -diol-3G: androstane-3 α , 17 β -diol-3-glucuronide ; E₁-S: Oestrone sulphate; E₁: estrone; E₂: estradiol; 2/4OH-CE: hydroxy catechol oestrogen; 16OH-CE: 16-hydroxy catechol oestrogen; MeO-CE: methoxy catechol oestrogens; ER: oestrogen receptor; AR: androgen receptor.

Fig. 2 Selection of study population of CLL patients recruited at a single center

Fig. 3 Hormonal imbalances observed in men and women CLL patients compared to healthy donors. Ratios correspond to CLL cases vs. healthy donors for each hormone. Left panels, CLL cases are compared to a limited number of 10 healthy donors (5 men and 5 women), recruited at the same institution (Austria). Right panels, CLL cases are compared to a larger set of (a) 15 healthy male and (b) 110 healthy female donors (Canada).^{31, 32} Red lines represent a two-fold change in hormone levels. † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, based on Mann-Whitney-Wilcoxon test.

Fig. 4 Forest plots for the association of hormones with treatment free survival (TFS) Adjusted hazard ratio (HR_{adj}) with 95% confidence interval for hormones in (a) men and (b) women CLL patients, calculated with the Cox proportional hazards model. Adjusted models were corrected for IGHV mutation, CD38 expression, Binet stage, 11q deletion in both sexes and further adjusted for VH usage in men and trisomy 12 in women. LH: Luteinizing hormone; FSH: Follicle-stimulating hormone; DHEA: Dehydroepiandrosterone; 4-dione: 4-androstenedione; Testo: Testosterone; DHT: Dihydrotestosterone; MeO-CE: Methoxy catechol. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Figure 1

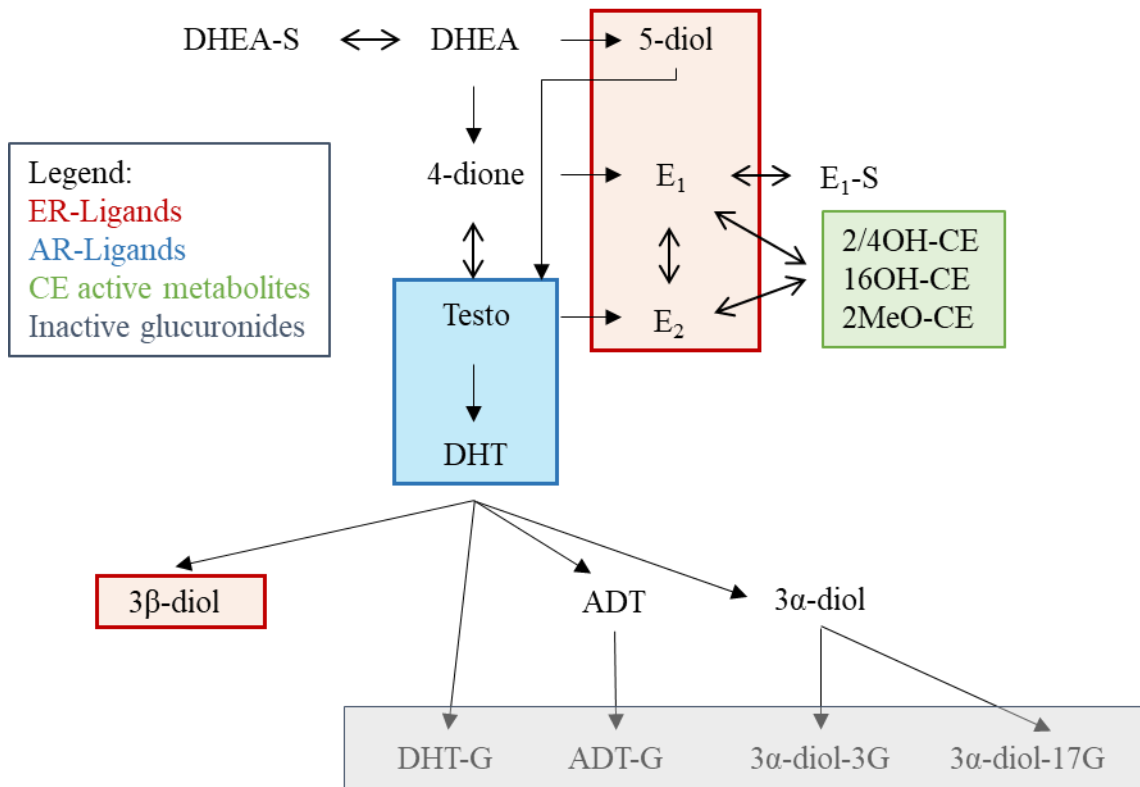


Figure 2

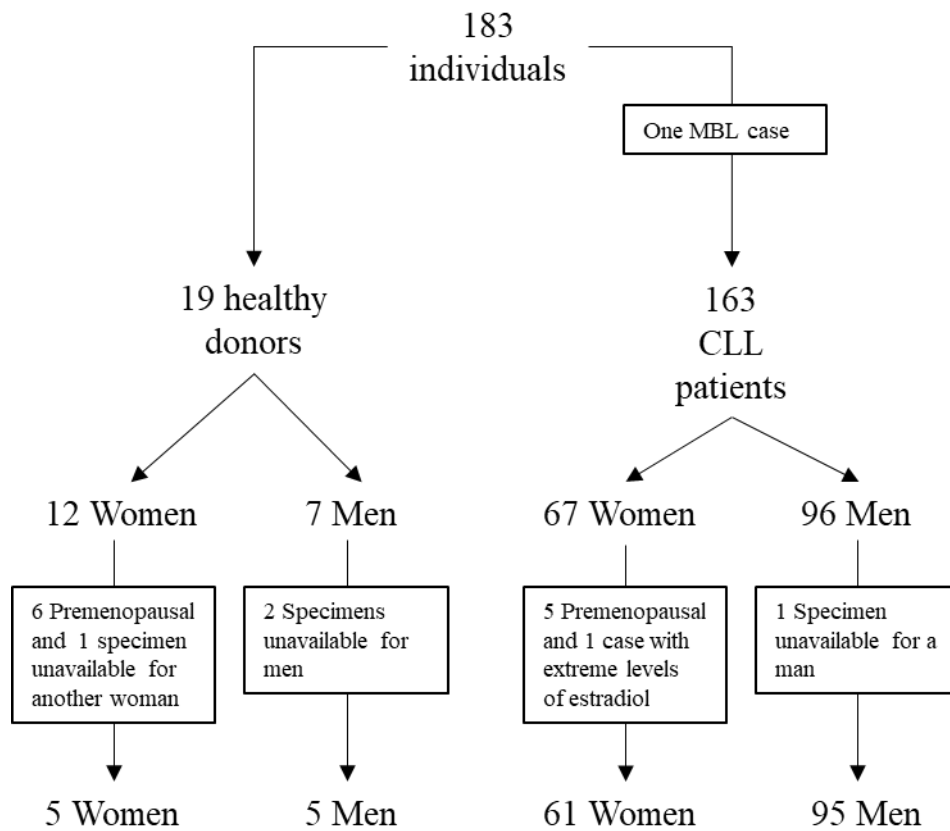
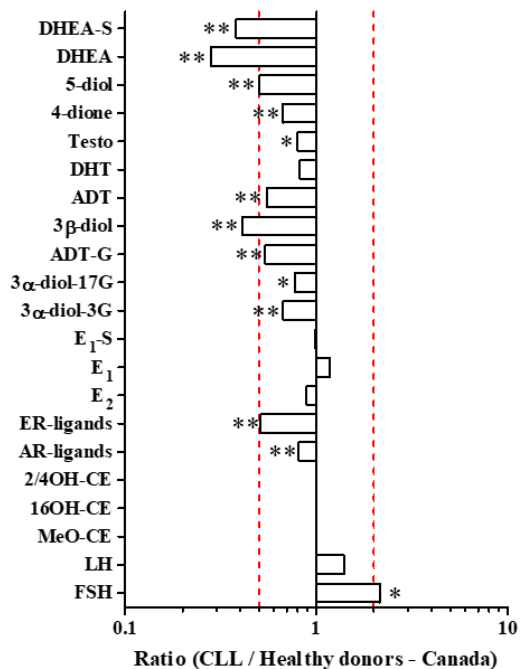
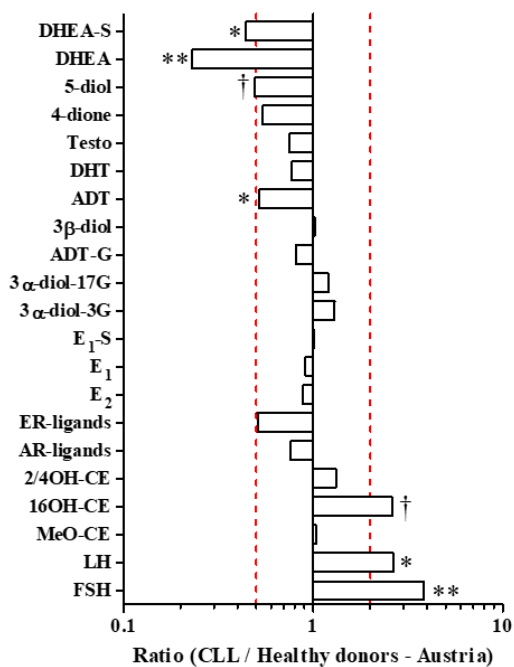


Figure 3

a. Men



b. Women

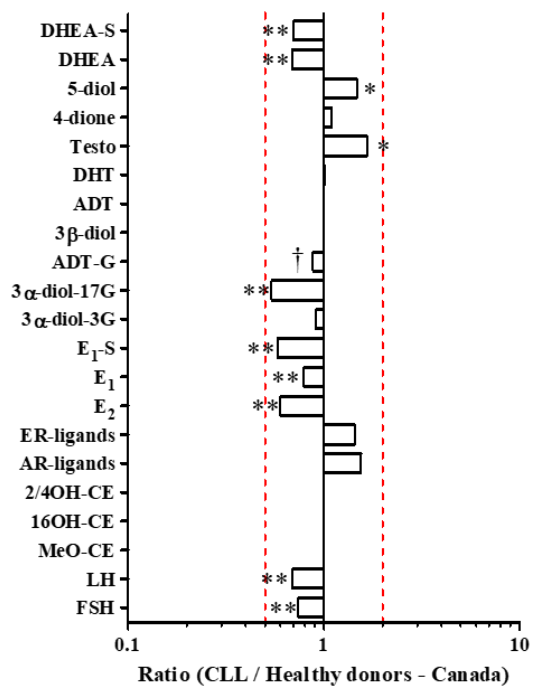
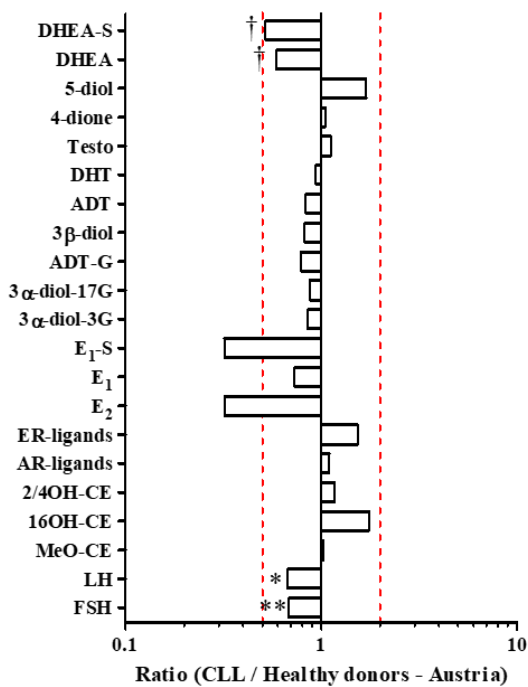
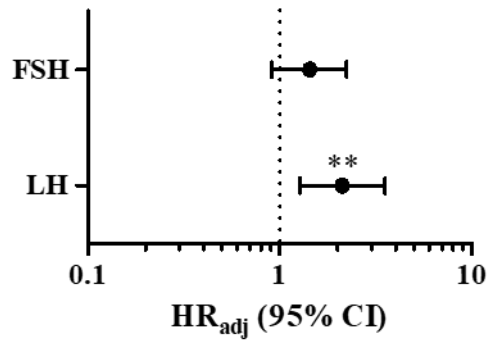
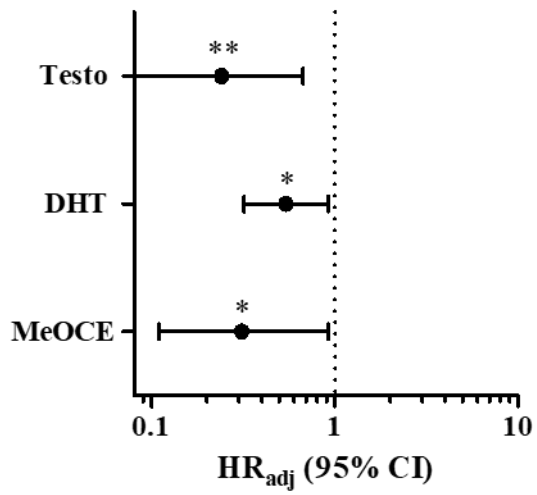


Figure 4

a. Men



b. Women



Supplementary Material

1. Supplementary Methods

1.1 Mass spectrometry-based quantification of steroids.

2. Supplementary Tables

2.1 Supplementary Table 1 Circulating hormones in men and women CLL patients

2.2 Supplementary Table 2 Circulating steroid levels of men with CLL compared to those of healthy individuals

2.3 Supplementary Table 3 Circulating steroid levels of women with CLL compared to those of healthy individuals

2.4 Supplementary Table 4 Association of high or low *UGT2B17* mRNA expression in peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) with treatment-free survival (TFS) in CLL patients (male and female combined)

2.5 Supplementary Table 5 Treatment free survival (TFS) is not significantly affected by the *UGT2B17* deletion polymorphism

2.6 Supplementary Table 6 Circulating hormone levels of CLL patients in relation to the

UGT2B17 deletion polymorphism

1. Methods

1.1 Mass spectrometry-based quantification of steroids

Steroids were purchased from Steraloids (Newport, RI, USA). Internal deuterated standards were added to samples. Deuterated standards were from C/D/N Isotopes (Montréal, QC, Canada), except d₃-DHEA, which was synthesized by the Organic Synthesis Service of the CHU de Québec Research Center (Québec, QC, Canada). Quality controls were prepared in non-adsorbed serum samples to obtain low, medium or high analyte concentrations and were included in each run, along with a seven-point calibration curve prepared by spiking, as well as blanks.

For catechol estrogen (reported as the sum of conjugated plus unconjugated forms), we used 250 µL of serum for extraction with a LLOQ of 5 pg/mL (ratio of signal-to-noise was $\geq 5:1$ corresponding to 16.56-18.52 pmol/L depending on the estrogen). Samples were treated with β glucuronidase/sulfatase prior to extraction with ethyl acetate:chlorobutane (25:75, v/v) and evaporated to dryness. Derivatization was then conducted with dansyl chloride (0.5 mg/mL final in 50% acetone and 50 mM sodium bicarbonate, pH 9.0). Samples were heated for 5 minutes at

60°C, mixed with 15 volumes of water:methanol (80:20, v/v) and loaded on pre-conditioned Strata X 60 mg SPE columns (Phenomenex, Torrance, CA, USA). After being washed with water and water:methanol (10:90, v/v), CE were eluted with dichloromethane:methanol (50:50, v/v) and evaporated to dryness at 45°C under nitrogen gas, reconstituted in 100 µL of acetone:water (75:25, v/v), and injected into a HPLC Waters alliance 2690 (Milford, MA, USA). The chromatographic separation was achieved with a Synergie RP Hydro column containing 2.5 µm packing material, 100 X 3 mm (Phenomenex, Torrance, USA). The mobile phases consisted of water with 0.0375% formic acid (solvent A) and MeOH with 0.0375% formic acid

(solvent B). The flow rate was 0.5 ml/min with the following program: 0-8 min, isocratic 22.5%

B; 8-18 min, linear gradient 22.5-35% B; 18-23 min, isocratic 35% B; 23-23.1 min, linear gradient 35-95% B; 23.1-28 min, isocratic 95% B; 28.0-28.1 min, linear gradient 95-

22.5% B and 28.1-33 min, isocratic 22.5% B. CE were detected with an API6500 (Concord, ON, Canada) equipped with a turbo ion-spray source set in positive ion mode, and operated in multiple reaction monitoring mode (MRM).

2. Supplementary Tables

2.1 Supplementary Table 1 Circulating hormones in men and women CLL patients.

Plasma steroid levels	Men (n=95) Mean ± SEM	Women (n=61) Mean ± SEM	Ratio Men/Women
Adrenal precursors			
DHEA-S (µg/mL)	0.75 ± 0.07	0.49 ± 0.05	1.5
DHEA (ng/mL)	1.35 ± 0.12	1.56 ± 0.15	0.9
5-diol (pg/mL)	577.21 ± 37.01	384.21 ± 36.48	1.5
Androgens			
4-dione (ng/mL)	0.82 ± 0.03	0.52 ± 0.04	1.6
Testo (ng/mL)	3.86 ± 0.20	0.26 ± 0.06	15.1
DHT (pg/mL)	293.86 ± 17.63	36.18 ± 6.13	8.0
ADT (pg/mL)	140.06 ± 9.01	93.85 ± 8.94	1.4
3β-diol (pg/mL)	18.72 ± 1.36	7.68 ± 0.83	2.3
ADT-G (ng/mL)	29.72 ± 2.09	13.37 ± 1.34	2.2
3α-diol-17G (ng/mL)	3.36 ± 0.28	0.40 ± 0.06	8.4
3α-diol-3G (ng/mL)	1.63 ± 0.13	0.60 ± 0.05	2.7
Estrogen			
E ₁ -S (ng/mL)	0.43 ± 0.04	0.15 ± 0.02	2.9
E ₁ (pg/mL)	26.59 ± 1.52	16.80 ± 1.26	1.6
E ₂ (pg/mL)	17.33 ± 0.86	3.37 ± 0.52	4.9
Receptor ligands*			
ER-ligands (pg/mL)	639.86 ± 38.00	411.35 ± 37.49	1.6
AR-ligands (ng/mL)	4.15 ± 0.21	0.29 ± 0.07	14.3
Catechol estrogens (CE)†			
	(n=83)	(n=51)	
2/4OH-CE (pg/mL)	55.08 ± 5.69	36.25 ± 6.80	1.5
16OH-CE (pg/mL)	205.46 ± 25.98	103.62 ± 25.59	2.0
MeO-CE (pg/mL)	38.90 ± 2.04	32.92 ± 2.29	1.2
Pituitary gonadotropins			
	(n=83)	(n=51)	
LH (mIU/mL)	6.63 ± 0.68	17.49 ± 1.21	0.4
FSH (mIU/mL)	11.94 ± 1.11	49.03 ± 2.32	0.2

Significant ($P<0.05$) ratios are in bold; trends ($P<0.10$) are in italics, based on Mann-Whitney-Wilcoxon test. Hormone levels for all cases were available, except catechol estrogens and gonadotropins (134/156); SEM - standard error of the mean.

*ER-ligands corresponds to the sum of E₁, E₂, 5-diol, 3β-diol; AR-ligands corresponds to the sum of Testo and DHT. ER - estrogen receptor; AR = androgen receptor.

†2/4OH-CE corresponds to the sum of 2OHE₁ and 4OHE₁. 16OH-CE corresponds to the sum of E₃, 16epiE₃, 16ketoE₂, and 16αOHE₁. Sum of MeO-CE corresponds to the sum of 2MeOE₁ and 4MeOE₁. CE - catechol estrogens.

In men, a partial negative correlation was noted between LH and FSH and levels of DHEA-S, DHEA, ADT and E₁-S (correlation values of $r = -0.22$ to -0.51 ; $P<0.05$). In women, a partial positive correlation was noted between LH and levels of ADT-G (correlation values of $r = -0.22$ to -0.51 ; $P=0.007$).

2.2 Supplementary Table 2 Circulating steroid levels of men with CLL compared to those of healthy individuals.

Plasma steroid levels	Men CLL cases	Healthy men	Ratio C/H	Healthy men	Ratio C/H
	Austria (n=95)	Austria (n=5)		Canada (n=15)	
	Mean ± SEM			Mean ± SEM	
Adrenal precursors					
DHEA-S (µg/mL)	0.75 ± 0.07	1.71 ± 0.44	0.44	1.96 ± 0.22	0.38
DHEA (ng/mL)	1.35 ± 0.12	5.79 ± 1.70	0.23	4.84 ± 0.75	0.28
5-diol (pg/mL)	577.21 ± 37.01	1186.57 ± 445.38	0.49	1155.36 ± 115.59	0.50
Androgens					
4-dione (ng/mL)	0.82 ± 0.03	1.53 ± 0.39	<i>0.54</i>	1.22 ± 0.11	0.67
Testo (ng/mL)	3.86 ± 0.20	5.11 ± 1.26	0.75	4.80 ± 0.35	0.80
DHT (pg/mL)	293.86 ± 17.63	381.42 ± 94.35	0.77	358.92 ± 34.17	0.82
ADT (pg/mL)	140.06 ± 9.01	273.47 ± 58.03	0.52	257.18 ± 23.90	0.55
3β-diol (pg/mL)	18.72 ± 1.36	18.56 ± 7.25	1.02	46.53 ± 4.66	0.41
ADT-G (ng/mL)	29.72 ± 2.09	36.66 ± 8.18	0.81	55.18 ± 6.65	0.54
3α-diol-17G (ng/mL)	3.36 ± 0.28	2.79 ± 0.48	1.21	4.38 ± 0.53	0.77
3α-diol-3G (ng/mL)	1.63 ± 0.13	1.25 ± 0.29	1.30	2.43 ± 0.34	0.67
Estrogens					
E ₁ -S (ng/mL)	0.43 ± 0.04	0.43 ± 0.17	1.01	0.43 ± 0.11	0.99
E ₁ (pg/mL)	26.59 ± 1.52	29.27 ± 1.83	0.91	22.51 ± 2.03	1.18
E ₂ (pg/mL)	17.33 ± 0.86	19.72 ± 2.64	0.88	19.56 ± 2.01	0.89
Receptor ligands*					
ER-ligands (pg/mL)	639.86 ± 38.01	1254.12 ± 450.76	0.51	1243.96 ± 118.21	0.51
AR-ligands (ng/mL)	4.15 ± 0.21	5.49 ± 1.35	0.76	5.15 ± 0.36	0.81
Catechol estrogens (CE)†					
	(n=83)	(n=5)			
2/4OH-CE (pg/mL)	55.08 ± 5.69	41.62 ± 14.13	1.32	-	
16OH-CE (pg/mL)	205.46 ± 25.98	78.52 ± 6.41	2.62	-	
MeO-CE (pg/mL)	38.90 ± 2.04	37.31 ± 7.86	1.04	-	
Pituitary gonadotropins					
	(n=83)	(n=5)		(n=12)	
LH (mIU/mL)	6.63 ± 0.68	2.49 ± 0.72	2.66	4.72 ± 0.56	1.40
FSH (mIU/mL)	11.94 ± 1.11	3.12 ± 0.62	3.83	5.57 ± 1.39	2.14

Significant ($P<0.05$) ratios are in bold, trends ($P<0.10$) are in italics, based on Mann-Whitney-Wilcoxon test. Hormone levels for all cases were available, except catechol estrogens and gonadotropins (134/156); SEM - standard error of the mean. Ratio C/H = ratio between levels observed in cases/healthy.

*ER-ligands corresponds to the sum of E₁, E₂, 5-diol, 3β-diol; AR-ligands corresponds to the sum of Testo and DHT. ER - estrogen receptor; AR = androgen receptor.

†2/4OH-CE corresponds to the sum of 2OHE₁ and 4OHE₁. 16OH-CE corresponds to the sum of E₃, 16epiE₃, 16ketoE₂, and 16αOHE₁. Sum of MeO-CE corresponds to the sum of 2MeOE₁ and 4MeOE₁. CE - catechol estrogens.

2.3 Supplementary Table 3 Circulating steroid levels of women with CLL compared to those of healthy individuals.

Plasma steroid levels	Women CLL cases	Healthy women	Ratio C/H	Healthy women	Ratio C/H
	Austria (n=61)	Austria (n=5)		Canada (n=110)	
	Mean ± SEM			Mean ± SEM	
Adrenal precursors					
DHEA-S (µg/mL)	0.49 ± 0.05	0.94 ± 0.28	<i>0.52</i>	0.70 ± 0.04	0.70
DHEA (ng/mL)	1.56 ± 0.15	2.66 ± 0.69	<i>0.59</i>	2.25 ± 0.14	0.69
5-diol (pg/mL)	384.21 ± 36.48	225.58 ± 86.40	1.70	259.09 ± 15.58	1.48
Androgens					
4-dione (ng/mL)	0.52 ± 0.04	0.50 ± 0.07	1.05	0.48 ± 0.02	1.10
Testo (ng/mL)	0.26 ± 0.06	0.23 ± 0.05	1.13	0.15 ± 0.01	1.67
DHT (pg/mL)	36.18 ± 6.13	39.28 ± 8.43	0.94	36.36 ± 2.14	1.01
ADT (pg/mL)	93.85 ± 8.94	123.51 ± 20.86	0.83	-	
3β-diol (pg/mL)	7.68 ± 0.83	9.82 ± 3.15	0.82	-	
ADT-G (ng/mL)	13.37 ± 1.34	16.97 ± 6.98	0.79	15.21 ± 0.89	<i>0.88</i>
3α-diol-17G (ng/mL)	0.40 ± 0.06	0.46 ± 0.10	0.87	0.73 ± 0.09	0.54
3α-diol-3G (ng/mL)	0.60 ± 0.05	0.71 ± 0.13	0.85	0.67 ± 0.06	0.91
Estrogen					
E ₁ -S (ng/mL)	0.15 ± 0.02	0.46 ± 0.27	0.32	0.25 ± 0.03	0.58
E ₁ (pg/mL)	16.80 ± 1.26	22.87 ± 4.54	0.73	21.14 ± 1.20	0.79
E ₂ (pg/mL)	3.37 ± 0.52	10.99 ± 5.98	0.32	5.86 ± 1.00	0.60
Receptor ligands					
ER-ligands (pg/mL)	411.35 ± 37.49	267.29 ± 93.43	1.54	286.08 ± 16.19	1.44
AR-ligands (ng/mL)	0.29 ± 0.07	0.27 ± 0.06	1.10	0.19 ± 0.01	1.55
Catechol estrogens (CE)					
	(n=51)	(n=5)			
2/4OH-CE (pg/mL)	36.25 ± 6.80	30.96 ± 11.58	1.17	-	
16OH-CE (pg/mL)	103.62 ± 25.59	58.97 ± 14.70	1.76	-	
MeO-CE (pg/mL)	32.92 ± 2.29	31.92 ± 5.39	1.03	-	
Pituitary gonadotropins					
	(n=51)	(n=5)		(n=110)	
LH (mIU/mL)	17.49 ± 1.21	25.47 ± 3.41	0.67	25.33 ± 0.33	0.69
FSH (mIU/mL)	49.03 ± 2.32	72.57 ± 8.43	0.68	66.35 ± 2.01	0.74

Significant ($P < 0.05$) ratios are in bold, trends ($P < 0.10$) are in italics, based on Mann-Whitney-Wilcoxon test. Hormone levels for all cases were available, except catechol estrogens and gonadotropins (134/156); SEM - standard error of the mean. Ratio C/H = ratio between levels observed in cases/healthy.

*ER-ligands corresponds to the sum of E₁, E₂, 5-diol, 3β-diol; AR-ligands corresponds to the sum of Testo and DHT. ER - estrogen receptor; AR = androgen receptor.

†2/4OH-CE corresponds to the sum of 2OHE₁ and 4OHE₁. 16OH-CE corresponds to the sum of E₃, 16epiE₃, 16ketoE₂, and 16αOHE₁. Sum of MeO-CE corresponds to the sum of 2MeOE₁ and 4MeOE₁. CE - catechol estrogens.

- : not available

2.4 Supplementary Table 4 Association of high or low *UGT2B17* mRNA expression in peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) with treatment-free survival (TFS) in CLL patients (male and female combined).

	UGT2B17-high	UGT2B17-low
	% (n=66)	% (n=87)
TFS, median (mo)	75.5	126.3
Requiring treatment	69.7% (n=46)	51.2% (n=45)

Significant ($P<0.05$) ratios are in bold, trends ($P<0.10$) are in italics. Calculated using the Kaplan-Meier method.

2.5 Supplementary Table 5 Treatment free survival (TFS) is not significantly affected by *UGT2B17* deletion polymorphism.

Men (n=95)		Women (n=60)¹	
Median TFS (months)		Median TFS (months)	
0 copy (n=14)	1-2 copies (n=81)	0 copy (n=9)	1-2 copies (n=49)
61.9	82.4	254	126

Significant ($P < 0.05$) differences are in bold, trends ($P < 0.10$) are in italics, based on the Log-rank test. Part of these data was included in the *UGT2B17* study by Gruber et al.¹⁸ the information was complemented and updated for this study cohort.

0 copy = *UGT2B17*^{del/del} or *UGT2B17*^{null} genotype; 1-2 copies = patients carrying at least one copy of the *UGT2B17* gene.

¹60 out of 61 women had *UGT2B17* copy number information.

2.6 Supplementary Table 6 Circulating hormone levels of CLL patients in relation to the *UGT2B17* deletion polymorphism.

Plasma steroid levels	Men CLL cases (n = 95)		Women CLL cases (n = 60)‡	
	0 copy (n=14)	1-2 copies (n=81)	0 copy (n=9)	1-2 copies (n=51)
	Mean ± SEM		Mean ± SEM	
Adrenal precursors				
DHEA-S (µg/mL)	0.83 ± 0.21	0.74 ± 0.07	0.40 ± 0.11	0.49 ± 0.05
DHEA (ng/mL)	1.75 ± 0.62	1.28 ± 0.09	1.38 ± 0.27	1.53 ± 0.16
5-diol (pg/mL)	602.11 ± 71.25	572.91 ± 41.76	330.48 ± 11.08	383.36 ± 38.78
Androgens				
4-dione (ng/mL)	0.98 ± 0.09	0.79 ± 0.04	0.51 ± 0.74	0.52 ± 0.04
Testo (ng/mL)	4.69 ± 0.51	3.71 ± 0.21	0.19 ± 0.03	0.26 ± 0.04
DHT (pg/mL)	381.91 ± 65.47	278.64 ± 16.99	28.77 ± 4.83	36.91 ± 7.26
ADT (pg/mL)	160.84 ± 22.47	136.47 ± 9.83	106.83 ± 17.92	88.89 ± 9.86
3β-diol (pg/mL)	19.69 ± 2.52	18.55 ± 1.54	9.71 ± 2.78	7.38 ± 0.87
ADT-G (ng/mL)	29.97 ± 5.16	29.67 ± 2.30	12.81 ± 3.84	13.03 ± 1.39
3α-diol-17G (ng/mL)	2.79 ± 0.45	3.46 ± 0.32	0.15 ± 0.02	0.44 ± 0.07
3α-diol-3G (ng/mL)	1.40 ± 0.17	1.67 ± 0.16	0.50 ± 0.14	0.61 ± 0.06
Estrogens				
E ₁ -S (ng/mL)	0.54 ± 0.12	0.41 ± 0.04	0.16 ± 0.06	0.14 ± 0.02
E ₁ (pg/mL)	28.84 ± 3.63	26.20 ± 1.67	19.84 ± 4.55	15.92 ± 1.23
E ₂ (pg/mL)	19.65 ± 1.79	16.93 ± 0.95	3.07 ± 0.90	3.30 ± 0.60
Receptor ligands*				
ER-ligands (pg/mL)	670.29 ± 71.14	634.53 ± 42.97	363.11 ± 99.13	408.34 ± 40.16
AR-ligands (ng/mL)	5.07 ± 0.57	3.99 ± 0.23	0.22 ± 0.03	0.30 ± 0.08
Catechol estrogens (CE)†				
	(n=14)	(n=69)	(n=9)	(n=42)
2/4OH-CE (pg/mL)	48.25 ± 7.87	56.46 ± 6.66	35.10 ± 6.30	36.53 ± 8.18
16OH-CE (pg/mL)	154.84 ± 25.14	215.73 ± 30.75	239.86 ± 128.33	74.43 ± 12.77
MeO-CE (pg/mL)	40.17 ± 5.12	38.64 ± 2.24	35.88 ± 6.81	32.28 ± 2.41
Pituitary gonadotropins				
	(n=14)	(n=69)	(n=9)	(n=42)
LH (mIU/mL)	5.46 ± 1.00	6.86 ± 0.79	17.70 ± 3.64	17.44 ± 1.28
FSH (mIU/mL)	7.87 ± 1.34	12.77 ± 1.29	42.56 ± 5.51	50.42 ± 2.54

UGT2B17 copy number variation is described as 0 = *UGT2B17*^{del/del}; 1-2 copies = patients carrying at least one copy of the gene. Frequency of *UGT2B17*^{del/del} or *UGT2B17*^{null} genotype was of 14.7% and 15.0% in male and female cases respectively. Significant ($P < 0.05$) ratios are in bold, trends ($P < 0.10$) are in italics, based on Mann-Whitney-Wilcoxon test. Hormone levels for all cases were available, except catechol estrogens and gonadotropins (134/156); SEM - standard error of the mean. Ratio C/H = ratio between levels observed in cases/healthy.

*ER-ligands corresponds to the sum of E₁, E₂, 5-diol, 3β-diol; AR-ligands corresponds to the sum of Testo and DHT. ER - estrogens receptor; AR = androgen receptor.

†2/4OH-CE corresponds to the sum of 2OHE₁ and 4OHE₁. 16OH-CE corresponds to the sum of E₃, 16epiE₃, 16ketoE₂, and 16αOHE₁. Sum of MeO-CE corresponds to the sum of 2MeOE₁ and 4MeOE₁. CE - catechol estrogens.

‡The *UGT2B17* deletion genotype was missing for one woman.

Chapitre 2: « Inactivation of prostaglandin E₂ as a mechanism for UGT2B17-mediated adverse effects in chronic lymphocytic leukemia »

Résumé

L'expression d'UGT2B17 est associée à un pronostic défavorable en LLC chez les patients non traités, suggérant que cette enzyme puisse être impliquée dans la biologie de la maladie. Nous avons émis l'hypothèse qu'UGT2B17 favorise un phénotype agressif en perturbant les concentrations de métabolites endogènes affectant l'expression génique et la progression tumorale. La surexpression d'UGT2B17 dans les modèles cellulaires est associée à une prolifération accrue. L'analyse du transcriptome en conditions de surexpression UGT2B17 a révélé une diminution de l'expression gènes associés à la prostaglandine E₂ (PGE₂). Le PGE₂ a des propriétés anti-oncogéniques partiellement dépendants des niveaux d'UGT2B17 *in vitro* et *ex vivo*. Nos résultats ont révélé que l'enzyme UGT2B17 inactive le PGE₂ via la conjugaison à l'acide glucuronique (GlcA). Ce phénomène a lieu à un taux accrue pour les patients ayant des niveaux élevés d'UGT2B17. Une activité accrue d'UGT2B17 pourrait donc contribuer à contrer les effets anti-oncogéniques du lipide bioactif PGE₂.

Inactivation of prostaglandin E₂ as a mechanism for UGT2B17-mediated adverse effects in chronic lymphocytic leukemia

Eric P Allain¹, Michèle Rouleau¹, Trang Le², Katrina Vanura², Lyne Villeneuve¹, Patrick Caron¹, Véronique Turcotte¹, Eric Lévesque³ and Chantal Guillemette*^{1,4}

¹Pharmacogenomics Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHU de Québec) Research Center – Université Laval and Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada.

²Division of Hematology and Hemostaseology, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

³CHU de Québec Research Centre – Université Laval, Division of hemato-oncology, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada.

⁴Canada Research Chair in Pharmacogenomics.

Correspondence: Chantal Guillemette, chantal.guillemette@crchudequebec.ulaval.ca

Keywords: UGT2B17, CLL, Prostaglandins, Glucuronidation, PGE₂

Number of figures: 5

Number of tables: 0

Number of references: 52

Supplementary files: 3

Word-count: 6909 total

Abstract: 247

Introduction: 423

Material and methods: 1936

Results: 1174

Discussion: 704

Abstract

High expression of the metabolic enzyme UDP-glucuronosyltransferase UGT2B17 in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells was associated with poor prognosis in two independent studies. However, the underlying mechanism remains unknown. We hypothesized that UGT2B17 impacts intracellular levels of hormone-like signaling molecules involved in the regulation of gene expression in leukemic cells. We initially confirmed in a third cohort of 291 CLL patients that those with high UGT2B17 displayed poor prognosis (hazard ratio of 2.31, $P = 0.015$). Consistent with the unfavorable prognostic significance of elevated UGT2B17 expression in CLL patients, high UGT2B17 expression was associated with enhanced proliferation of MEC1 and JVM2 malignant B-cell models. Transcriptomic analyses revealed that high UGT2B17 was linked to a significant alteration of genes related to prostaglandin E₂ (PGE₂) and to its precursor arachidonic acid, both in cell models and a cohort of 448 CLL patients. In functional assays, PGE₂ emerged as a regulator of apoptosis in CLL patients and proliferation in cells models, whereas its effect was partially abrogated by high UGT2B17 expression in MEC1 and JVM2 cells. Enzymatic assays and mass-spectrometry analyses established that the UGT2B17 enzyme inactivates PGE₂ by its conjugation to glucuronic acid (GlcA) leading to the formation of two glucuronide (G) derivatives. High UGT2B17 expression was further associated with a proficient inactivation of PGE₂ to PGE₂-G in CLL patient cells and cell models. We conclude that UGT2B17-dependent PGE₂ glucuronidation impairs anti-oncogenic PGE₂ effects in leukemic cells, thereby partially contributing to disease progression in high UGT2B17 CLL patients.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common form of adult leukemia in the western world (1). It is characterized by an accumulation of mature B-cells in peripheral blood, bone marrow and other lymphoid organs. CLL has a highly variable course and generally develops at a slower pace than other leukemia subtypes. The accumulation of CLL cells in patients can be explained, in part, by defects in the regulation of apoptosis (2), but other studies have also shown evidence of clonal evolution (3, 4) and the importance of active proliferation in progressive disease (5, 6).

A significant increase in therapeutic options for CLL patients has been associated with improved survival. However, CLL remains incurable (7). Recent investigations have yielded insights into molecular indicators used to better predict clinical outcome of this disease. Of those, uridine diphospho-glucuronosyltransferase 2B17 (*UGT2B17*) expression was identified as a novel molecular marker for CLL progression in two independent CLL cohorts (8, 9). The initial report associated high *UGT2B17* mRNA expression with poor prognosis, unmutated-IGHV and other expression-based markers, such as LPL and CD38 (9). The second study reported high *UGT2B17* expression as a prognostic marker particularly for mutated-IGHV individuals, a subgroup of patients for which few indicators of progression currently exist (8). The *UGT2B17* gene encodes a member of a superfamily of metabolic enzymes responsible for the conjugation of small lipophilic substrates to glucuronic acid (GlcA) derived from its co-substrate UDP-GlcA (10). Glucuronidation inactivates the enzyme's substrates, increases their polarity and facilitates their elimination through bile or urine. The function of this metabolic route is to maintain homeostasis of endogenous molecules while protecting cells from potentially harmful chemicals arising from exogenous sources, including pharmacological compounds (11).

The underlying mechanism(s) by which the *UGT2B17* protein may affect CLL malignancy and disease progression in patients remains unknown. Amongst the 19 human UGT isoforms, *UGT2B17* is the only significantly expressed UGT in CLL cells. The *UGT2B17* protein is enzymatically functional, as it was shown to conjugate *UGT2B17* substrates such as androgens in cells isolated from CLL patients (9). It is plausible that *UGT2B17* influences intracellular levels of hormone-like signaling molecules involved in the regulation of gene

expression, with subsequent impacts on cancer cell growth and survival. We hypothesized that overexpression of UGT2B17 perturbs the bioavailability and response to endogenous B-cell modulators with consequences on the transcriptome of leukemic cells and neoplastic behavior. We report that high UGT2B17 modifies expression of genes related to prostanoids. It also impairs prostaglandin-mediated growth inhibition of malignant cells through direct inactivation of these hormone-like molecules by glucuronidation.

Materials and methods

Patients, cell lines and culture

The B-cell neoplastic cell lines MEC1 and JVM2 were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) in 2010 and ATCC (Manassas, VA) in 2015, respectively. The MEC1-2B17 and JVM2-2B17 cell models were generated by electroporation of parental cells with a pcDNA6 vector containing the coding sequence of UGT2B17 for stable overexpression. Electroporation was achieved with the Neon Transfection System (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA). The JVM2-CTRL cells were produced by electroporation with the pcDNA6 vector and the MEC1-CTRL cells were prepared as described (9). All cell lines were cultured in RPMI medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 1% penicillin / streptomycin, 1% sodium pyruvate and 1% L-glutamine. Selection of MEC1-2B17 cells was achieved by supplementing culture medium with 20 µg/mL blasticidin for 3 weeks, after which selection was maintained by growing cells with 10 µg/mL of blasticidin. MEC1-CTRL cells were supplemented with 3 µg/mL of puromycin. For JVM2-CTRL and JVM2-2B17 cells, selection for 3 weeks and subsequent growth was achieved by supplementing medium with 5 µg/mL blasticidin. All cell culture components were purchased from Wisent Bioproducts (St-Bruno, QC). Cells were regularly tested for mycoplasma, with the most recent carried out on February 9th, 2019.

Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 15 CLL patients diagnosed between 1987 and 2011 at Vienna General Hospital were used (**Table S1**). Cell purity was assessed by measuring CD5 and CD19 surface expression by cytometry prior to experimentation, with CLL cells representing 67% of total PBMCs on average. Primary cells from CLL patients were cultured in RPMI supplemented with 10% FBS, 1% sodium pyruvate and 1% L-glutamine without antibiotics. All subjects gave written informed consent in accordance with the Helsinki Declaration and the study was evaluated and approved by local Ethical Research Committees of the Medical University of Vienna (Ethics vote 1499/2015) and the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec (A14-10-1205).

Immunoblotting

For western blot, microsomal fractions were prepared from MEC1 and JVM2 by resuspending 10^8 cells in 1 mL microsome buffer (4 mM potassium phosphate, 20% glycerol, pH 7.0). Cells were sonicated three times for 30 seconds, alternating with 30-second pauses on ice. Extracts were centrifuged twice at $12,000 \times g$ for 22 minutes at 4°C . Supernatants were centrifuged at $105,000 \times g$ for 60 minutes at 4°C to isolate the microsomal fraction that was resuspended in microsome buffer containing 0.5 mM dithiothreitol (DTT). Microsomal fractions (20 μg) were mixed with Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Mississauga, ON), heated at 95°C for 5 minutes prior to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Protein detection was adapted from a previously described immunoblotting strategy (12) using the polyclonal anti-UGT2B antibody EL-93 (1:2000) for detection of UGT2B17 (13) or an anti-calnexin antibody (1:2000, Enzo Life Science, Farmingdale, NY) as a loading control.

Glucuronidation assays

Enzyme activity assays, incubated at 37°C for 120 minutes, were conducted with cell homogenates (100 μg) prepared by resuspending 10^8 JVM2 and MEC1 cells in 1 mL PBS containing 0.5 mM DTT or with microsomal fractions (20 μg) from primary cells from CLL patients (prepared as described above) in a final volume of 100 μL . The reaction assays also contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatin, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 0.5 mM UDP-GlcA, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alamethicin and indicated substrates. Final substrate concentrations were 200 μM for prostaglandins (PG) and vorinostat (SAHA; Sigma-Aldrich) or 25 μM for dihydrotestosterone (DHT), testosterone (Testo) and estradiol (E_2) (all from Steraloids, Newport, RI). Steroid glucuronides (-G) were analyzed by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as previously described (14). For PGs, chromatographic separation was performed onto an ACE C18 HL column (3 μM packing material, 100×4.6 mm; Canadian Life Science, Peterborough, ON) and a Nexera system (Shimadzu Scientific instruments, Columbia, MD). Elution of PGs-G was done in isocratic conditions consisting of 65% methanol, 35% H_2O , 1 mM ammonium formate at a constant flow rate of 0.9 ml/min. For vorinostat, chromatographic separation was performed onto an ACE C18 HL column (3 μM packing material, 100×4.6 mm; Canadian Life Science). The mobile phases were solvent A: H_2O , 0.1% formic acid and solvent B:

acetonitrile, 0.1% formic acid. Vorinostat-G was eluted using the following program: 0-1.5 minutes, isocratic 40% B; 1.5-1.6 minutes, linear gradient 40-90% B; 1.6-2.9 minutes, isocratic 90% B; 2.9-3.0 minutes, linear gradient 90-40% B; 3.1-6.0 minutes, isocratic 40% B. Relative amounts of glucuronides were compared by area under the curve (AUC) by tandem MS (API 6500; Sciex, Concord, ON) operated in multiple reactions monitoring mode (MRM) and equipped with a turbo ion-spray source. The following mass ion transitions (m/z) were used: 527.2 → 175 for PGE₂-G and 441.3 → 265.1 for vorinostat-G. Both systems were controlled through Analyst Software (version 1.6.1, AB Sciex).

Gene expression analysis

Publicly available data sets were used for analysis of overall survival (OS) of CLL patients and CLL expression profiles in relation to *UGT2B17* levels using the affy (v1.48) and limma (v3.26.9) packages for R (<http://www.bioconductor.org>). The first dataset was obtained from the International Cancer Genome Consortium (ICGC-CLLE-ES, n=291) (15, 16). A second dataset was from the Gene Expression Omnibus (GEO-GSE13159, n=448 untreated patients) (17). For MEC1 and JVM2 cell models, total RNA from three biological replicates was extracted using RNeasy mini kit, as per manufacturer's instructions (Qiagen, Toronto, ON). Samples were subjected to ribosomal RNA depletion before Illumina HiSeq2000 paired-end sequencing at Genome Québec McGill University and at the CHU de Québec Research center - Université Laval. Raw data was processed using the MUGQIC pipeline version 1.3. Briefly, reads were quality trimmed and aligned to the hg38 human genome. Differential gene expression analysis was performed using the edgeR and DESeq2 tools for R v3.2.2 (18, 19). Differences in gene expression were considered significant if Benjamini-Hochberg adjusted *P*-values for both tools were below 0.05. Analysis of enriched biological pathways was carried out using g:profiler (20) with the Reactome (21), KEGG (22-24) and GO biological process databases. Reactome FI plugin for Cytoscape v3.2.1 was also used for clustering of genes into modules and visualization of enriched pathways (25). Altered expression of selected genes was validated by quantitative real time PCR. Briefly, total RNA was DNase I-treated and purified using the RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen, Hilden, DE) following the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesis was accomplished using Superscript IV RNase H-RT (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, CA), PCR

purification kit (Qiagen, Hilden, DE) was used to purify cDNA. Oligoprimers were designed by GeneTool 2.0 software (Biotools Inc, Edmonton, AB, CA), their specificity was verified by BLAST alignment to human RefSeq sequences and were synthesized by IDT (Integrated DNA Technology, Coralville, IA, USA) (**Table S2**). RT-qPCR quantification was carried out using the LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, DE). Reagent LightCycler 480 SYBRGreen I Master (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) was used as described by the manufacturer with 2% DMSO. Relative quantity was calculated using the second derivative method and by applying the delta Ct method (26). *B2M*, *HPRT1* and *UBC* were used as reference genes for normalization (27). Quantitative qPCR measurements were performed in compliance with MIQE guidelines by the Gene Expression Platform of our institution (28, 29).

Cell proliferation and viability assays

Cells were plated at 1×10^4 cells/well (MEC1) or 5×10^4 cells/well (JVM2) in 96-well U-bottom tissue culture plates (BD Bioscience, Mississauga, ON). For treatment assays, growth media was supplemented with PGs or vehicle (ethanol) at time of plating and renewed every 48 hours. PGE₂, Butaprost and PGE₁-OH, used at concentrations indicated in the text, were purchased from Cayman chemicals (Ann Arbor, MI). Every 24 hours, an aliquot of cells was stained with trypan blue (50%) and counted with a TC-10 automated cell counter (Bio-Rad). Assays were replicated at least three times in duplicate. For MTS assays, 20 μ L of CellTiter aqueous one solution cell proliferation reagent (MTS Promega, Madison, WI, USA) was added to 100 μ L of cells. Absorbance at 490nm was read after a 4-hour incubation at 37°C. To further assay cell proliferation, cells were labelled with 5 μ M of CFSE (Thermo Fisher Scientific) and incubated at 37°C for 10 minutes before rinsing once with DPBS and plating at 4×10^6 cells/mL in 12-well culture plates with whole medium 72 hours prior to analysis.

Migration assays

CLL PBMCs were plated at 3×10^6 cells/mL in 24-well culture plates 24 hours prior to migration assays. Cells were then treated for 24 hours with PGE₂ (1-5 μ M) before initiation of migration experiments. Transwell 5 μ m pore inserts (Corning, New-York, NY) were then placed in a 24-well plate with 600 μ L of medium in the lower well and 100 μ L in the upper well, containing 5×10^5 CLL cells. Cells were treated with either vehicle (PBS) or CXCL12

(200 ng/mL) before incubation for 4 hours at 37°C. Cells in the upper and lower compartments were recovered in separate tubes by incubation with a non-enzymatic cell dissociation solution (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) for 10 minutes at 37°C. Each tube was then spiked with 50 µL of 123eBeads (Thermo Fisher Scientific) and counted using a FACS Canto II flow cytometer (BD Bioscience). Migration was calculated with the following formula:

$$\% \text{ Migration} = \frac{\text{Cells in lower chamber}}{\text{Cells in lower chamber} + \text{Cells in upper chamber}} \times 100$$

Flow Cytometry Analyses

Each patient PBMC sample was thawed and diluted to 3×10^6 cells/ml prior to identification of CLL cells by analysis of cell surface markers using PerCPCy5.5-conjugated anti-human CD5 (BD Pharmingen), PE-Cy7-conjugated anti-human CD19 (BD Bioscience) and APC-Cy7-conjugated anti-human CD45 (BD Bioscience). All analyses were conducted with a FACS Canto II flow cytometer (BD Bioscience).

Cell death

Aliquots of 5×10^5 cells were centrifuged at $520 \times g$ and rinsed twice with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) before resuspension in Annexin V binding buffer (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl₂, pH 7.4). Cells were labeled with Alexa Fluor 647-conjugated Annexin V as per manufacturer's instructions (Thermo Fisher scientific) and propidium iodide (PI; 4 ng/mL) in the dark, on ice, for 30 minutes prior to analysis.

BCR stimulation assays

Primary CLL PBMCs (5×10^5 cells) were treated with PGE₂ (1-5 µM) or DMSO 2 hours after thawing. Cells were primed with PMA (10 ng/mL, Sigma-Aldrich) for 1 hour, then stimulated with LPS (200 ng/mL Sigma-Aldrich) or F(ab')₂ anti-human IgM (10 µg/mL, Southern Bioscience, Birmingham, AL). For assessment of ERK phosphorylation, cell aliquots (5×10^5) were labeled with LIVE/DEAD[®] fixable dead cell stain kit (Thermo Fisher Scientific) as per manufacturer's instructions after 15 minutes of stimulation, then fixed with

3.7% paraformaldehyde and permeabilized with 90% ice-cold methanol before staining with 5 μ L APC-conjugated rabbit anti-human p44/42 MAPK (pERK1/2, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA) and analysis. For assessment by surface markers, aliquots of 5×10^5 cells were labeled with LIVE/DEAD[®] 24 hours post-stimulation, rinsed once with DPBS and incubated 30 minutes on ice with mouse anti-human PE-conjugated CD80 (BioLegend, San Diego, CA) and APC-conjugated CD86 (BD Pharmingen) before analysis.

Statistical analysis

The half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) were calculated by fitting variable slope non-linear curves to normalized response data from PGE₂ treatments. Statistical analysis was carried out using a two-tailed Student's t-test, unless otherwise indicated in the legends. Analysis of overall survival was done using the Kaplan-Meier method and the Log-Rank test. Statistics were performed using GraphPad Prism v5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) and R v3.2.2. Statistical significance is defined as $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**). Each experiment was performed with three biological replicates, unless otherwise indicated in figure legends.

Data availability

The datasets generated during the current study are available in the GEO repository with the accession number GSE121626.

Results

UGT2B17 confers a proliferative advantage to malignant B- cell models

A significant reduction in overall survival (OS) was established in 291 CLL patients from the International Cancer Genome Consortium (ICGC) expressing high *UGT2B17* levels (**Fig. 1A**). Neoplastic B-cell models MEC1 and JVM2 stably overexpressing UGT2B17 were created to examine its role in CLL progression. These two cell lines were chosen on the basis of relatedness to CLL and diversity of cytogenetic aberrations. Overexpression was confirmed at the mRNA (2.6 fold) and protein (2.6 fold) levels in the MEC1-2B17 cells, and the functionality of the enzyme was supported by an enhanced glucuronidation activity for characteristic UGT2B17 substrates vorinostat (SAHA), testosterone (Testo), dihydrotestosterone (DHT), and estradiol (E₂) by 1.6 to 1.7-fold ($P < 0.05$), compared to control cells levels (**Fig. 1B-D**). In the JVM2-2B17 model, a 2.5-fold enhanced mRNA expression and 2.2-fold higher protein levels were observed with a corresponding 2.1 to 2.5-fold enhanced UGT2B17 activity ($P < 0.05$) (**Fig. 1B-D**). Consistent with the unfavorable prognostic significance of UGT2B17 expression in CLL patients (above), (8, 9) high UGT2B17 expression was associated with enhanced proliferation by 1.7 ($P < 0.05$) and 2.0-fold ($P < 0.01$) for MEC1 and JVM2, respectively (**Fig. 1E, F**). A significantly shorter doubling time for high UGT2B17 expressing cells was evidenced in cell lines by cell counts, MTS assays and CFSE labeling (**Fig. 1E-I**). No significant difference in cell viability was noted by Annexin V/PI and trypan blue exclusion assays when cells were grown in either basal or serum starvation conditions (data not shown). Robustness of cellular phenotypes was measured periodically for several months to confirm stability of UGT2B17 cell models.

UGT2B17 modulates expression of genes related to prostanoids in cell models and leukemic cells from patients

RNA sequencing revealed a strong effect of elevated UGT2B17 on global gene expression. A total of 5474 and 2880 genes were differentially expressed in MEC1-2B17 and JVM2-2B17 cells respectively, when compared to control cells ($FDR < 0.05$) (**Fig. 2A**). Of those, 683 modulated genes were concordant between models, among which 272 had an absolute fold-change (FC) greater than 1.3 ($FDR < 0.05$) in UGT2B17 overexpressing cells (**Table S3**). Pathway analyses using the Reactome and KEGG databases revealed biological

pathways overrepresented among common modulated genes such as cell adhesion, chemokine signaling, antigen processing, translation, apoptosis, antigen-receptor signaling as well as steroid and lipid signaling pathways (**Fig. 2B**). The latter was well represented with 54 genes connected to the metabolism and biosynthesis of lipids or eicosanoids (prostanoids and leukotrienes) significantly modified by UGT2B17 (**Table S4**). This is plausible given that several bioactive lipids are glucuronidated by the UGT pathway (30). This set of genes was selected for further investigation. Genes involved in arachidonic acid metabolism such as *FADS1*, *FADS2* and *ACSL4* were significantly down-regulated in both cell models (**Fig. 2C-D, Table S4**). The leukotriene biosynthesis genes *ALOX5* and *LTA4H* as well as genes from prostaglandin-related pathways were also differentially expressed. This included lower expression of the genes encoding the prostaglandin (PG) E receptors *PTGER2* and *PTGER4*, higher expression of the PG-inactivating enzyme *PTGR2*, as well as decreased expression of the prostanoid biosynthesis enzymes *PTGES2* and *CBR1*. Quantitative PCR confirmed these observations (**Fig. 2E**). Their clinical relevance was supported by the altered expression of these genes in CLL patients expressing high levels of *UGT2B17* in a cohort of 448 cases (GSE13159) dichotomized on the basis of median *UGT2B17* expression (**Fig. 2E**). Notably, genes of the PG biosynthesis pathway and PG receptors were significantly down-regulated in CLL patients with high *UGT2B17* expression (**Fig. 2E**). Also, the expression of genes coding for membrane transporters known to mediate PG influx such as *SLCO3A1* and *SLCO4A1* was reduced in CLL patients with high *UGT2B17*, while the PG efflux transporter gene *ABCC4* was enhanced (not shown). Pathway enrichment analysis of genes commonly altered in both MEC1 and JVM2 further revealed that response to PGE₂ was a significantly enriched pathway (FDR = 0.032). According to these observations coherent for CLL patients and cell models, the effect of PGE₂ on B-cell phenotypes and the influence of UGT2B17 expression were investigated further.

PGE₂ increases cell death and inhibits migration of primary CLL patient cells

PBMCs from 15 CLL patients were analyzed following treatment with PGE₂ for potential differences in cell death, activation and migration by flow cytometry. Sample purity was assessed by analysis of CD5, CD19 and CD45 expression. A trend towards increased cell death was observed for primary CLL cells treated for 24 hours with 5 μM PGE₂ ($P = 0.067$).

By 48 hours of treatment, cell death was significantly enhanced by PGE₂ ($P = 0.0007$), suggesting that PGE₂ promotes cell death of CLL cells (**Fig. 3A**). CLL cells showed a trend for inhibition of CXCL12-directed migration by 5 μ M PGE₂ when compared to cells treated only with CXCL12 (**Fig. 3B**; $P = 0.102$). PGE₂ did not alter the activation of PBMCs triggered by IgM stimulation, which was assessed with CD80 and pERK markers (**Fig. 3C, D**). Based on these data, potential anti-oncogenic effects of PGE₂ and possible interactions with UGT2B17 were investigated further using *in vitro* cell models of B-cell malignancies.

High UGT2B17 expression hinders PGE₂-mediated growth inhibition in cell models

MEC1 cells treated with PGE₂ or with synthetic agonists of the PGE₂ receptors EP₂ (butaprost) or EP₄ (PGE₁-OH) showed considerable growth inhibition (**Fig. 4A**). MEC1 cells exposed to increasing physiologically relevant concentrations of PGE₂ (1 to 20 μ M) further supported a repressive effect of PGE₂ on B-cell growth, with an inhibition profile significantly different for MEC1-2B17 compared to control cells (**Fig. 4B**). High UGT2B17 significantly decreased the responsiveness of B-cells to PGE₂, evidenced by a 1.5-fold higher half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 12.4 μ M *vs.* 8.2 μ M for high *vs.* low expressing cells ($P = 0.0006$). We then tested the effects of other PGs. In these experiments, the level of UGT2B17 expression affected the inhibitory effect of PGE₂ by up to 33% ($P \leq 0.022$) but not of the other PGs (**Fig. 4C, D**).

UGT2B17 inactivates PGE₂ and other related PGs

PGs share a lipid backbone and comprise several functional groups (hydroxyl and carboxyl groups) that may be susceptible to conjugation with GlcA by the UGT pathway (**Fig. 5A**). Amongst all 19 human UGT enzymes, UGT2B17 largely predominates in human leukemic B-cells, although with significant variability ($CV_{UGT2B17} = 242.9\%$; $n = 291$ CLL patients) (**Fig. 5B**). We investigated the possibility that PGE₂ may be a substrate of UGT2B17. The initial series of experiments revealed the formation of two glucuronide (G) derivatives (PGE₂-G1 and PGE₂-G2) detected by MS in MRM mode, upon incubations of PGE₂ with MEC1-2B17 microsomes (**Fig. 5C**). The patterns of fragmentation of individual glucuronides were consistent with the loss of the GlcA moiety (molecular mass of 176) (**Fig. 5C**) and support UGT2B17 targeting two of the functional groups on the PGE₂ molecule. Enzymatic assays with PGE₂ further established that primary CLL samples and cell lines

expressing high *UGT2B17* levels produced significant amounts of PGE₂-G1 and PGE₂-G2 derivatives whereas they were not detected in those expressing low *UGT2B17* levels in CLL patients (**Fig. 5D**).

Discussion

CLL is a chronic disease characterized by a high degree of heterogeneity, with complex clonal dynamics resulting in an imbalance between B-cell proliferation and death that favors an accumulation of leukemic cells during progressive disease (5). We demonstrated that high UGT2B17 expression is associated with adverse outcome in a cohort of 291 CLL patients, consistent with two independent previous reports (8, 9). UGT2B17 is the only appreciably expressed UGT in CLL cells, although heterogeneously expressed. Our work revealed that high UGT2B17 expression confers a growth advantage to malignant B-cells that is mediated, at least in part, through significant changes in gene expression in PGE₂-related pathways and its inactivation by the UGT2B17 enzyme. This enhanced proliferation rate results in a significantly larger B-cell population only after several days in culture, consistent with the slow rate of B-cell accumulation in CLL. PGE₂ emerges as a potential regulator of B-cell growth and apoptosis, a notion supported by previous reports in mouse models and in human B cells (31-36). Similarly, our analysis of primary cells from CLL patients exposed to physiological concentrations of PGE₂ revealed an enhanced cell death after 48h and a slight inhibition of CXCL12-mediated migration. Furthermore, in CLL patients' samples expressing high UGT2B17 levels, we also observed PGE₂ inactivation but not in those with low UGT2B17 levels. One mechanism by which UGT2B17 may modify cancer cell behaviour may be through inactivation of PGE₂, thereby altering homeostatic levels of PGE₂ and gene expression related to PGE₂ synthesis, transport and action.

PGE₂ is a key lipid hormone-like signaling molecule of the eicosanoid family, and plays important roles in disease-associated inflammation and normal physiological functions (37). PGE₂ is produced from a cascade of enzymatic modifications to arachidonic acid (**Fig. 5**), a polyunsaturated fatty acid esterified in cell membrane phospholipids and a previously reported substrate of UGT2B7 (not expressed in B-cells) leading to its inactivation in the liver (38). Two PGE₂ glucuronide derivatives were produced by UGT2B17 in leukemic cells, consistent with the conjugation of hydroxyl groups that corresponds to the preferred substrate moieties of the enzyme (39), whereas the hepatic UGT2B7 enzyme may preferentially target the carboxyl group (40). Analysis of PGE₂-G by nuclear magnetic resonance will be required to confirm this reasoning.

PGE₂ displays tumor suppressor functions in B-cells and other immune cells by impairing BCR activation and cell proliferation, as well as by triggering cell death (31, 35). PGE₂ signals through different types of E-series PG receptors (EPs), namely EP₁, EP₂, EP₃, and EP₄ (41). Past studies in murine cells have demonstrated inhibition of B-cell activation by PGE₂ through binding and activation of EP₂ and EP₄ (31, 32, 36, 42). EP₄ was shown to be a negative feedback regulator of B-cell activation via the BCR signaling cascade, which is an integral pathway in CLL (31). Our findings that PGE₂ receptor agonists mimicked the growth-inhibition induced by PGE₂ support a receptor-mediated mechanism of action in human neoplastic B-cells. The expression of genes related to PGE₂ signaling, including the EP receptors, was reduced in CLL patient cells and B-cell models with high UGT2B17 expression, likely further disrupting PGE₂ homeostasis. The mechanism by which UGT2B17 modulates PGE₂-related gene expression remains to be addressed, but likely involves regulatory PGE₂ feedback loops. Together, this altered expression profile combined with the direct PGE₂ deactivation by UGT2B17 support the notion that CLL cells with high UGT2B17 are less responsive to PGE₂, thus conferring a proliferative advantage that could influence CLL disease course.

Our results provide a first potential mechanism for understanding the role UGT2B17 in CLL by circumventing the actions of endogenous signalling factors such as PGE₂. This study does have limitations, namely the use of two cell models imperfectly representing CLL, the variability in CLL sample purity and limited number of available patients to investigate the correlation between UGT2B17 expression levels and PGE₂ response in detail. UGT2B17-dependent glucuronidation of additional endogenous effectors remain to be identified and may contribute to divergent expression profiles and phenotypes reported here for low and high UGT2B17 expressing B-cells.

In conclusion, our findings imply a relevant anti-oncogenic function of PGE₂ in CLL cells that is blocked by high UGT2B17 expression, through a direct metabolic inactivation of PGE₂ and altered PGE₂-related gene expression leading to PGE₂ unresponsiveness.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

EA, LV, PC and VT performed the experiments. EA, MR, LV, EL and CG analyzed the data. EA performed bioinformatics analyses. EA, MR, EL and CG designed the research. TL and KV provided patient samples, collected clinical data and revised the manuscript. EA, MR and CG wrote the manuscript.

Funding

The Cancer Research Society, the Leukemia and Lymphoma Society of Canada, the Canadian Institutes of Health Research (FRN-152986), and the Canada Research Chair in Pharmacogenomics financially supported this study.

Acknowledgements

The authors wish to thank Alexandre Brunet, Andréa Fournier, Nathalie Paquet and Sylvie Desjardins for excellent technical assistance. We acknowledge Calcul Québec and Compute Canada for the use of the MUGQIC pipelines, developed by the bio-informatics team of the Centre d'innovation Génome Québec and McGill University. These pipelines, installed on the Colosse supercomputer at Laval University, are under the shared responsibility of the teams of Calcul Québec and Arnaud Droit at Laval University. The Colosse supercomputer is managed by Calcul Québec and Compute Canada. The operation of the Colosse supercomputer was funded by the Canada Foundation for Innovation, the ministère de l'Économie, de la science et de l'innovation du Québec and the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies. EPA has received scholarships from Université Laval foundation - Leadership and sustainable development award, and CHU de Québec foundation - Fernand Labrie excellence award. EL is recipient of the CIHR phase II clinician-scientist award. CG holds a Canada Research Chair in Pharmacogenomics.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* (2016) 66:7-30. doi: 10.3322/caac.21332.
2. Schimmer AD, Munk-Pedersen I, Minden MD, Reed JC. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol.* (2003) 4:211-8.
3. Burger JA, Landau DA, Taylor-Weiner A, Bozic I, Zhang H, Sarosiek K, et al. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat Commun.* (2016) 7:11589. doi: 10.1038/ncomms11589.
4. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, Benner A, Leupolt E, Winkler D, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica.* (2007) 92:1242-5.
5. Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* (2007) 20:399-413. doi: 10.1016/j.beha.2007.03.007.
6. 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) 115:755-64. doi: 10.1172/JCI23409.
7. Burger JA, O'Brien S. Evolution of CLL treatment - from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* (2018) 15:510-27. doi: 10.1038/s41571-018-0037-8.
8. Bhoi S, Baliakas P, Cortese D, Mattsson M, Engvall M, Smedby KE, et al. UGT2B17 expression: a novel prognostic marker within IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica.* (2016) 101:e63-5. doi: 10.3324/haematol.2015.136440.
9. Gruber M, Bellemare J, Hoermann G, Gleiss A, Porpaczy E, Bilban M, et al. Overexpression of uridine diphospho glucuronosyltransferase 2B17 in high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* (2013) 121:1175-83. doi: 10.1182/blood-2012-08-447359.

10. Guillemette C, Levesque E, Harvey M, Bellemare J, Menard V. UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab Rev.* (2010) 42:24-44. doi: 10.3109/03602530903210682.
11. Guillemette C, Levesque E, Rouleau M. Pharmacogenomics of human uridine diphospho-glucuronosyltransferases and clinical implications. *Clin Pharmacol Ther.* (2014) 96:324-39. doi: 10.1038/clpt.2014.126.
12. Girard H, Court MH, Bernard O, Fortier LC, Villeneuve L, Hao Q, et al. Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics.* (2004) 14:501-15.
13. Levesque E, Beaulieu M, Green MD, Tephly TR, Belanger A, Hum DW. Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene. *Pharmacogenetics.* (1997) 7:317-25.
14. Lepine J, Bernard O, Plante M, Tetu B, Pelletier G, Labrie F, et al. Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* (2004) 89:5222-32. doi: 10.1210/jc.2004-0331.
15. Ramsay AJ, Martinez-Trillos A, Jares P, Rodriguez D, Kwarciak A, Quesada V. Next-generation sequencing reveals the secrets of the chronic lymphocytic leukemia genome. *Clin Transl Oncol.* (2013) 15:3-8. doi: 10.1007/s12094-012-0922-z.
16. Zhang J, Baran J, Cros A, Guberman JM, Haider S, Hsu J, et al. International Cancer Genome Consortium Data Portal--a one-stop shop for cancer genomics data. *Database (Oxford).* (2011) 2011:bar026. doi: 10.1093/database/bar026.
17. Kohlmann A, Kipps TJ, Rassenti LZ, Downing JR, Shurtleff SA, Mills KI, et al. An international standardization programme towards the application of gene expression profiling in routine leukaemia diagnostics: the Microarray Innovations in LEukemia study prephase. *Br J Haematol.* (2008) 142:802-7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07261.x.

18. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* (2014) 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
19. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* (2010) 26:139-40. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
20. Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J. g:Profiler--a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res.* (2007) 35:W193-200. doi: 10.1093/nar/gkm226.
21. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, et al. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* (2018) 46:D649-D55. doi: 10.1093/nar/gkx1132.
22. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* (2017) 45:D353-D61. doi: 10.1093/nar/gkw1092.
23. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* (2016) 44:D457-62. doi: 10.1093/nar/gkv1070.
24. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* (2000) 28:27-30.
25. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* (2003) 13:2498-504. doi: 10.1101/gr.1239303.
26. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* (2001) 29:e45.
27. Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics.* (2000) 2:143-7. doi: 10.1152/physiolgenomics.2000.2.3.143.

28. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* (2009) 55:611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
29. Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, et al. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol.* (2010) 11:74. doi: 10.1186/1471-2199-11-74.
30. Turgeon D, Chouinard S, Belanger P, Picard S, Labbe JF, Borgeat P, et al. Glucuronidation of arachidonic and linoleic acid metabolites by human UDP-glucuronosyltransferases. *J Lipid Res.* (2003) 44:1182-91. doi: 10.1194/jlr.M300010-JLR200.
31. Murn J, Alibert O, Wu N, Tendil S, Gidrol X. Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *J Exp Med.* (2008) 205:3091-103. doi: 10.1084/jem.20081163.
32. Prijatelj M, Celhar T, Gobec M, Mlinaric-Rascan I. EP4 receptor signalling in immature B cells involves cAMP and NF-kappaB dependent pathways. *J Pharm Pharmacol.* (2012) 64:1090-8. doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01499.x.
33. Roper RL, Graf B, Phipps RP. Prostaglandin E2 and cAMP promote B lymphocyte class switching to IgG1. *Immunol Lett.* (2002) 84:191-8.
34. Roper RL, Phipps RP. Prostaglandin E2 and cAMP inhibit B lymphocyte activation and simultaneously promote IgE and IgG1 synthesis. *J Immunol.* (1992) 149:2984-91.
35. Simkin NJ, Jelinek DF, Lipsky PE. Inhibition of human B cell responsiveness by prostaglandin E2. *J Immunol.* (1987) 138:1074-81.
36. Prijatelj M, Celhar T, Mlinaric-Rascan I. Prostaglandin EP4 receptor enhances BCR-induced apoptosis of immature B cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2011) 95:19-26. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2011.04.001.
37. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* (2001) 294:1871-5. doi: 10.1126/science.294.5548.1871.

38. Little JM, Kurkela M, Sonka J, Jantti S, Ketola R, Bratton S, et al. Glucuronidation of oxidized fatty acids and prostaglandins B1 and E2 by human hepatic and recombinant UDP-glucuronosyltransferases. *J Lipid Res.* (2004) 45:1694-703. doi: 10.1194/jlr.M400103-JLR200.
39. Beaulieu M, Levesque E, Hum DW, Belanger A. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a human UDP-glucuronosyltransferase active on C19 steroids. *J Biol Chem.* (1996) 271:22855-62.
40. Sakaguchi K, Green M, Stock N, Reger TS, Zunic J, King C. Glucuronidation of carboxylic acid containing compounds by UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Arch Biochem Biophys.* (2004) 424:219-25. doi: 10.1016/j.abb.2004.02.004.
41. Bhattacharya M, Peri K, Ribeiro-da-Silva A, Almazan G, Shichi H, Hou X, et al. Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J Biol Chem.* (1999) 274:15719-24.
42. Fedyk ER, Ripper JM, Brown DM, Phipps RP. A molecular analysis of PGE receptor (EP) expression on normal and transformed B lymphocytes: coexpression of EP1, EP2, EP3beta and EP4. *Mol Immunol.* (1996) 33:33-45.

Figures and Figure legends

Fig. 1: UGT2B17 confers a proliferative advantage to leukemic cells.

A High *UGT2B17* levels are significantly associated with reduced overall survival of CLL patients. Kaplan Meier plot represents survival of 291 CLL patients of the ICGC cohort, dichotomized according to the median expression of *UGT2B17*. **B-D** The malignant B-cell models MEC1 and JVM2 stably expressing low (CTRL) or high UGT2B17 (2B17) levels, as characterized **B** at the mRNA level by qPCR, **C** at the protein level by immunoblotting of the microsomal fraction with a UGT2B-specific antibody; and **D** by measuring the glucuronidation activity in cell homogenates using the UGT2B17 substrates vorinostat (SAHA), testosterone (Testo), dihydrotestosterone (DHT) and estradiol (E₂). Calnexin was used as a protein loading control in C. **(E-F)** High UGT2B17 expression enhances the proliferation rate of **E** MEC1 and **F** JVM2 neoplastic cells. Viable cell count was determined every 24 hours for 7 days. Doubling times (DT) were calculated from the exponential growth phase (96-144 h). MTS assays of **G** MEC1 and **H** JVM2 cells also indicated increased proliferation of UGT2B17 overexpressing cells. **I** representative graphic showing cytometry data of CFSE labeling in MEC1 72 hours after plating. CFSE-low cells represent the fraction of cells having undergone at least one cell division. Data represent mean \pm SEM of three independent experiments. Cellular phenotypes associated with high UGT2B17 were reproducibly observed over time, attesting of the stability of cell models. *, $P < 0.05$ **, $P < 0.01$. Comparisons without reported P-value are nonsignificant.

Fig. 2: UGT2B17 alters the gene expression profile of lymphoid cells.

A Genes significantly differentially expressed in MEC1 and JVM2 leukemic cells with high UGT2B17 expression *vs.* controls (false discovery rate (FDR) < 0.05) are represented in the Venn diagram, with 683 genes showing overlapping and concordant changes in both cell lines. Differential expression was established by DEseq2 and EdgeR analyses of gene expression profiles in each cell model determined by RNA sequencing (GSE121626). **B** Pathway enrichment analysis of the 683 differentially expressed genes common to both MEC1 and JVM2 models based on the Reactome, KEGG and GO biological process databases. **C, D** Volcano plot overviews of genes differentially expressed in high UGT2B17 *vs.* control MEC1 and JVM2 cells. Blue data points represent significantly (FDR<0.05) and differentially expressed genes (fold change (FC) >1.3). Several genes related to eicosanoid biosynthesis and signaling are highlighted. **E left:** Differential expression of genes related to prostaglandin (PG) biosynthesis and signaling in UGT2B17-high *vs.* control MEC1 and JVM2 cells, and in B-cells of CLL patients (n=448, GSE13159) dichotomized into high *vs.* low *UGT2B17* expression subsets based on median expression level. Gene sets included are shown as defined in the Reactome pathway database. *Right:* RT-qPCR validation of altered expression in selected genes related to PGE₂. Data represents mean ± SEM of three independent experiments.

Fig. 3: CLL patient cells are sensitive to PGE₂

A Cell death of CLL patient PBMCs (n = 12) induced by PGE₂ (5 μM). **B** Influence of PGE₂ (5 μM) on CXCL12-induced migration of CLL patient PBMCs (n = 9). Migration assays were conducted 24 hours after treatment with PGE₂. **C, D** Influence of PGE₂ (5 μM) on the activation of CLL PBMCs (n = 9) with F(ab')₂ anti-human IgM. Activation was assessed by mean fluorescence intensity (MFI) of pERK **C** 15 minutes after stimulations and **D** by CD80 expression 24-hour post-treatment. Stimulated cells were primed with PMA 1 hour prior to addition of anti-human IgM. LPS was used as a positive control. Purity of CLL fraction was 70% on average, as determined by CD5, CD19 and CD45 expression. In D, E, F, data represent means ± SEM of patient samples. Statistics were calculated using a paired-sample T-test. Comparisons without reported P-value are nonsignificant (n.s).

Fig. 4: UGT2B17 impedes PGE₂-mediated inhibition of neoplastic cell growth.

A Influence of prostaglandin E₂ (PGE₂) and the EP receptor agonists PGE₁-OH and Butaprost (Buta) on MEC1 cell growth. Cells were counted 120 hours after initiation of treatment with vehicle (Veh) or 10 μM of each compound. **B** PGE₂ IC₅₀ was determined in MEC1 cell models by fitting a non-linear curve to normalized response data and comparing the best-fit parameters with the sum of squares F test. **C-D** Influence of prostaglandins (5 μM) on **C** MEC1 and **D** JVM2 cell growth relative to vehicle-treated cells, 120 hours post-treatment. Data represent mean ± SEM of three independent experiments, each with three technical replicates; *, $P < 0.05$ **, $P < 0.01$. All other data were nonsignificant (n.s.).

Fig. 5: Glucuronidation of PGE₂ by UGT2B17 and CLL patient cells

A The prostaglandin biosynthetic pathway. Functional groups on arachidonic acid and related molecules with a potential for glucuronidation are grey-shadowed. PLA2, phospholipase A2; COX-1/-2, cyclooxygenase -1 and -2. **B** *UGT2B17* is the predominant UGT gene expressed in CLL PBMCs, based on data from the ICGC CLL cohort. **C** *Top*, Mass spectrometry analysis of PGE₂-glucuronides (-G) produced by MEC1-2B17 cell homogenates. Elution profiles indicate the formation of two glucuronidated products (PGE₂-G1 and PGE₂-G2). The deprotonated PGE₂ glucuronide ([M+G-H]⁻) mass (527.2 Da) is consistent with the masses of PGE₂ (352.4 Da) and glucuronic acid (GlcA; 176 Da). *Bottom*, The MS/MS fragmentation pattern of each eluted molecule confirms the identity of PGE₂-glucuronides with mass/charge (m/z) ratios of fragments specific to PGE₂ glucuronides, including [M+G-H]⁻, PGE₂ [M-H]⁻ and the glucuronide moieties, such as [G-H]⁻ and [G-H-CO₂-H₂O]⁻. **D** LC-MS/MS quantification of PGE₂ glucuronides formed by PBMC cell homogenates of CLL patient cells and lymphoid cell lines engineered to overexpress UGT2B17. Cells with high (n=3) *UGT2B17* expression efficiently produced the two PGE₂ glucuronides but not those with low expression (n=2). MEC1-2B17 and JVM2-2B17 cells efficiently conjugating PGE₂ served as positive controls. Data represents mean ± SEM of at least two assays.

Figure 1

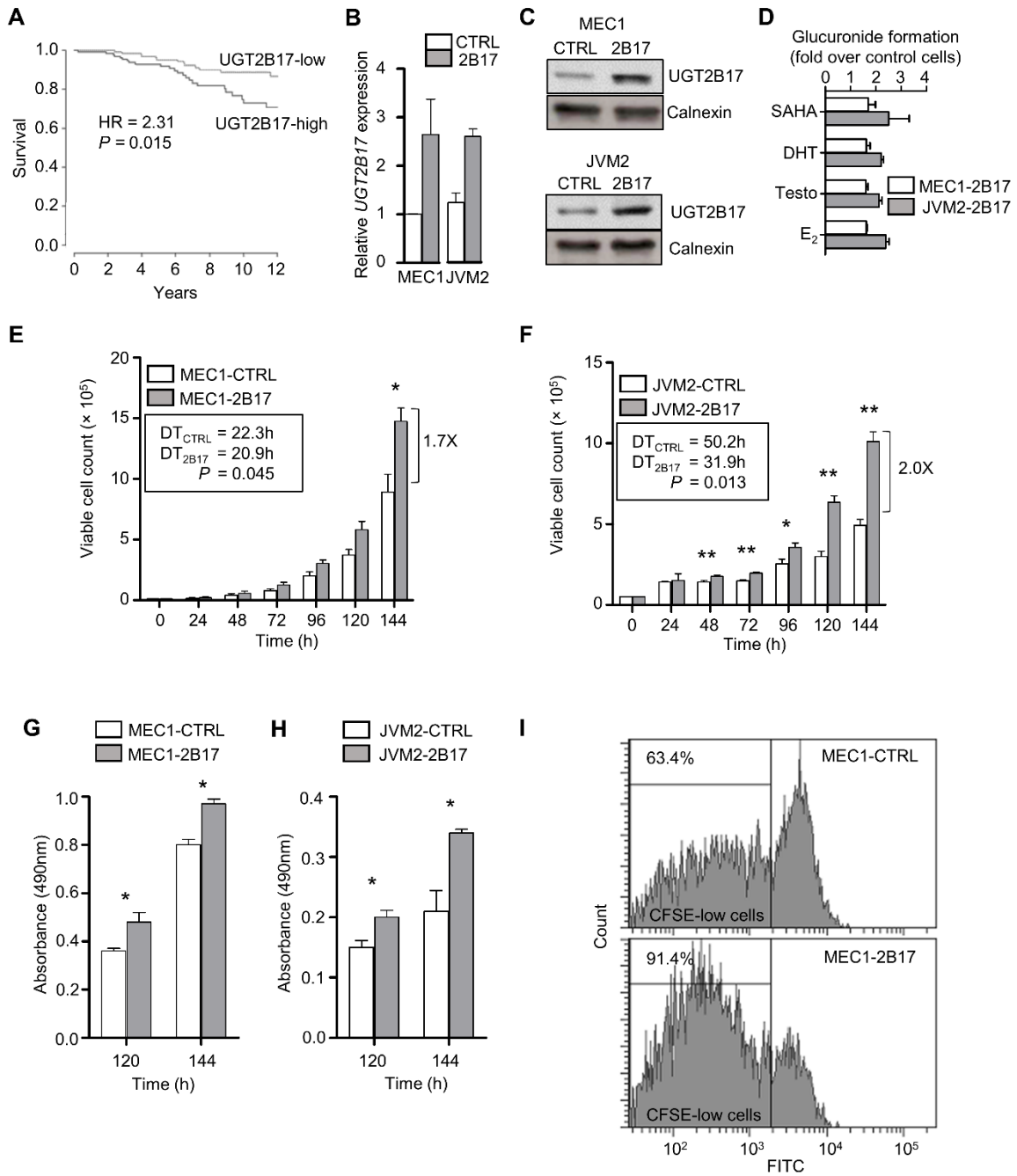


Figure 2

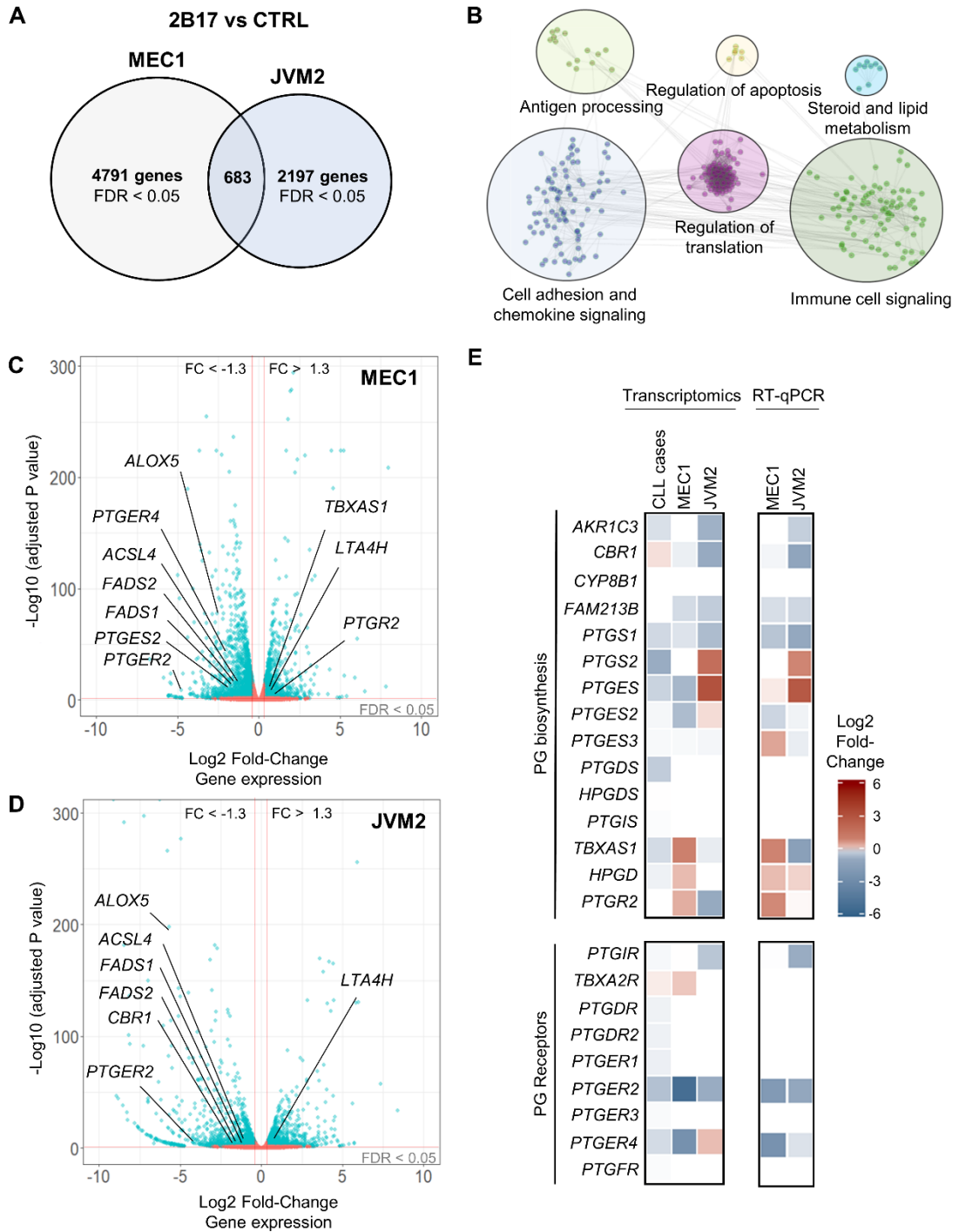


Figure 3

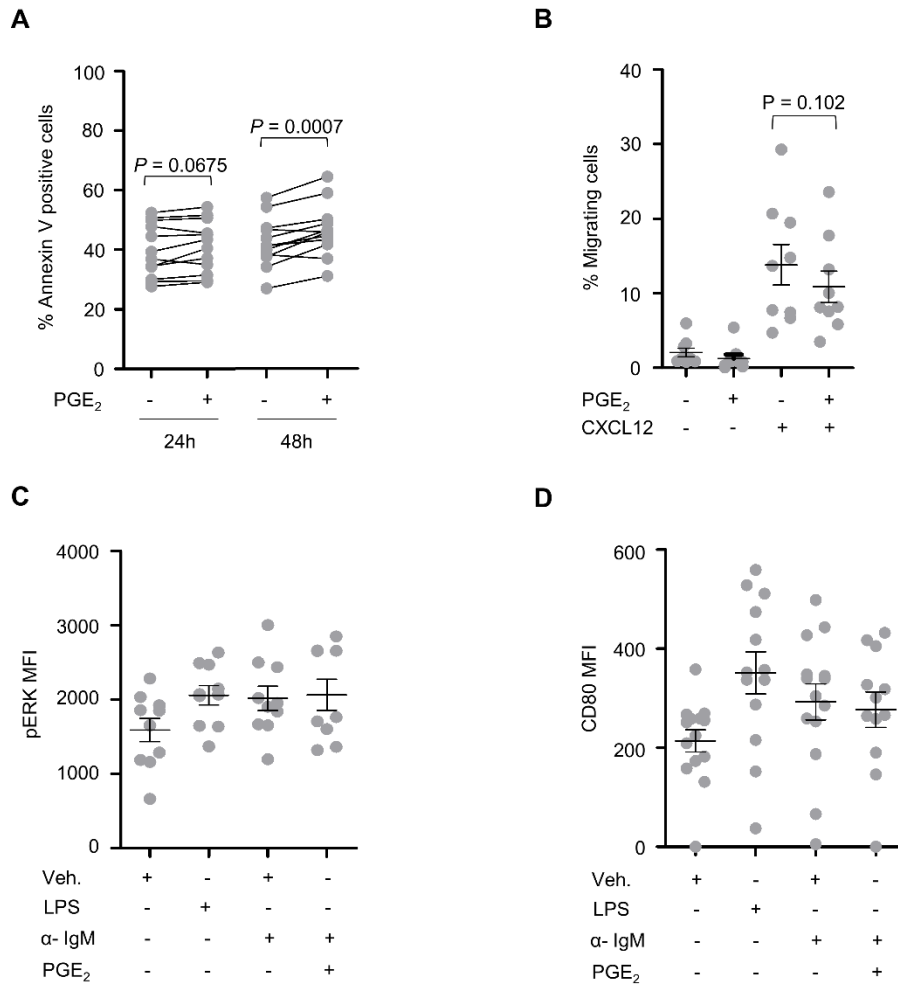


Figure 4

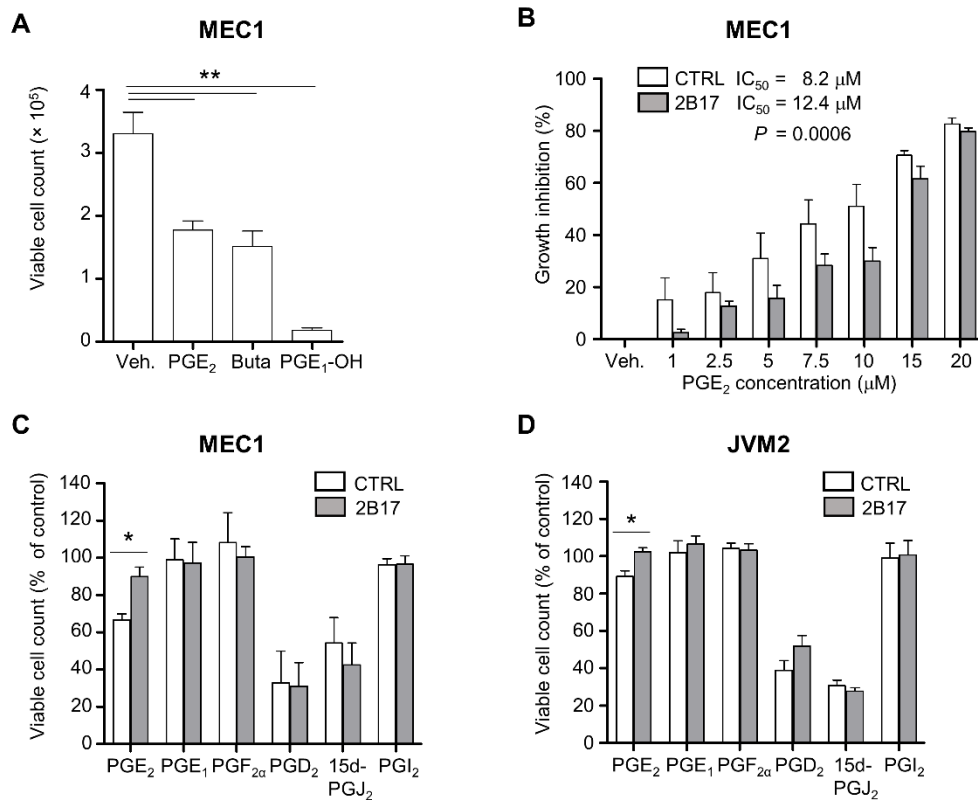


Figure 5

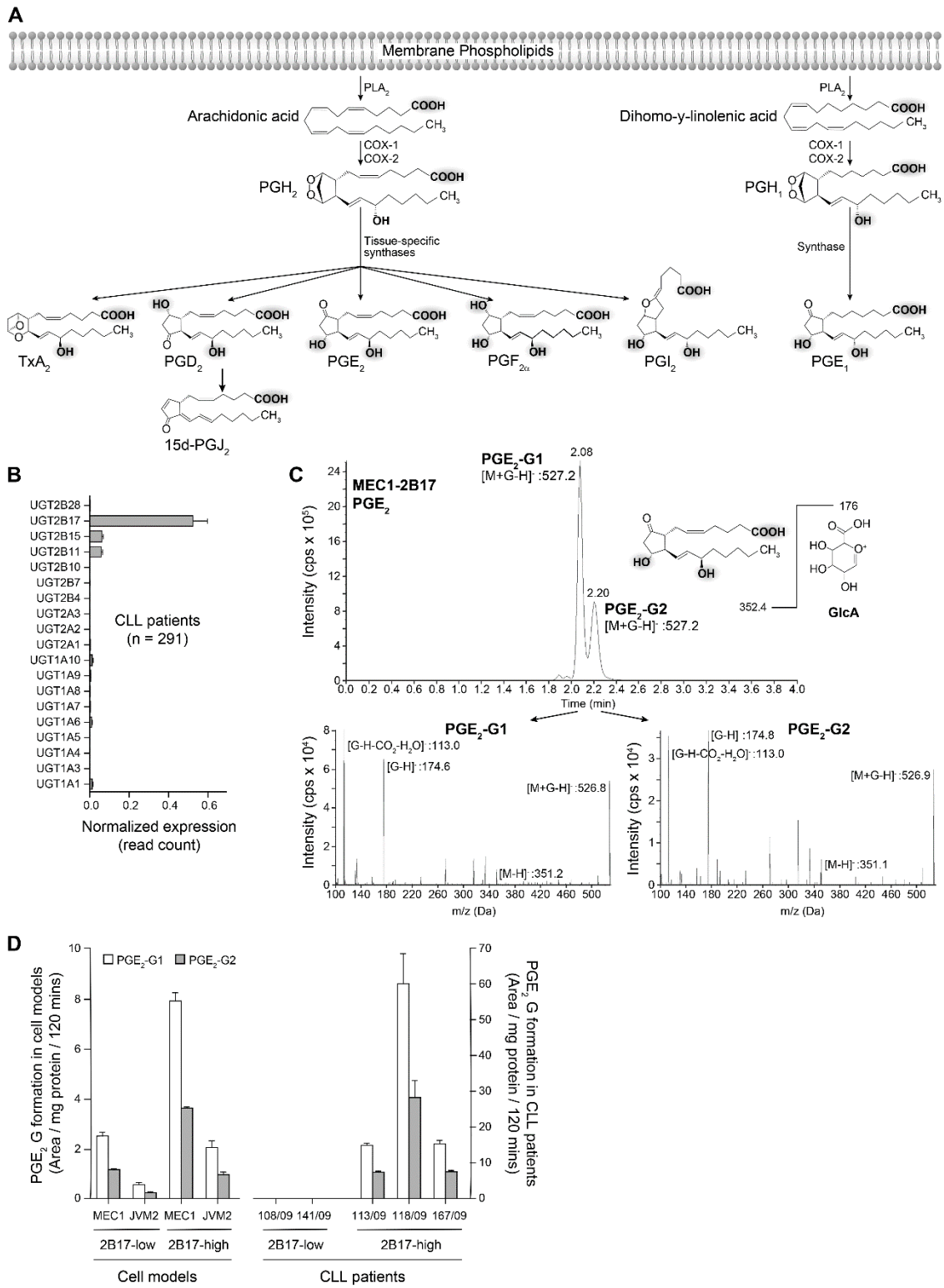


Table S1: CLL patient features

Feature	N (%)
Age (Median)	63.5 years
Sex	
Male	12 (80)
Female	3 (20)
Binet B/C	2 (13)
Cytogenetics	
IGHV UM	7 (47)
Del 13q	5 (33)
Del 11q	1 (6)
Del 17p	0 (0)

Chapitre 3 : « UGT2B17 modifies drug response in chronic lymphocytic leukemia »

Résumé

Chez les patients LLC, l'expression d'UGT2B17 est induite suite au traitement avec un régime à base de fludarabine et est associée à une réponse clinique réduite. Dans les modèles cellulaires, nous avons établi le rôle d'UGT2B17 dans l'inactivation de certains médicaments utilisés en LLC et une sensibilité réduite des cellules lymphoïdes en présence de la surexpression d'UGT2B17. Certains de ces composés sont des substrats de l'enzyme suggérant un mécanisme direct d'inactivation au niveau de la cellule leucémique pouvant influencer la réponse locale au médicament. Toutefois, d'autres mécanismes sont en jeu puisque d'autres médicaments dont l'efficacité varie en fonction de l'expression d'UGT2B17, ne sont pas des substrats de cette enzyme. L'expression du gène *UGT2B17* est en fait régulée par un promoteur alternatif dans les cellules B. Ces observations pourraient avoir des implications thérapeutiques et contribuer à mieux comprendre les mécanismes affectant la réponse à la thérapie.

UGT2B17 Modifies Drug Response in Chronic Lymphocytic Leukaemia

Eric P. Allain¹, Michèle Rouleau¹, Katrina Vanura², Joanie Vaillancourt¹, Vincent Bat¹, Patrick Caron¹, Lyne Villeneuve¹, Adrien Labriet¹, Véronique Turcotte¹, Trang Le², Medhat Shehata², Susanne Schnabl², Dita Demirtas², Rainer Hubmann², Charles Joly-Beauparlant³, Arnaud Droit³, Ulrich Jäger², Philipp B. Staber², Eric Lévesque⁴, Chantal Guillemette^{1,5}

¹Pharmacogenomics Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHU de Québec) Research Center and Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada.

²Division of Hematology and Hemostaseology, Department of Medicine I and Comprehensive Cancer Center, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

³CHU de Québec Research Center and Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada.

⁴CHU de Québec Research Centre, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada.

⁵Canada Research Chair in Pharmacogenomics.

Correspondence: Chantal Guillemette. CHU de Québec Research Center, R4701.5, 2705 Blvd. Laurier, Québec, Canada, G1V 4G2; Phone: (418) 654-2296; Email: chantal.guillemette@crchudequebec.ulaval.ca

Running title: UGT2B17 Modifies Drug Response in CLL

Abstract

Background: High UGT2B17 glucuronosyltransferase is associated with poor prognosis and a lack of response to fludarabine-containing regimens in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) patients. We examined whether UGT2B17, the predominant lymphoid UGT, affects leukaemic drug response and the UGT-mediated inactivation of antileukaemic agents.

Methods: Functional assays followed by mass-spectrometry analysis were used to screen potential substrates. MTS-based cytotoxicity assays and RNA sequencing were used to assess phenotype and transcriptome changes associated with high levels of UGT2B17.

Results: High UGT2B17 in B-cell models was associated with reduced sensitivity to fludarabine, ibrutinib and idelalisib. UGT2B17 expression involved a non-canonical promoter and was induced by short-term drug treatment. AMP-activated protein kinase emerges as a pathway associated with high UGT2B17 in patients and cell models whereas expression changes linked to UGT2B17 exposed nuclear factor kappa B as a key regulatory hub. UGT2B17 conjugated fludarabine, venetoclax, cerdulatinib and chlorambucil whereas UGT1A4 conjugates all nine investigated antileukaemics. Glucuronides of fludarabine and ibrutinib were detected in CLL patients on respective treatments.

Conclusions: Data imply that UGT2B17 represents a mechanism altering drug response through direct inactivation but would also involve additional mechanisms for drugs not inactivated by UGT2B17.

Background

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is the most frequent adult leukaemia in the western world. Cancer growth varies widely with indolent and aggressive forms of CLL. In recent years, there has been substantial progress in the clinical management of CLL patients supported by a better risk stratification and the introduction of a number of novel therapeutic agents.¹ These advances significantly improved clinical outcomes of CLL patients.

Pretreatment evaluation of informative prognostic markers helps the stratification of CLL patients into risk subgroups. These markers include unmutated immunoglobulin heavy chain variable region (U-IGHV), del(17p) or TP53 mutations, which are associated with poor response to treatment and predict earlier relapse after achieving initial haematological remission.² For treatment-naïve patients with these high-risk features, the Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor ibrutinib is indicated as an initial systemic therapy rather than chemoimmunotherapy.^{3,4} The latter is based on the purine analogue fludarabine, alkylating agents such as cyclophosphamide, bendamustine or chlorambucil combined to the monoclonal antibody rituximab directed against the CD20 B-cell marker.⁵ Other therapeutic small molecules include two distinct mechanisms of actions with venetoclax, a BCL-2 inhibitor,⁶ idelalisib, a phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) δ inhibitor, and duvelisib, a dual inhibitor of PI3K delta and gamma isoforms.^{7,8} Phase 3 trials are ongoing for additional agents such as the second-generation oral BTK inhibitor acalabrutinib and the Syk/Jak inhibitor cerdulatinib.^{9,10} Whilst treatment has significantly advanced patients' survival, it is also associated with incomplete clonal eradication, relapse, refractoriness or transformation to a more aggressive lymphoma (Richter's syndrome).³

Both innate and acquired resistance represent major challenges for long-term disease control and is an intense area of research. Findings reveal that targeted agents have unique mechanisms of resistance compared with chemotherapy. Genetic anomalies associated with fludarabine refractoriness include mutations in TP53, SF3B1, NOTCH1 and BIRC3 genes.^{11,12} Other genetic screens have recently identified further genes that could be implicated in fludarabine sensitivity such as ARID5B and BRAF.^{13,14} As targeted therapies agents have become more established in cancer therapy, recent reports attribute acquired hypermorphic mutations in genes of targeted pathways, including BTK and its immediate downstream

effector phospholipase C, γ 2 (PLCG2) critical for BCR signaling.¹⁵ Mechanisms of resistance to other targeted agents, so early in clinical use, have not yet been portrayed in CLL patients but work is ongoing in this area.

Additional contributing mechanisms of reduced drug sensitivity that may be shared by targeted and chemotherapy may include increased drug efflux by ATP-dependent transporters and drug inactivation by metabolizing pathways such as the glucuronidation pathway by UDP-glucuronosyltransferase enzymes (UGTs). By conjugating lipophilic drugs to glucuronic acid (GlcA), biological activity is impaired and water solubility enhanced, driving drug elimination and a lack of drug efficacy.¹⁶ Accumulating evidence support an influence of the UGT pathway to drug resistance in many cancers including in leukaemias, namely in CLL patients treated with fludarabine and acute myeloid leukaemia (AML) patients receiving ribavirin or cytarabine-based treatments.¹⁷⁻¹⁹ However, for most drugs used in CLL, the glucuronidation pathway has not been comprehensively studied. Reports have established that high UGT2B17 expression is an adverse prognostic factor, associated with shorter treatment-free survival, overall survival and CLL patients requiring more treatment.^{17, 20, 21} High UGT2B17 expression was further linked to a lack of response to fludarabine-containing regimens.¹⁷ UGT2B17 is one of the 19 functional human drug-conjugating UGT enzymes, also involved in regulating homeostasis of a number of endogenous metabolites.¹⁶

In the present study, we investigated response to antileukaemic agents namely fludarabine, ibrutinib, idelalisib, bendamustin, chlorambucil, venetoclax, acalabrutinib, cerdulatinib and duvelisib in relation to UGT2B17 expression levels. We then sought to evaluate the UGT-mediated enzymatic inactivation of drugs relevant to CLL and the possible involvement of the UGT2B17 enzyme. Our data support that high UGT2B17 expression alters drug response by direct inactivation but likely also through other mechanisms. We further evidence that the UGT pathway is involved in the inactivation of the majority of antileukaemic agents used in CLL, suggesting that this pathway may be associated with drug resistance.

Methods

Patients, primary CLL cells and cell lines

Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and plasma samples were obtained from CLL patients who were diagnosed between 1987 and 2011 at Vienna General Hospital. UGT2B17 mRNA analysis was performed for twenty patients as described,²² and plasma samples were available from two patients treated with fludarabine-containing regimens and fifteen treated with ibrutinib. MEC1, JVM2 and EHEB cells were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) or DSMZ (Braunschweig, Germany) and cells overexpressing UGT2B17 were previously described.²³ Cell culture components were all purchased from Wisent Bioproducts (Saint-Bruno, QC, Canada).

Glucuronidation assays

Glucuronidation assays were conducted using human liver, intestine and kidney microsomes (Xenotech, Kansas City, KS, USA) or supersomes expressing individual human UGT isoforms (Corning, MA, USA). In the absence of commercially available UGT2B11 supersomes, microsomal proteins derived from HEK293 expressing the recombinant UGT2B11 enzyme were used. Substrates included dihydrotestosterone (DHT) purchased from Steraloids (Newport, RI, USA), fludarabine and chlorambucil from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) and bendamustine from Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada). All other compounds were purchased from Selleckchem (Houston, TX, USA). UGT assays were incubated at 37°C for 6 hours in a final volume of 100 µL of assay buffer containing 20 µg of proteins, 0.5 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 µg/mL alamethicin, 2 mM UDP-GlcA and 0.5 µg/mL leupeptin with the indicated substrate. Samples were then stopped by adding 100 µL cold methanol, centrifuged at 16,000 × g for 10 minutes and supernatants analysed by mass spectrometry.

Mass spectrometry-based analysis of drug conjugation

The establishment of these analytical methods required the optimization of chromatographic conditions, production of glucuronide standards using pooled liver microsomes and the use of deuterated molecules as internal standards (Clearsynth, Mississauga, ON, Canada), for each drug investigated. Drug and their glucuronide (G) metabolites were measured on an API

6500 mass spectrometer (Sciex, Concord, ON, Canada), operated in multiple reactions monitoring mode and equipped with a turbo ion-spray source. Electrospray ionisation was performed in positive ion mode. The chromatographic system consisted of a Nexera (Shimadzu Scientific instruments, Inc, Columbia, MD, USA). For fludarabine, the chromatographic separation was achieved with an ACE Phenyl 3.0 μm packing material, 100 X 4.6 mm (Canadian Life Science, Peterborough, ON, Canada). The mobile phases were solvent A: water with 0.1 % formic acid (v/v) and solvent B: methanol at a flow rate of 0.9 ml/min. Metabolites were eluted using the following program: 0 – 2.0 min, isocratic 20% B; 2.0-2.1 min, linear gradient 20-65% B; 2.1 – 4.0 min, isocratic 65 % B; 4.0 – 4.1 min, linear gradient 65 – 90% B; 4.1 – 5.2 min, isocratic 90%B; 5.2 – 5.3 min, linear gradient 90 – 20% B; 5.3 – 8.5 min, isocratic 20% B. For cerdulatinib and chlorambucil G metabolites, the chromatographic separation was achieved with a Gemini C18 3.0 μm packing material, 100 X 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phases were solvent A: 1 mM ammonium formate in water and solvent B: 1 mM ammonium formate in methanol at a flow rate of 0.9 ml/min. Metabolites were eluted using the following program: 0 – 5 min, linear gradient 10-90% B; 5-5.2 min, isocratic 90% B; 5.2 – 5.3 min, linear gradient 90-10 % B; 5.3 – 8.3 min, isocratic 10% B. For the chlorambucil metabolite HP2-G, chromatographic separation was achieved with a Gemini C18 3.0 μm packing material, 100 X 4.6 mm, with mobile phases and flow rates as described above and eluted using the following program: 0 – 5 min, linear gradient 20-90% B; 5-5.2 min, isocratic 90% B; 5.2 – 5.3 min, linear gradient 90-20 % B; 5.3 – 8.3 min, isocratic 20% B. For idelalisib-G, the chromatographic separation was achieved with a Gemini C18 3.0 μm packing material, 100 X 4.6 mm using solvent A: 2 mM ammonium formate in water and solvent B: 2 mM ammonium formate in methanol at a flow rate of 0.9 ml/min. Idelalisib-G derivatives were eluted using the following program: 0 – 3 min, isocratic 60% B; 3-3.1 min, linear gradient 60-90% B; 3.1 – 4.0 min, isocratic 90% B; 4.0 – 4.1 min, linear gradient 90-60% B; 4.1 – 7.0 min, isocratic 60% B. For ibrutinib-G and duvelisib-G, the chromatographic separation was achieved with an ACE Phenyl 3.0 μm packing material, 100 X 4.6 mm (Canadian Life Science) using a mobile phase of 75% and 65% methanol respectively, with 1 mM ammonium formate in water in isocratic mode at a flow rate of 0.9 ml/min. The systems were controlled through Analyst Software, version 1.6.1 from AB Sciex.

Drug sensitivity assays

Cells were plated at 1×10^4 cells/well (MEC1) or at 5×10^4 cells/well (JVM2) in 96-well U-bottom tissue culture plates (BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada). Drugs were added at time of plating at a single dose and Aqueous One MTS viability assay reagent (Promega, Madison, WI, USA) was added 72 hours after treatment initiation. After a 4-hour incubation with reagent, cell viability was measured by reading absorbance with a TECAN infinite M1000 plate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Zurich, Switzerland) at 495 nm. Half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) were calculated by fitting variable slope non-linear curves to normalised response data from drug treatments. Assays were replicated at least three times in triplicates.

Gene expression analyses

Total RNA was extracted from MEC1, EHEB and JVM2 cells treated with fludarabine, ibrutinib or idelalisib using RNeasy plus mini spin kits (Qiagen, Toronto, ON, Canada). cDNA was generated using SuperScript IV reverse polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). UGT enzymes were measured by qPCR analysis of 10 ng of cDNA with Power SYBR green master mix (Thermo Fisher Scientific). For measures of other genes, total RNA was DNase I-treated and purified using the RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) per manufacturer's instructions and as described previously.²³ RNA sequencing experiments were performed on MEC1, EHEB and JVM2 cells treated with fludarabine (10 μ M and 50 μ M), ibrutinib (1 μ M and 5 μ M) and idelalisib (5 μ M and 10 μ M). Sequencing data was quality trimmed using Trimmomatic v0.36 and aligned to GRCh38 using HISAT2 v2.1.²⁴ Transcriptome assembly and generation of read-count matrices was performed using Ensembl GRCh38 transcriptome annotation with StringTie v1.3.4.²⁵ Differential gene expression analysis was done with the edgeR package for R v3.5.1. Isoform quantification was done using kallisto v0.44.0 with a custom GTF formatted annotation containing alternative UGT transcript information.²⁶ Sequencing data are available from the Gene Expression Omnibus (GEO) accession number GSE135030.

Public expression data from 291 CLL patients was downloaded from the International Cancer Genome Consortium (ICGC) with the project code CLLE-ES.²⁷ Public microarray data from untreated CLL patients and patients treated with fludarabine-containing regimens were

obtained from the Gene Expression Omnibus with the accession numbers GSE15490 and GSE13159. Long-read sequencing data was downloaded from the Sequence Read Archive (SRA) using the accession number SRP036136 and aligned with HISAT before visualisation. Identification of possible upstream regulators was carried out using iRegulon²⁸ for Cytoscape v3.2.1. ENCODE ChIP-seq data from samples GM12891, GM12878 and GM19099 was analysed for RELA binding within a 10kb window centered on the TSS of genes co-expressed with UGT2B17 by bootstrapping. Differential expression analysis for RNA-seq data was done using the edgeR v3.22.5, while microarray data was analysed with limma v3.36.5 and affy v1.58. AnnotationHub v2.12.1, Iranges v2.14.12 and GenomicRanges v1.32.7 were used for analysis of ChIP-seq data. Clustering and functional enrichment analyses were performed using clusterProfiler v3.8.1, coseq v1.4.0, ComplexHeatmap v1.18.1 and DESeq2 v1.20.0 packages for R v3.5.1 (<http://www.bioconductor.org>).²⁹⁻³⁶

Luciferase assays

Sequence corresponding to 2.5 kb of UGT2B17_{n2} promoter (including exon 1c) was PCR amplified from LNCaP cell line genomic DNA using Phusion DNA Polymerase (NEB, Whitby, ON, Canada) as recommended, with the following primers (annealing at 63°C): forward 5'-CTAGCAGACGCGTGAGATCCTAGTAGGAGGTTTTGGC-3' and reverse 5'-CTAGCAGCTCGAGCAAGTTCCAGATGTCCAGACTC-3'. Fragment was then digested with MluI and XhoI restriction enzymes and inserted in pGL3 basic vector (Promega) digested with the same enzymes, using the Rapid DNA Ligation Kit (Roche). Construct was verified by Sanger sequencing. MEC-1 cells were co-transfected with 9.5 µg pGL3 constructs and 0.5 µg pRL-null basic renilla (Promega) using the Neon Transfection System (Thermo Fisher scientific). Cells were then harvested, lysed and assessed for luciferase activity using the dual-luciferase reporter assay kit (Promega), as per manufacturer's instructions. Luciferase activity was calculated as the ratio of firefly luciferase to renilla activity, relative to the pGL3 control. Assays were replicated four times in triplicates.

Statistical analyses

Results from glucuronidation assays represent a minimum of two independent experiments. All other results represent at least three independent experiments. Statistics were calculated

using GraphPad Prism v5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) or R v3.5.1. P-values were calculated using Student's T-test unless otherwise indicated. Differences in gene expression were considered significant if adjusted P-values were inferior to 0.05.

Results

UGT2B17 expression in B-cells is associated with reduced sensitivity to antileukaemic drugs and is induced by short-term drug treatment.

In 20 patients exposed to fludarabine-based regimens,²² microarray data analysis (GSE15490) showed that UGT2B17 was induced shortly after treatment initiation in 6 of 11 non-responders whereas it was induced in only 2 responders out of 9. Non-responders also displayed a 7.5-fold higher basal expression of UGT2B17 than responders (P = 0.0006) (Figure 1a), with all cases showing low expression of all other UGT isoforms. This was sustained by the analysis of RNA sequencing data from 291 CLL cases indicating that UGT2B17 predominates in leukaemic cells (Figure 1b). Cells of MEC1 and JVM2 models expressing high UGT2B17 were more resistant than cells with low expression, with half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values higher by 1.5 to 4.3-fold (P < 0.013) for fludarabine and ibrutinib (MEC1 and JVM2) as well as idelalisib, chlorambucil and venetoclax (MEC1) (Table 1). As observed in CLL patients (Figure 1a), fludarabine significantly induced UGT2B17 expression in MEC1, JVM2, and EHEB cellular models (Figure 2a-c). UGT2B17 was also induced by ibrutinib and idelalisib (by 1.2 to 13.6-fold; P < 0.01) and was associated with elevated enzyme activity for DHT glucuronidation, a substrate for the UGT2B17 enzyme (1.9 to 10.5-fold; P < 0.01) (Figure 2d). The low expression of UGT1A was also perturbed by each drug treatment (Figure 2a-c). Consistent with these changes, glucuronidation activity was induced as demonstrated by increased levels of conjugate of the substrate estradiol (E2) (Figure 2d). In the same line, fludarabine, ibrutinib and idelalisib increased fludarabine glucuronidation (Figure 2e). As observed in CLL patients (Figure 1b) comparative analysis of relative UGT expression levels further indicated a predominance of UGT2B17 (Figure 2f). A more detailed assessment of the isoforms expressed identified UGT1A6 as the most abundant UGT1A isoform (Supplementary Figure S1).

Transcriptional changes associated with high UGT2B17 in CLL patients and cell models

To gain insights into the cellular pathways associated with high UGT2B17 expression, we initially established a transcriptional signature associated with elevated UGT2B17 expression in 448 untreated CLL samples (Figure 3a). This signature was then examined in cell models expressing high levels of UGT2B17 as well as in drug-treated cells in which UGT2B17 expression was induced. First, clustering revealed transcriptomic changes associated with elevated UGT2B17 expression in untreated CLL patients that resembled those found in overexpression models (Figure 3b). K-means clustering of gene expression data designated two clusters with globally up-regulated (cluster 2) or down-regulated (cluster 3) gene expression across all samples, suggesting that these clusters encompass changes connected to UGT2B17 levels rather than those produced by drugs. Cluster 2 contained the UGT2B17 gene whereas several genes of the AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway were significantly enriched in cluster 3 (Supplementary Table S1), and further validated by quantitative PCR (Figure 3b,c).

A second series of analysis focused on drug-related signatures. We observed that kinase inhibitor-treated cells clustered together whereas fludarabine-treated cells had a distinct expression profile, likely owing to different mechanisms of action (Figure 3b). An upstream analysis for causal interpretation of the expression changes associated with UGT2B17 exposed an enrichment of nuclear factor kappa B (NF- κ B) binding targets (Supplementary Table S2). The analysis of NF- κ B ChIP-seq data (GM12891, GM12878 and GM19099) derived from tumour necrosis factor alpha (TNF- α) treated B-cells further confirmed NF- κ B as a key regulatory ‘hub point’.

An analysis of the UGT2B17 transcriptomes of CLL patients and leukaemic cell models revealed that the enzyme is largely expressed from alternative transcripts rather than the canonical v1 transcript (Figure 3d, e). These alternative transcripts named UGT2B17_n2, n3 and n4 encode the UGT2B17 enzyme and are comprised of additional alternative exons that extend the 5' untranslated region (Figure 3e). Sanger sequencing of RT-PCR amplicons sustained this observation. Long read sequencing data using PacBio SMRT technology confirmed the expression of alternative UGT2B17_n2 in the GM12891 lymphoid cell line. The functionality of the regulatory sequences upstream of the novel exon 1c (P3) and exon 1b (P2) were evidenced in luciferase assays (Figure 3f). Compared to the low expression

derived from the canonical UGT2B17 promoter P1 (1.3-fold), P2 and P3 enhanced luciferase gene expression by 2.5 and 16.3-fold, respectively, in MEC1 cells (Figure 3f).

Antileukaemic drugs are conjugated to GlcA in CLL-treated patients by UGT2B17 and UGT1A4.

Our observations in CLL patients treated with fludarabine raised the possibility that UGT2B17 may be involved in the glucuronidation of the drug itself, and potentially also of B-cell receptor inhibitors ibrutinib and idelalisib, which contain functional hydroxyl and amino groups susceptible for conjugation into inactive glucuronides (G). Glucuronidation assays using pooled human liver microsomes enriched in UGT enzymes led to the formation of polar G derivatives confirmed by their fragmentation patterns assessed by mass spectrometry (MS), namely a loss of the GlcA moiety corresponding to a m/z shift of 176 Da (Figure 4a). Fludarabine was conjugated into two glucuronides G1 and G2, named according to their chromatographic resolution (Figure 4a). Additional confirmation was achieved by the disappearance of G1 and G2 upon β -glucuronidase hydrolysis (Supplementary Figure S2). Similarly, ibrutinib and idelalisib led respectively to two glucuronidated products (Figure 4a).

A second set of experiments identified the UGT enzyme(s) involved, based on UGT expressed in metabolic liver, kidney and intestine tissues, and individual recombinant UGT1A (n=8) and UGT2B (n=6) enzymes, using quantitative MS methods (Figure 4b). UGT2B17 and UGT1A4 were the main conjugating enzymes for fludarabine glucuronidation (Figure 4b), with a preferred formation of G2 over G1, an observation that mirrored activity in livers, which express these UGTs. The confirmation of fludarabine-G formation in CLL patients was established in plasma of two cases collected in the first week after fludarabine treatment (Figure 4c). Both fludarabine-G1 and G2 were measured in the first patient (16.4 and 11.7 pg/mL), whereas G2 (24.1 pg/mL) was detected in the second patient. For ibrutinib and idelalisib, G1 and G2 were formed only in the presence of UGT1A4 and livers, with similar kinetic parameters (Figure 4b, Supplementary Table S3), supporting the implication of this sole enzyme. Their formation was further abolished by nearly 90% in the presence of a specific UGT1A4 inhibitor, hecogenin (Supplementary Table S3). The formation of ibrutinib-G was then established in serial serum samples from 15 CLL patients undergoing

ibrutinib treatment collected at baseline (T0), 3 weeks to 2 months (T1), and between 4 and 9 months (T2) after treatment initiation (Figure 4d, Supplementary Tables S4, S5). A predominance of G2 over G1 (ratio of 6.5) was noted, similar to what was observed in livers and UGT1A4. The formation of ibrutinib-G represented on average 24% of the parent drug and was strongly correlated to levels of ibrutinib ($R^2 = 0.917$, $P < 0.001$) but with a considerable patient-to-patient variability ($CV = 190\%$). Lastly, MS analysis confirmed the formation of at least one G product by livers following incubations with bendamustine, chlorambucil and targeted agents venetoclax, acalibrutinib, cerdulatinib and duvelisib (Figure 5). The UGT2B17 and UGT1A4 enzymes were predominantly involved in their inactivation by glucuronidation (Figure 5).

Discussion

Understanding mechanisms that contribute to intrinsic and acquired resistance to therapy is key to finding useful predictive markers and innovative strategies to prevent or overcome treatment resistance in CLL. Previous reports identified UGT2B17 as a prognostic marker and a potential therapeutic target.^{17, 20, 21, 37} Our observations support a significant impact of the UGT metabolic pathway on the inactivation of most anticancer agents used in CLL, including commonly used treatments fludarabine, bendamustine, chlorambucil and emerging targeted therapies ibrutinib, idelalisib, venetoclax, acalibrutinib, cerdulatinib and duvelisib. This resulted in reduced sensitivity of cells to several antileukaemics associated with high UGT2B17 expression. A potential impact of UGT2B17 expression on clinical outcome emerges whereas drug treatment further induces the UGT2B17 metabolic capacity of lymphoid cells. Our findings support that this may be caused, at least in part, by direct glucuronidation of the drug by the UGT2B17 enzyme namely for fludarabine but would also involve other mechanisms for ibrutinib and idelalisib not inactivated by UGT2B17.

By catalyzing the transfer of GlcA from the co-substrate UDP-GlcA, UGT2B17 inactivates and detoxifies its substrates. This is supported by the detection of fludarabine-glucuronides in circulation of CLL patients that recently initiated fludarabine-based treatment. The glucuronidation pathway inactivates other nucleotide analogues such as ribavirin and cytarabine through a glioma-associated oncogene homologue 1 (GLI1)-dependent mechanism involving the regulation of UGT1A protein stability in AML.^{18, 19} This differs

from our observations in untreated CLL patients, in which UGT2B17 expression predominates, and where high UGT2B17 expression was associated with shorter treatment-free and overall survival and more patients requiring treatment.^{17, 20, 21} This shows that for a significant proportion of high-risk CLL patients, UGT2B17 is expressed in cancer cells prior to treatment initiation with the potential to affect primary response to first line treatment such as fludarabine and ibrutinib. Once fludarabine treatment is initiated, an induction of UGT2B17 expression was observed in B-cells of CLL patients not responding to fludarabine as well as in lymphoid cell models.^{17, 22}

Treatment with clinically relevant concentrations of ibrutinib and idelalisib resulted in a marked transcriptional up-regulation of UGT2B17, and high UGT2B17 expression was associated with reduced sensitivity to these drugs in B-cell models. It raises the possibility that therapeutic pressure induces UGT expression in B-cells. This rapid adaptation of neoplastic cells in the presence of a cytotoxic stressor and targeted therapies support that the UGT metabolic pathway is highly relevant in leukaemia, has the potential to affect drug response locally in malignant cells and may be useful in predicting response to additional CLL therapies. We also demonstrated the inactivation of chlorambucil, venetoclax and cerdulatinib by the UGT2B17 enzyme. These three antileukaemic agents target different cellular pathways than fludarabine and have distinct modes of action. High UGT2B17 expression may lead to lower response to these drugs in CLL patients but this remains to be demonstrated.

Crucial parts of the machinery governing UGT2B17 transcription remain poorly understood and especially in lymphoid cells. We provide the first evidence that UGT2B17 expression in B-cells is driven by a non-canonical UGT2B17 promoter and the use of an alternative noncoding exon 1c coupled to the common protein-coding region leading to the canonical UGT2B17 enzyme. This promoter may be targeted by NF- κ B that plays a central role in CLL. The NF- κ B pathway is associated with poor prognosis and response to drug treatment, and represents an emerging drug target in CLL.^{17, 38-42} The mechanism underlying high UGT2B17 expression in B-cells remains to be fully explored. According to our analysis, the gene expression signature associated with high UGT2B17 expression in CLL patients and cell models comprises a number of genes targeted by NF- κ B.

Our data also point to other mechanisms of altered drug sensitivity associated with high UGT2B17 expression. The inactivation of ibrutinib and idelalisib is largely dependent on UGT1A4, far less abundant than UGT2B17 in leukaemic B cells, and undetected at the mRNA level in most untreated CLL patients. Given that ibrutinib is mainly administered as an oral agent and subjected to first-pass hepatic metabolism, this drug is most likely conjugated primarily in the liver expressing high levels of UGT1A4 instead of being metabolised in B-cells. Yet, in one of the lymphoid cell models, we showed that induction of UGT1A4 is conceivable, but this finding remains to be demonstrated in CLL patients. Induction at the protein level also requires examination, given the recent report in AML cells suggesting an enhanced UGT1A protein expression mediated by increased protein stability upon drug treatment.¹⁸

Consistent with its enzymatic function, high UGT2B17 may deplete intracellular metabolites leading to aberrant cell signaling and dysregulated cell functions,²³ which could favour progression in untreated CLL cases and subsequent drug resistance in treated patients. In our transcriptomic analysis, AMPK signaling was negatively associated with high UGT2B17 expression in conditions of both induced and high basal UGT2B17 expression, potentially linking B-cell metabolism to the glucuronidation pathway and subsequent adverse clinical outcomes. AMPK is a major regulator balancing energy supply and ultimately protects cells from harmful stresses by the coordination of multiple metabolic pathways.⁴³ The activation of the AMPK pathway has been shown to affect growth and apoptosis in CLL.⁴⁴ As a stress-response molecule mediating drug resistance through different mechanisms, AMPK is further involved in the metabolism reprogramming and autophagy induction, also regulating the self-renewal ability of cancer stem cells.⁴⁵ More recently, ibrutinib resistance was associated with a metabolic rewiring in CLL.⁴⁶ Likewise, UGT proteins were shown to be part of complex protein networks. Their functional interaction with other metabolic proteins induced broad changes in cell metabolism and may contribute to tumourigenesis and drug response.^{47, 48}

In summary, we unveiled a biochemical underpinning of reduced drug sensitivity related to the UGT2B17 metabolic pathway and drug inactivation. The evidence provided should prove useful for understanding and potentially overcoming drug refractoriness. The impact of

glucuronidation in the inactivation of additional antileukaemic drugs is underestimated since we established that most antileukaemic agents are subjected to this metabolic process, including ibrutinib, idelalisib, venetoclax and duvelisib as well as other small molecules under development such as acalibrutinib and cerdulatinib. This may well apply to a number of other cancer therapeutics given the recent report that GLI1-inducible glucuronidation imparts resistance to a broad spectrum of compounds including FDA-approved drugs.¹⁹ Our observations warrant additional studies to appreciate the prevalence and the clinical implications of high UGT2B17 expression on outcomes of leukaemia patients.

Additional information

Ethics approval and consent to participate

The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients provided informed consent and the study was approved by the local ethical research committees of the Medical University of Vienna (Ethics vote 1499/2015) and the CHU de Québec (A14-10-1205).

Consent for publication

Not applicable

Data availability

The datasets generated during the current study are available in the Gene Expression Omnibus repository with the accession number GSE135030.

For reviewers: access to GEO accession number GSE135030 is currently private. For reviewing purposes, access can be granted by going to:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE135030> and by entering token itcfouocjvyltet into the box.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Funding

The Cancer Research Society, the Leukemia and Lymphoma Society of Canada, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; FRN-152986), and the Canada Research Chair Program financially supported this study.

Authors' contributions:

Study concept: Guillemette. Performed experiments: Eric P. Allain, Joanie Vaillancourt, Vincent Bat, Patrick Caron, Lyne Villeneuve, Adrien Labriet, Véronique Turcotte. Analysed Data: Eric P. Allain, Michèle Rouleau, Joanie Vaillancourt, Vincent Bat, Patrick Caron, Lyne Villeneuve, Véronique Turcotte, Charles Joly-Beauparlant, Eric Lévesque, Chantal Guillemette. Patient recruitment and clinical data: Katrina Vanura, Trang Le, Medhat Shehata, Susanne Schnabl, Dita Demirtas, Rainer Hubmann, Ulrich Jäger, Philipp Staber. Drafting of the manuscript: Eric P. Allain, Michèle Rouleau, Chantal Guillemette. Critical revision of the manuscript for intellectual content: All authors. Obtaining funding: Eric Lévesque, Chantal Guillemette

Acknowledgements

The authors would like to thank Etienne Audet-Walsh for his helpful advices. Eric P. Allain was supported by scholarships from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS), Université Laval foundation - Leadership and sustainable development award, CHU de Québec foundation - Fernand Labrie excellence award. Joanie Vaillancourt and Adrien Labriet were each supported by a scholarship from the FRQS. Chantal Guillemette holds a Canada Research Chair in Pharmacogenomics from Canadian Institutes of Health Research.

Supplementary information is available at the British Journal of Cancer's website

References

1. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al: iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 2018, 131, 2745-60.
2. Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, Ferrajoli A, Burger J, Faderl S, et al: Outcomes of first-line treatment for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion. *Haematologica* 2014, 99, 1350-5.
3. 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, 369, 32-42.
4. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al: Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2014, 371, 213-23.
5. Jain N, Keating M, Thompson P, Ferrajoli A, Burger J, Borthakur G, et al: Ibrutinib and Venetoclax for First-Line Treatment of CLL. *N Engl J Med* 2019, 380, 2095-103.
6. Kater AP, Seymour JF, Hillmen P, Eichhorst B, Langerak AW, Owen C, et al: Fixed Duration of Venetoclax-Rituximab in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Eradicates Minimal Residual Disease and Prolongs Survival: Post-Treatment Follow-Up of the MURANO Phase III Study. *J Clin Oncol* 2019, 37, 269-77.
7. Flinn IW, Hillmen P, Montillo M, Nagy Z, Illes A, Etienne G, et al: The phase 3 DUO trial: duvelisib vs ofatumumab in relapsed and refractory CLL/SLL. *Blood* 2018, 132, 2446-55.
8. 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, 370, 997-1007.
9. Blunt MD, Koehrer S, Dobson RC, Larrayoz M, Wilmore S, Hayman A, et al: The Dual Syk/JAK Inhibitor Cerdulatinib Antagonizes B-cell Receptor and Microenvironmental Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2017, 23, 2313-24.

10. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, et al: Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2016, 374, 323-32.
11. Messina M, Del Giudice I, Khiabani H, Rossi D, Chiaretti S, Rasi S, et al: Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia chemo-refractoriness. *Blood* 2014, 123, 2378-88.
12. Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, et al: Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009, 114, 2589-97.
13. Pandzic T, Larsson J, He L, Kundu S, Ban K, Akhtar-Ali M, et al: Transposon Mutagenesis Reveals Fludarabine Resistance Mechanisms in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2016, 22, 6217-27.
14. Moussay E, Palissot V, Vallar L, Poirel HA, Wenner T, El Khoury V, et al: Determination of genes and microRNAs involved in the resistance to fludarabine in vivo in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer* 2010, 9, 115.
15. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al: Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 2014, 370, 2286-94.
16. Guillemette C, Levesque E, Rouleau M: Pharmacogenomics of human uridine diphospho-glucuronosyltransferases and clinical implications. *Clin Pharmacol Ther* 2014, 96, 324-39.
17. Gruber M, Bellemare J, Hoermann G, Gleiss A, Porpaczy E, Bilban M, et al: Overexpression of uridine diphospho glucuronosyltransferase 2B17 in high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013, 121, 1175-83.
18. Zahreddine HA, Culjkovic-Kraljacic B, Assouline S, Gendron P, Romeo AA, Morris SJ, et al: The sonic hedgehog factor GLI1 imparts drug resistance through inducible glucuronidation. *Nature* 2014, 511, 90-3.

19. Zahreddine HA, Culjkovic-Kraljacic B, Gasiorek J, Duchaine J, Borden KLB: GLI1-Inducible Glucuronidation Targets a Broad Spectrum of Drugs. *ACS Chem Biol* 2019, 14, 348-55.
20. Allain EP, Venzl K, Caron P, Turcotte V, Simonyan D, Gruber M, et al: Sex-dependent association of circulating sex steroids and pituitary hormones with treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients. *Ann Hematol* 2018, 97, 1649-61.
21. Bhoi S, Baliakas P, Cortese D, Mattsson M, Engvall M, Smedby KE, et al: UGT2B17 expression: a novel prognostic marker within IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica* 2016, 101, e63-5.
22. Shehata M, Demirtas D, Schnabl S, Hilgarth M, Hubmann R, Fonatsch C, et al: Sequential gene expression profiling during treatment for identification of predictive markers and novel therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2010, 24, 2122-7.
23. Allain EP, Rouleau M, Le T, Vanura K, Villeneuve L, Caron P, et al: Inactivation of prostaglandin E2 as a mechanism for UGT2B17-mediated adverse effects in chronic lymphocytic leukemia. (Under Review) 2019.
24. Kim D, Langmead B, Salzberg SL: HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 2015, 12, 357-60.
25. Perteua M, Perteua GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL: StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol* 2015, 33, 290-5.
26. Tourancheau A, Margailan G, Rouleau M, Gilbert I, Villeneuve L, Levesque E, et al: Unravelling the transcriptomic landscape of the major phase II UDP-glucuronosyltransferase drug metabolizing pathway using targeted RNA sequencing. *Pharmacogenomics J* 2016, 16, 60-70.
27. Zhang J, Baran J, Cros A, Guberman JM, Haider S, Hsu J, et al: International Cancer Genome Consortium Data Portal--a one-stop shop for cancer genomics data. *Database (Oxford)* 2011, 2011, bar026.

28. Janky R, Verfaillie A, Imrichova H, Van de Sande B, Standaert L, Christiaens V, et al: iRegulon: from a gene list to a gene regulatory network using large motif and track collections. *PLoS Comput Biol* 2014, 10, e1003731.
29. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK: edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010, 26, 139-40.
30. Lawrence M, Huber W, Pages H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, et al: Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput Biol* 2013, 9, e1003118.
31. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al: limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015, 43, e47.
32. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA: affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004, 20, 307-15.
33. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY: clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 2012, 16, 284-7.
34. Rau A, Maugis-Rabusseau C: Transformation and model choice for RNA-seq co-expression analysis. *Brief Bioinform* 2018, 19, 425-36.
35. Gu Z, Eils R, Schlesner M: Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 2016, 32, 2847-9.
36. Love MI, Huber W, Anders S: Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014, 15, 550.
37. Zhong Y, Byrd JC: UGT2B17 as a disease accelerator in CLL. *Blood* 2013, 121, 1067-8.
38. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ: Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 2000, 164, 2200-6.

39. Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S: The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2010, 14, 45-55.
40. Baud V, Karin M: Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 2009, 8, 33-40.
41. Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I: p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 2002, 1, 493-503.
42. Vaisitti T, Gaudino F, Ouk S, Moscvin M, Vitale N, Serra S, et al: Targeting metabolism and survival in chronic lymphocytic leukemia and Richter syndrome cells by a novel NF-kappaB inhibitor. *Haematologica* 2017, 102, 1878-89.
43. Steinberg GR, Kemp BE: AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 2009, 89, 1025-78.
44. Campas C, Lopez JM, Santidrian AF, Barragan M, Bellosillo B, Colomer D, et al: Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood* 2003, 101, 3674-80.
45. Wang Z, Liu P, Chen Q, Deng S, Liu X, Situ H, et al: Targeting AMPK Signaling Pathway to Overcome Drug Resistance for Cancer Therapy. *Curr Drug Targets* 2016, 17, 853-64.
46. Galicia-Vazquez G, Aloyz R: Ibrutinib Resistance Is Reduced by an Inhibitor of Fatty Acid Oxidation in Primary CLL Lymphocytes. *Front Oncol* 2018, 8, 411.
47. Fujiwara R, Yokoi T, Nakajima M: Structure and Protein-Protein Interactions of Human UDP-Glucuronosyltransferases. *Front Pharmacol* 2016, 7, 388.
48. Rouleau M, Audet-Delage Y, Desjardins S, Rouleau M, Girard-Bock C, Guillemette C: Endogenous Protein Interactome of Human UDP-Glucuronosyltransferases Exposed by Untargeted Proteomics. *Front Pharmacol* 2017, 8, 23.

Figure Legends

Figure 1. Expression of UGTs in CLL patients and induction of UGT2B17 after treatment initiation in twenty CLL patients receiving fludarabine-containing regimens (GSE 15490).²² (A) UGT2B17 is preferentially induced in non-responders. Expression of UGT2B17 is significantly enhanced ($> 15\%$; $P = 0.0007$) one day after fludarabine treatment in a subset of patients not responding to fludarabine. CLL patients were divided based on UGT2B17 inducibility. Average levels of UGT2B17 were 4.1 and 7.0 log₂-units ($P = 0.0006$, after normalization by robust multi-array average) prior to fludarabine initiation in patients exhibiting no induction and induction of UGT2B17 expression, respectively. (B) UGT2B17 predominates in leukaemic cells. Relative expression levels of UGT isoforms in a cohort of 291 CLL patients from the International Cancer Genomic Consortium (ICGC) demonstrate that UGT2B17 is the main UGT expressed in leukaemic cells. The proportion of patients expressing UGT2B17 and other UGTs is illustrated. Other UGTs include nine UGT1A (1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 and 1A10) and six UGT2B (2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15 and 2B28).

Figure 2. Drug treatments induced UGT2B17 expression and activity in CLL cell models. Quantification of UGT2B17 (left panels) and UGT1A (right panels) mRNAs by RT-qPCR in MEC1 (A), JVM2 (B) and EHEB (C) cells subjected to fludarabine, ibrutinib or idelalisib treatment at specified concentrations. (D) Drug treatments induced UGT2B17 (left) and UGT1A (right) glucuronidation activity for their probe substrates dihydrotestosterone (DHT) and estradiol (E2), respectively. (E) Fludarabine glucuronidation was enhanced following treatment with fludarabine, ibrutinib or idelalisib. (F) Relative expression levels of UGT1A and UGT2B17 in leukaemic cell models. G: Glucuronide. Student's T-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3. Ascertaining pathways affected by high UGT2B17 expression in B cells and upstream regulators. (A) Schematic overview of the analysis pipeline. K-means clustering, enrichment and co-expression analyses served to identify pathways associated with high UGT2B17 expression and upstream transcriptional regulators. Detailed analysis of UGT2B17 transcriptome by RNA-seq revealed expression of non-canonical transcripts and alternate regulation. (B) A transcriptional signature associated with elevated UGT2B17

expression in 448 untreated CLL samples (GSE13159) enabled clustering and identification of pathways altered by elevated UGT2B17 expression. The top 1000 most statistically significant genes were selected as features for clustering RNA-seq samples with log₂ fold-change values using the K-means method. Cluster 3 contained genes which were globally down-regulated across all experimental conditions and was enriched with genes belonging to the AMPK signaling pathway. (C) RT-qPCR validation of down-regulated AMPK pathway-related genes in cell models. (D) UGT2B17 is predominantly expressed from an alternative UGT2B17_n2 transcript in lymphoid cell models and in CLL patients (n=6; GSE99724) evaluated by RNA-sequencing. (E) Schematic overview of the UGT2B17 gene and main coding transcripts in leukaemic cells. Only exons included in main leukaemic UGT2B17 transcripts are shown for sake of clarity. The alternative UGT2B17_n2-n4 transcripts include the supplementary exon 1c or 1b previously reported, which extend the 5' untranslated sequence relative to the canonical UGT2B17_v1 transcript.²⁶ UGT2B17_n2 and n4 transcripts were validated by RT-PCR in cells of three CLL patients, and in MEC1 and JVM2. These transcripts encode a functional UGT2B17 enzyme. (F) Luciferase reporter gene expression assays were performed in MEC1 cells. Cells were transfected with pGL3 vectors containing either the canonical promoter of UGT2B17_v1 (P1), or the alternative promoters P2 or P3 upstream of each novel exons 1b or 1c respectively. Experiments were conducted four times in triplicates.

Figure 4. Inactivation of antileukaemic drugs by glucuronidation in human metabolic tissues, B-cell models, and detected in CLL patients. (A) Fludarabine, ibrutinib or idelalisib glucuronidation by human liver microsomes generated two glucuronidated metabolites G1 and G2 for each drug separated by liquid chromatography and named according to their order of elution. MS fragmentation patterns confirmed the glucuronidated nature of metabolites with the loss of the glucuronic acid (GlcA) moiety corresponding to a m/z shift of 176 Da. Masses of the protonated drug-glucuronide [M+H]⁺ and parent drug [M-G+H]⁺ are shown, and were in accordance with those of the parent drugs alone and of GlcA. Their identity was confirmed upon β -glucuronidase hydrolysis (not shown). (B) Identification of UGT2B17 and UGT1A4 enzymes primarily targeting anti-leukaemic drugs for glucuronidation using quantitative MS methods. The screening included human liver, intestine and kidney that are enriched in UGTs and individual recombinant UGT1A (n=8) and UGT2B (n=6) enzymes.

(C) Detection of fludarabine-G in plasma samples of two CLL patients collected in the first week after fludarabine treatment. Peaks corresponding to fludarabine-G are highlighted. (D) Concentrations of ibrutinib-G and the parent drug measured by quantitative MS in two CLL patients undergoing ibrutinib treatment collected at baseline (T0), 3 weeks to 2 months (T1) and between 4 and 9 months (T2) after treatment initiation. Patients' characteristics are displayed in Table S4.

Figure 5. Antileukaemic agents used in the treatment of CLL are substrates for UGT-dependent glucuronidation. MS analysis indicated the formation of one or two glucuronidated products named according to their order of elution G1 and G2. Glucuronidation assays using pooled human liver microsomes enriched in UGT enzymes led to the formation of polar G derivatives confirmed by their fragmentation patterns assessed by mass spectrometry (MS), namely a loss of the GlcA moiety corresponding to a m/z shift of 176 Da. Masses of the protonated drug-glucuronide $[M+H]^+$ and parent drug $[M-G+H]^+$ are shown and were in accordance with the masses of the parent drug and of GlcA (176 Da). The metabolite of bendamustine HP2 was glucuronidated. The HP2 metabolite has hydroxyl groups in place of chlorine atoms in bendamustine. Chlorambucil undergoes a similar process, generating a dechlorinated metabolite subsequently conjugated. Venetoclax is an orally available, selective, small molecule inhibitor of BCL2 approved by the US Food and Drug Administration for the treatment of patients with CLL. Acalabrutinib is an orally available, irreversible Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor in development designed to be more selective than ibrutinib.¹⁰ Cerdulatinib (PRT062070) is an investigational oral, dual spleen tyrosine kinase (Syk), janus kinase (JAK1/3) and tyrosine kinase 2 (TYK2) inhibitor for the treatment of haematological malignancies and approved for the treatment of peripheral T-cell lymphoma.⁹ Duvelisib is an oral, dual small molecule inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) delta and gamma, approved for the treatment of relapsed or refractory CLL.⁷ A second set of experiments identified the UGT enzyme(s) involved, revealing a predominant role for UGT2B17 and UGT1A4.

Table 1 Drug sensitivity of lymphoid cell models overexpressing UGT2B17 compared to control cells.

MEC1 cells	Fludarabine	Ibrutinib	Idelalisib	Venetoclax	Chlorambucil	Bendamustine
CTRL IC ₅₀ (μM)	29.27	0.99	1.73	2.22	7.99	60.09
2B17 IC ₅₀ (μM)	58.82	4.13	7.40	4.16	12.35	76.05
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	0.014	0.025	< 0.001	0.094
Fold over control	2.01	2.08	4.28	1.87	1.55	1.27
JVM2 cells						
CTRL IC ₅₀ (μM)	9.08	3.64	1.79	4.06	10.38	54.24
2B17 IC ₅₀ (μM)	15.05	8.95	2.95	2.94	8.64	62.78
<i>P</i>	< 0.001	0.013	0.588	0.100	0.278	0.233
Fold over control	1.66	2.46	1.65	0.72	0.83	1.16

Half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) are shown for cells overexpressing UGT2B17 (2B17) or controls (CTRL). Drug concentrations range from 1 nM to 100 μM, but varied for each drug. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (in bold).

Figure 1

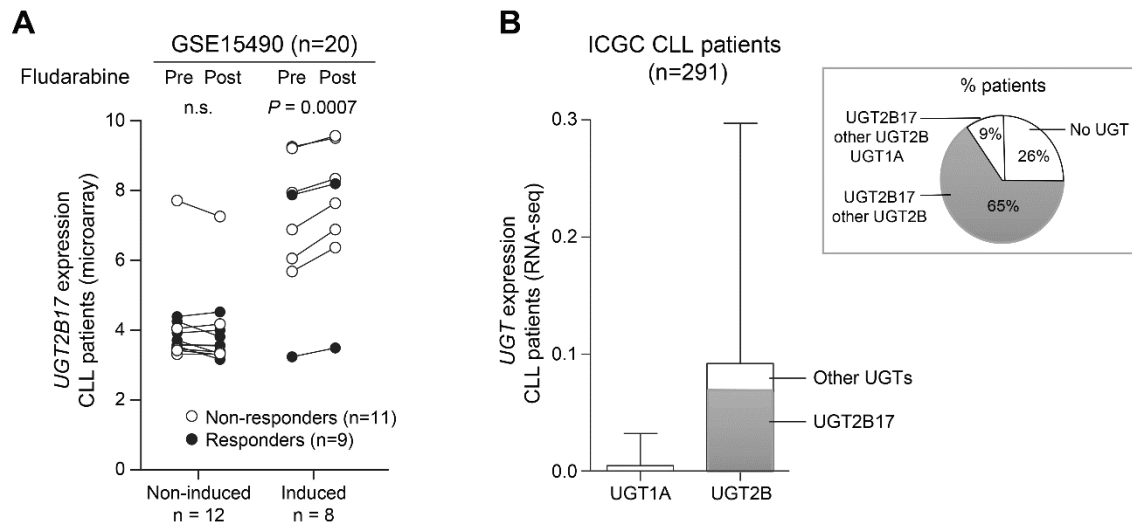


Figure 2

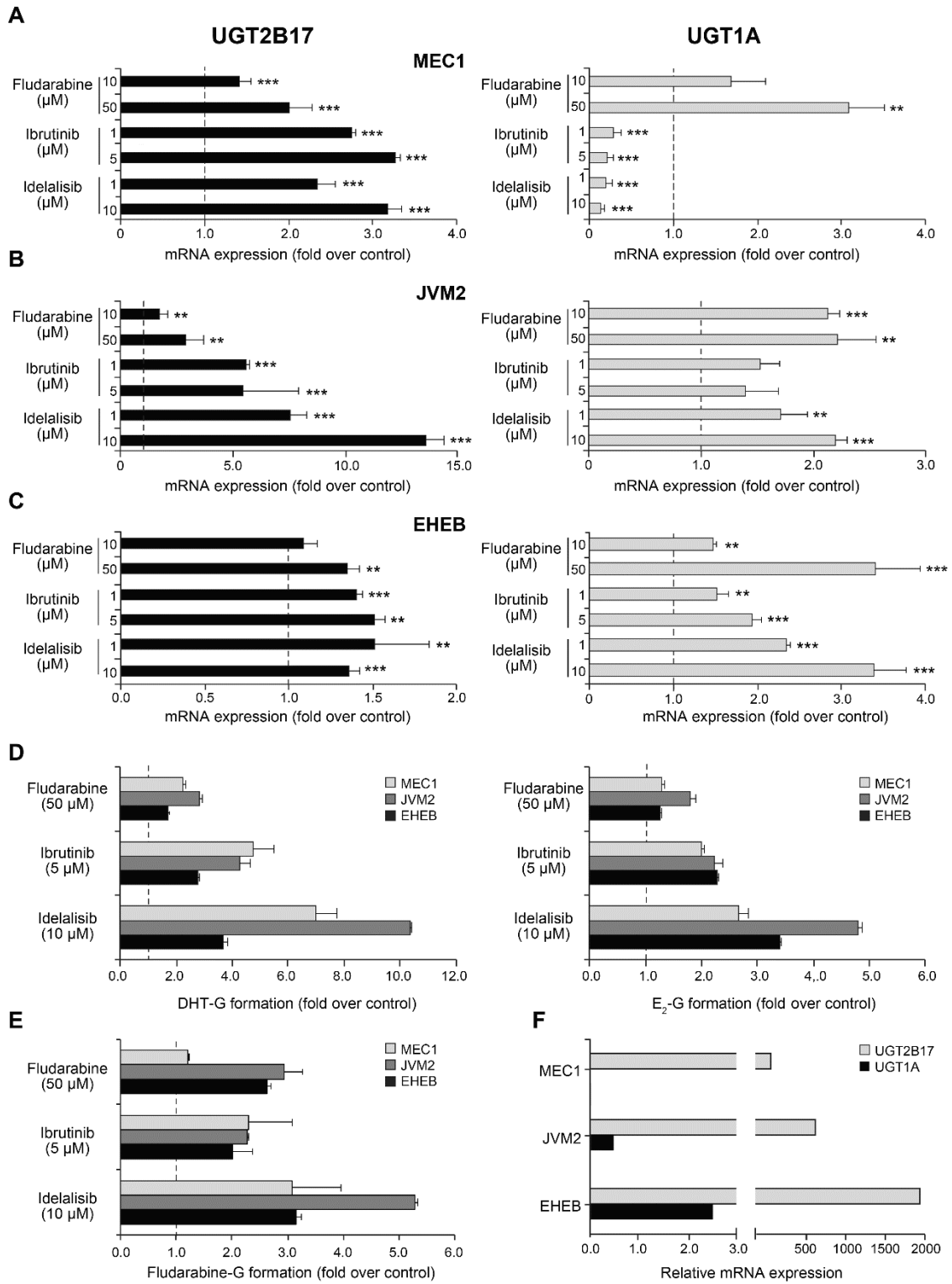


Figure 3

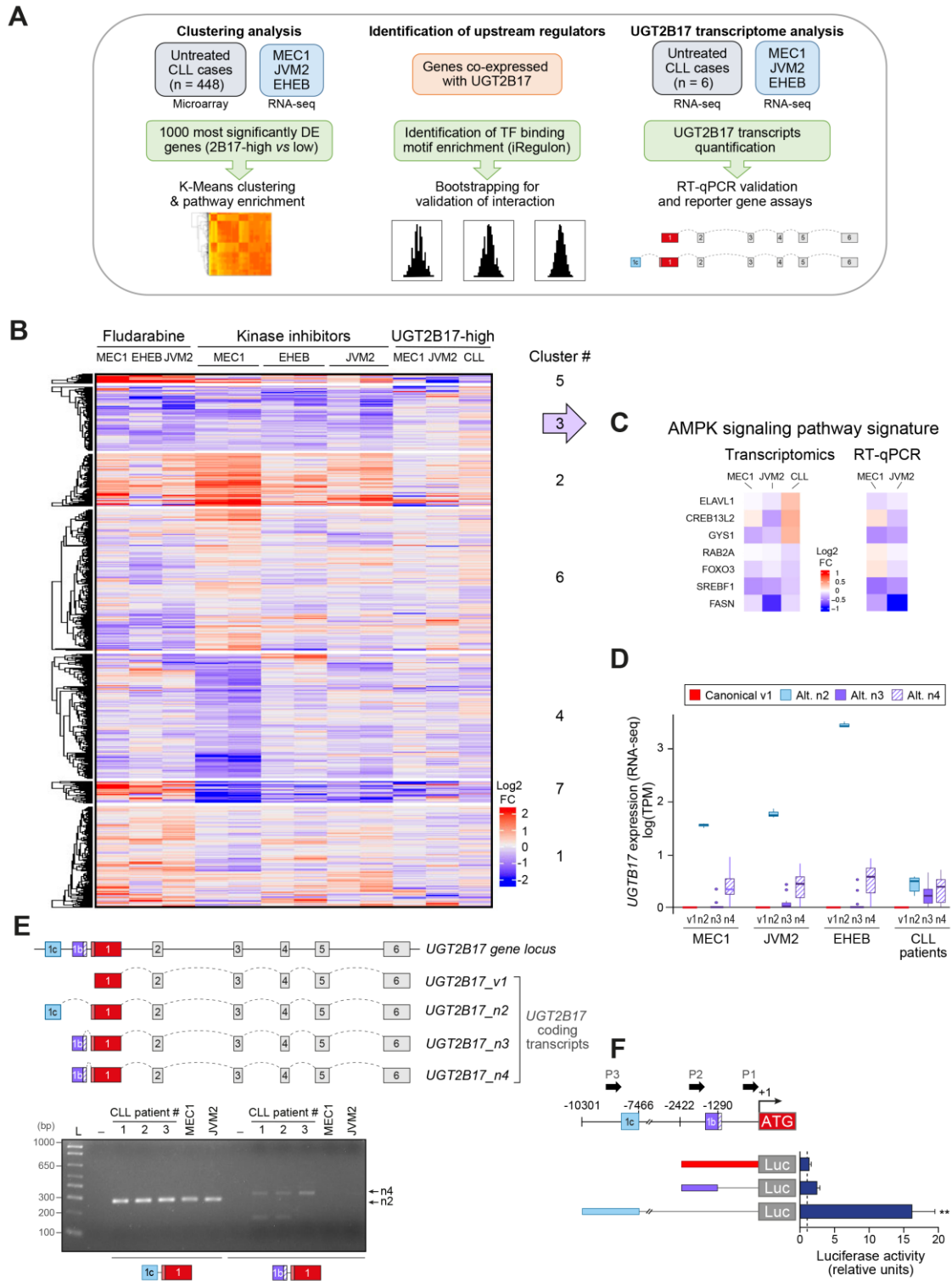


Figure 4

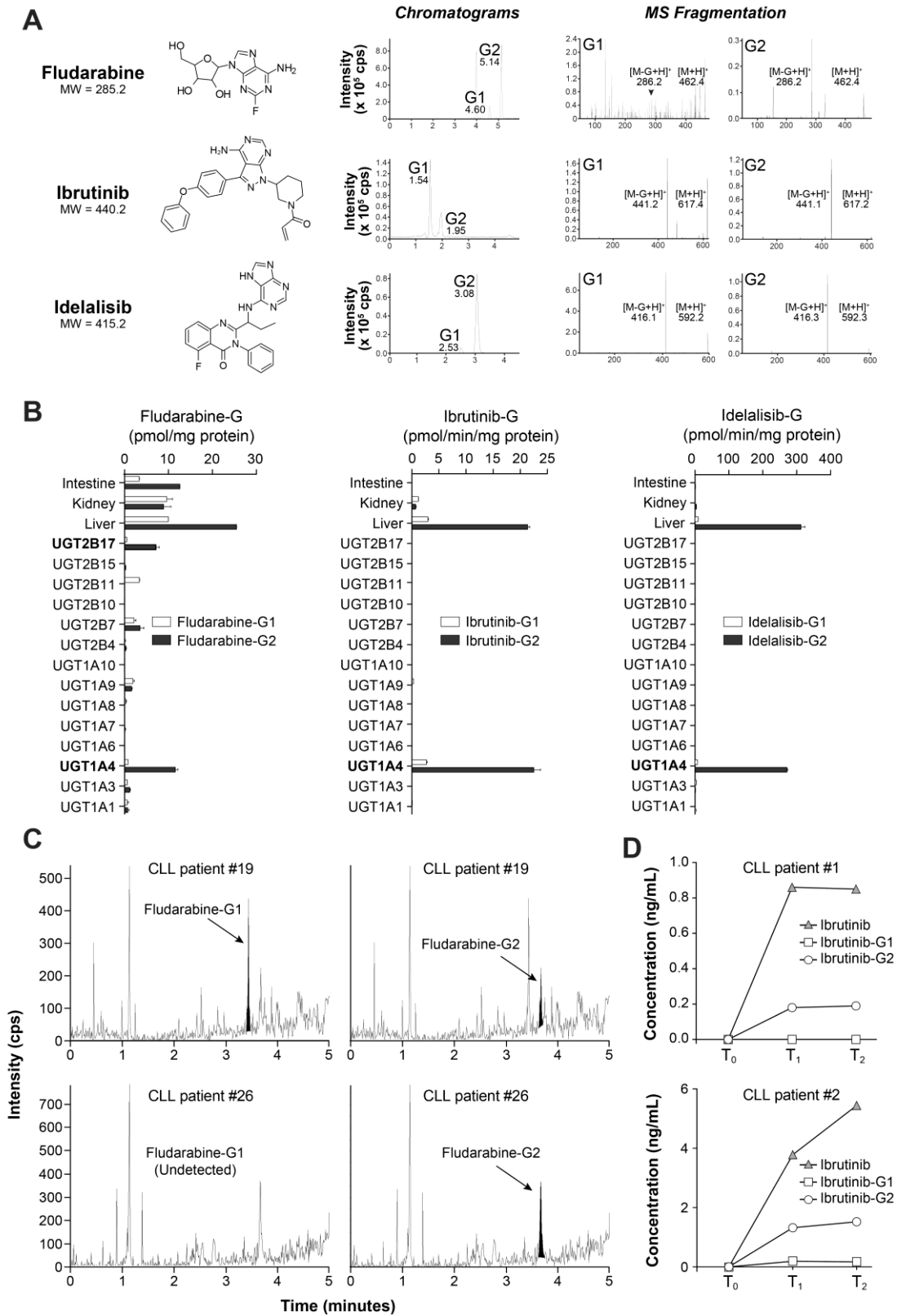


Figure 5

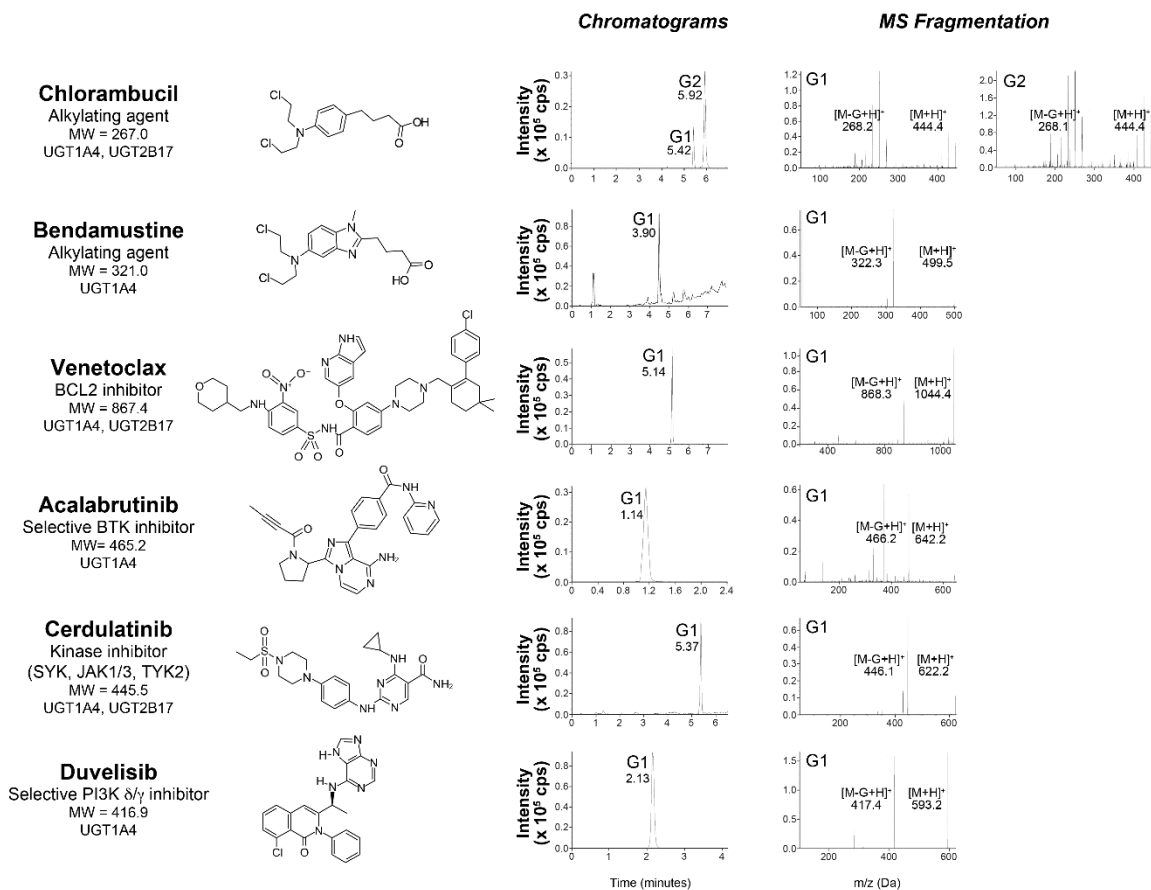
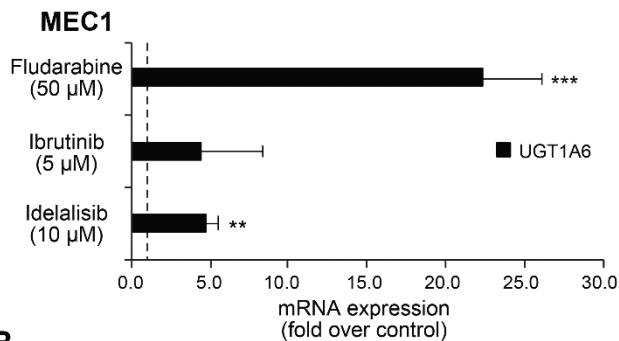
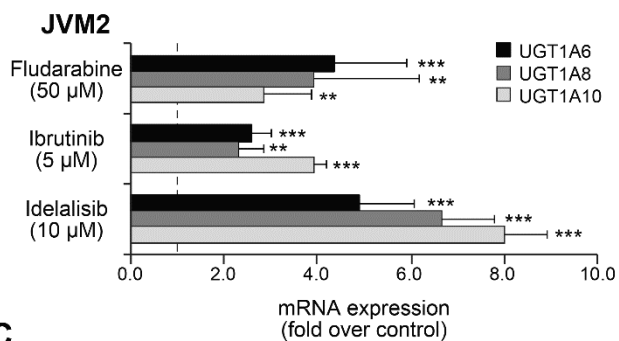


Figure S1

A.



B.



C.

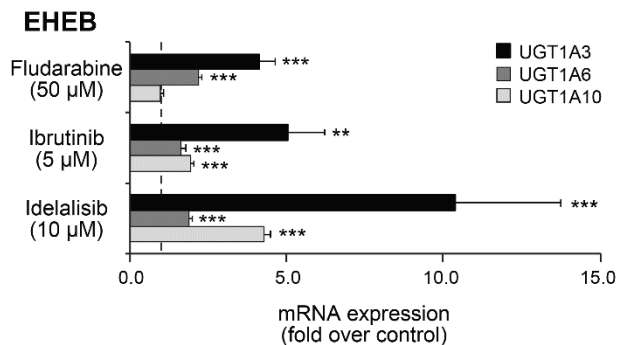


Figure S2

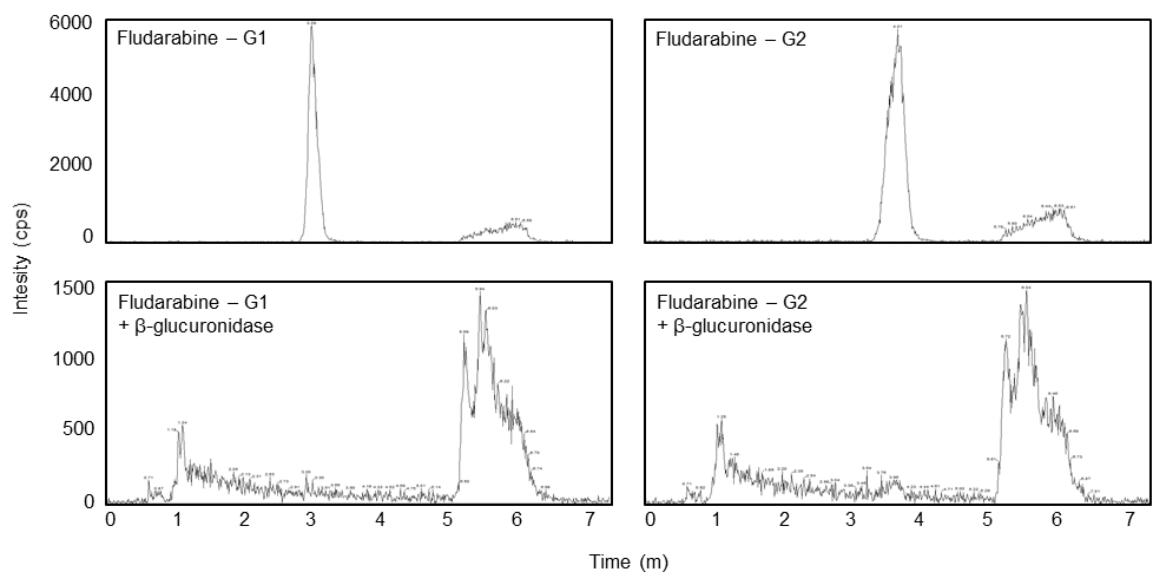


Table S1: Major pathways defined by KEGG classifications based on their expression pattern by K-mean clustering and their significance determined using a hypergeometric test (False discovery test < 0.05 are indicated in bold).

Cluster #	Description of expression changes	Major enriched pathways
1	Little to no change across all samples.	Valine, leucine and isoleucine degradation Propanoate metabolism Pantothenate and CoA biosynthesis Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis Fructose and mannose metabolism
2	Up-regulated in all samples.	Steroid hormone biosynthesis Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 Ascorbate and aldarate metabolism Drug metabolism - other enzymes Chemical carcinogenesis
3	Down-regulated in all samples.	AMPK signaling pathway Mitophagy - animal Renal cell carcinoma Ras signaling pathway Insulin resistance
4	Down-regulated in the MEC1 cell model treated with kinase inhibitors.	Phosphatidylinositol signaling system Inositol phosphate metabolism Notch signaling pathway Thyroid hormone signaling pathway Shigellosis
5	Up-regulated in conditions of all drug treatments (cell models and patients).	Hematopoietic cell lineage Legionellosis Inflammatory bowel disease (IBD) Leishmaniasis Pertussis
6	Down-regulated in fludarabine-treated conditions (cell models and patients)	Purine metabolism Ribosome Base excision repair Primary immunodeficiency Protein processing in endoplasmic reticulum
7	Up-regulated in fludarabine-treated cells, down-regulated in all other conditions.	Amoebiasis JAK-STAT signaling pathway PI3K-Akt signaling pathway Transcriptional misregulation in cancer Focal adhesion

Table S2 NF- κ B gene targets co-expressed with UGT2B17 during drug treatment.

Study	Cell lines			CLL patients			
	Gilmore	Li	Zhao	Gilmore	Li	Zhao	
NF- κ B regulated genes	CXCL3	ALOX5	OR7E47P	CCL3	ABR	MAPK14	AHNAK
	TFF3	ATOX1	EPB41L4A	CD38	AHNAK	MTMR2	ZBTB32
	TNFRSF1B	BCL2L11	SACS	NOD2	AICDA	MYB	LDLRAD4
	HAMP	CD74	RIN3	GCLC	APBB2	MYLK	IL6R
	ALOX5	CDK6	OSBPL10	ADORA2A	ATOX1	NOD2	RXRA
	NQO1	CXCL3	TCF7	BNIP3	AZIN1	NUMB	GALNT2
	GRM2	FCGBP		KLF10	BCAT1	PANX1	RHOBTB2
	BCL2L11	GRM2		MYB	BNIP3	PFKP	TRIB1
	CDK6	HAMP		AICDA	BTK	PIGR	ABCG1
	NUAK2	IKBKE		BTK	CCND2	PTEN	SH3PXD2A
	SERPINB1	INO80C		CTSB	CD38	PTK6	GABPB1
		NEO1		DPYD	CD59	PTPN2	CSTB
		NQO1		MYLK	CDK12	PTTG1IP	ABR
		PLEKHG2		CCND2	CEACAM1	RAPGEF3	ELL3
		PTGER4		LGALS3	CPD	RCAN1	HSP90B1
		RAPH1		SLC16A1	CTSB	RUSC1	CTNNA1
		SERPINB1		PTEN	CTSS	SAR1B	WARS
		TFF3		TICAM1	CYFIP1	SERPINB8	
		TNFRSF10B			DPYD	SERPINH1	
		TNFRSF1B			DSTN	SH3BP4	
		TPMT			FBXO46	SLC16A1	
					FBXW11	SLC29A1	
					GABPB1	SRGN	
					GCH1	ST7	
					GCLC	STAT5B	
					IGSF3	TICAM1	
					IL15RA	TNFAIP1	
					KLF10	TP53I3	
					KRT18	TSG101	
					LGALS3		

Genes regulated by NF- κ B according to recent studies that are co-expressed with UGT2B17 in CLL patients treated with a fludarabine-containing regimen and in leukemic cell models MEC1 and JVM2 after treatment with fludarabine, ibrutinib or idelalisib.

Table S3 Kinetic estimates for conjugation of fludarabine, ibrutinib and idelalisib by human liver and UGT enzymes and inhibitory constants (K_i) for drug glucuronidation.

Protein preparations	Affinity K_m (μM)	Velocity V_{max} ($\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	UGT1A4 inhibitory constant (K_i in μM)
Fludarabine			
Liver	878 \pm 15	0.12 \pm 0.03	-
UGT2B17	949 \pm 4	0.01 \pm 0.00	-
UGT1A4	1020 \pm 7	0.05 \pm 0.00	-
Ibrutinib			
Liver	39 \pm 6	90 \pm 14	5.8 \pm 0.2
UGT1A4	58 \pm 13	68 \pm 2	2.8 \pm 0.4
Idelalisib			
Liver	54 \pm 1	530 \pm 44	0.9 \pm 0.1
UGT1A4	45 \pm 3	348 \pm 1	0.6 \pm 0.0

Observed V_{max} values correspond to the velocity measured at the highest concentrations of substrate. Affinities (K_m) were estimated by calculating $1/2$ of the observed V_{max} . Hecogenin was used as a specific UGT1A4 inhibitor. Values are only shown for the predominant drug-G. - : not determined.

Table S4 Characteristics of CLL patients under ibrutinib treatment.

Characteristics	N = 15 (%)
Sex	
Male	8 (53)
Female	7 (47)
Binet stage B/C	6 (40)
CD38 High	4 (27)
Del(13q)	8 (53)
Tris 12	5 (33)
Del(11q)	4 (27)
Del(17p)	4 (27)
UM IGHV	10 (67)

Table S5 MS-based quantification of ibrutinib and ibrutinib-G in plasma samples of 15 CLL patients undergoing ibrutinib therapy.

Patients (n = 15)	Ibrutinib	Ibrutinib-G1	Ibrutinib-G2	Total ibrutinib-G	G / Ibrutinib
Mean (ng/mL)	12.72	0.54	3.51	4.05	24%
Median (ng/mL)	20.73	1.02	6.67	7.69	12%
SD (ng/mL)	3.68	0.20	0.99	1.24	24%
CV (ng/mL)	163%	190%	190%	190%	52%

Data are derived from blood samples collected after at least 4 months of therapy (at T₂) and data were highly similar for T₁. CV = coefficient of variation; SD standard deviation; G= glucuronide.

Discussion

La nature imparfaite des marqueurs cytogénétiques et de génétique moléculaire pour évaluer le pronostic de la LLC nous incite à adopter des modèles multifactoriels incorporant plusieurs biomarqueurs afin d'estimer plus précisément le parcours clinique des patients (163). De plus en plus d'études examinent un bon nombre de lésions génétiques et ne se limitent pas aux anomalies cytogénétiques principales ayant un lien connu avec la LLC (163,164). Au-delà des marqueurs pronostiques cytogénétiques, les avancées en génomique ont identifié de nouveaux marqueurs d'expression associés à la survie, tels que ZAP70 et LPL. Certains de ces marqueurs favorisent la progression de la maladie via des mécanismes bien caractérisés (165-170). Ces marqueurs d'expression peuvent être indépendants aux marqueurs cytogénétiques, et permettent d'expliquer une plus grande partie de l'hétérogénéité de la maladie et de son parcours clinique. De plus, ces marqueurs permettent de mieux identifier les voies cellulaires impliquées dans l'initiation, la progression de la maladie et sa réponse au traitement.

Les marqueurs prédictifs existants, quant à eux, sont tous autant imparfaits (171,172) et sont largement moins nombreux que les marqueurs pronostiques. La prédiction de la réponse thérapeutique, particulièrement avec de nouvelles thérapies ciblées, est effectuée selon l'état de deux principaux biomarqueurs prédictifs : les gènes TP53 et IGHV. Encore là, les lignes directrices les plus récentes recommandent soit l'administration de la chimio-immunothérapie ou les inhibiteurs du BCR en première intention selon l'état de ces marqueurs, ainsi que l'âge et les comorbidités du patient (91). Des modèles prédictifs multivariés seront alors sans doute privilégiés dans le futur avec la venue de nouvelles thérapies ciblées permettant d'adapter le traitement aux caractéristiques du patient et de la maladie. La caractérisation des mécanismes qui influencent le développement et la réponse thérapeutique de la LLC a le potentiel d'améliorer la stratification des patients et à optimiser le choix de traitement. La caractérisation des fonctions associées aux biomarqueurs cytogénétiques et d'expression génique connus pour la LLC a révélé une grande gamme de fonctions biologiques importantes pour la progression de la maladie, ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques. Les données décrites dans cette thèse ajoutent aux connaissances des mécanismes biologiques qui régulent la progression et la réponse au traitement de la LLC.

UGT2B17 est unique en tant que biomarqueur pour la LLC, car il semble pouvoir agir à la fois en tant que marqueur pronostique et prédictif. C'est un biomarqueur qui peut être mesuré au niveau génétique par l'entremise du polymorphisme de délétion affectant *UGT2B17* ou bien via la mesure de l'expression des produits de ce gène. Bien que la délétion semble être moins précise que l'expression génique pour discriminer les patients ayant une maladie progressive ou indolente, ce polymorphisme a tout de même un effet important sur la survie dans la LLC (1). D'ailleurs, si l'expression génique d'*UGT2B17* influence la progression de la maladie, une délétion complète de ce gène entraîne nécessairement une abolition de son expression, alors que la délétion d'un seul allèle est insuffisante pour induire un changement phénotypique. Par exemple, les populations asiatiques ont un taux d'incidence très faible de LLC et une fréquence élevée de délétion complète du gène *UGT2B17*. Bien que cette observation soit circonstancielle, ce polymorphisme pourrait être compris dans un profil génétique plus large qui défavorise l'expansion des sous-populations de lymphocytes leucémiques dans ce groupe ethnique. Il serait alors intéressant d'examiner le lien entre l'expression UGT2B17, la délétion du gène et la progression de la maladie dans cette population. Le rôle d'UGT2B17 dans le métabolisme des médicaments rend aussi cette enzyme un marqueur prédictif potentiel, ajoutant à sa valeur clinique. Plus important encore, UGT2B17 a une activité enzymatique précise et contribue à l'inactivation de molécules endogènes et exogènes ayant diverses fonctions biologiques. Les résultats présentés aux chapitres 1 à 3 de cette thèse proposent pour la première fois des mécanismes qui peuvent expliquer le parcours clinique défavorable des patients ayant une forte expression UGT2B17 en LLC.

Les hormones et la LLC

Le rôle d'UGT2B17 dans le cancer de la prostate est notamment lié à la dépendance de ce cancer à la signalisation androgénique (127). Les ligands naturels du récepteur aux androgènes (AR), ainsi que plusieurs autres stéroïdes, sont des substrats connus d'UGT2B17 et sont inactivés par son activité catalytique (108). On utilise les glucocorticoïdes depuis longtemps pour traiter plusieurs maladies lymphoïdes, car les lymphocytes sont très sensibles à la signalisation via le récepteur aux glucocorticoïdes (GR). Cela suggère une sensibilité possible des lymphocytes aux effets des hormones stéroïdiennes. Les résultats décrits au chapitre 1 révèlent des associations entre les niveaux de certaines hormones en circulation et

la progression de la LLC. Les androgènes, ainsi que les méthoxy-catécholestrogènes sont associés à une survie médiane prolongée des femmes et un parcours clinique moins agressif. De plus, les hormones gonadotropiques (LH et FSH) sont associées à une survie réduite des hommes ayant la LLC. Or, nous avons observé une plus forte association entre les niveaux d'expression d'UGT2B17 et la survie chez les femmes que chez les hommes. Plusieurs hormones stéroïdiennes sont des substrats connus de l'enzyme UGT2B17, il est alors possible que la glucuronidation des stéroïdes puisse réguler la signalisation hormonale dans la LLC. Nos résultats suggèrent que la leucémie pourrait être une maladie hormonosensible. Les réponses différentes aux hormones, ressorties de nos travaux, sont une possible cause des dimorphismes sexuels dans la LLC. Toutefois, les modèles multivariés corrigés pour l'expression d'UGT2B17 suggèrent que celle-ci n'influence pas ces associations pour le groupe de patients étudié.

Nos résultats, ainsi que les études précédentes visant les effets des hormones sur les lymphocytes, suggèrent que les hormones stéroïdiennes puissent influencer la croissance et la différenciation des cellules B. Les niveaux de plusieurs stéroïdes en circulation chez les patients ayant la LLC sont réduits comparativement aux donneurs sains et reflètent possiblement une perturbation de l'équilibre hormonal associée à la LLC. Cette perturbation pourra alors être associée à une réduction globale des effets immunomodulateurs de ces molécules. La diminution graduelle des niveaux hormonaux et particulièrement des androgènes chez l'homme associée au vieillissement pourrait favoriser une expansion progressive de certaines populations de cellules B aberrantes, ce qui est en lien avec l'âge avancé des patients ayant cette maladie. Toutefois, la baisse des hormones chez les patients LLC excède largement la baisse expliquée par l'âge.

Les androgènes étaient associés à la survie seulement pour les femmes, ce qui pourrait indiquer que les femmes aient une sensibilité plus accrue aux effets des hormones que les hommes, dont la variation de la survie n'était pas statistiquement significative selon les niveaux de ces hormones dans le groupe étudié. Bien que l'inclusion d'UGT2B17 dans les modèles statistiques n'a pu révéler d'interaction entre l'effet des hormones et les niveaux d'UGT2B17, nous avons noté que l'effet de l'expression de cette enzyme sur la survie est plus significatif chez les femmes. Cette observation est tout de même intéressante, car les

androgènes sont parmi les stéroïdes associés à la progression de la maladie pour les femmes et représentent des substrats bien connus d'UGT2B17. Cette observation pourrait être dû au fait que les femmes ménopausées ont des niveaux hormonaux très faibles comparativement aux hommes, ce qui pourrait augmenter l'impact de l'enzyme UGT2B17 sur le parcours de la maladie dans cette population. En contrepartie, les niveaux hormonaux élevés des hommes pourraient réduire l'importance de ce métabolisme. Le récepteur aux androgènes est exprimé au niveau de certaines classes de lymphocytes B et l'inactivation de ce récepteur dans les souris cause une accumulation de cellules B résistantes à l'apoptose (150-152), suggérant un rôle important de la voie androgénique dans la biologie des lymphocytes B. Les effets directs des androgènes sur les cellules leucémiques ne sont pas bien caractérisés, mais certaines études suggèrent une action indirecte des androgènes sur les cellules lymphoïdes par l'entremise des cellules du microenvironnement (173). Cette dynamique est en voie d'être explorée dans le cadre de la programmation de ma directrice. Ces investigations permettront de mieux comprendre comment ces molécules peuvent affecter la biologie des lymphocytes et le parcours clinique des patients souffrant de cancers hématologiques.

Alternativement, cette association pourrait être reliée à une signalisation estrogénique accrue et l'effet des androgènes pourrait être dû au fait qu'ils sont les précurseurs des estrogènes parentaux. Comme les corticostéroïdes et les androgènes, les estrogènes semblent avoir des effets pro-apoptotiques ou antiprolifératifs sur les lymphocytes B (144,145). Les récepteurs aux estrogènes sont exprimés par les lymphocytes B et sont surexprimés dans les cellules LLC, comparativement aux lymphocytes B normaux (146-148). L'activation du récepteur ER β avec un agoniste synthétique sélectif induit l'apoptose et inhibe la croissance de cellules MEC-1 et de cellules LLC primaires (149). De plus, le traitement de lymphocytes B murins normaux avec des estrogènes altère la maturation et la différenciation de ces cellules (174,175). Ces changements au programme de différenciation des lymphocytes surviennent aussi lors de l'inactivation des récepteurs aux estrogènes chez la souris (176). Il est alors possible que cette voie signalétique soit active dans les cellules leucémiques et exerce une fonction anti-oncogénique.

Les métabolites méthoxy des estrogènes étaient aussi associées à une survie prolongée chez les femmes ayant la LLC. Les catéchols estrogènes (OH-CE), les méthoxy estrogènes (MeO-

CE), l'estriol (E₃) et le 16 α -hydroxy estrone (16OH-CE) sont tous des métabolites dérivés de l'estrone (E₁) et l'estradiol (E₂) ayant différentes fonctions biologiques (177,178). Les hydroxy-estrogènes ou catécholestrogènes (CE) sont formés par l'oxydation des estrogènes parentaux et peuvent générer des adduits génotoxiques jouant un rôle important dans la pathophysiologie du cancer du sein et autres cancers (178,179). Les hydroxy estrogènes peuvent ensuite être convertis en méthoxy estrogènes (MeO-CE) par l'enzyme catéchol-O-méthyltransférase (COMT), une enzyme fortement exprimée au niveau des érythrocytes (177,180). Les méthoxy estrogènes ont des effets anti-angiogéniques et pro-apoptotiques dans divers types cellulaires (177,181-186). Il est alors possible que les méthoxy estrogènes exercent des effets anti-oncogéniques au niveau des cellules leucémiques. Des niveaux élevés de méthoxy estrogènes peuvent aussi être indicatifs d'une activité COMT accrue et d'une réduction globale de l'exposition des cellules leucémiques aux estrogènes génotoxiques.

Les découvertes présentées au chapitre 1 ont contribué à renforcer la programmation de recherche du laboratoire portant sur le volet sur la signalisation hormonale dans la LLC. Mes travaux bonifient la littérature existante suggérant que les hormones peuvent représenter une susceptibilité inhérente aux cellules leucémiques pouvant être exploitées. L'altération de l'activité de signalisation hormonale par des composés pharmacologiques représente alors une avenue thérapeutique intéressante. Il existe présentement des traitements hormonaux qui sont surtout utilisés pour combattre les cancers hormono-dépendants. Ces traitements permettraient de manipuler les voies de signalisation afin de mieux caractériser le rôle des hormones dans la leucémie. Les inhibiteurs de l'aromatase (Anastrozole, Exemestane), les anti-androgènes (Bicatulamide, Enzalutamide) et les anti-estrogènes (Fluvestran, Tamoxifène) peuvent être utilisés afin de bloquer la cascade biosynthétique des hormones à plusieurs niveaux (153). Il y a aussi une étude d'un cas de LLC où la patiente recevait un traitement à base d'inhibiteur d'aromatase pour son cancer du sein et pour laquelle une régression de la leucémie a été observée après l'initiation du traitement (187). Alternativement, le traitement *in vitro* de cellules leucémiques avec des estrogènes, des androgènes ou des agonistes sélectifs des récepteurs hormonaux tels que le 2,3-bis(4-hydroxy-phenyl)-propionitrile ou le R1881 pourrait nous informer quant aux effets de l'activation de ces voies dans la leucémie (149,188).

Nos travaux ne permettent pas de conclure si nous observons les effets de la maladie sur le profil hormonal et/ou les effets des hormones sur la LLC. Il faudra une meilleure caractérisation de ces voies signalétiques et l'activité biologique des récepteurs hormonaux dans les cellules leucémiques et le microenvironnement pour tirer des conclusions sur la pertinence clinique des associations observées au chapitre 1, en plus de les répliquer dans des cohortes indépendantes. De plus certaines hypothèses émises ci-haut peuvent sembler contradictoire, telles que celle qui propose que UGT2B17 puisse avoir plus d'impact sur la progression de la maladie chez les femmes dû au fait que celles-ci ont des niveaux hormonaux faibles comparativement aux hommes. L'activité accrue d'UGT2B17 dans les lymphocytes B cancéreux pourrait alors réduire une signalisation hormonal anti-oncogénique, ce qui semble globalement en accord avec la littérature. Cependant, les hommes ont des niveaux hormonaux très élevées comparativement aux femmes, mais ceux-ci ont aussi un taux d'incidence plus élevée et un pronostic qui est, en moyenne, plus défavorable que les femmes. Si c'est réellement le cas que les hormones ont une activité pro-apoptotique ou anti-oncogénique, il doit alors y avoir des dimorphismes importants au niveau de la signalisation hormonal ou de l'expression de récepteurs hormonaux entre les lymphocytes B provenant d'hommes comparativement aux femmes.

Certaines données cliniques pouvant influencer les niveaux hormonaux, telles que l'indice de masse corporelle, n'étaient pas disponibles pour inclusion dans les modèles statistiques. Il est possible que certains résultats soient modifiés lors de la correction pour ce facteur. En perspective, il sera important de confirmer ces résultats dans d'autres cohortes indépendantes, et d'examiner plus profondément l'expression et l'activité des récepteurs hormonaux dans les cellules leucémiques, ainsi que dans les cellules du microenvironnement.

L'interaction entre UGT2B17 et le PGE₂ dans la LLC

Comme les effets des stéroïdes ne permettaient pas nécessairement d'expliquer le parcours clinique défavorable des individus ayant une forte expression UGT2B17, nous avons voulu explorer si d'autres molécules endogènes substrats de l'enzyme UGT2B17 pouvaient être impliquées. Nos travaux sont les premiers à mettre en évidence les conséquences phénotypiques d'une forte expression de l'enzyme UGT2B17 dans les lymphocytes B et un mécanisme moléculaire possible impliquant la PGE₂.

Deux modèles cellulaires de surexpression stable d'UGT2B17 ont été générés à partir des lignées MEC-1 et JVM-2. Ce sont des lignées transformées par le virus Epstein Barr prélevées d'un patient ayant la LLC (MEC-1) et d'une patiente ayant un lymphome du manteau (JVM-2). L'augmentation de la croissance cellulaire associée à la surexpression d'UGT2B17 dans ces modèles suggère que la forte expression de cette enzyme puisse favoriser la croissance des cellules leucémiques. L'analyse des profils transcriptomiques des modèles de surexpression a révélé une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse et la signalisation des prostaglandines. De plus, cette baisse transcriptionnelle des gènes de la cascade signalétique des prostaglandines est encore plus prononcée dans les cellules de patients comparativement aux modèles cellulaires. Nos résultats démontrent que les cellules mononuclées du sang périphérique de patients ayant la LLC subissent une augmentation de l'apoptose et une inhibition partielle de la migration lorsque traitées avec la prostaglandine E₂ (PGE₂). Le traitement de cellules MEC-1 et JVM-2 avec cette molécule inhibe leur croissance, un effet qui est dépendant du niveau d'UGT2B17 cellulaire. De plus, PGE₂ ainsi que plusieurs autres prostaglandines sont des substrats pour UGT2B17 et leur conjugaison est accrue dans les cellules de patients ayant une forte expression de cette enzyme. Ces résultats suggèrent que UGT2B17 puisse contourner les effets anti-oncogéniques du PGE₂ dans les cellules leucémiques afin de favoriser un phénotype agressif.

Le PGE₂ est un lipide bioactif dérivé de l'acide arachidonique via la cascade des cyclooxygénases 1 et 2 (COX1/2). Cette molécule joue un rôle physiologique important dans l'inflammation, et elle est associée à des effets pro-oncogéniques dans plusieurs carcinomes (189,190). Par opposition, le PGE₂ est une molécule ayant un effet inhibiteur sur la croissance des lymphocytes B (191-194). De plus, cette molécule peut induire l'apoptose de cellules lymphoïdes, mais cette mort cellulaire semble être dépendante des niveaux d'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (194). Les lymphocytes et les cellules cancéreuses phénotypiquement immatures semblent être beaucoup plus sensibles aux effets immunosuppresseurs du PGE₂ comparativement aux cellules matures (194,195). Les cellules de LLC ont un phénotype mature, ce qui signifie qu'ils ont possiblement une sensibilité limitée aux effets du PGE₂ et que nos découvertes soient potentiellement importantes dans la biologie des lymphomes et leucémies issues de lymphocytes immatures.

Certains proposent que les récepteurs du PGE₂ puissent réguler l'activation du BCR, ce qui mènerait à une répression partielle de cette cascade de signalisation à la suite du stimulus (196). Le récepteur EP₄ et l'enzyme COX2 sont induits à la suite de l'activation de la cascade de signalisation BCR et le récepteur EP₄ a été proposé comme un régulateur négatif induit en réponse à cette activation afin de contrôler l'intensité de cette stimulation via un mécanisme cAMP-dépendant (197-199). La capacité des cellules LLC de répondre à une stimulation du BCR est très variable, représentant un obstacle important pour l'étude des effets des prostaglandines sur l'activation du BCR dans la LLC (18,200-204). De plus, une étude plus approfondie de la stimulation du BCR (au chapitre 2) pourrait être envisagée. Par exemple, le CpG-ODN et le CD40 soluble peuvent stimuler la prolifération de cellules LLC *ex vivo*, induire la production de cytokines, et protéger les cellules LLC d'un traitement pharmacologique (205,206). Il sera donc nécessaire de tester ces conditions additionnelles dans les futures expériences visant à étudier le rôle du PGE₂ sur la prolifération et la survie des cellules B induite par l'activation du BCR.

La voie de biosynthèse des prostaglandines est une cascade métabolique fréquemment ciblée par des médicaments anti-inflammatoires pour le traitement de l'inflammation aiguë. Les inhibiteurs de COX sont largement utilisés dans un contexte inflammatoire, mais ils ont souvent été utilisés dans le cadre de plusieurs études examinant les liens entre le PGE₂ et le cancer (207). Dans la LLC, il y a un lien entre l'expression de COX2 et un pronostic défavorable, ce qui s'oppose aux résultats présentés chapitre 2 (208,209). De plus, les inhibiteurs de COX2 ont des effets anti-oncogéniques sur les cellules LLC, mais certaines études subséquentes ont démontré que ces effets sont indépendants de l'inhibition de l'activité COX2 (208,210,211). Il est aussi possible que l'importance des autres enzymes impliquées dans la biosynthèse des prostaglandines ait été sous-estimé. Selon les résultats présentés au chapitre 2, cette voie de signalisation pourrait être ciblée par des agonistes des récepteurs EP₂ et EP₄. L'activation de ces récepteurs *in vivo* pourrait induire une inhibition de la croissance semblable aux effets observés dans les modèles MEC-1 et JVM-2. Les récepteurs EP₂ et EP₄ agissent via l'adénylate cyclase, et plusieurs études ont démontré que des molécules qui induisent la formation d'AMP cyclique (cAMP) peuvent avoir des effets semblables à l'activation des récepteurs EP₂ et EP₄ indépendamment de ceux-ci, ce qui rend également les agonistes de l'adénylate cyclase intéressants pour de futures thérapies (212).

Alternativement, il serait aussi possible d'inhiber UGT2B17 afin de prévenir l'élimination du PGE₂, mais jusqu'à présent, il n'existe aucun inhibiteur sélectif d'UGT2B17. Le développement d'inhibiteurs allostériques pour certaines isoformes UGT est en cours, mais ce travail n'est pas trivial, car il n'existe pas de structure tridimensionnelle résolue pour les UGT humains (213).

Cette étude présente certaines limites importantes, dont l'absence d'un nombre suffisant de cellules périphériques saines dans le cadre de cette première étude, afin de comparer la réponse au PGE₂ de lymphocytes B provenant d'individus en santé et de patients leucémiques. Ainsi, il n'était pas possible de bien comparer la réponse des lymphocytes primaires selon le niveau d'expression UGT2B17. La démonstration d'une sensibilité accrue aux effets du PGE₂ des lymphocytes cancéreux, comparativement aux cellules saines, aurait grandement amélioré le potentiel de cette voie signalétique en tant que cible thérapeutique. L'utilisation de cellules LLC purifiées aurait probablement amélioré l'interprétabilité des résultats comparativement aux PBMC. Bien que certains échantillons eussent une pureté de cellules leucémiques au-delà de 96 %, plusieurs contenaient des contaminants tels que des cellules T. De plus, le changement phénotypique observé pour les modèles cellulaires (prolifération) n'était pas le même que les cellules primaires (apoptose/migration). Cela est une conséquence du protocole utilisé pour la culture de cellules de patients, qui permet la mesure à court terme des effets d'un traitement, mais n'est pas bien adapté pour mesurer une prolifération active. Cependant, il demeure que les effets du PGE₂ sur les cellules primaires, ainsi que sur les modèles cellulaires, sont anti-oncogéniques. Il serait intéressant d'examiner un plus grand groupe de patients et de donneurs sains pour la sensibilité au PGE₂, tout en mesurant les niveaux d'UGT2B17 cellulaires ainsi que les niveaux d'expression des récepteurs EP₂ et EP₄. Il serait aussi intéressant de transduire des cellules primaires d'un donneur portant le polymorphisme de délétion UGT2B17 pour générer une surexpression de l'enzyme *ex vivo* et ensuite mesurer les conséquences sur la survie et la prolifération. La nature polymorphique du gène *UGT2B17* rend cette approche de « knock-in » possible. Cela permettrait de conclure plus définitivement quant à la pertinence clinique des effets d'UGT2B17 sur les phénotypes oncogéniques et la réponse au PGE₂. La culture de cellules leucémiques primaires présente aussi certains défis techniques importants, mais ces problèmes peuvent être palliés par la coculture de ces cellules avec des cellules stromales de

la moelle osseuse et l'ajout de facteurs de croissance ou de cytokines au milieu de culture (206,214-221). D'ailleurs, les prochaines étapes de ce projet de recherche seront d'examiner l'impact du microenvironnement sur les effets d'UGT2B17, ce qui nécessite la mise au point de ces méthodes de coculture, toutefois couramment utilisées dans le domaine. Ces interactions sont d'une grande importance pour caractériser davantage le rôle d'UGT2B17 dans l'élimination du PGE₂, car les cellules du microenvironnement pourraient contrôler la croissance de certaines populations aberrantes de lymphocytes B en sécrétant du PGE₂ (222). Les résultats présentés au chapitre 2 suggèrent que la surexpression d'UGT2B17 pourrait contribuer à modifier la signalisation intracrine ou autocrine du PGE₂ via les altérations au transcriptome, mais peut aussi modifier la signalisation paracrine, tel que démontré par les traitements au PGE₂ exogène. Il serait alors intéressant de considérer ces deux avenues dans de futures études visant à caractériser davantage ces mécanismes.

Les MEC-1 et les JVM-2 expriment UGT2B17 en conditions de base, donc les conclusions tirées des résultats au chapitre 2 ne sont valides que pour la comparaison d'une forte expression comparativement à une expression de base, par opposition à une expression nulle. Certaines méthodes telles que l'édition du génome pourraient permettre d'étudier l'abolition de l'expression génique *UGT2B17 in vitro*. Cela pourrait simuler le polymorphisme de délétion du gène *UGT2B17* et aiderait à déterminer l'impact de ce polymorphisme sur les mécanismes décrits par mes travaux. Cette méthode comporte plusieurs avantages, par exemple elle empêche les effets non spécifiques de l'insertion aléatoire d'un vecteur d'expression stable dans le génome ou de l'utilisation des antibiotiques de sélection. Cette approche d'édition génomique ne permet cependant pas de questionner la surexpression, qui était réellement la propriété d'UGT2B17 la plus fortement associée avec la progression de la maladie, d'où la pertinence des modèles de surexpression utilisés dans nos expériences.

Cette étude ajoute aussi à la littérature existante portant sur les lipides bioactifs et leur rôle possible dans la LLC (223). Plusieurs études indépendantes ont noté des associations entre la dyslipidémie et la LLC (223,224). Il y a une forte proportion de patients ayant la LLC qui souffrent aussi d'hypercholestérolémie (225). L'utilisation des statines est aussi associée à un meilleur parcours clinique, et peut augmenter l'efficacité de certains médicaments (226-228). La lipoprotéine lipase (LPL) est aussi un marqueur pronostic important qui est

surexprimé dans les cellules leucémiques de patients ayant une maladie progressive (229). LPL peut modifier le métabolisme des lipides dans les cellules leucémiques afin de favoriser un phénotype oncogénique (230,231). L'expression LPL semble surtout altérer le profil des acides gras libres dans la cellule leucémique via sa fonction enzymatique, menant à ce phénotype défavorable (230,232). Il est alors possible que le remodelage des acides gras dans les cellules leucémiques puisse davantage défavoriser la formation du PGE₂ ainsi que d'autres lipides ayant des fonctions anti-oncogéniques. LPL et UGT2B17 pourraient donc participer à une plus grande transformation globale du lipidome cellulaire qui favorise un phénotype agressif.

Le rôle de l'enzyme UGT2B17 dans la réponse aux médicaments

Nous avons démontré pour la première fois la glucuronidation de la fludarabine par l'enzyme UGT2B17. Cela suggère que les cellules leucémiques puissent éliminer ce médicament directement via l'activité de cette enzyme. Ce résultat pourrait permettre d'expliquer, du moins en partie, certaines observations cliniques en lien avec la thérapie à base de fludarabine. D'une part, nos résultats précédents publiés dans *Blood* démontrent que seulement les patients ne répondant pas à cette thérapie présentent une augmentation de l'expression UGT2B17 au niveau des cellules leucémiques après seulement 48h suivant l'initiation du traitement (1). Les résultats de *Bhoi* et collègues démontrent aussi que certains patients peuvent passer d'un statut de faible expression UGT2B17 à une forte expression suivant l'initiation du traitement. De plus, les patients ayant un gène IGHV non-muté ont une réponse inférieure au régime FCR (91,233). Selon nos observations, un bon nombre de ces patients pourraient présenter une forte expression UGT2B17 (environ 60%), car nous avons démontré une corrélation entre UGT2B17 et IGHV-UM, malgré que cette association soit imparfaite (1). UGT2B17 est l'enzyme UGT principale exprimée dans les cellules LLC ainsi que dans nos modèles, et celui-ci est fortement induit après le traitement. Cela rend probable l'élimination accrue de la fludarabine par la cellule leucémique lorsqu'il y a forte expression d'UGT2B17. Ceci a été confirmé avec les spécimens de quelques patients. De plus, nous avons observé une induction de l'expression d'UGT2B17 dans les cellules de patients qui présentent une expression basale plus élevée de cette enzyme, suggérant que la détection de niveaux de base d'expression pourrait être indicative du potentiel d'induction produit par le traitement. Il est donc probable que les voies ou facteurs affectant l'expression d'UGT2B17

dans la LLC avant la thérapie soient également impliquées dans l'induction de ce transcrit, notamment par le traitement pharmacologique. Les analyses du transcriptome ont démontré que le transcrit *UGT2B17* exprimé par les modèles lymphoïdes ainsi que les cellules de patients ayant la LLC contiennent un exon supplémentaire produisant une région 5' UTR plus longue. Cela signifie que les lymphocytes utilisent un promoteur alternatif régulant l'expression d'*UGT2B17* et peuvent présenter un programme de régulation transcriptionnelle distinctif par rapport au foie qui utilise le promoteur canonique. De plus, mes travaux révèlent un enrichissement de cibles du facteur de transcription NF- κ B parmi les gènes coexprimés avec *UGT2B17*, ce qui appuie un mécanisme d'induction transcriptionnel NF- κ B dépendant. Ceci devra toutefois être validé expérimentalement.

Récemment, l'induction de la voie de glucuronidation a été caractérisée comme étant un mécanisme pouvant contribuer à la résistance aux analogues de nucléotides des cellules leucémiques dans la leucémie myéloïde aiguë (LMA) (157,234,235). Ces travaux ont révélé une forte expression de la protéine Gli1 dans les cellules leucémiques de patients ayant une faible réponse au traitement à base de ribavirine, un inhibiteur d'eIF4E (157). Cette forte expression Gli1 est associée à une augmentation de la stabilité protéique des enzymes UGT1A, ce qui augmente la glucuronidation de la ribavirine, mais est aussi associée à une répression de l'expression génique. Des lignées résistantes à la ribavirine prétraitées avec un inhibiteur de la cascade de signalisation hedgehog ciblant des facteurs en amont de Gli1 sensibilise les cellules au traitement de ribavirine (157). De plus, les niveaux protéiques d'UGT1A étaient élevés dans les cellules de patients LMA pendant la récurrence comparativement aux patients qui répondent au traitement (157). Les dérivés glucuronides de la ribavirine et de la cytarabine, un médicament utilisé pour le traitement de la LMA, ont été détectés davantage dans les cellules résistantes (157). Cependant, les données de ces études appuient une augmentation de la stabilité des protéines UGT et une diminution de l'expression génique. Les mécanismes expliquant la conjugaison accrue des médicaments dans la LMA sont alors probablement différents que pour la LLC, mais la finalité demeure semblable dans les deux cas : une augmentation de la glucuronidation des médicaments. Cela suggère que la voie métabolique des UGT pourrait contribuer à l'élimination des analogues des nucléotides et d'autres médicaments dans plusieurs cancers hématologiques.

Les résultats présentés au chapitre 3 démontrent aussi une résistance aux inhibiteurs de kinases utilisés pour le traitement de la LLC associée à la forte expression d'UGT2B17 dans les modèles cellulaires. Ces molécules ne sont pas toutes des substrats pour l'enzyme UGT2B17, mais elles le sont toutes pour UGT1A4. Nous avons tout de même observé une sensibilité plus faible lorsque le niveau d'expression d'UGT2B17 est élevé. La quantification des ARN messagers après traitement a révélé une induction de l'expression d'UGT2B17 mais aussi de certains transcrits *UGT1A*, dont l'expression en ARNm est nettement moindre que celle d'UGT2B17 dans les cellules B et les modèles cellulaires. Notamment, UGT1A6 semble être parmi les isoformes UGT1A les plus abondantes, mais nous avons aussi détecté une induction d'UGT1A4 dans l'un de nos modèles cellulaires qui présente un niveau de base d'expression pour cette UGT. Cette induction d'UGT1A4 demeure à être démontrée dans les cellules de patients. UGT1A4 est la seule enzyme impliquée dans la glucuronidation de l'ibrutinib et l'idelalisib. Il est alors possible que les cellules leucémiques de certains patients ayant la LLC puissent exprimer UGT1A4 ou induire cette enzyme à la suite du traitement afin de contrer les effets des inhibiteurs de kinases. Cependant, ce résultat doit être répliqué en utilisant des spécimens de patients afin de confirmer la présence de cette enzyme dans les cellules leucémiques. Il est important de considérer que l'induction transcriptionnelle a été observée à court terme, donc l'effet d'un traitement répété ou continu sur le niveau d'expression des UGT *in vivo* n'est pas connu. Conséquemment, nos travaux ne permettent pas de déterminer la contribution de la voie des UGT dans la résistance acquise, mais peuvent fournir des indices quant aux facteurs influençant la réponse initiale à la thérapie. De plus, comme la pathophysiologie de la LLC dépend grandement des cellules du microenvironnement prolifératif, et que celles-ci peuvent protéger les cellules leucémiques des effets de certains médicaments, il serait intéressant d'évaluer si la glucuronidation joue un rôle dans ces interactions (236).

Au-delà de la glucuronidation de la fludarabine par UGT2B17, nos analyses ont révélé que certains changements d'expression génique associés au niveau de base d'*UGT2B17* surviennent aussi lorsque celui-ci est induit par un traitement pharmacologique. Un des changements qui a été mis en évidence, est l'altération transcriptionnelle associée à la signalisation AMPK par l'expression accrue d'UGT2B17. AMPK est une kinase importante pour la régulation de l'équilibre métabolique cellulaire (237). Nos résultats suggèrent que

l'enzyme UGT2B17 pourrait induire une réduction globale de l'expression de gènes impliqués dans la signalisation AMPK, ce qui pourrait réduire l'activité de cette voie signalétique. Cette possibilité est en voie d'investigation au laboratoire. L'activation de l'AMPK par le traitement avec des agonistes sélectifs inhibe la croissance des cellules leucémiques (238). De plus, la perte des activateurs en amont de AMPK dans les cellules B murines favorise le développement de lymphome chez la souris (239). L'induction de l'enzyme UGT2B17 pourrait donc contribuer à réduire l'activation de cette voie afin de permettre une meilleure viabilité de la cellule leucémique lors du traitement, ce qui est concordant avec nos observations cliniques. Certains traitements pharmacologiques peuvent grandement altérer le métabolisme cellulaire des cellules leucémiques, il est donc probable que les changements détaillés au chapitre 3 ne représentent qu'une fraction des altérations métaboliques induites par le traitement (240, 241). Cependant, nous avons démontré que l'induction d'UGT2B17, ainsi que les changements transcriptomiques associés à cette induction peuvent altérer la réponse cellulaire à divers médicaments. Cela ajoute à la pertinence d'étudier cette enzyme dans un contexte de prédiction de la réponse thérapeutique, car UGT2B17 pourrait réduire la réponse à certains substrats via sa fonction enzymatique, mais pourrait aussi altérer la réponse à des médicaments n'étant pas des substrats par l'entremise des changements transcriptomiques et métaboliques. Une analyse plus ciblée de l'interaction entre UGT2B17 et AMPK pourrait améliorer notre compréhension du rôle d'UGT2B17 dans la leucémie et l'impact de cette interaction sur la réponse à la thérapie.

Plusieurs des facteurs connus influençant significativement la réponse aux médicaments dépendent de l'évolution clonale constante qui a lieu lors de la progression de la LLC. Certains patients subissent une réduction balancée de toutes les populations clonales après traitement, tandis que d'autres subissent une sélection favorisant la dominance de clones agressifs portant des mutations ou des délétions du gène TP53 (55,70). Ce phénomène se produit surtout lors du traitement à base de fludarabine, mais ne se reproduit pas lors du traitement ibrutinib (55,70). Cela suggère que les dynamiques clonales lors du traitement ibrutinib ne favorisent pas la dominance d'un clone résistant à ce traitement, appuyant l'efficacité de l'ibrutinib pour les sous-groupes de patients ayant des caractéristiques moléculaires agressives. Certaines mutations somatiques ancestrales dans les cellules leucémiques de patients sous traitement ibrutinib affectent la signalisation NF- κ B, un facteur

de transcription révélé comme étant un régulateur potentiel de l'expression UGT2B17 par mes résultats (70). Les changements d'expression UGT2B17 pendant l'évolution clonale ne sont pas connues, des clones ayant une signalisation NF- κ B aberrante pourraient donc être ceux qui ont aussi une forte expression UGT2B17. D'ailleurs, cela pourrait expliquer, du moins en partie, le pronostic défavorable associé à la forte expression UGT2B17, car la voie NF- κ B est une voie majeure impliquée dans la progression de la maladie (18,242). Une forte expression UGT2B17 pourrait alors être indicative d'une signalisation NF- κ B accrue, tout en ayant des conséquences fonctionnelles sur la prolifération et sur la réponse au traitement. Il pourrait être informatif de mesurer l'expression en ARN d'*UGT2B17* au niveau clinique pour estimer le parcours des patients ayant la LLC. La mesure de son expression cellulaire par cytométrie ou bien la détection d'une délétion complète par PCR de l'ADN génomique pourrait être envisagée afin de compléter les modèles pronostiques et prédictifs actuels. L'identification de traitements qui peuvent préférentiellement cibler des cellules ayant des niveaux élevés d'UGT2B17 pourrait mener à de nouvelles thérapies ou une amélioration des régimes combinés actuels.

Conclusion

Plusieurs questions importantes quant au rôle d'UGT2B17 dans la LLC demeurent non répondues. Mes travaux réussissent tout de même à éclaircir des pistes de mécanismes biologiques pouvant expliquer nos observations cliniques en lien avec UGT2B17. Mes travaux ont révélé plusieurs avenues intéressantes pour continuer la caractérisation des effets d'UGT2B17 dans la LLC, telles que le métabolisme des eicosanoïdes, l'association entre UGT2B17 et les voies AMPK et NF- κ B, la régulation d'UGT2B17 via un promoteur alternatif dans les cellules B, et les perturbations hormonales et métaboliques associées à la LLC et l'influence d'UGT2B17 sur celles-ci. L'accès privilégié à certaines banques de spécimens ou à des données moléculaires telles que les échantillons du groupe autrichien ou les données des études MILES et ICGC ont grandement aidé à tester nos hypothèses. Malgré les avantages offerts par ces sources d'information, ces données n'étaient pas parfaitement adaptées pour répondre à toutes nos questions de recherche au cours de ce projet. Une étude prospective longitudinale, incluant des spécimens récoltés au diagnostic, à l'initiation du traitement, et post-traitement, à des intervalles réguliers, serait indispensable pour questionner le rôle d'UGT2B17 et des stéroïdes dans la LLC. La nature incomplète des données publiques était un obstacle lors des analyses menées dans le cadre de ce projet, une étude de ce type ayant des données moléculaires de qualité serait donc un atout.

En conclusion, les résultats soulignés ci-dessus suggèrent un rôle fonctionnel pour UGT2B17 dans la LLC. Au-delà de son rôle de biomarqueur, nous avons démontré que son expression au niveau des cellules leucémiques peut engendrer des conséquences moléculaires et phénotypiques pouvant favoriser une maladie progressive et une réduction de la réponse à certains traitements. Aussi, les mécanismes moléculaires mis en lumière dans le cadre de mes travaux, en lien avec UGT2B17, peuvent révéler des susceptibilités pouvant être exploitées lors du design de nouveaux médicaments ou de nouveaux régimes thérapeutiques combinés.

Bibliographie

1. Gruber M, Bellemare J, Hoermann G, Gleiss A, Porpaczy E, Bilban M, *et al.* Overexpression of uridine diphospho glucuronosyltransferase 2B17 in high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2013**;121(7):1175-83 doi 10.1182/blood-2012-08-447359.
2. Bhoi S, Baliakas P, Cortese D, Mattsson M, Engvall M, Smedby KE, *et al.* UGT2B17 expression: a novel prognostic marker within IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica* **2016**;101(2):e63-5 doi 10.3324/haematol.2015.136440.
3. Zhong Y, Byrd JC. UGT2B17 as a disease accelerator in CLL. *Blood* **2013**;121(7):1067-8 doi 10.1182/blood-2012-12-469965.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians* **2009**;59(4):225-49 doi 10.3322/caac.20006.
5. Chen Q, Jain N, Ayer T, Wierda WG, Flowers CR, O'Brien SM, *et al.* Economic Burden of Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Oral Targeted Therapies in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2017**;35(2):166-74 doi 10.1200/JCO.2016.68.2856.
6. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **2017**;31(2):282-91 doi 10.1038/leu.2016.322.
7. Rossi D, Gaidano G. Biological and clinical significance of stereotyped B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **2010**;95(12):1992-5 doi 10.3324/haematol.2010.033241.
8. Minici C, Gounari M, Ubelhart R, Scarfo L, Duhren-von Minden M, Schneider D, *et al.* Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature communications* **2017**;8:15746 doi 10.1038/ncomms15746.
9. Garcia-Munoz R, Galiacho VR, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Annals of hematology* **2012**;91(7):981-96 doi 10.1007/s00277-012-1460-z.
10. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **1999**;94(6):1848-54.
11. 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. *The Journal of experimental medicine* **2001**;194(11):1625-38.
12. Oakes CC, Seifert M, Assenov Y, Gu L, Przekopowicz M, Ruppert AS, *et al.* DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease

- phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics* **2016**;48(3):253-64 doi 10.1038/ng.3488.
13. 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. *The Journal of clinical investigation* **2005**;115(3):755-64 doi 10.1172/JCI23409.
 14. Decker T, Schneller F, Hipp S, Miething C, Jahn T, Duyster J, *et al.* Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia* **2002**;16(3):327-34 doi 10.1038/sj.leu.2402389.
 15. O'Brien S, del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **1995**;85(2):307-18.
 16. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* **2006**;107(5):1761-7 doi 10.1182/blood-2005-08-3182.
 17. Munk Pedersen I, Reed J. Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leukemia & lymphoma* **2004**;45(12):2365-72 doi 10.1080/10428190412331272703.
 18. Herishanu Y, Perez-Galan 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**;117(2):563-74 doi 10.1182/blood-2010-05-284984.
 19. Obermann EC, Went P, Tzankov A, Pileri SA, Hofstaedter F, Marienhagen J, *et al.* Cell cycle phase distribution analysis in chronic lymphocytic leukaemia: a significant number of cells reside in early G1-phase. *Journal of clinical pathology* **2007**;60(7):794-7 doi 10.1136/jcp.2006.040956.
 20. 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**;91(7):2387-96.
 21. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *British journal of haematology* **1996**;92(1):97-103.
 22. Ghia P, Circosta P, Scielzo C, Vallario A, Camporeale A, Granziero L, *et al.* Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Current topics in microbiology and immunology* **2005**;294:135-45.
 23. Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *The Journal of experimental medicine* **1993**;177(4):925-35.

24. 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**;101(5):1962-9 doi 10.1182/blood-2002-05-1339.
25. 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**;96(8):2655-63.
26. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* **2011**;117(6):1781-91 doi 10.1182/blood-2010-07-155663.
27. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer* **2010**;10(1):37-50 doi 10.1038/nrc2764.
28. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richards SJ, *et al.* Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* **2002**;100(7):2289-90 doi 10.1182/blood-2002-03-0892.
29. Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, *et al.* Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *The Journal of clinical investigation* **2005**;115(6):1636-43 doi 10.1172/JCI24387.
30. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, *et al.* B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* **2002**;99(11):4087-93.
31. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annual review of immunology* **2003**;21:841-94 doi 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141018.
32. 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. *The Journal of experimental medicine* **2001**;194(11):1639-47.
33. Shanafelt TD, Rabe KG, Kay NE, Zent CS, Jelinek DF, Reinalda MS, *et al.* Age at diagnosis and the utility of prognostic testing in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **2010**;116(20):4777-87 doi 10.1002/cncr.25292.
34. Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia: planning for an aging population. *Expert review of anticancer therapy* **2010**;10(9):1389-94 doi 10.1586/era.10.127.
35. Houlston RS, Sellick G, Yuille M, Matutes E, Catovsky D. Causation of chronic lymphocytic leukemia--insights from familial disease. *Leukemia research* **2003**;27(10):871-6.

36. Zhao Y, Wang Y, Ma S. Racial Differences in Four Leukemia Subtypes: Comprehensive Descriptive Epidemiology. *Scientific reports* **2018**;8(1):548 doi 10.1038/s41598-017-19081-4.
37. Gale RP, Cozen W, Goodman MT, Wang FF, Bernstein L. Decreased chronic lymphocytic leukemia incidence in Asians in Los Angeles County. *Leukemia research* **2000**;24(8):665-9.
38. Pan JW, Cook LS, Schwartz SM, Weis NS. Incidence of leukemia in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer causes & control : CCC* **2002**;13(9):791-5.
39. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics, 2017*. CA: a cancer journal for clinicians **2017**;67(1):7-30 doi 10.3322/caac.21387.
40. 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. *British journal of haematology* **1989**;72(2):141-9.
41. Kristinsson SY, Dickman PW, Wilson WH, Caporaso N, Bjorkholm M, Landgren O. Improved survival in chronic lymphocytic leukemia in the past decade: a population-based study including 11,179 patients diagnosed between 1973-2003 in Sweden. *Haematologica* **2009**;94(9):1259-65 doi 10.3324/haematol.2009.007849.
42. Catovsky D, Wade R, Else M. The clinical significance of patients' sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **2014**;99(6):1088-94 doi 10.3324/haematol.2013.101378.
43. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **1999**;94(6):1840-7.
44. Crowther-Swanepoel D, Wild R, Sellick G, Dyer MJ, Mauro FR, Cuthbert RJ, *et al.* Insight into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) through analysis of IgVH gene usage and mutation status in familial CLL. *Blood* **2008**;111(12):5691-3 doi 10.1182/blood-2008-03-142349.
45. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, *et al.* iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* **2018**;131(25):2745-60 doi 10.1182/blood-2017-09-806398.
46. Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood* **2015**;126(4):454-62 doi 10.1182/blood-2015-02-585059.
47. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N, *et al.* Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *British journal of haematology* **2005**;130(3):325-32 doi 10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x.

48. Barrio S, Shanafelt TD, Ojha J, Chaffee KG, Secreto C, Kortum KM, *et al.* Genomic characterization of high-count MBL cases indicates that early detection of driver mutations and subclonal expansion are predictors of adverse clinical outcome. *Leukemia* **2017**;31(1):170-6 doi 10.1038/leu.2016.172.
49. Rawstron AC, Shanafelt T, Lanasa MC, Landgren O, Hanson C, Orfao A, *et al.* Different biology and clinical outcome according to the absolute numbers of clonal B-cells in monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Cytometry Part B, Clinical cytometry* **2010**;78 Suppl 1:S19-23 doi 10.1002/cyto.b.20533.
50. Crowther-Swanepoel D, Corre T, Lloyd A, Gaidano G, Olver B, Bennett FL, *et al.* Inherited genetic susceptibility to monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood* **2010**;116(26):5957-60 doi 10.1182/blood-2010-07-294975.
51. Binet JL, Leparrier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, *et al.* A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer* **1977**;40(2):855-64.
52. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **1975**;46(2):219-34.
53. Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood* **2010**;115(2):187-97 doi 10.1182/blood-2009-08-207126.
54. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**;99(24):15524-9 doi 10.1073/pnas.242606799.
55. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, *et al.* Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* **2013**;152(4):714-26 doi 10.1016/j.cell.2013.01.019.
56. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **2000**;343(26):1910-6 doi 10.1056/NEJM200012283432602.
57. Winkler D, Schneider C, Krober A, Pasqualucci L, Lichter P, Dohner H, *et al.* Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* **2005**;19(7):1211-5 doi 10.1038/sj.leu.2403778.
58. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, *et al.* NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* **2012**;119(2):329-31 doi 10.1182/blood-2011-10-386144.
59. Delgado J, Espinet B, Oliveira AC, Abrisqueta P, de la Serna J, Collado R, *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *British journal of haematology* **2012**;157(1):67-74 doi 10.1111/j.1365-2141.2011.09000.x.

60. Wawrzyniak E, Kotkowska A, Blonski JZ, Siemieniuk-Rys M, Ziolkowska E, Giannopoulos K, *et al.* Clonal evolution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance. *European journal of haematology* **2014**;92(2):91-101 doi 10.1111/ejh.12215.
61. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed research international* **2014**;2014:435983 doi 10.1155/2014/435983.
62. Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, *et al.* Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* **2009**;114(13):2589-97 doi 10.1182/blood-2009-05-224071.
63. Yu L, Kim HT, Kasar S, Benien P, Du W, Hoang K, *et al.* Survival of Del17p CLL Depends on Genomic Complexity and Somatic Mutation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2017**;23(3):735-45 doi 10.1158/1078-0432.CCR-16-0594.
64. Valganon M, Giraldo P, Agirre X, Larrayoz 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. *British journal of haematology* **2005**;129(1):53-9 doi 10.1111/j.1365-2141.2005.05405.x.
65. Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, *et al.* p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* **1995**;85(6):1580-9.
66. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do KA, *et al.* Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2011**;29(31):4088-95 doi 10.1200/JCO.2010.33.9002.
67. 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**;119(12):2854-62 doi 10.1182/blood-2011-12-395673.
68. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **2015**;526(7574):525-30 doi 10.1038/nature15395.
69. Lazarian G, Guieze R, Wu CJ. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2017**;35(9):984-93 doi 10.1200/JCO.2016.71.0822.
70. Landau DA, Sun C, Rosebrock D, Herman SEM, Fein J, Sivina M, *et al.* The evolutionary landscape of chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib

- targeted therapy. *Nature communications* **2017**;8(1):2185 doi 10.1038/s41467-017-02329-y.
71. Falay M, Ceran F, Gunes AK, Dagdas S, Ayli M, Ozet G. CD38 Expression and Variation as a Prognostic Factor Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical laboratory* **2016**;62(7):1287-93 doi 10.7754/Clin.Lab.2015.151125.
 72. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, *et al.* ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* **2003**;101(12):4944-51 doi 10.1182/blood-2002-10-3306.
 73. Cui B, Ghia EM, Chen L, Rassenti LZ, DeBoever C, Widhopf GF, 2nd, *et al.* High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2016**;128(25):2931-40 doi 10.1182/blood-2016-04-712562.
 74. Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C, Jeannel D, Vuillier F, Legarff-Tavernier M, *et al.* The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2005**;106(2):650-7 doi 10.1182/blood-2004-08-3344.
 75. Nuckel H, Huttmann A, Klein-Hitpass L, Schroers R, Fuhrer A, Sellmann L, *et al.* Lipoprotein lipase expression is a novel prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* **2006**;47(6):1053-61 doi 10.1080/10428190500464161.
 76. Knauf WU, Lissitchkov T, Aldaoud A, Liberati AM, Loscertales J, Herbrecht R, *et al.* Bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia: updated results of a randomized phase III trial. *British journal of haematology* **2012**;159(1):67-77 doi 10.1111/bjh.12000.
 77. Ricci F, Tedeschi A, Morra E, Montillo M. Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Therapeutics and clinical risk management* **2009**;5(1):187-207.
 78. Di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, Bassan R, Rambaldi A, Golay J, *et al.* Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *British journal of haematology* **2001**;114(4):800-9.
 79. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, *et al.* Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* **2016**;127(2):208-15 doi 10.1182/blood-2015-06-651125.
 80. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *Journal of immunology* **1980**;125(4):1678-85.
 81. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, *et al.* Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **1994**;83(2):435-45.

82. Jaglowski SM, Alinari L, Lapalombella R, Muthusamy N, Byrd JC. The clinical application of monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2010**;116(19):3705-14 doi 10.1182/blood-2010-04-001230.
83. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine* **2013**;19(2):202-8 doi 10.1038/nm.3048.
84. Itchaki G, Brown JR. Lenalidomide in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert opinion on investigational drugs* **2017**;26(5):633-50 doi 10.1080/13543784.2017.1313230.
85. 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**;116(12):2078-88 doi 10.1182/blood-2010-02-271171.
86. Lampson BL, Kasar SN, Matos TR, Morgan EA, Rassenti L, Davids MS, *et al.* Idelalisib given front-line for treatment of chronic lymphocytic leukemia causes frequent immune-mediated hepatotoxicity. *Blood* **2016**;128(2):195-203 doi 10.1182/blood-2016-03-707133.
87. Aw A, Brown JR. Current Status of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Development and Use in B-Cell Malignancies. *Drugs & aging* **2017**;34(7):509-27 doi 10.1007/s40266-017-0468-4.
88. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, *et al.* Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine* **1998**;338(21):1506-14 doi 10.1056/NEJM199805213382104.
89. Farooqui MZ, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, *et al.* Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *The Lancet Oncology* **2015**;16(2):169-76 doi 10.1016/S1470-2045(14)71182-9.
90. Jain N, O'Brien S. Initial treatment of CLL: integrating biology and functional status. *Blood* **2015**;126(4):463-70 doi 10.1182/blood-2015-04-585067.
91. Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. *Blood cancer journal* **2018**;8(10):93 doi 10.1038/s41408-018-0131-2.
92. van Gelder M, de Wreede LC, Bornhauser M, Niederwieser D, Karas M, Anderson NS, *et al.* Long-term survival of patients with CLL after allogeneic transplantation: a report from the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone marrow transplantation* **2017**;52(3):372-80 doi 10.1038/bmt.2016.282.
93. Gribben JG. How and when I do allogeneic transplant in CLL. *Blood* **2018**;132(1):31-9 doi 10.1182/blood-2018-01-785998.

94. Marostica E, Sukbuntherng J, Loury D, de Jong J, de Trixhe XW, Vermeulen A, *et al.* Population pharmacokinetic model of ibrutinib, a Bruton tyrosine kinase inhibitor, in patients with B cell malignancies. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2015**;75(1):111-21 doi 10.1007/s00280-014-2617-3.
95. Gandhi V, Plunkett W. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clinical pharmacokinetics* **2002**;41(2):93-103 doi 10.2165/00003088-200241020-00002.
96. Boogaerts MA, Van Hoof A, Catovsky D, Kovacs M, Montillo M, Zinzani PL, *et al.* Activity of oral fludarabine phosphate in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2001**;19(22):4252-8 doi 10.1200/JCO.2001.19.22.4252.
97. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **2013**;369(1):32-42 doi 10.1056/NEJMoa1215637.
98. Jin F, Robeson M, Zhou H, Moyer C, Wilbert S, Murray B, *et al.* Clinical drug interaction profile of idelalisib in healthy subjects. *Journal of clinical pharmacology* **2015**;55(8):909-19 doi 10.1002/jcph.495.
99. Ramanathan S, Jin F, Sharma S, Kearney BP. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Idelalisib. *Clinical pharmacokinetics* **2016**;55(1):33-45 doi 10.1007/s40262-015-0304-0.
100. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, *et al.* Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2014**;123(22):3390-7 doi 10.1182/blood-2013-11-535047.
101. Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, *et al.* Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenetics and genomics* **2005**;15(10):677-85.
102. Guillemette C, Levesque E, Rouleau M. Pharmacogenomics of human uridine diphospho-glucuronosyltransferases and clinical implications. *Clinical pharmacology and therapeutics* **2014**;96(3):324-39 doi 10.1038/clpt.2014.126.
103. Belledant A, Hovington H, Garcia L, Caron P, Brisson H, Villeneuve L, *et al.* The UGT2B28 Sex-steroid Inactivation Pathway Is a Regulator of Steroidogenesis and Modifies the Risk of Prostate Cancer Progression. *European urology* **2016**;69(4):601-9 doi 10.1016/j.eururo.2015.06.054.
104. Turgeon D, Carrier JS, Levesque E, Beatty BG, Belanger A, Hum DW. Isolation and characterization of the human UGT2B15 gene, localized within a cluster of UGT2B genes and pseudogenes on chromosome 4. *Journal of molecular biology* **2000**;295(3):489-504 doi 10.1006/jmbi.1999.3374.
105. Ohno S, Nakajin S. Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug metabolism and*

- disposition: the biological fate of chemicals **2009**;37(1):32-40 doi 10.1124/dmd.108.023598.
106. Court MH, Zhang X, Ding X, Yee KK, Hesse LM, Finel M. Quantitative distribution of mRNAs encoding the 19 human UDP-glucuronosyltransferase enzymes in 26 adult and 3 fetal tissues. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **2012**;42(3):266-77 doi 10.3109/00498254.2011.618954.
 107. Tourancheau A, Rouleau M, Guauque-Olarte S, Villeneuve L, Gilbert I, Droit A, *et al.* Quantitative profiling of the UGT transcriptome in human drug-metabolizing tissues. *The pharmacogenomics journal* **2018**;18(2):251-61 doi 10.1038/tpj.2017.5.
 108. Beaulieu M, Levesque E, Hum DW, Belanger A. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a human UDP-glucuronosyltransferase active on C19 steroids. *The Journal of biological chemistry* **1996**;271(37):22855-62.
 109. Jones NR, Lazarus P. UGT2B gene expression analysis in multiple tobacco carcinogen-targeted tissues. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2014**;42(4):529-36 doi 10.1124/dmd.113.054718.
 110. Bhatt DK, Basit A, Zhang H, Gaedigk A, Lee SB, Claw KG, *et al.* Hepatic Abundance and Activity of Androgen- and Drug-Metabolizing Enzyme UGT2B17 Are Associated with Genotype, Age, and Sex. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2018**;46(6):888-96 doi 10.1124/dmd.118.080952.
 111. Hu DG, Selth LA, Tarulli GA, Meech R, Wijayakumara D, Chanawong A, *et al.* Androgen and Estrogen Receptors in Breast Cancer Coregulate Human UDP-Glucuronosyltransferases 2B15 and 2B17. *Cancer research* **2016**;76(19):5881-93 doi 10.1158/0008-5472.CAN-15-3372.
 112. Gregory PA, Mackenzie PI. The homeodomain Pbx2-Prep1 complex modulates hepatocyte nuclear factor 1alpha-mediated activation of the UDP-glucuronosyltransferase 2B17 gene. *Molecular pharmacology* **2002**;62(1):154-61.
 113. Gregory PA, Hansen AJ, Mackenzie PI. Tissue specific differences in the regulation of the UDP glucuronosyltransferase 2B17 gene promoter. *Pharmacogenetics* **2000**;10(9):809-20.
 114. Hu DG, Mackenzie PI. Estrogen receptor alpha, fos-related antigen-2, and c-Jun coordinately regulate human UDP glucuronosyltransferase 2B15 and 2B17 expression in response to 17beta-estradiol in MCF-7 cells. *Molecular pharmacology* **2009**;76(2):425-39 doi 10.1124/mol.109.057380.
 115. Beaulieu M, Levesque E, Tchernof A, Beatty BG, Belanger A, Hum DW. Chromosomal localization, structure, and regulation of the UGT2B17 gene, encoding a C19 steroid metabolizing enzyme. *DNA and cell biology* **1997**;16(10):1143-54 doi 10.1089/dna.1997.16.1143.
 116. Levesque E, Beaulieu M, Guillemette C, Hum DW, Belanger A. Effect of interleukins on UGT2B15 and UGT2B17 steroid uridine diphosphate-glucuronosyltransferase

- expression and activity in the LNCaP cell line. *Endocrinology* **1998**;139(5):2375-81 doi 10.1210/endo.139.5.6001.
117. Bao BY, Chuang BF, Wang Q, Sartor O, Balk SP, Brown M, *et al.* Androgen receptor mediates the expression of UDP-glucuronosyltransferase 2 B15 and B17 genes. *The Prostate* **2008**;68(8):839-48 doi 10.1002/pros.20749.
 118. Guillemette C, Hum DW, Belanger A. Regulation of steroid glucuronosyltransferase activities and transcripts by androgen in the human prostatic cancer LNCaP cell line. *Endocrinology* **1996**;137(7):2872-9 doi 10.1210/endo.137.7.8770908.
 119. Chouinard S, Pelletier G, Belanger A, Barbier O. Isoform-specific regulation of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 2B enzymes in the human prostate: differential consequences for androgen and bioactive lipid inactivation. *Endocrinology* **2006**;147(11):5431-42 doi 10.1210/en.2006-0229.
 120. Wijayakumara DD, Hu DG, Meech R, McKinnon RA, Mackenzie PI. Regulation of Human UGT2B15 and UGT2B17 by miR-376c in Prostate Cancer Cell Lines. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2015**;354(3):417-25 doi 10.1124/jpet.115.226118.
 121. Margailan G, Levesque E, Guillemette C. Epigenetic regulation of steroid inactivating UDP-glucuronosyltransferases by microRNAs in prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **2016**;155(Pt A):85-93 doi 10.1016/j.jsbmb.2015.09.021.
 122. Hu DG, Gardner-Stephen D, Severi G, Gregory PA, Treloar J, Giles GG, *et al.* A novel polymorphism in a forkhead box A1 (FOXA1) binding site of the human UDP glucuronosyltransferase 2B17 gene modulates promoter activity and is associated with altered levels of circulating androstane-3 α ,17 β -diol glucuronide. *Molecular pharmacology* **2010**;78(4):714-22 doi 10.1124/mol.110.065953.
 123. Xue Y, Sun D, Daly A, Yang F, Zhou X, Zhao M, *et al.* Adaptive evolution of UGT2B17 copy-number variation. *American journal of human genetics* **2008**;83(3):337-46 doi 10.1016/j.ajhg.2008.08.004.
 124. McCarroll SA, Bradner JE, Turpeinen H, Volin L, Martin PJ, Chilewski SD, *et al.* Donor-recipient mismatch for common gene deletion polymorphisms in graft-versus-host disease. *Nature genetics* **2009**;41(12):1341-4 doi 10.1038/ng.490.
 125. Jervis S, Collins P, Tate D, Foster L, Bowman V, Adhern C, *et al.* Increased severity of acute graft versus host disease as a result of differential expression following a homozygous gene deletion. *International journal of immunogenetics* **2013**;40(2):116-9 doi 10.1111/j.1744-313X.2012.01138.x.
 126. Santos N, Rodriguez-Romanos R, Nieto JB, Buno I, Vallejo C, Jimenez-Velasco A, *et al.* UGT2B17 minor histocompatibility mismatch and clinical outcome after HLA-identical sibling donor stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* **2016**;51(1):79-82 doi 10.1038/bmt.2015.207.

127. Chouinard S, Barbier O, Belanger A. UDP-glucuronosyltransferase 2B15 (UGT2B15) and UGT2B17 enzymes are major determinants of the androgen response in prostate cancer LNCaP cells. *The Journal of biological chemistry* **2007**;282(46):33466-74 doi 10.1074/jbc.M703370200.
128. Turgeon D, Chouinard S, Belanger P, Picard S, Labbe JF, Borgeat P, *et al.* Glucuronidation of arachidonic and linoleic acid metabolites by human UDP-glucuronosyltransferases. *Journal of lipid research* **2003**;44(6):1182-91 doi 10.1194/jlr.M300010-JLR200.
129. Balliet RM, Chen G, Gallagher CJ, Dellinger RW, Sun D, Lazarus P. Characterization of UGTs active against SAHA and association between SAHA glucuronidation activity phenotype with UGT genotype. *Cancer research* **2009**;69(7):2981-9 doi 10.1158/0008-5472.CAN-08-4143.
130. Zhang H, Soikkeli A, Tolonen A, Rousu T, Hirvonen J, Finel M. Highly variable pH effects on the interaction of diclofenac and indomethacin with human UDP-glucuronosyltransferases. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **2012**;26(8):1286-93 doi 10.1016/j.tiv.2012.01.005.
131. Sun D, Chen G, Dellinger RW, Sharma AK, Lazarus P. Characterization of 17-dihydroexemestane glucuronidation: potential role of the UGT2B17 deletion in exemestane pharmacogenetics. *Pharmacogenetics and genomics* **2010**;20(10):575-85 doi 10.1097/FPC.0b013e32833b04af.
132. Loureiro AI, Fernandes-Lopes C, Bonifacio MJ, Wright LC, Soares-da-Silva P. Hepatic UDP-glucuronosyltransferase is responsible for eslicarbazepine glucuronidation. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2011**;39(9):1486-94 doi 10.1124/dmd.111.038620.
133. Ma L, Sun J, Peng Y, Zhang R, Shao F, Hu X, *et al.* Glucuronidation of edaravone by human liver and kidney microsomes: biphasic kinetics and identification of UGT1A9 as the major UDP-glucuronosyltransferase isoform. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2012**;40(4):734-41 doi 10.1124/dmd.111.043356.
134. Mano Y, Usui T, Kamimura H. The UDP-glucuronosyltransferase 2B7 isozyme is responsible for gemfibrozil glucuronidation in the human liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2007**;35(11):2040-4 doi 10.1124/dmd.107.017269.
135. Chen G, Giambrone NE, Jr., Dluzen DF, Muscat JE, Berg A, Gallagher CJ, *et al.* Glucuronidation genotypes and nicotine metabolic phenotypes: importance of functional UGT2B10 and UGT2B17 polymorphisms. *Cancer research* **2010**;70(19):7543-52 doi 10.1158/0008-5472.CAN-09-4582.
136. Schwaninger AE, Meyer MR, Zapp J, Maurer HH. The role of human UDP-glucuronosyltransferases on the formation of the methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) phase II metabolites R- and S-3-methoxymethamphetamine 4-O-

- glucuronides. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2009**;37(11):2212-20 doi 10.1124/dmd.109.029215.
137. Turgeon D, Carrier JS, Chouinard S, Belanger A. Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2003**;31(5):670-6.
 138. Li H, Xie N, Chen R, Verreault M, Fazli L, Gleave ME, *et al.* UGT2B17 Expedites Progression of Castration-Resistant Prostate Cancers by Promoting Ligand-Independent AR Signaling. *Cancer research* **2016**;76(22):6701-11 doi 10.1158/0008-5472.CAN-16-1518.
 139. Paquet S, Fazli L, Grosse L, Verreault M, Tetu B, Rennie PS, *et al.* Differential expression of the androgen-conjugating UGT2B15 and UGT2B17 enzymes in prostate tumor cells during cancer progression. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2012**;97(3):E428-32 doi 10.1210/jc.2011-2064.
 140. Kpoghomou MA, Soatiana JE, Kalembo FW, Bishwajit G, Sheng W. UGT2B17 Polymorphism and Risk of Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *ISRN oncology* **2013**;2013:465916 doi 10.1155/2013/465916.
 141. Nadeau G, Bellemare J, Audet-Walsh E, Flageole C, Huang SP, Bao BY, *et al.* Deletions of the androgen-metabolizing UGT2B genes have an effect on circulating steroid levels and biochemical recurrence after radical prostatectomy in localized prostate cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2011**;96(9):E1550-7 doi 10.1210/jc.2011-1049.
 142. Gallagher CJ, Muscat JE, Hicks AN, Zheng Y, Dyer AM, Chase GA, *et al.* The UDP-glucuronosyltransferase 2B17 gene deletion polymorphism: sex-specific association with urinary 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol glucuronidation phenotype and risk for lung cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **2007**;16(4):823-8 doi 10.1158/1055-9965.EPI-06-0823.
 143. Gruber M, Le T, Filipits M, Gsur A, Mannhalter C, Jager U, *et al.* UDP-glucuronosyltransferase 2B17 genotype and the risk of lung cancer among Austrian Caucasians. *Cancer epidemiology* **2013**;37(5):625-8 doi 10.1016/j.canep.2013.06.004.
 144. Trigunaite A, Dimo J, Jorgensen TN. Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cellular immunology* **2015**;294(2):87-94 doi 10.1016/j.cellimm.2015.02.004.
 145. Ladikou EE, Kassi E. The emerging role of estrogen in B cell malignancies. *Leukemia & lymphoma* **2017**;58(3):528-39 doi 10.1080/10428194.2016.1213828.
 146. Yakimchuk K, Norin S, Kimby E, Hagglund H, Warner M, Gustafsson JA. Up-regulated estrogen receptor beta2 in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* **2012**;53(1):139-44 doi 10.3109/10428194.2011.605187.

147. Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunology letters* **2005**;97(1):107-13 doi 10.1016/j.imlet.2004.10.007.
148. Melo N, Hobday C, Dowsett M, Catovsky D, Matutes E, Morilla R, *et al.* Oestrogen receptor (ER) analysis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation of biochemical and immunocytochemical methods. *Leukemia research* **1990**;14(11-12):949-52.
149. Hasni MS, Yakimchuk K. Expression and Effects of Ligand-activated Estrogen Receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Anticancer research* **2019**;39(1):167-72 doi 10.21873/anticancer.13093.
150. Altuwajri S, Chuang KH, Lai KP, Lai JJ, Lin HY, Young FM, *et al.* Susceptibility to autoimmunity and B cell resistance to apoptosis in mice lacking androgen receptor in B cells. *Molecular endocrinology* **2009**;23(4):444-53 doi 10.1210/me.2008-0106.
151. Lai JJ, Lai KP, Zeng W, Chuang KH, Altuwajri S, Chang C. Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: lessons from conditional AR knockout mice. *The American journal of pathology* **2012**;181(5):1504-12 doi 10.1016/j.ajpath.2012.07.008.
152. Viselli SM, Reese KR, Fan J, Kovacs WJ, Olsen NJ. Androgens alter B cell development in normal male mice. *Cellular immunology* **1997**;182(2):99-104 doi 10.1006/cimm.1997.1227.
153. Mostaghel EA, Martin PS, Mongovin S, Frayo S, Zhang A, Edlefsen KL, *et al.* Androgen receptor expression in mantle cell lymphoma: Potential novel therapeutic implications. *Experimental hematology* **2017**;49:34-8 e2 doi 10.1016/j.exphem.2017.01.001.
154. Yang H, Chen CM, Yan P, Huang TH, Shi H, Burger M, *et al.* The androgen receptor gene is preferentially hypermethylated in follicular non-Hodgkin's lymphomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2003**;9(11):4034-42.
155. Everaus H. Hormones and immune responsiveness in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* **1992**;8(6):483-9 doi 10.3109/10428199209051031.
156. Edavana VK, Penney RB, Yao-Borengasser A, Williams S, Rogers L, Dhakal IB, *et al.* Fulvestrant up regulates UGT1A4 and MRPs through ERalpha and c-Myb pathways: a possible primary drug disposition mechanism. *SpringerPlus* **2013**;2:620 doi 10.1186/2193-1801-2-620.
157. Zahreddine HA, Culjkovic-Kraljacic B, Assouline S, Gendron P, Romeo AA, Morris SJ, *et al.* The sonic hedgehog factor GLI1 imparts drug resistance through inducible glucuronidation. *Nature* **2014**;511(7507):90-3 doi 10.1038/nature13283.
158. Dellinger RW, Matundan HH, Ahmed AS, Duong PH, Meyskens FL, Jr. Anti-cancer drugs elicit re-expression of UDP-glucuronosyltransferases in melanoma cells. *PloS one* **2012**;7(10):e47696 doi 10.1371/journal.pone.0047696.

159. Basseville A, Preisser L, de Carne Trecesson S, Boisdron-Celle M, Gamelin E, Coqueret O, *et al.* Irinotecan induces steroid and xenobiotic receptor (SXR) signaling to detoxification pathway in colon cancer cells. *Molecular cancer* **2011**;10:80 doi 10.1186/1476-4598-10-80.
160. de Almagro MC, Selga E, Thibaut R, Porte C, Noe V, Ciudad CJ. UDP-glucuronosyltransferase 1A6 overexpression in breast cancer cells resistant to methotrexate. *Biochemical pharmacology* **2011**;81(1):60-70 doi 10.1016/j.bcp.2010.09.008.
161. Selga E, Oleaga C, Ramirez S, de Almagro MC, Noe V, Ciudad CJ. Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate. *Genome medicine* **2009**;1(9):83 doi 10.1186/gm83.
162. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, *et al.* MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res* **1999**;23(2):127-36.
163. 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**;121(8):1403-12 doi 10.1182/blood-2012-09-458265.
164. Nabhan C, Raca G, Wang YL. Predicting Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Contemporary Era. *JAMA oncology* **2015**;1(7):965-74 doi 10.1001/jamaoncol.2015.0779.
165. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* **2007**;109(5):2032-9 doi 10.1182/blood-2006-03-011759.
166. 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**;100(13):4609-14 doi 10.1182/blood-2002-06-1683.
167. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, *et al.* ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2005**;105(5):2036-41 doi 10.1182/blood-2004-05-1715.
168. Chen L, Huynh L, Apgar J, Tang L, Rassenti L, Weiss A, *et al.* ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2008**;111(5):2685-92 doi 10.1182/blood-2006-12-062265.
169. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood* **2011**;118(13):3470-8 doi 10.1182/blood-2011-06-275610.
170. Yu J, Chen L, Chen Y, Hasan MK, Ghia EM, Zhang L, *et al.* Wnt5a induces ROR1 to associate with 14-3-3zeta for enhanced chemotaxis and proliferation of chronic

- lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **2017**;31(12):2608-14 doi 10.1038/leu.2017.132.
171. Montserrat E. CLL therapy: the increasing importance of predictive markers. *Oncology* **2012**;26(11):1064-6.
 172. Stephens DM, Byrd JC. Chronic lymphocytic leukemia with del(17p13.1): a distinct clinical subtype requiring novel treatment approaches. *Oncology* **2012**;26(11):1044-54.
 173. Olsen NJ, Gu X, Kovacs WJ. Bone marrow stromal cells mediate androgenic suppression of B lymphocyte development. *The Journal of clinical investigation* **2001**;108(11):1697-704 doi 10.1172/JCI13183.
 174. Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS, Moussai D, Diamond B. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *The Journal of clinical investigation* **2002**;109(12):1625-33 doi 10.1172/JCI14873.
 175. Venkatesh J, Peeva E, Xu X, Diamond B. Cutting Edge: Hormonal milieu, not antigenic specificity, determines the mature phenotype of autoreactive B cells. *Journal of immunology* **2006**;176(6):3311-4 doi 10.4049/jimmunol.176.6.3311.
 176. Hill L, Jeganathan V, Chinnasamy P, Grimaldi C, Diamond B. Differential roles of estrogen receptors alpha and beta in control of B-cell maturation and selection. *Molecular medicine* **2011**;17(3-4):211-20 doi 10.2119/molmed.2010.00172.
 177. Lippert TH, Seeger H, Mueck AO. The impact of endogenous estradiol metabolites on carcinogenesis. *Steroids* **2000**;65(7):357-69.
 178. Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer letters* **2015**;356(2 Pt A):231-43 doi 10.1016/j.canlet.2014.04.018.
 179. Santen R, Cavalieri E, Rogan E, Russo J, Guttenplan J, Ingle J, *et al.* Estrogen mediation of breast tumor formation involves estrogen receptor-dependent, as well as independent, genotoxic effects. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**;1155:132-40 doi 10.1111/j.1749-6632.2008.03685.x.
 180. Bates GW, Edman CD, Porter JC, MacDonald PC. Metabolism of catechol estrogen by human erythrocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **1977**;45(5):1120-3 doi 10.1210/jcem-45-5-1120.
 181. Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, *et al.* The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* **1994**;368(6468):237-9 doi 10.1038/368237a0.
 182. Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer research* **1997**;57(1):81-6.
 183. Tsukamoto A, Kaneko Y, Yoshida T, Han K, Ichinose M, Kimura S. 2-Methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen, enhances apoptosis and beta-galactosidase expression in vascular endothelial cells. *Biochemical and*

biophysical research communications **1998**;248(1):9-12 doi 10.1006/bbrc.1998.8902.

184. Cushman M, He HM, Katzenellenbogen JA, Lin CM, Hamel E. Synthesis, antitubulin and antimitotic activity, and cytotoxicity of analogs of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite of estradiol that inhibits tubulin polymerization by binding to the colchicine binding site. *Journal of medicinal chemistry* **1995**;38(12):2041-9.
185. Kulke MH, Chan JA, Meyerhardt JA, Zhu AX, Abrams TA, Blaszkowsky LS, *et al.* A prospective phase II study of 2-methoxyestradiol administered in combination with bevacizumab in patients with metastatic carcinoid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2011**;68(2):293-300 doi 10.1007/s00280-010-1478-7.
186. Tevaarwerk AJ, Holen KD, Alberti DB, Sidor C, Arnott J, Quon C, *et al.* Phase I trial of 2-methoxyestradiol NanoCrystal dispersion in advanced solid malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2009**;15(4):1460-5 doi 10.1158/1078-0432.CCR-08-1599.
187. Paydas S. Regression of chronic lymphocytic leukemia with aromatase inhibitor-letrozole? *Leukemia research* **2009**;33(4):566-7 doi 10.1016/j.leukres.2008.05.008.
188. Kempainen JA, Langley E, Wong CI, Bobseine K, Kelce WR, Wilson EM. Distinguishing androgen receptor agonists and antagonists: distinct mechanisms of activation by medroxyprogesterone acetate and dihydrotestosterone. *Molecular endocrinology* **1999**;13(3):440-54 doi 10.1210/mend.13.3.0255.
189. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **2001**;294(5548):1871-5 doi 10.1126/science.294.5548.1871.
190. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Seminars in immunopathology* **2013**;35(2):123-37 doi 10.1007/s00281-012-0342-8.
191. Thompson PA, Jelinek DF, Lipsky PE. Regulation of human B cell proliferation by prostaglandin E2. *Journal of immunology* **1984**;133(5):2446-53.
192. Garrone P, Galibert L, Rousset F, Fu SM, Banchereau J. Regulatory effects of prostaglandin E2 on the growth and differentiation of human B lymphocytes activated through their CD40 antigen. *Journal of immunology* **1994**;152(9):4282-90.
193. Soleymani Fard S, Jeddi Tehrani M, Ardekani AM. Prostaglandin E2 induces growth inhibition, apoptosis and differentiation in T and B cell-derived acute lymphoblastic leukemia cell lines (CCRF-CEM and Nalm-6). *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **2012**;87(1):17-24 doi 10.1016/j.plefa.2012.04.012.
194. Brown DM, Phipps RP. Bcl-2 expression inhibits prostaglandin E2-mediated apoptosis in B cell lymphomas. *Journal of immunology* **1996**;157(4):1359-70.
195. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in immunology* **2002**;23(3):144-50.

196. Murn J, Alibert O, Wu N, Tendil S, Gidrol X. Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *The Journal of experimental medicine* **2008**;205(13):3091-103 doi 10.1084/jem.20081163.
197. Bernard MP, Phipps RP. CpG oligodeoxynucleotides induce cyclooxygenase-2 in human B lymphocytes: implications for adjuvant activity and antibody production. *Clinical immunology* **2007**;125(2):138-48 doi 10.1016/j.clim.2007.07.006.
198. Roper RL, Ludlow JW, Phipps RP. Prostaglandin E2 inhibits B lymphocyte activation by a cAMP-dependent mechanism: PGE-inducible regulatory proteins. *Cellular immunology* **1994**;154(1):296-308.
199. Prijatelj M, Celhar T, Gobec M, Mlinaric-Rascan I. EP4 receptor signalling in immature B cells involves cAMP and NF-kappaB dependent pathways. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **2012**;64(8):1090-8 doi 10.1111/j.2042-7158.2012.01499.x.
200. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2003**;101(3):1087-93 doi 10.1182/blood-2002-06-1822.
201. Guarini A, Chiaretti S, Tavolaro S, Maggio R, Peragine N, Citarella F, *et al.* BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* **2008**;112(3):782-92 doi 10.1182/blood-2007-12-127688.
202. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, *et al.* Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer research* **2006**;66(14):7158-66 doi 10.1158/0008-5472.CAN-06-0085.
203. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, *et al.* The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2012**;120(2):356-65 doi 10.1182/blood-2011-12-397158.
204. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* **2012**;120(6):1175-84 doi 10.1182/blood-2012-02-362624.
205. Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, *et al.* Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **2000**;95(3):999-1006.
206. Purroy N, Abrisqueta P, Carabia J, Carpio C, Palacio C, Bosch F, *et al.* Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget* **2015**;6(10):7632-43 doi 10.18632/oncotarget.2939.

207. Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anti-cancer drugs* **2002**;13(2):127-37.
208. Ryan EP, Pollock SJ, Kaur K, Felgar RE, Bernstein SH, Chiorazzi N, *et al.* Constitutive and activation-inducible cyclooxygenase-2 expression enhances survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Clinical immunology* **2006**;120(1):76-90 doi 10.1016/j.clim.2005.12.012.
209. Secchiero P, Barbarotto E, Gonelli A, Tiribelli M, Zerbinati C, Celeghini C, *et al.* Potential pathogenetic implications of cyclooxygenase-2 overexpression in B chronic lymphoid leukemia cells. *The American journal of pathology* **2005**;167(6):1599-607 doi 10.1016/S0002-9440(10)61244-8.
210. Ryan EP, Bushnell TP, Friedman AE, Rahman I, Phipps RP. Cyclooxygenase-2 independent effects of cyclooxygenase-2 inhibitors on oxidative stress and intracellular glutathione content in normal and malignant human B-cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2008**;57(3):347-58 doi 10.1007/s00262-007-0374-4.
211. Gallouet AS, Travert M, Bresson-Bepoldin L, Guilloton F, Pangault C, Caulet-Maugendre S, *et al.* COX-2-independent effects of celecoxib sensitize lymphoma B cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2014**;20(10):2663-73 doi 10.1158/1078-0432.CCR-13-2305.
212. Fedyk ER, Phipps RP. Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**;93(20):10978-83 doi 10.1073/pnas.93.20.10978.
213. Osborne MJ, Coutinho de Oliveira L, Volpon L, Zahreddine HA, Borden KLB. Overcoming Drug Resistance through the Development of Selective Inhibitors of UDP-Glucuronosyltransferase Enzymes. *Journal of molecular biology* **2019**;431(2):258-72 doi 10.1016/j.jmb.2018.11.007.
214. Herndon TM, Chen SS, Saba NS, Valdez J, Emson C, Gatmaitan M, *et al.* Direct in vivo evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood. *Leukemia* **2017**;31(6):1340-7 doi 10.1038/leu.2017.11.
215. 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. *British journal of haematology* **1989**;71(3):343-50.
216. 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**;25(5):828-37 doi 10.1038/leu.2011.12.
217. Witkowska M, Nowak W, Cebula-Obrzut B, Majchrzak A, Medra A, Robak T, *et al.* Spontaneous in vitro apoptosis of de novo chronic lymphocytic leukemia cells

- correlates with risk of the disease progression. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* **2014**;86(6):410-7 doi 10.1002/cyto.b.21163.
218. 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**;100(5):1795-801.
 219. Bagnara D, Kaufman MS, Calissano C, Marsilio S, Patten PE, Simone R, *et al.* A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood* **2011**;117(20):5463-72 doi 10.1182/blood-2010-12-324210.
 220. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* **2009**;114(16):3367-75 doi 10.1182/blood-2009-06-225326.
 221. Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, Marolleau JP. A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro. *PloS one* **2013**;8(3):e60370 doi 10.1371/journal.pone.0060370.
 222. Brown DM, Warner GL, Ales-Martinez JE, Scott DW, Phipps RP. Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. *Clinical immunology and immunopathology* **1992**;63(3):221-9.
 223. Friedman DR. Lipids and Their Effects in Chronic Lymphocytic Leukemia. *EBioMedicine* **2017**;15:2-3 doi 10.1016/j.ebiom.2016.12.001.
 224. Mozessohn L, Earle C, Spaner D, Cheng SY, Kumar M, Buckstein R. The Association of Dyslipidemia With Chronic Lymphocytic Leukemia: A Population-Based Study. *Journal of the National Cancer Institute* **2017**;109(3) doi 10.1093/jnci/djw226.
 225. Chow S, Buckstein R, Spaner DE. A link between hypercholesterolemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* **2016**;57(4):797-802 doi 10.3109/10428194.2015.1088651.
 226. Friedman DR, Magura LA, Warren HA, Harrison JD, Diehl LF, Weinberg JB. Statin use and need for therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* **2010**;51(12):2295-8 doi 10.3109/10428194.2010.520050.
 227. Lee JS, Roberts A, Juarez D, Vo TT, Bhatt S, Herzog LO, *et al.* Statins enhance efficacy of venetoclax in blood cancers. *Science translational medicine* **2018**;10(445) doi 10.1126/scitranslmed.aq1240.
 228. Righolt CH, Zhang G, Ye X, Banerji V, Johnston JB, Gibson SB, *et al.* Statin use and chronic lymphocytic leukemia incidence: A nested case-control study in Manitoba, Canada. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **2019** doi 10.1158/1055-9965.EPI-19-0107.

229. Heintel D, Kienle D, Shehata M, Krober A, Kroemer E, Schwarzingler I, *et al.* High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **2005**;19(7):1216-23 doi 10.1038/sj.leu.2403748.
230. Rozovski U, Grgurevic S, Bueso-Ramos C, Harris DM, Li P, Liu Z, *et al.* Aberrant LPL Expression, Driven by STAT3, Mediates Free Fatty Acid Metabolism in CLL Cells. *Molecular cancer research : MCR* **2015**;13(5):944-53 doi 10.1158/1541-7786.MCR-14-0412.
231. Moreno P, Abreu C, Borge M, Palacios F, Morande P, Pegazzano M, *et al.* Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment. *Leukemia* **2013**;27(3):721-5 doi 10.1038/leu.2012.212.
232. Pallasch CP, Schwamb J, Konigs S, Schulz A, Debey S, Kofler D, *et al.* Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **2008**;22(3):585-92 doi 10.1038/sj.leu.2405058.
233. Chai-Adisaksopha C, Brown JR. FCR achieves long-term durable remissions in patients with IGHV-mutated CLL. *Blood* **2017**;130(21):2278-82 doi 10.1182/blood-2017-07-731588.
234. Zahreddine HA, Borden KL. Molecular Pathways: GLI1-Induced Drug Glucuronidation in Resistant Cancer Cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2015**;21(10):2207-10 doi 10.1158/1078-0432.CCR-14-1370.
235. Zahreddine HA, Culjkovic-Kraljacic B, Gasiorek J, Duchaine J, Borden KLB. GLI1-Inducible Glucuronidation Targets a Broad Spectrum of Drugs. *ACS chemical biology* **2019**;14(3):348-55 doi 10.1021/acscchembio.8b01118.
236. Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP, *et al.* Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* **2009**;114(20):4441-50 doi 10.1182/blood-2009-07-233718.
237. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiological reviews* **2009**;89(3):1025-78 doi 10.1152/physrev.00011.2008.
238. Campas C, Lopez JM, Santidrian AF, Barragan M, Bellosillo B, Colomer D, *et al.* Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood* **2003**;101(9):3674-80 doi 10.1182/blood-2002-07-2339.
239. Faubert B, Vincent EE, Griss T, Samborska B, Izreig S, Svensson RU, *et al.* Loss of the tumor suppressor LKB1 promotes metabolic reprogramming of cancer cells via HIF-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**;111(7):2554-9 doi 10.1073/pnas.1312570111.

240. Galicia-Vazquez G, Aloyz R. Ibrutinib Resistance Is Reduced by an Inhibitor of Fatty Acid Oxidation in Primary CLL Lymphocytes. *Frontiers in oncology* **2018**;8:411 doi 10.3389/fonc.2018.00411.
241. Galicia-Vazquez G, Aloyz R. Metabolic rewiring beyond Warburg in chronic lymphocytic leukemia: How much do we actually know? *Critical reviews in oncology/hematology* **2019**;134:65-70 doi 10.1016/j.critrevonc.2018.12.003.
242. Hewamana S, Alghazal S, Lin TT, Clement M, Jenkins C, Guzman ML, *et al.* The NF-kappaB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target. *Blood* **2008**;111(9):4681-9 doi 10.1182/blood-2007-11-125278.