



**Bases moléculaires de l'interaction entre cellules B de
leucémie lymphoïde chronique et nurse like cells :
nouveaux rationnels pour de nouveaux traitements dans
la leucémie lymphoïde chronique**

Frédéric Boissard

► **To cite this version:**

Frédéric Boissard. Bases moléculaires de l'interaction entre cellules B de leucémie lymphoïde chronique et nurse like cells : nouveaux rationnels pour de nouveaux traitements dans la leucémie lymphoïde chronique. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. <NNT : 2015TOU30149>. <tel-01284354>

HAL Id: tel-01284354

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01284354>

Submitted on 7 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Frédéric BOISSARD

le mardi 20 octobre 2015

Titre :

Bases moléculaires de l'interaction entre cellules B de leucémie lymphoïde chronique et nurse like cells : nouveaux rationnels pour de nouveaux traitements dans la leucémie lymphoïde chronique.

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biotechnologies, Cancérologie

Unité de recherche :

Therapeutic immunotargeting of B-cell tumors CRCT UMR 1037 INSERM-UPS ERL CNRS 5294

Directeur/trice(s) de Thèse :

Madame le Docteur Mary Poupot
Monsieur le Docteur Loïc Ysebaert

Jury :

Monsieur le Professeur Christian Recher (Président)
Monsieur Professeur Olivier Tournilhac (Rapporteur)
Madame le Professeur Karin Tarte (Rapporteur)
Monsieur le Directeur de recherche Marc Bajenoff (Examineur)

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

Jean Rostand

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

Bertrand, 3ème comte Russell of Kingston Russell

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

Philippe Geluck

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté de juger mes travaux de Thèse.

Le président du Jury, **Monsieur le Professeur Christian Recher**. Je vous remercie de me faire l'honneur de présider mon jury.

Les rapporteurs, le **Monsieur Professeur Olivier Tournilhac** et Madame le **Professeur Karin Tarte**. Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteurs pour ma Thèse et de consacrer autant de temps au manuscrit.

L'examineur, **Monsieur le Directeur de recherche Marc Bajenoff**. Merci de consacrer de votre temps pour mon manuscrit.

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

Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

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

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

Au labo, merci à Emilie pour me supporter tous les jours et pour tes précieux conseils orthographiques. A Marie qui ne s'énervé jamais, à Don-Marc au flegme olympien, à Anne

avec laquelle nous nous partageons les prélèvements, à Chris la surexcitée pleine de bonne humeur, à Thibault et Sarah nos M2 médecins, à Ekaterina et enfin à Jean-Jacques qui m'a accepté dans son laboratoire.

A mes amis,

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

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

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

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

RESUME

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est l'hémopathie maligne la plus fréquente des pays occidentaux. Elle se caractérise par une accumulation de cellules leucémiques dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires. Malgré les nouvelles thérapies, la LLC reste incurable. Dans la LLC, comme dans tout cancer, le microenvironnement tumoral, un milieu complexe contenant des cellules immunitaires pouvant être pro-tumorales, prend une part croissante aussi bien dans la physiopathologie que le pronostic. La recherche de nouvelles thérapies ciblant les interactions des cellules leucémiques avec ce microenvironnement représente aujourd'hui une piste prometteuse pour traiter cette pathologie.

Les « nurse-like » cells (NLC) semblaient être les macrophages associés aux tumeurs (TAM) de la LLC. Ces cellules, retrouvées dans les ganglions lymphatiques de patients, favorisent *in vitro* la survie des cellules leucémiques. Elles partagent avec les TAM de nombreuses caractéristiques telles que des capacités immunosuppressives, un profil transcriptomique proche et une implication dans la résistance aux traitements. Nous l'avons confirmé par une analyse fonctionnelle et phénotypique. Nos travaux indiquent clairement que les NLC sont les TAM de la LLC avec une forte expression de CD68 et de CD163 et qu'elles favorisent la survie des cellules leucémiques.

Suite à ce travail, nous avons déterminé l'impact pronostique des NLC dans la LLC, en émettant l'hypothèse que, comme dans d'autres cancers, une forte infiltration par les TAM pouvait être de mauvais pronostic. Nous avons alors montré que le taux de NLC présentes au sein du ganglion lymphatique chez le patient est corrélé à la progression de la LLC. Les NLC relarguent également un facteur soluble le CD163 soluble (sCD163) dans le sang des patients, dont le taux est corrélé à des marqueurs de mauvais pronostic dans la LLC tels que le statut IgHV non muté, le caryotype complexe et les mutations de *TP53*. Enfin, le taux de sCD163 est un marqueur pronostique indépendant dans la LLC : un fort taux étant associé à un raccourcissement du temps avant retraitement, de la survie sans progression et de la survie globale des patients.

Ensuite nous avons étudié l'impact d'une thérapie innovante, l'ibrutinib, un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant spécifiquement la Bruton Tyrosine Kinase, sur ces NLC. *In vitro*, les monocytes se différencient toujours en NLC et leur phénotype n'est pas modifié. De plus, ces cellules sont toujours capables de protéger les cellules leucémiques de l'apoptose. Finalement, nous avons mis en évidence qu'elles pouvaient participer à la chimiorésistance, en protégeant

RESUME

in vitro les cellules leucémiques de l'ibrutinib mais pas du dasatinib, de l'idélalisib, du vénétoclax, de la bendamustine et du rituximab.

L'ensemble de nos résultats indique que cibler les NLC est une piste prometteuse dans le traitement de la LLC. Les interactions cellulaires entre NLC et cellules leucémiques pourraient représenter une cible thérapeutique intéressante. Nous avons montré qu'*in vitro* le contact entre NLC et cellules leucémiques est nécessaire à la survie de ces dernières. Suite à une étude transcriptomique, nous avons mis en évidence plusieurs couples moléculaires potentiellement impliqués dans ces interactions. Seul le couple LFA3/CD2 s'est révélé être nécessaire dans ce contact *via* un mécanisme dépendant d'Akt et son blocage inhibe totalement les effets pro-survie des NLC sur les cellules leucémiques.

En conclusion, les NLC *via* des interactions dépendantes du couple LFA-3/CD2 protègent les cellules leucémiques de l'apoptose *in vitro*. De plus, elles participent à la chimiorésistance en protégeant aussi les cellules leucémiques de l'ibrutinib. Elles relarguent également du sCD163, dosable dans le sérum, un facteur pronostique indépendant de la LLC. La recherche de nouvelles thérapies plus spécifiques, ciblant les NLC constitue donc une piste thérapeutique intéressante dans la LLC.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common hemopathy in western countries. This pathology is characterized by an accumulation of leukemic cells in blood, bone marrow and secondary lymphoid organs. Despite new therapies, CLL is still incurable. In CLL, the microenvironment, a complex media containing immune cells which can favor the tumor, takes now a large place in the physiopathology and the prognosis. The research of new therapies targeting interactions between CLL cells and microenvironment is a promising runway to find new drugs in CLL.

“Nurse-like” cells (NLC) should be the tumor associated macrophages (TAM) of CLL. These cells, found in the lymph node of CLL patients, protect CLL cells against *in vitro* apoptosis. They share with TAM many characteristics including immunosubversive properties, chemoresistance induction and a close gene expression profiling. We confirmed that by functional and phenotypical analysis. Our results indicate that NLC are the TAM of CLL with a high expression of CD68 and CD163 and that NLC can protect CLL cells against *in vitro* apoptosis.

Thus, we focused on the clinical impact of NLC in CLL. Because in several cancers a high infiltration of TAM is correlated with a poor clinical outcome, we hypothesized that NLC infiltration should be associated with CLL outcome. We showed that infiltration of NLC in the lymph node can be correlated with the progressivity of CLL. Moreover, NLC release a soluble factor, the sCD163 (soluble sCD163), in the blood of CLL patients. High levels of this factor, can be correlated with previously established prognostic markers in CLL such as *TP53* mutations, unmutated IgHV status and complex karyotype. Finally, sCD163 was an independent prognostic marker in CLL and high levels are associated with shorter time to next treatment, progression free survival and overall survival.

Next, we studied the impact of ibrutinib, a new therapy in CLL, on NLC. Ibrutinib is a specific tyrosine kinase inhibitor which targets specifically the Bruton Tyrosine Kinase. *In vitro*, NLC differentiated from ibrutinib treated patients have the same phenotype as NLC from untreated patients and are still able to protect CLL cells against apoptosis. To end, we tested if *in vitro*

ABSTRACT

NLC could protect CLL cells against chemotherapy and showed that NLC protect CLL cells against ibrutinib but not against idelalisib, dasatinib, venetoclax, bendamustin and rituximab.

All our previous studies reveal that NLC are a good target to find new therapies in CLL. We focused our work on the interaction between NLC and CLL cells. First, we demonstrated that the NLC/CLL cells contact is necessary to prevent CLL cells death *in vitro*. Next, by gene expression profiling, we screened several couple of molecules potentially implicated in these interactions. Finally, only LFA-3/CD2 couple was necessary for this contact through an Akt pathway dependent and the inhibition of this couple totally inhibited the pro-survival effect of NLC on CLL cells.

To conclude, NLC protect CLL cells from *in vitro* apoptosis through LFA-3/CD2. Moreover, they protect CLL cells against ibrutinib and so facilitate the chemoresistance. They release sCD163, an independent marker in CLL, which can be measured in the serum. The research of new targets, which can be considerate as more specific, targeting NLC is still an interesting way to find new therapies in CLL

SOMMAIRE

RESUME.....	5
ABSTRACT	7
SOMMAIRE	9
LISTE DES ABREVIATIONS	14
LISTE DES FIGURES	21
LISTES DES TABLES	23
INTRODUCTION.....	24
I La leucémie lymphoïde chronique	24
I.A Définition et épidémiologie	24
I.A.1 Définition	24
I.A.2 Epidémiologie	24
I.A.3 Facteurs de risques et formes familiales	25
I.B Diagnostic	27
I.B.1 Circonstances de découverte et critères diagnostiques	27
I.B.1.1 Circonstances de découverte	27
I.B.1.2 Diagnostic	27
I.B.1.2.1 Hémogramme.....	27
I.B.1.2.2 Immuphénotypage et analyse morphologique	28
I.B.1.2.3 Diagnostic différentiel	29
I.B.2 Explorations initiales obligatoires	30
I.B.2.1 Interrogatoire	30
I.B.2.2 Examen clinique	30
I.B.2.3 Examens biologiques	30
I.C Origine de la leucémie lymphoïde chronique et physiopathologie.....	32
I.C.1 Origine de la leucémie lymphoïde chronique	32
I.C.1.1 La lymphocytose B monoclonale isolée.....	32
I.C.1.2 La cellule souche de la leucémie lymphoïde chronique	33
I.C.1.3 Rôle de la stimulation antigénique dans la leucémogénèse de la LLC.....	34
I.C.1.4 Le cas des cellules B non leucémiques CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺	37
I.C.2 Physiopathologie	37
I.C.2.1 La résistance à l'apoptose.....	37
I.C.2.2 La prolifération	38
I.C.2.3 La voie de signalisation du BCR	39

SOMMAIRE

I.D Facteurs pronostiques	41
I.D.1 Facteurs pronostiques généraux	41
I.D.2 Facteurs pronostiques clinico-biologiques	41
I.D.2.1 Classification de Binet.....	41
I.D.2.2 Classification de Rai.....	43
I.D.2.3 Les facteurs pronostiques liés à la prolifération : le temps de doublement des lymphocytes.....	44
I.D.2.4 Les facteurs pronostiques liés à la signalisation du BCR : le statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines.....	45
I.D.3 Marqueurs cytogénétiques	46
I.D.4 Mutations récurrentes.....	47
I.D.4.1 Classification combinant les anomalies caryotypiques et les mutations récurrentes	48
I.D.5 Marqueurs sériques pronostiques.....	49
I.D.5.1 $\beta 2$ microglobulinémie.....	49
I.D.5.2 Taux de Thymidine Kinase sérique.....	50
I.D.6 Facteurs pronostiques liés au microenvironnement tumoral.....	50
I.D.6.1 Expression du CD38.....	50
I.D.6.2 Expression du CD49d.....	51
I.E Traitements conventionnels de la leucémie lymphoïde chronique	52
I.E.1 Critères de mise en place du traitement.....	52
I.E.2 Choix du traitement	54
I.E.3 Traitement de première ligne des patients avec un bon état général et <i>TP53</i> non muté : Rituximab + Fludarabine + Cyclophosphamide	54
I.E.3.1 Le rituximab (Mabthera ®).....	55
I.E.3.2 La fludarabine (Fludara ®)	56
I.E.3.3 Le cyclophosphamide (Endoxan ®)	57
I.E.4 Le traitement de première ligne chez les patients âgés ou avec un mauvais état général sans mutation <i>TP53</i> : Rituximab + Bendamustine	57
I.E.5 Le traitement des patients avec une mutation de <i>TP53</i> , en rechute ou réfractaires : les petites molécules.....	58
I.E.5.1 L'ibrutinib (Imbruvica ®).....	58
I.E.5.2 Idélalisib (Zydelig ®)	61
II Le microenvironnement tumoral.....	64
II.A L'immunosurveillance anti tumorale	66
II.A.1 Concept théorique	66
II.A.2 Les forces en présence dans la réaction immunitaire anti-tumorale.....	67
II.A.2.1 Les acteurs de l'immunité innée	68

SOMMAIRE

II.A.2.2 Les acteurs à la frontière de l'immunité innée et adaptative.....	69
II.A.2.3 Les acteurs de l'immunité adaptative.....	69
II.B Immunoédition.....	72
II.B.1 Concept théorique	72
II.B.2 Les grandes phases de l'immunoédition des tumeurs.....	73
II.C Les acteurs du microenvironnement tumoral et leurs impacts pronostiques.....	76
II.C.1 Les acteurs généralement considérés comme anti-tumoraux et les mécanismes d'échappement	77
II.C.1.1 Les lymphocytes T CD8.....	77
II.C.1.1.1 Impact pronostique	77
II.C.1.1.2 Mécanismes d'échappement.....	77
II.C.1.2 Les cellules Natural Killer.....	80
II.C.1.2.1 Impact pronostique	80
II.C.1.2.2 Mécanismes d'échappement.....	80
II.C.1.3 Les cellules dendritiques matures	82
II.C.1.3.1 Impact pronostique	82
II.C.1.3.2 Mécanismes d'échappement.....	83
II.C.2 Les acteurs généralement considérés comme pro-tumoraux	84
II.C.2.1 Les cellules suppressives de la moelle	84
II.C.2.1.1 Impact pronostique	85
II.C.2.1.2 Mécanismes d'accumulation dans les cancers.....	86
II.C.2.2 Les lymphocytes T régulateurs	87
II.C.2.2.1 Impact pronostique	87
II.C.2.2.2 Mécanismes d'accumulation dans les tumeurs.....	88
II.D Le microenvironnement tumoral dans la leucémie lymphoïde chronique	89
II.D.1 Les lymphocytes T dans la leucémie lymphoïde chronique.....	89
II.D.1.1 Les sous-populations particulières de lymphocytes T dans la leucémie lymphoïde chronique	92
II.D.2 Les cellules Natural Killer dans la leucémie lymphoïde chronique	93
II.D.3 Cellules suppressives de la moelle dans la leucémie lymphoïde chronique.....	94
II.D.4 Les cellules folliculaires dendritiques dans la leucémie lymphoïde chronique..	95
II.D.5 Les cellules endothéliales dans la leucémie lymphoïde chronique	95
II.D.6 Les neutrophiles dans la leucémie lymphoïde chronique	96
II.D.7 Un microenvironnement tumoral largement pro-tumoral.....	96
III. Les macrophages associés aux tumeurs.....	98
III.A Les macrophages de type I et de type II.....	98
III.B Les macrophages et les tumeurs.....	100

SOMMAIRE

III.B.1 Définition des macrophages associés aux tumeurs.....	100
III.B.2 Recrutement et différenciation	100
III.B.2.1 Le recrutement des monocytes.....	100
III.B.2.2 Différenciation	101
III.B.3 Phénotype	102
III.B.3.1 Le CD163.....	103
III.B.4 Fonctions	104
III.B.4.1 Immunosuppression	105
III.B.4.2 Rôle pro-angiogénique.....	106
III.B.4.3 Rôle dans l'invasion et la dissémination tumorale	107
III.B.5 Impact pronostique	108
III.B.5.1 Impact pronostique des TAM	109
III.B.5.2 Impact pronostique des macrophages de type I	111
III.B.6 Influence des macrophages associés aux tumeurs sur les traitements.....	112
III.B.6.1 Chimiothérapie.....	112
III.B.6.2 Radiothérapie	113
III.B.6.3 Thérapies ciblées.....	113
III.C Les « nurses-like cells » : les macrophages associés aux tumeurs de la leucémie lymphoïde chronique	115
III.C.1 Profil d'expression génique et phénotype	116
III.C.2 Origine et différenciation.....	117
III.C.2.1 L'impact pronostique des monocytes dans la leucémie lymphoïde chronique	119
III.C.3 Fonctions	120
III.C.3.1 Attraction des cellules leucémiques.....	120
III.C.3.2 Protection contre l'apoptose des cellules leucémiques <i>in vitro</i>	121
III.C.3.2.1 Protection <i>via</i> les facteurs solubles	121
III.C.3.2.2 Protection <i>via</i> des interactions contact-dépendantes	121
III.C.3.3 Favorisation de l'immunoéchappement.....	123
III.C.3.4 Rôle dans la pathogénèse et dans l'évolution de la leucémie lymphoïde chronique	124
III.C.4 Localisation tissulaire chez le patient.....	125
III.C.5 Impact pronostique	126
III.C.6 Effets sur les thérapies utilisées dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique.....	127
III.C.6.1 Effets sur les thérapies classiques.....	127
III.C.6.2 Effets sur l'efficacité des petites molécules.....	128

SOMMAIRE

III.C.7 Cibler les « nurse-like cells » : le nouvel Eldorado de la leucémie lymphoïde chronique ?	128
III.C.8 Les « nurse-like cells », des cellules spécifiques de la leucémie lymphoïde chronique ?	130
OBJECTIFS DE LA THESE	131
RESULTATS	133
I. Les « nurse-like » cells : les macrophages associés aux tumeurs dans la leucémie lymphoïde chronique	133
II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique	137
III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique	171
IV. LFA-3 : facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique	181
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	216
REFERENCES	224

LISTE DES ABREVIATIONS

β

β2m : β2 microglobuline

A

ADCP : Phagocytose dépendante des anticorps

ADM : Adrénomédulline

ADN : Acide désoxyribo nucléique

Ag : Antigène

ANG2 : Angiopoeitine 2

APRIL : A proliferation-inducing ligand

ARN : Acide ribo nucléique

ARNm : ARN messagers

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

B

BAFF : B-cell activating factor

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 : B-cell CLL/lymphoma 2

Bcl-xl : B-cell lymphoma extra-large

Bcl-xs : B-cell lymphoma

BCR : B Cell Receptor

bFGF : Basic fibroblast growth factor

BIRC3 : Baculoviral IAP Repeat Containing 3

BTK : Bruton Tyrosine Kinase

C

CD : Cluster de differentiation

CD40L : CD40 ligand

CD79a : Immunoglobulin α

LISTE DES ABREVIATIONS

CD79b	:	Immunoglobulin β
CDR3	:	Complementary determining region 3
CMH	:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CO	:	Monoxyde de carbone
COX-2	:	Cyclooxygenase 2
CSF-1	:	Colony stimulating factor 1
CSF-1R	:	Récepteur au CSF-1
CTLA-4	:	Cytotoxic T-lymphocytes associated protein 4
CXCL12	:	Chemokine (C-X-C Motif) ligand 12
CXCL13	:	Chemokine (C-X-C Motif) ligand 13
CXCL1	:	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1

D

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

E

EGF	:	Epidermal growth factor
EGFR	:	Epidermal growth factor receptor
EPO	:	Eosinophil peroxidase
ET-1	:	Endothéline 1
ETAR	:	Recepteur à l'endothéline de type A

F

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

LISTE DES ABREVIATIONS

G

GITR	:	Glucocorticoid-induced TNF factor
GM-CSF	:	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

H

HAS	:	Haute Autorité de Santé
Hb	:	Hémoglobine
Hb-Hp	:	Complexe hémoglobine-haptoglobine
HGF	:	Hepatocyte growth factor
Hp	:	Haptoglobine
HRM	:	High resolution mel
HSP-27	:	Heat shock protein 27

I

IAP	:	Inhibiteurs de l'apoptose
IDO	:	Indoleamine 2-3 dioxygénase
IFN γ	:	Interferon γ
Ig	:	Immunoglobuline
IgHV	:	Immunoglobulin Heavy Chain
IL-4	:	Interleukine 4
InVS	:	Institut de veille sanitaire
IwCLL	:	International workshop on chronic lymphocytic leukaemia

K

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

L

LDT	:	Temps de doublement des lymphocytes
LLC	:	Leucémie lymphoïde chronique
LMC	:	Leucémie myéloïde aïgue
LPS	:	Lipopolysaccharides
LT $\alpha\beta$:	Lymphotoxine $\alpha\beta$

LISTE DES ABREVIATIONS

LT β R : Récepteur lymphotoxine β

LYZ : Lysozyme

M

M1 : Macrophages de type 1

M2 : Macrophages de type 2

MAC-1 : Macrophage-1 antigen

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MAPK1 : Mitogen activated protein kinase 1

MB : Megabases

MBL : Lymphocytose B monoclonale isolée

MBP : Major basic protein

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1

MDSC : Cellules suppressives de la moelle

MEC : Matrice extracellulaire

MFG-E8 : Milk fat globule-epidermal growth factor 8 protein

MICA : MCH class I polypeptide-related sequence A

MICB : MCH class I polypeptide-related sequence B

MIF : Macrophage migration inhibitor factor

MMP : Matrix metalloprotéinase

MYD88 : Myeloid differentiation primary response 88

N

NAMPT : Nicotinamide phosphoribosyltransférase

NCID : Notch intracellular domain

NF-KB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NFAT : Nuclear factor of Activated T-cells

NFS : Numération formule sanguine

NK : Natural killer

NKG2D : Killer cell lectin-like receptor subfamily K member 1

NKp30 : Natural killer cell p30-related protein

NKp46 : Natural cytotoxicity triggering receptor 1

LISTE DES ABREVIATIONS

NLC : « Nurse-like » cells

O

OMS : Organisation mondiale de la santé

P

PCA : Principal component analysis

PD-1 : Programmed cell death 1

PDGF : Platelet-derived growth factor

PD-L1 : Programm cell death ligand 1

PECAM1 : Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1

PGE-2 : Prostaglandin E2

PI3K δ : isoforme δ de la phosphatidylinositol-3 kinase

PLEKHG5 : Pleckstrin homology domain containing family G (with RhoGef domain) member 5

PRR : Pattern Recognition Receptors

R

RAG2 : Recombinaison activating gene 2

RAGE : Receptor for advanced glycosylation endproducts

RFC : Fludarabine cyclophosphamide rituximab

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RT-PCR : Reverse transcriptase polymerization chain reaction

S

S1P : Sphingosine 1 phosphate

S1PR1 : Sphingosine-1-phosphate receptor 1

sCD163 : CD163 soluble

sCD23 : CD23 soluble

SF3B1 : Splicing Factor 3b subunit 1 155kDa

sHMGB1 : Soluble high mobility group box 1

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

LISTE DES ABREVIATIONS

sLFA-3	:	Soluble LFA-3
SLL	:	Small lymphocytic leukemia
sTK	:	Thymidine kinase sérique
SYK	:	Spleen tyrosine kinase
T		
TAM	:	Macrophages associés aux tumeurs
TCL1	:	T-cell leukemia 1
TCR	:	T Cell receptor
<i>TGM7</i>	:	Transglutaminase 7
Tie2 domains	:	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology
TIL	:	Lymphocytes infiltrant les tumeurs
TK	:	Thymidine kinase
TMEM	:	Tumor microenvironment for metastasis
TNF α	:	Tumor necrosis factor α
<i>TP53</i>	:	Tumor protein p53
TRAIL	:	Tumor-necrosis factor related apoptosis inducing ligand
Treg	:	Lymphocytes T régulateurs
U		
uPA	:	Urokinase-type plasminogen activator
V		
VCAM-1	:	Vascular-cell adhesion molecule 1
VDJ	:	Variable diversity joining
VEGF-A	:	Vascular endothelial growth factor A
VEGFR	:	Vascular endothelial growth factor receptor 2
VIH	:	Virus de l'immunodéficience humaine
VLA-4	:	Very late antigen 4

LISTE DES ABREVIATIONS

X

XPO1 : Exportin 1

Z

ZAP-70 : Zeta-chain-associated-protein kinase

ZMYM3 : Zinc finger MYM-type 3

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Incidence par âge en 2012 de la LLC et du lymphome lymphocytaire (extrait de ³).	25
Figure 2 : Étalement sanguin typique d'une LLC (gauche). Nombreux petits lymphocytes avec noyau arrondi et cytoplasme très réduit avec des ombres de Gumprecht (croix) (droite) (source : http://campus.cerimes.fr/).	28
Figure 3: Représentation schématique d'un clone leucémique typique de LLC (haut : marqueurs pris en compte dans le score de Matutes).	29
Figure 4 : Prévalence de la MBL aux Etats-Unis et dans différents pays européens (extrait de ²⁰).	32
Figure 5: Présentation schématique du développement de LLC chez l'Homme basée sur un modèle de xénogreffe murine (extrait de ²⁶).	34
Figure 6: Représentation schématique du développement et de l'évolution de la LLC dépendante de la stimulation antigénique selon le modèle de Chiorazzi (adapté de ³⁰).	36
Figure 7: Représentation schématique du signalosome du BCR (extrait de ⁵³).	40
Figure 8 : Les cinq aires lymphoïdes palpables (extrait de ²).	41
Figure 9: Courbes de survie en fonction du stade de Binet en 1981(extrait de ⁶⁰).	42
Figure 10: Courbe de survie en fonction du stade de Binet en 2011 (Hallek, communication personnelle).	43
Figure 11: Courbes de survie en fonction du stade de Rai (extrait de ⁶¹).	44
Figure 12: Courbes de survie en fonction du LDT (extrait de ⁶³).	45
Figure 13: Courbes de survie sans progression de patients LLC traités par RFC (Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab) en fonction du statut IgHV (courbe verte : IgHV muté, courbe orange : IgHV non muté) (Fisher K., IwCLL, 2013).	46
Figure 14: Courbes de survie globale selon la classification hiérarchique proposée par Rossi <i>et al</i> basée sur les anomalies cytogénétiques et les mutations récurrentes (extrait de ¹⁰⁰).	49
Figure 15: Schéma de la stratégie décisionnelle dans la LLC (extrait de ²).	52
Figure 16: Survie sans progression de patients traités par RFC (courbe verte) ou FC (courbe bleue) (extrait de ¹²³).	55
Figure 17: Représentation schématique des différents mécanismes d'action du rituximab (extrait de ¹²⁸).	56
Figure 18: Analyses en sous-groupes du taux de réponse globale de patients traités par ibrutinib (Étude PCYC-1104-CA) (source: Vidal®).	59
Figure 19: Implication de BTK dans les signalisations du clone leucémique (Ysebaert, non publié).	60
Figure 20: Modélisation structurale de l'interaction de la BTK muté ou non avec l'ibrutinib (extrait de ¹⁴³).	61
Figure 21: Acquisition et propriétés transformantes des cellules cancéreuses (extrait de ¹⁵²).	64
Figure 22: Courbes d'incidence des tumeurs chimiquement induites chez des souris immunodéficientes ou immunocompétentes (extrait de ¹⁵⁵).	66
Figure 23: Représentation schématique des effecteurs de l'immunité innée (gauche) et acquise (droite) dans la réponse anti-tumorale (CTL : lymphocytes T cytotoxiques) (extrait de ¹⁶²).	67
Figure 24: Représentation schématique de la réponse immunitaire anti-tumorale (extrait de ¹⁶²).	71

Figure 25: Les tumeurs provenant de souris immunocompétentes sont qualitativement différentes des tumeurs provenant de souris immunodéprimées (extrait de ¹⁵⁵).....	73
Figure 26: Représentation schématique de l'immunoédition des tumeurs (extrait de ¹⁸⁴).	74
Figure 27: Les acteurs du microenvironnement tumoral (extrait de ¹⁸⁵).....	76
Figure 28: Stratégies immunosuppressives exploitées par les cellules tumorales pour échapper aux réponses immunitaires T (extrait de ²⁰²).....	79
Figure 29: Mécanismes de l'évasion tumorale lors d'une attaque par les cellules NK (extrait de ²¹⁷).....	81
Figure 30: Corruption des DC par les cellules tumorales (extrait de ²³³).....	83
Figure 31: Effets pro-tumoraux des MDSC (extrait de ²⁵⁰).	85
Figure 32: Mécanismes de recrutement des MDSC au sein des tumeurs (extrait de ²⁵⁰).....	87
Figure 33: Les acteurs du microenvironnement tumoral dans la leucémie lymphoïde chronique. A. Au sein de la moelle osseuse. B. Au sein du ganglion lymphatique. (extrait de ²⁹⁵)	89
Figure 34: Interaction entre cellules leucémiques et cellules T (extrait de ³⁰⁹).....	91
Figure 35: Le cross talk entre cellules leucémiques et MDSC (extrait de ³⁴¹).....	94
Figure 36: Composants cellulaires et moléculaires du microenvironnement tumoral dans la leucémie lymphoïde chronique (extrait de ³⁴²).....	97
Figure 37: Phénotype des macrophages suivant leurs états de polarisation (extrait de ³⁵⁴).	99
Figure 38: Mécanismes de recrutement des monocytes au sein des tumeurs (extrait de ³⁵³). 101	
Figure 39: Mécanismes de différenciation des monocytes en TAM au sein des tumeurs (extrait de ³⁸²).....	102
Figure 40: Exemple de phénotype de TAM (extrait de ³⁹¹).	103
Figure 41 : Mécanismes d'immunosubversion médiés par les TAM (extrait de ⁴¹⁵).....	106
Figure 42: Les TAM contribuent au potentiel invasif des cellules tumorales (extrait de ⁴¹⁵).108	
Figure 43: Les NLC protègent les cellules leucémiques de l'apoptose <i>in vitro</i> (courbe noire: co-culture de NLC et de cellules leucémiques, courbe blanche: cellules leucémiques cultivées seules) (extrait de ⁴¹).	115
Figure 44: Morphologie des NLC (extrait de ⁴¹).....	116
Figure 45: Les NLC ont un profil transcriptomique de TAM like (extrait de ⁴⁶⁵).	117
Figure 46: Courbes de survie globale en fonction du taux de monocytes sanguins (extrait de ⁴⁸⁰).....	119
Figure 47: BAFF, APRIL et CXCL12 sont moins efficaces que les NLC pour protéger les cellules leucémiques de l'apoptose (extrait de ⁴⁷²).	122
Figure 48: Cellules CD163 ⁺ (marron) au sein d'un ganglion de patient (la zone entourée correspond au pseudo-follicule) (extrait de ⁴⁶⁵).	126
Figure 49: Profil transcriptomique de 19 NLC en fonction du statut IgHV et du caryotype des cellules leucémiques.....	218

LISTES DES TABLES

Table 1: Score de Matutes ¹⁷	29
Table 2: Classification des stades de Binet ⁶⁰	42
Table 3: Classification de Rai ¹⁷	43
Table 4 : Principales anomalies cytogénétiques retrouvées dans la LLC.	47
Table 5 : Principales mutations récurrentes retrouvées dans la LLC.	48
Table 6: Médiane de survie en fonction du taux de β 2 microglobuline ¹⁰⁵	49
Table 7: Résultats d'efficacité de l'étude 312-0116 comparant l'association rituximab et idélalisib à l'association rituximab et placebo (source: Vidal®).....	62
Table 8: Survie globale à 5 et 10 ans en fonction du taux de lymphocytes T CD4 et T CD8 ³¹⁰	92
Table 9: Relation entre TAM et pronostic dans différents cancers (adapté de ³⁷³).....	111

INTRODUCTION

I La leucémie lymphoïde chronique

I.A Définition et épidémiologie

I.A.1 Définition

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par une accumulation dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires de petits lymphocytes d'aspect mature¹, apparentés à la lignée B dans 95 % des cas. Le diagnostic est biologique. La Haute Autorité de Santé (HAS) définit la LLC selon ces critères «Toute lymphocytose isolée de plus de 5 000 / mm³, persistant depuis plus de 3 mois, chez un sujet adulte, doit faire évoquer le diagnostic de LLC»².

I.A.2 Epidémiologie

La LLC est l'hémopathie maligne la plus fréquente dans les pays occidentaux. L'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) estime à 4 464 le nombre de nouveaux cas en France en 2012, avec une prévalence nettement masculine (60 % de nouveaux cas pour les hommes et 40 % pour les femmes)³. Au niveau mondial, l'incidence standardisée sur la population mondiale est de 4,4 pour 100 000 personnes-année chez l'homme et de 2,2 pour 100 000 personnes-année chez la femme, soit un sex-ratio de 2. Il convient de noter que des variations ethniques étudiées aux États-Unis sont marquées par une incidence plus faible chez les Asiatiques et les Afro-Américains comparée à celle des Caucasiens⁴ mais en Europe, aucune variation n'a pu être établie⁵.

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

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

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

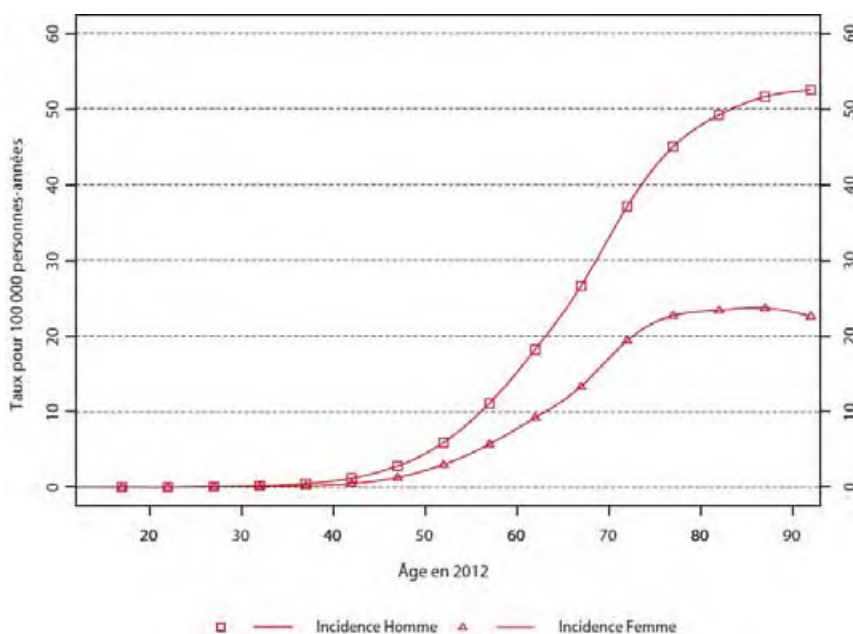


Figure 1: Incidence par âge en 2012 de la LLC et du lymphome lymphocytaire (extrait de ³).

I.A.3 Facteurs de risques et formes familiales

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

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

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

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

I.B Diagnostic

I.B.1 Circonstances de découverte et critères diagnostiques

I.B.1.1 Circonstances de découverte

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

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

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

I.B.1.2 Diagnostic

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

I.B.1.2.1 Hémogramme

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

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

I.B.1.2.2 Immuphénotypage et analyse morphologique

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

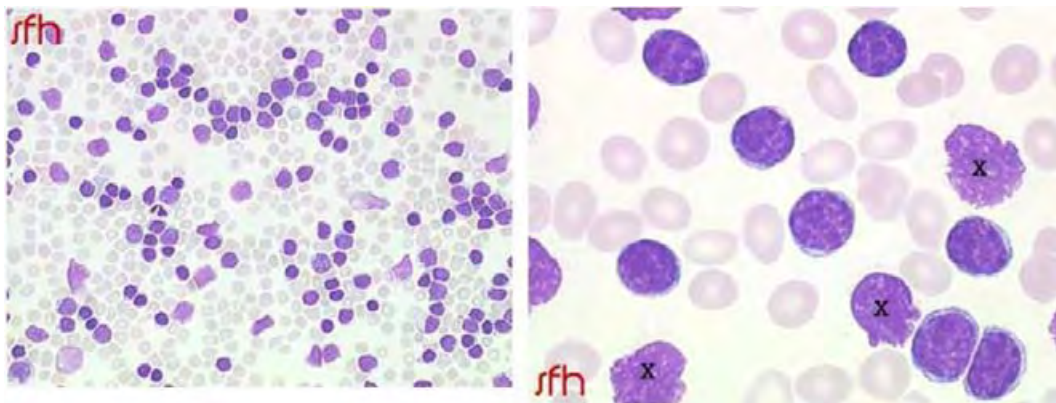


Figure 2 : Étalemt sanguin typique d'une LLC (gauche). Nombreux petits lymphocytes avec noyau arrondi et cytoplasme très réduit avec des ombres de Gumprecht (croix) (droite) (source : <http://campus.cerimes.fr/>).

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

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

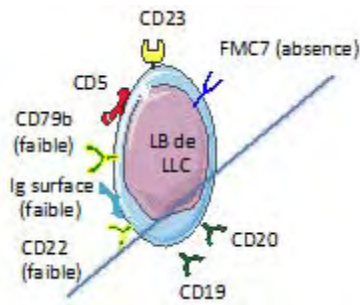


Figure 3: Représentation schématique d'un clone leucémique typique de LLC (haut : marqueurs pris en compte dans le score de Matutes).

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

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

Table 1: Score de Matutes ¹⁷.

I.B.1.2.3 Diagnostic différentiel

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

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

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

D'après la classification des néoplasies hématopoïétiques de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), la LLC diffère du lymphome lymphocytaire (SLL, Small Lymphocytic Leukemia) uniquement par des manifestations cliniques différentes¹⁹. Dans le SLL, on retrouve la présence d'adénopathies et/ou d'une splénomégalie, résultant de l'infiltration des cellules B matures identiques à celles de la LLC. Cependant dans le SLL, la lymphocytose est normalement inférieure à 5 000 lymphocytes / mm³¹⁶.

I.B.2 Explorations initiales obligatoires

I.B.2.1 Interrogatoire

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

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

I.B.2.2 Examen clinique

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

I.B.2.3 Examens biologiques

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

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

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

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

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

I.C Origine de la leucémie lymphoïde chronique et physiopathologie

I.C.1 Origine de la leucémie lymphoïde chronique

I.C.1.1 La lymphocytose B monoclonale isolée

La lymphocytose B monoclonale isolée (MBL) se définit par une lymphocytose B monoclonale persistante inférieure à 5 000 lymphocytes / mm³ en l'absence d'atteinte ganglionnaire, de cytopénie ou de maladie auto-immune associée²⁰. Elle est retrouvée chez 3 à 12 % des individus dans la population générale selon les études et les techniques analytiques utilisées (Figure 4).

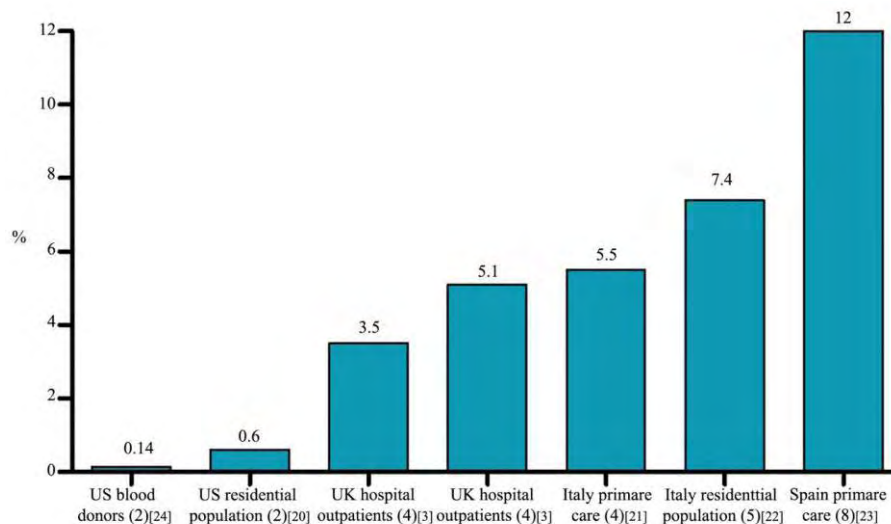


Figure 4 : Prévalence de la MBL aux Etats-Unis et dans différents pays européens (extrait de²⁰).

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

Il est intéressant de noter que malgré la faible lymphocytose, les MBL peuvent présenter des anomalies cytogénétiques caractéristiques de la LLC²¹ mais les données sur les mutations récurrentes manquent dans la littérature. Enfin, au niveau biologique, les MBL ne diffèrent des LLC stade Rai 0 (stade précoce de la maladie, ces stades seront plus précisément décrits dans la partie I.D.2.2 Classification de Rai) qu'au regard du statut IgHV (Immunoglobulin Heavy Chain), ce dernier étant plus souvent retrouvé non muté chez les patients Rai 0 comparés aux

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

patients atteints de MBL ²². Ces résultats posent la question du suivi des patients MBL, ainsi en France l'InVS proposait en 2012 de rendre sa déclaration obligatoire, proposition restant sans réponse à l'heure actuelle.

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

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

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

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

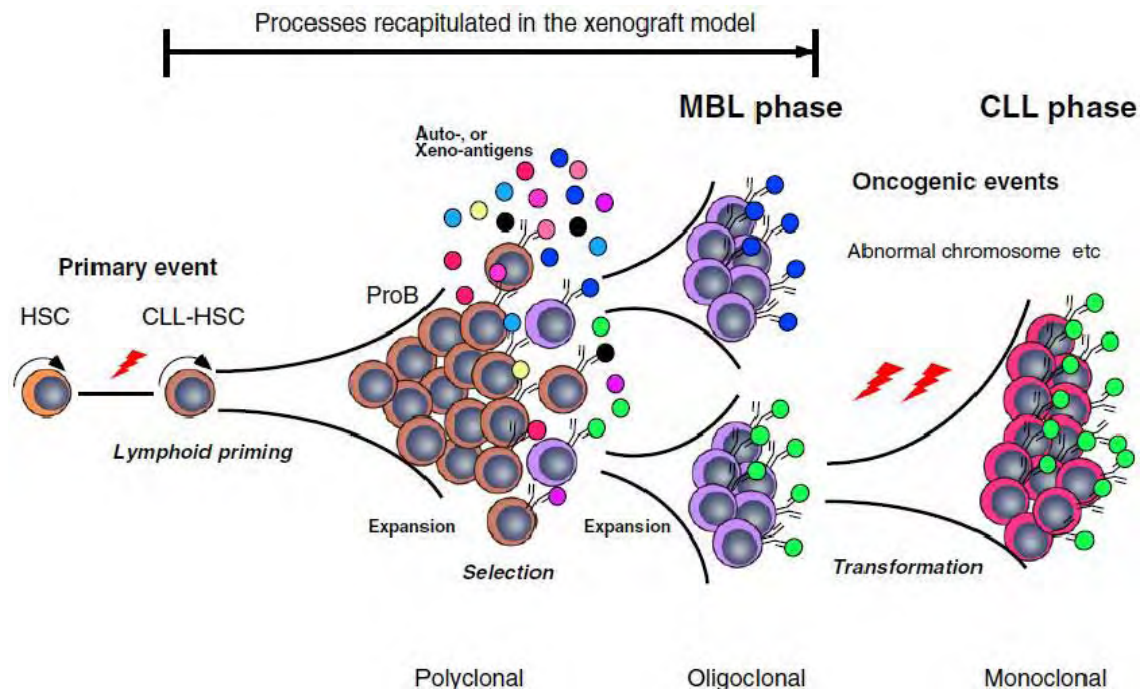


Figure 5: Présentation schématique du développement de LLC chez l'Homme basée sur un modèle de xélogreffe murine (extrait de ²⁶).

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

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

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

Or, dans la LLC, des études ont montré l'existence de similarités de séquence du BCR chez environ 20 % des patients ²⁷. Ces similarités, appelées stéréotypiques, suggèreraient un biais de répertoire qui serait le reflet d'une stimulation antigénique commune lors de la leucémogénèse. Cette hypothèse se heurte au fait que le profil des antigènes (Ag) reconnus par

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

le BCR diffère, suggérant que plusieurs Ag différents pourraient être responsables de la sélection du répertoire des Ig (Immunoglobulines) associées à la LLC ²⁸. De plus, le BCR des cellules leucémiques de LLC est capable de reconnaître un épitope interne à leur propre BCR, induisant sa stimulation autonome ²⁹. Ainsi, l'hypothèse d'une stimulation antigénique commune à l'origine de la LLC semble peu probable au vu de la diversité des Ag reconnus.

D'autres auteurs proposent de diviser la leucémogénèse des LLC en deux groupes sur la base du statut mutationnel d'IgHV (Figure 6) ³⁰.

Ainsi, les cellules leucémiques à IgHV non muté, qui expriment le plus souvent un BCR polyréactif, proviendraient de lymphocytes B normaux soumis à une stimulation antigénique de faible intensité mais constante ce qui induirait leur prolifération. La localisation tissulaire de cette stimulation est quant à elle peu claire. Les hypothèses les plus communément retenues évoquent les centres germinatifs, bien que l'on n'observe pas de commutation isotypique, ou encore la zone marginale, *via* une réponse à des Ag T indépendants ³¹.

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

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

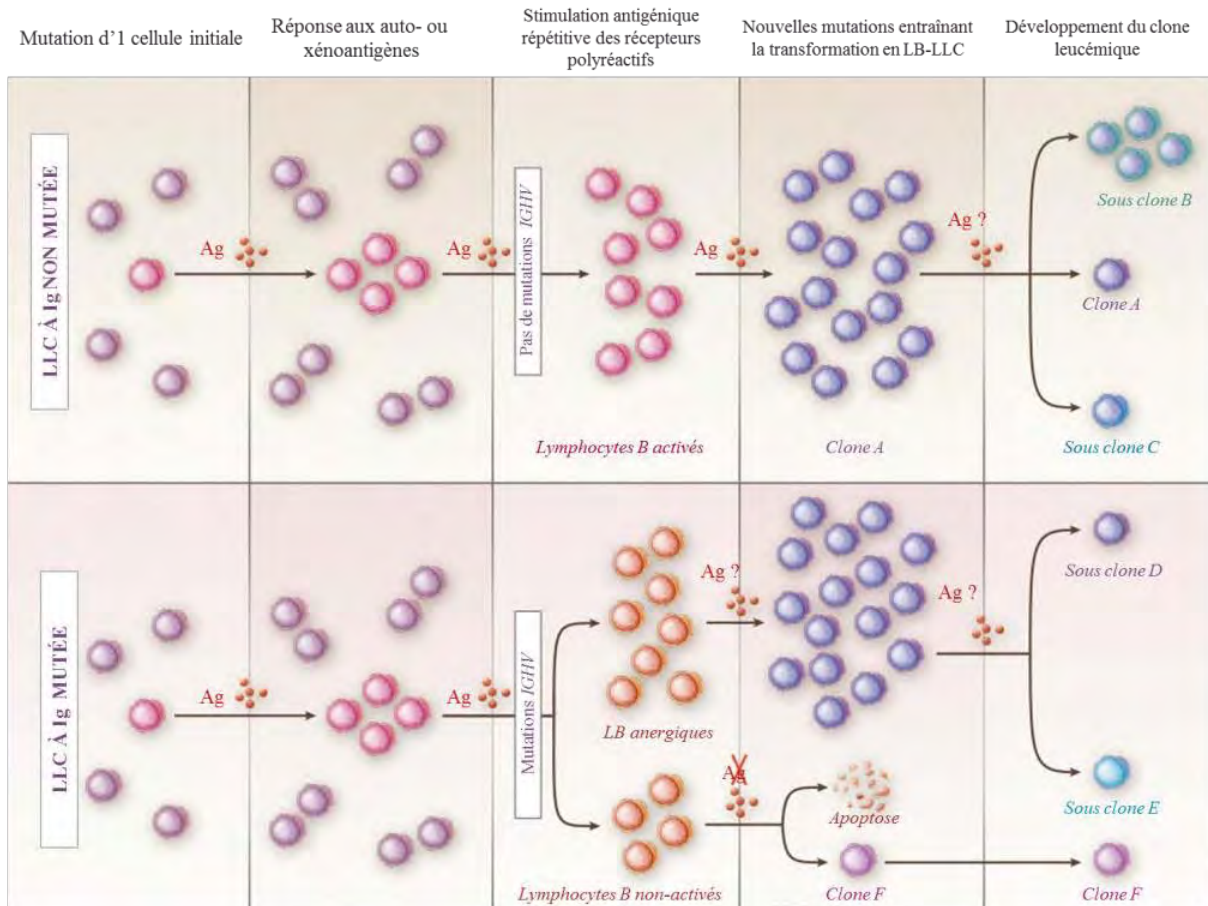


Figure 6: Représentation schématique du développement et de l'évolution de la LLC dépendante de la stimulation antigénique selon le modèle de Chiorazzi (adapté de ³⁰).

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

Une autre hypothèse a donc été formulée. La LLC, peu importe le statut IgHV, proviendrait de la prolifération de lymphocytes B mémoires de la zone marginale. Ainsi, suivant leur mode d'activation, il y aurait ou non des mutations hypersomatiques ce qui expliquerait l'émergence de clones mutés ou non. Cependant, dans cette théorie, les lymphocytes B mémoires n'expriment ni le CD5 ni le CD23, deux marqueurs d'un état activé. Enfin, afin de complexifier encore cette théorie, il a récemment été décrit un clone leucémique IgHV non muté mais sélectionné par une stimulation antigénique dépendante des cellules T *via* des cellules dendritiques ³¹. Cette hypothèse reste donc à ce jour purement intellectuelle, avec peu de preuves expérimentales venant la confirmer ou l'infirmer.

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

I.C.1.4 Le cas des cellules B non leucémiques CD19⁺ CD5⁺ CD23⁺

Il existe, chez l'individu sain, une sous-population de lymphocytes B exprimant le CD5 et le CD23 correspondant à un stade mature activé selon leurs critères phénotypiques. Ainsi, l'hypothèse élégante selon laquelle la LLC proviendrait d'un processus leucémogène de cette sous-population a été formulée, bien qu'elle soit relativement peu étayée par des preuves expérimentales.

I.C.2 Physiopathologie

I.C.2.1 La résistance à l'apoptose

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

En effet, une surexpression de la protéine antiapoptique Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) a été mise en évidence^{32,33} dans les cellules leucémiques. Initialement cette surexpression était expliquée par une hypométhylation du promoteur de Bcl-2³⁴, mais aujourd'hui l'hypothèse la plus communément admise est que miR-15-a et miR-16-1, qui régulent négativement Bcl-2 au niveau post traductionnel, sont sous-exprimés dans la LLC. Cette régulation de la transcription de Bcl-2 conduit à une accumulation de cette protéine³⁵. De plus, d'autres protéines antiapoptiques telles que Bcl-x1 (B-cell lymphoma-extra large) et Mcl-1 (Myeloid cell leukemia 1) sont surexprimées dans cette pathologie, tandis que des protéines proapoptiques telles que Bax (BCL2-associated X protein) ou Bcl-xs (B-cell lymphoma-extra small) sont quant à elles sous-exprimées³⁶. De ce déséquilibre résulterait un défaut d'apoptose des cellules leucémiques. En plus de favoriser la survie des cellules leucémiques, ces protéines ont été décrites comme étant des facteurs clés dans la résistance aux traitements. Ainsi, une augmentation du rapport Bcl-2/Bax est associée à une maladie en progression et une résistance aux drogues *in vitro*³⁷. On peut également noter qu'un taux élevé de Mcl-1, *in vitro* ou *in vivo*,

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

ou du rapport Mcl-1/Bax sont corrélés à une mauvaise réponse à la fludarabine et une durée avant traitement réduite³⁸.

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

Cette évidence de défaut d'apoptose *in vivo* contraste très fortement avec l'hypersensibilité de ces cellules à la mort programmée *in vitro*. En effet, *ex vivo* ces cellules leucémiques engagent spontanément des processus apoptotiques³⁹. Ce processus peut être inhibé par la culture de ces cellules leucémiques avec des cellules de leur microenvironnement tumoral telles que les cellules stromales de moelle osseuse³⁹, les cellules mésenchymateuses⁴⁰, ou les Nurse-Like Cells (NLC)⁴¹ (voir III.C.3.2 Protection contre l'apoptose des cellules leucémiques *in vitro*).

I.C.2.2 La prolifération

La vision selon laquelle la LLC serait une maladie quiescente résultant d'un défaut d'apoptose plus que d'une prolifération reposait sur plusieurs faits objectifs. Premièrement, les cellules leucémiques, prélevées dans le sang périphérique, sont des lymphocytes quiescents. On observe en effet au niveau morphologique une chromatine nucléaire condensée, un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, et une absence de nucléole. Deuxièmement, ces cellules, toujours prélevées dans le sang périphérique, sont bloquées en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire. L'hypothèse retenue pour expliquer ce phénomène serait que les gènes contrôlant ce cycle sont dérégulés. En effet, dans les cellules leucémiques, la protéine p27Kip1, un inhibiteur de kinases dépendantes du cycle cellulaire, est sur-exprimée ce qui expliquerait le blocage en phase G₀/G₁.

La plus grosse brèche dans cette théorie apparaît dans l'étude de Messmer et al⁴². En faisant ingérer à des patients de l'eau lourde quotidiennement, ils ont étudié l'incorporation de ce radio isotope au sein des cellules leucémiques. Grâce à cette méthode, ils ont pu montrer que 0,1 à 1,75 % de l'ensemble des cellules leucémiques proliféraient soit environ de 1 x10⁹ à 1x 10¹² cellules naissantes chaque jour. De plus, ils proposent qu'un taux de prolifération supérieur à 0,35 % serait le reflet d'une maladie progressive⁴².

Ensuite, les cellules leucémiques expriment un certain nombre de marqueurs d'activation (CD23 et souvent CD25, CD69 et CD71). Ces observations indiquent que ces

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

cellules malignes ressemblent à des lymphocytes B activés ayant eu une expérience antigénique.

De plus, l'analyse de la longueur des télomères apporte une autre preuve de la prolifération des cellules leucémiques. Les télomères sont des séquences polynucléotidiques répétées en tandem, situées aux extrémités des chromosomes et qui se raccourcissent après chaque division cellulaire. Plusieurs études révèlent que les cellules leucémiques ont des télomères plus courts que les lymphocytes B normaux démontrant ainsi une augmentation de leur prolifération⁴³⁻⁴⁷.

Finalement, des cellules leucémiques en prolifération peuvent être retrouvées au sein des ganglions lymphatiques ou plus rarement dans la moelle osseuse⁴⁸. Elles sont regroupées au niveau de structures histologiques particulières appelées pseudo-follicules. Elles sont composées de foyers nodulaires contenant de grands agrégats de cellules tumorales, proliférantes (Ki67⁺) et exprimant fortement des molécules anti-apoptotiques. Au sein même de ces centres de prolifération, ces cellules leucémiques sont en contact avec les cellules du microenvironnement tumoral et leurs délivrent de nombreuses cytokines et chimiokines permettant leur prolifération et leur survie au sein de la niche^{49, 50}. Ainsi, les cellules proliféreraient au sein des ganglions et migreraient ensuite dans le sang périphérique *via* un mécanisme impliquant la sphingosine-1-phosphate et son récepteur⁵¹. Dans le sang, sans leur microenvironnement, ces cellules deviendraient quiescentes.

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

I.C.2.3 La voie de signalisation du BCR

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

Le BCR est constitué d'une Ig de surface associée au CD79a et CD79b (Immunoglobulin α et β respectivement). Son activation, suite à la fixation d'un antigène sur l'Ig de surface, entraîne une phosphorylation de la partie intracellulaire de l'hétérodimère CD79a/CD79b. Cette fixation permet le recrutement de la protéine kinase SYK (Spleen Tyrosine Kinase) qui active ensuite une cascade de signalisation impliquant BTK (Bruton Tyrosine Kinase) et PI3K δ (isoforme delta de la Phosphatidylinositol-3 Kinase). Ces kinases

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

activeront ensuite différentes protéines des voies de prolifération et de survie comme les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ou NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) ⁵² (Figure 7).

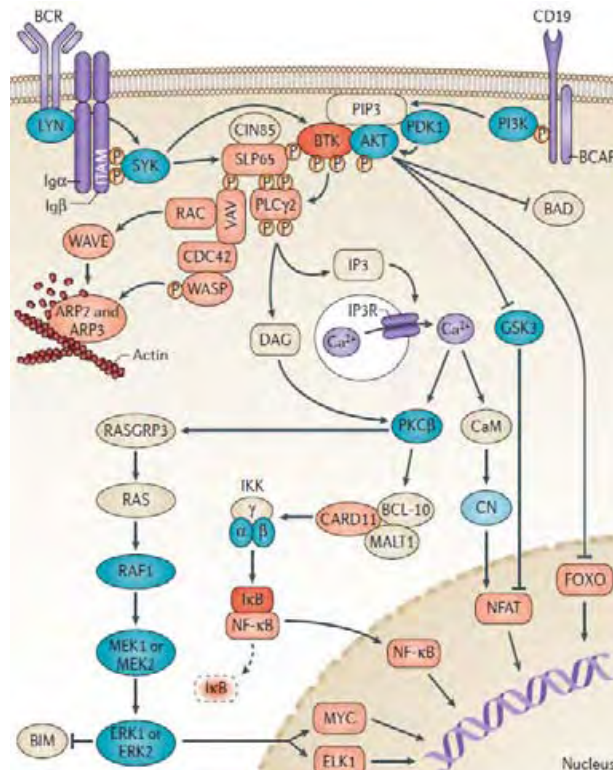


Figure 7: Représentation schématique du signalosome du BCR (extrait de ⁵³).

Dans la LLC, la voie de signalisation du BCR est essentielle à la survie, à la prolifération, et aux interactions avec le microenvironnement ⁴⁹.

De plus, lorsque l'on dicotomise les patients suivant leur statut IgHV (voir le statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines), on observe au niveau transcriptomique que parmi la centaine de gènes différenciellement exprimés, la plupart concerne la signalisation du BCR ^{54, 55}. En effet, ces auteurs ont retrouvé notamment ZAP-70 (zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa), protéine qui est absente dans la voie de signalisation normale du lymphocyte B. Cette protéine est utilisée dans la LLC pour augmenter la signalisation du BCR *via* une augmentation des flux calciques et en activant diverses kinases dont BTK ⁵⁶.

Enfin, cette voie de signalisation fait actuellement l'objet d'une attention toute particulière car de nombreux inhibiteurs des protéines de signalisation sont en cours de développement ou déjà sur le marché notamment dans le traitement de la LLC (pour plus d'informations voir I.E.5.1 L'ibrutinib (Imbruvica ®) et I.E.5.2 Idélalisib (Zydelig ®)).

I.D Facteurs pronostiques

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

I.D.1 Facteurs pronostiques généraux

Comme dans d'autres hémopathies malignes, l'âge avancé, un mauvais état général, l'existence de signes généraux, des facteurs de comorbidités associés, ou encore le sexe masculin, ont un impact négatif sur la survie des patients ⁵⁷⁻⁵⁹.

I.D.2 Facteurs pronostiques clinico-biologiques

I.D.2.1 Classification de Binet

Cette classification est la plus utilisée en France et en Europe. Créée en 1981 par Jacques-Louis Binet, elle est déterminée par le nombre d'aires ganglionnaires atteintes, le plus souvent bilatérales (Figure 8), et les troubles de l'hémogramme (Table 2), et divise les patients en trois groupes ⁶⁰. Au moment du diagnostic, 75 % des patients sont au stade A, 18 % au B et 7 % au C.

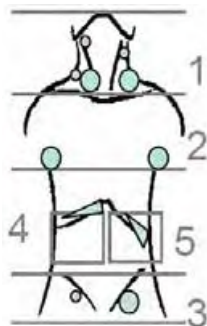


Figure 8 : Les cinq aires lymphoïdes palpables (extrait de ²).

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

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

Table 2: Classification des stades de Binet ⁶⁰.

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

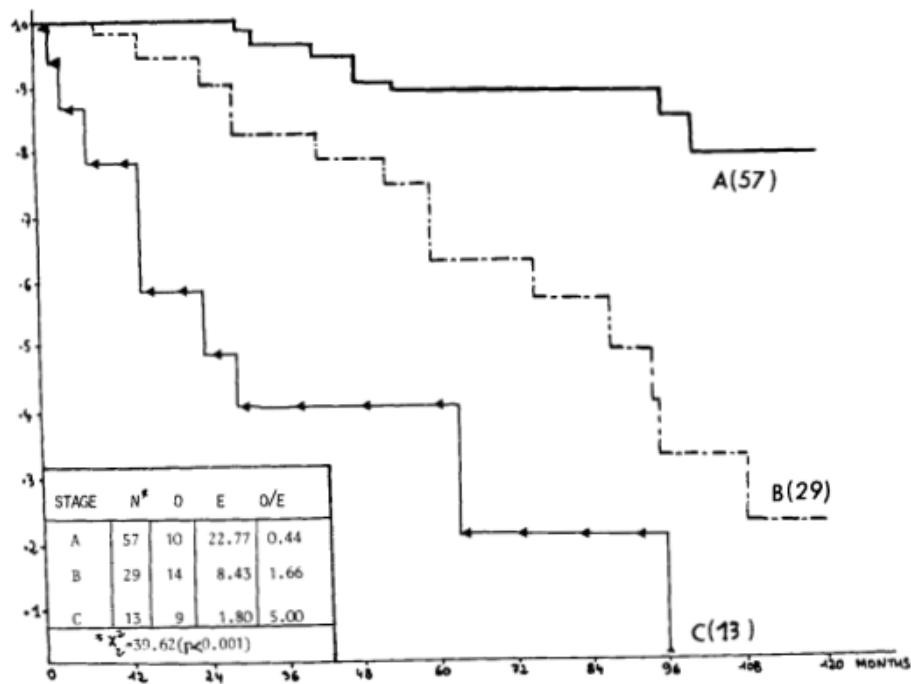


Figure 9: Courbes de survie en fonction du stade de Binet en 1981(extrait de ⁶⁰).

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

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

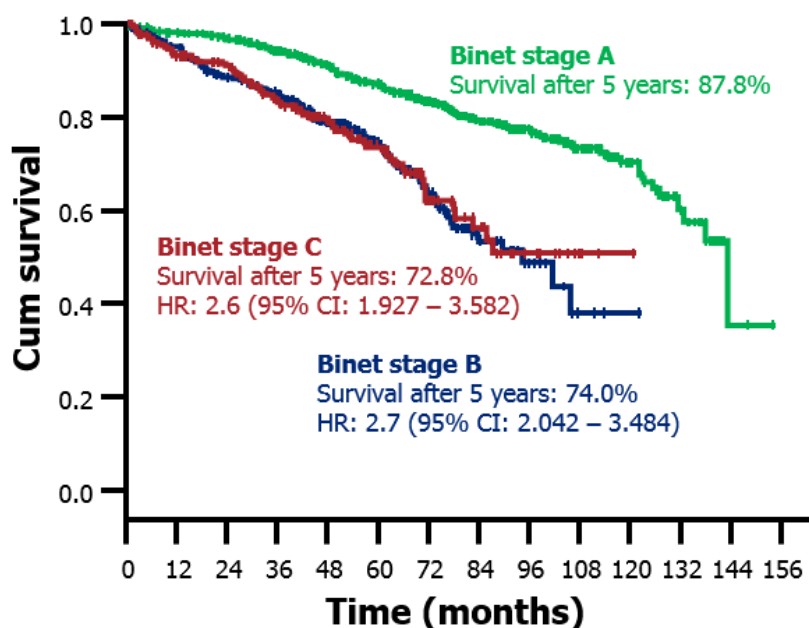


Figure 10: Courbe de survie en fonction du stade de Binet en 2011 (Hallek, communication personnelle).

I.D.2.2 Classification de Rai

Décrite par Rai aux Etats-Unis en 1975, elle est beaucoup utilisée en Amérique du Nord. Elle définit quatre stades par l'existence d'un syndrome tumoral (adéno-, spléno- ou hépatomégalie) et la présence de cytopénies (anémie, thrombopénie) (Table 3) ⁶¹. Là encore, cette classification est hautement pronostique de la survie (Table 3 et Figure 11)

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

Table 3: Classification de Rai ¹⁷.

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

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

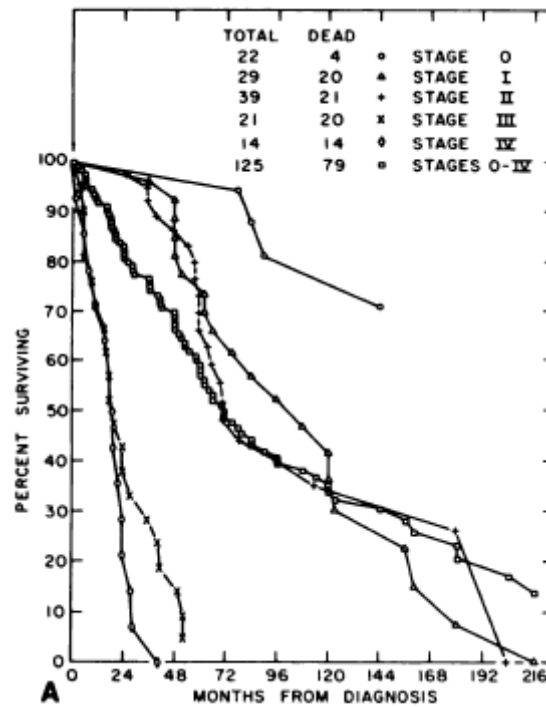


Figure 11: Courbes de survie en fonction du stade de Rai (extrait de ⁶¹).

I.D.2.3 Les facteurs pronostiques liés à la prolifération : le temps de doublement des lymphocytes

Le temps de doublement des lymphocytes (LDT) se définit comme la durée durant laquelle le nombre absolu de lymphocytes est multiplié par deux. Il s'agit d'un marqueur de prolifération mais aussi de défaut d'apoptose sans qu'il soit possible de différencier la part respective de chacun. Ainsi, un LDT inférieur à 6 mois est un reflet d'une maladie active et nécessite un traitement ⁶². De plus, un LDT inférieur à 12 mois est associé à une diminution de la survie globale ⁶³ (Figure 12).

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

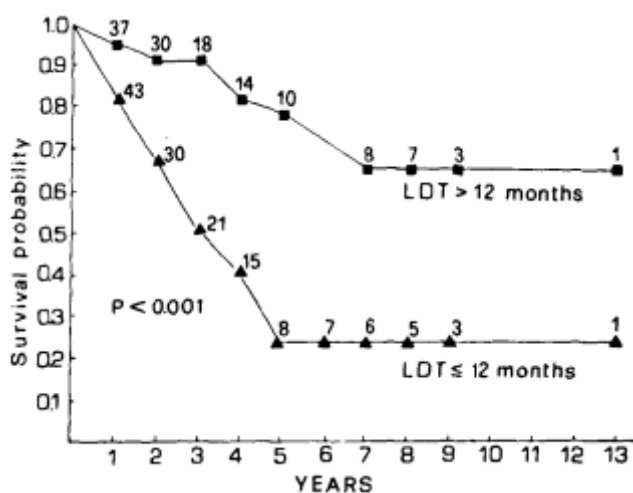


Figure 12: Courbes de survie en fonction du LDT (extrait de ⁶³).

I.D.2.4 Les facteurs pronostiques liés à la signalisation du BCR : le statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines

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

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

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

La première concerne les LLC avec IgHV muté, soit environ 60 % des patients, où la chaîne lourde des Ig présente plus de 2 % de différences avec celle du lymphocyte B naïf. La seconde, les LLC avec IgHV non-muté, soit environ 40 % des patients, où la chaîne lourde des Ig présente moins de 2 % de différences avec le lymphocyte B naïf. Il s'agit d'un facteur

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

pronostique important, les patients LLC à IgHV non muté ayant une diminution significative de leur survie sans progression, de leur temps sans retraitement ⁶⁴ et de leur survie globale (Figure 13).

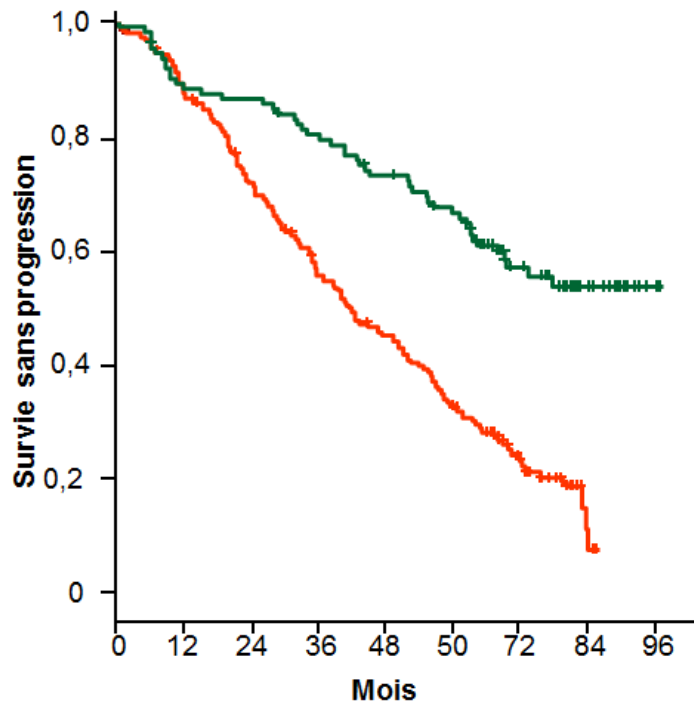


Figure 13: Courbes de survie sans progression de patients LLC traités par RFC (Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab) en fonction du statut IgHV (courbe verte : IgHV muté, courbe orange : IgHV non muté) (Fisher K., IwCLL, 2013).

Le statut mutationnel ne varie pas au cours de la LLC ⁶⁴. L'utilité de sa détermination est contrebalancée par le fait qu'elle fait appel à un procédé long, coûteux et nécessitant des techniques rarement accessibles hors des laboratoires hospitaliers des CHU.

I.D.3 Marqueurs cytogénétiques

La découverte de marqueurs cytogénétiques, notamment par la FISH (Hybridation *In Situ* en Fluorescence), a révolutionné la prise en charge de la LLC ^{62, 65} en retrouvant des anomalies cytogénétiques liées au pronostic, chez plus de 80 % des patients.

Contrairement à d'autres hémopathies malignes caractérisées par des arrangements chromosomiques récurrents, comme le chromosome Philadelphie dans les leucémies myéloïdes chroniques (LMC), dans la LLC aucun évènement oncogénique spécifique responsable de son

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

initiation n'a été découvert. La majorité de ces anomalies apparaît au cours du développement et semble survenir plus fréquemment chez les patients ayant un statut IgHV non muté ⁶².

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

L'impact pronostique, la fréquence et les anomalies génétiques consécutives des principaux marqueurs cytogénétiques sont résumés dans la Table 4.

Anomalies caryotypiques	Fréquence (%)	Pronostic	Anomalies génétiques	Médiane de survie (mois)	Commentaires	Références
Délétion 13q14	51	Favorable	Perte de <i>miR-15a</i> et de <i>miR-16-1</i>	133	-	15, 65-68
Délétion 11q22-23	17-19	Défavorable	Perte d' <i>ATM</i>	79	-	68-76
Trisomie 12	15	intermédiaire	Non décrit	114	Associé à un score de Matutes < 4	67, 77-79
Délétion 17p13	5-7	Défavorable	Perte de <i>TP53</i>	32	Résistance à la fludarabine	80-83
Délétion 6q21	5-6	Intermédiaire	-	105		84
Translocation (igH-Bcl2)	4-7	Défavorable	Activation constitutive de <i>Bcl2</i>	-	-	85
Caryotype complexe (plus de 3 anomalies non apparenté)	10	Défavorable	-	18.3	Résistance à l'ibrutinib	86-88

Table 4 : Principales anomalies cytogénétiques retrouvées dans la LLC.

I.D.4 Mutations récurrentes

Le développement récent des techniques de séquençage à haut débit a mis en évidence des mutations somatiques récurrentes contribuant à la pathogenèse de la LLC. Au total 18 anomalies récurrentes ont été décrites dont *NOTCH1*, *XPO1* (Exportin 1), *MYD88* (Myeloid Differentiation Primary Response 88), *KLH6* (Kelch-Lite 6), *TP53* (Tumor Protein p53), *TGM7* (Transglutaminase 7), *BIRC3* (Baculoviral IAP Repeat Containing 3), *PLEKHG5* (pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 5), *ATM* (Ataxia telangiectasia mutated), *SF3B1* (splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa), *ZMYM3* (zinc finger, MYM-type 3) *MAPK1*, *FBXW7* (F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase) et *DDX3* (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3) ⁸⁹. De plus, ces mutations sont mutuellement exclusives.

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

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

Les principales mutations récurrentes de la LLC ainsi que leur pronostic sont résumés dans la Table 5.

Mutations récurrentes	Fréquence (%)	Pronostic	Médiane de survie (mois)	Commentaires	Références
TP53	4-37	Défavorable	40.8	Résistance à la fludarabine Même impact pronostique pour les clones ultraminoritaires	81, 90, 91
NOTCH1	8-12	Défavorable	93.8	Evolution fréquente en lymphome B diffus à grande cellules	89, 92-98
SF3B1	5-18	Défavorable	-	Souvent associé à la délétion 11q Résistance à la fludarabine	98, 99
MYD88	3	Peu clair	-	Plus fréquente chez les patient IgHV muté	89, 98, 100
BIRC3	2	Défavorable	37.2	Résistance à la fludarabine	101, 102

Table 5 : Principales mutations récurrentes retrouvées dans la LLC.

I.D.4.1 Classification combinant les anomalies caryotypiques et les mutations récurrentes

En se basant sur les facteurs cytogénétiques et les mutations récurrentes, Rossi *et al* ont proposé une classification hiérarchique des patients nouvellement diagnostiqués en quatre groupes ¹⁰⁰. Le premier groupe, pour les patients à haut risque, concerne les patients mutés ou délétés pour *TP53* et/ou *BIRC3* indépendamment des autres mutations et/ou anomalies caryotypiques, présente une survie globale à dix ans de 29 %. Le second, pour les patients ayant des mutations sur *NOTCH1* et/ou *SF3B1* et/ou une délétion 11q22-23 en l'absence des mutations décrites dans le premier groupe, est défini comme un groupe de risque intermédiaire avec une survie à 10 ans de 37 %. La présence d'une trisomie 12, d'un caryotype normal et de *TP53*, *BIRC3*, *NOTCH1* et *SF3B1* non mutés forme le troisième groupe des patients à risque faible avec une survie à dix ans de 57 %. Enfin, les patients ayant une délétion 13q forment le dernier groupe, à risque très faible dont la survie à dix ans ne diffère pas de la population témoin (Figure 14).

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

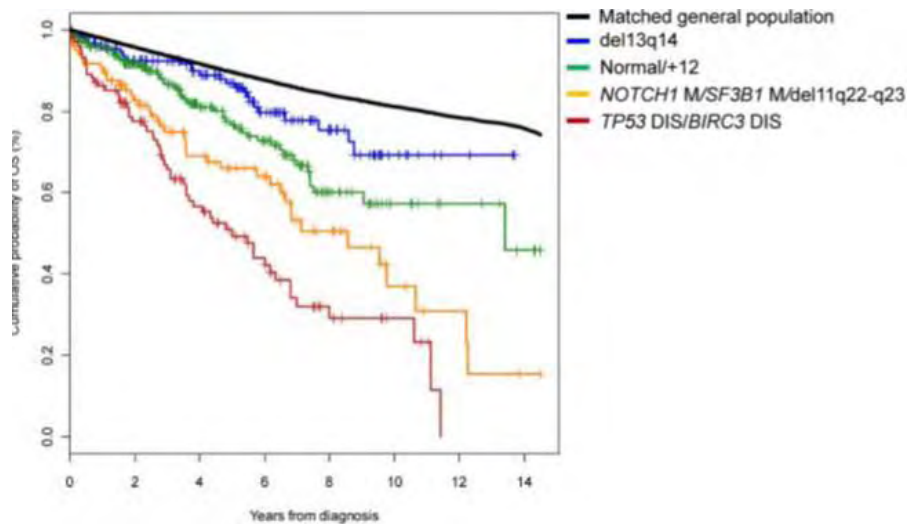


Figure 14: Courbes de survie globale selon la classification hiérarchique proposée par Rossi *et al* basée sur les anomalies cytogénétiques et les mutations récurrentes (extrait de ¹⁰⁰).

I.D.5 Marqueurs sériques pronostiques

I.D.5.1 $\beta 2$ microglobulinémie

La $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$) est une protéine extracellulaire de la superfamille des Ig liée de façon non covalente à la chaîne α des molécules du CMH (Complexe Majeur d’Histocompatibilité) de classe I. La forme soluble de cette protéine est détectable dans le sérum et cette $\beta 2$ microglobulinémie est un facteur pronostique indépendant ¹⁰³. Lorsqu’elle est élevée, on observe chez les patients à un stade avancé de la maladie, une charge tumorale élevée et une infiltration ganglionnaire et médullaire.

Une élévation de sa concentration est associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie ¹⁰⁴ ainsi qu’un temps avant la rechute et une survie globale diminués ^{62, 105} (Table 6).

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

Table 6: Médiane de survie en fonction du taux de $\beta 2$ microglobuline ¹⁰⁵.

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

Néanmoins, il faut prendre certaines précautions avec ce facteur. En effet, la β_2m a une élimination rénale dépendante du DFG (Débit de Filtration Glomérulaire) et peut donc être augmentée artificiellement par une insuffisance rénale. Ainsi, la valeur prédictive de ce facteur pronostique serait améliorée si on ajustait la β_2m au DFG ⁶².

I.D.5.2 Taux de Thymidine Kinase sérique

La thymidine kinase (TK) est une enzyme cellulaire impliquée dans la réparation de l'ADN lors de sa synthèse. Elle contrôle la phosphorylation de la désoxythymidine en désoxythymidine monophosphate, ensuite incorporée sous forme triphosphate à l'ADN. Sa forme prédominante, TK1, est retrouvée dans les cellules en division, elle est donc corrélée à la prolifération cellulaire ^{62, 65} ce qui en fait un marqueur de l'activité proliférative. Dans la LLC, l'activité de la TK sérique (sTK) est donc probablement liée à la quantité de cellules leucémiques en division ¹⁰⁴. Un taux sérique de TK élevé est associé à une progression rapide et aux stades avancés de la maladie ^{106, 107}. Parmi les patients Binet stade A, des taux élevés de sTK sont corrélés à d'autres marqueurs pronostiques tels que le LDT, l'expression de CD38 et de ZAP-70, le CD23 soluble, les anomalies cytogénétiques et le statut IgHV ¹⁰⁸. De plus, la sTK est considérée comme étant un marqueur pronostique indépendant ¹⁰³.

La technique d'analyse de l'activité de la sTK est radio enzymatique ce qui limite son utilisation. De plus, sa spécificité n'est pas parfaite, car son activité peut être augmentée lors d'une carence en vitamine B12 ou d'infections virales ¹⁰⁹, il n'est donc pas dosé couramment en routine.

I.D.6 Facteurs pronostiques liés au microenvironnement tumoral

I.D.6.1 Expression du CD38

Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire de type II, qui a une fonction de récepteur ou d'ectoenzyme. Son activité enzymatique est impliquée dans le métabolisme de l'ADP où elle a une activité NAD glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase ou encore ADP-ribose cyclique hydrolase. Il est physiologiquement présent sur les lymphocytes B, T, les cellules NK

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

et les monocytes. Sur ces cellules il peut s'associer avec le CMH de classe III et jouer un rôle de co-récepteur dans l'activation des lymphocytes T induite par les super-Ag¹¹⁰.

Dans la LLC, CD38 est à la fois un reflet de l'activité proliférative et de l'interaction avec le microenvironnement. Il a tout d'abord été décrit comme un marqueur de substitution au statut IgHV¹¹¹. Cependant, après de nombreuses études aux résultats controversés¹¹²⁻¹¹⁴, il est maintenant considéré comme un marqueur indépendant dans la LLC¹¹⁴⁻¹¹⁷. Les principaux problèmes limitant l'utilisation de ce marqueur en clinique sont que le taux de CD38 peut varier au cours de l'évolution de la maladie chez un même patient^{115, 117, 118} et que le taux de positivité fait encore débat. En effet, à l'origine, un taux arbitraire de 30 % a été défini¹¹¹, valeur confirmée plus tard par des études statistiques¹¹⁷ mais certaines équipes ont proposé des taux beaucoup plus faibles jusqu'à 7 %¹¹⁹. Ce pourcentage, même faible, serait le reflet de la part proliférante des cellules leucémiques. Son rôle dans le microenvironnement tumoral serait dû à la liaison avec son ligand, le CD31 aussi appelé PECAM1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1). La fixation de ce ligand, exprimé par les cellules stromales et les Nurse-Like Cells (NLC) provoque dans la cellule leucémique, l'activation d'une cascade de signalisation favorisant la survie de ces dernières¹²⁰.

L'expression du CD38 considérée comme positive est associée à un mauvais pronostic : stade avancé de la maladie, incidence plus importante d'adénopathies, hépatomégalie, taux de $\beta 2$ microglobuline et CD23s élevés, LDT court.

I.D.6.2 Expression du CD49d

Le CD49d ou intégrine $\alpha 4$ est une molécule d'adhésion généralement retrouvée complexée au CD29. Elle permet le déplacement des leucocytes, leur activation et leur survie. Cette protéine permet également les interactions entre leucocytes et cellules stromales médullaires dans les centres germinatifs via la fibronectine ou par la liaison à la molécule d'adhésion cellulaire VCAM-1 (vascular-cell adhesion molecule 1).

Dans la LLC, son expression est variable, mais est augmentée chez les patients ayant un stade avancé de LLC ou ayant des adénopathies lymphoïdes. Cette expression de CD49d est corrélée à l'expression de CD38. Quelques études montrent sa valeur prédictive sur la survie globale et le délai avant traitement¹²¹, mais il est peu utilisé en clinique.

I.E Traitements conventionnels de la leucémie lymphoïde chronique

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

La stratégie décisionnelle pour la LLC est présentée en Figure 15. Pour les patients sans indication thérapeutique initiale, une surveillance est nécessaire afin de détecter une éventuelle progression de la maladie. Cette surveillance, effectuée par le médecin traitant, passe par l'examen clinique et des NFS régulières tous les 3 à 6 mois. Il est important de noter que plus de la moitié des patients diagnostiqués au stade de Binet A ne seront pas évolutifs et donc non traités ultérieurement.

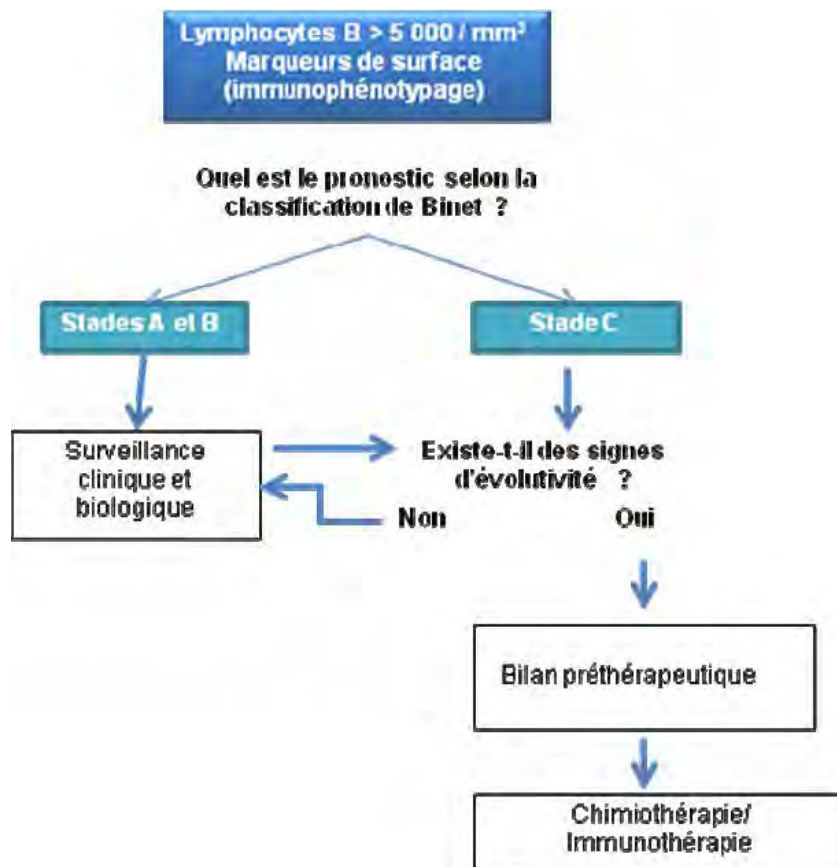


Figure 15: Schéma de la stratégie décisionnelle dans la LLC (extrait de ²).

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

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

Symptômes systémiques (au moins un) :

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

Syndrome tumoral volumineux :

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

Hyperlymphocytose progressive avec :

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

Insuffisance médullaire progressive ; apparition ou aggravation :

- Anémie ;
- Thrombocytopénie

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

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

I.E.2 Choix du traitement

Comme pour toute pathologie, l'état général des patients conditionne le traitement. En s'inspirant des classifications proposées dans les tumeurs solides, les Allemands ont proposé de classer les patients suivant trois groupes en fonction de leurs objectifs thérapeutiques. Le premier, le groupe « no go » est constitué des patients ayant une survie estimée réduite par de multiples et/ou de sévères comorbidités, qui doivent être traités avec les meilleurs soins palliatifs. Le second, le groupe « slow go » est composé de patients ayant une espérance de vie intermédiaire qui doivent être traités pour permettre un bon contrôle des symptômes de la maladie, *via* des traitements à des doses réduites. Enfin, le groupe des patients « go, go » est formé de patients avec un bon état général et ils sont traités par de fortes doses de chimiothérapie en vue d'obtenir de longues rémissions complètes.

I.E.3 Traitement de première ligne des patients avec un bon état général et *TP53* non muté : Rituximab + Fludarabine + Cyclophosphamide

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

Cycle 1 : Rituximab 375 mg/m² en IV (intraveineuse), à 50 mg/h (augmenté de 50 mg/h toutes les 30 min jusqu'à 400mg/h maximum) à J1 et cyclophosphamide 250 mg/m² *per os* à J1-3 et fludarabine 25 mg/m² en *per os* à J1-3.

Cycles 2-6 : Rituximab 500 mg/m² IV, à 50 mg/h (augmenté de 50mg/h toutes les 30 min jusqu'à 400mg/h max) à J1 et cyclophosphamide 250 mg/m² *per os* à J1-3 et fludarabine 25 mg/m² en *per os* à J1-3.

L'efficacité de cette association a été démontrée dans l'essai randomisé ouvert allemand CLL8, où un total de 817 patients atteints de LLC non précédemment traités et 552 patients atteints de LLC en rechute ou réfractaires, ont été randomisés afin de recevoir une chimiothérapie soit FC (fludarabine, cyclophosphamide) soit RFC (rituximab, fludarabine, cyclophosphamide) ¹²² (Figure 16).

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

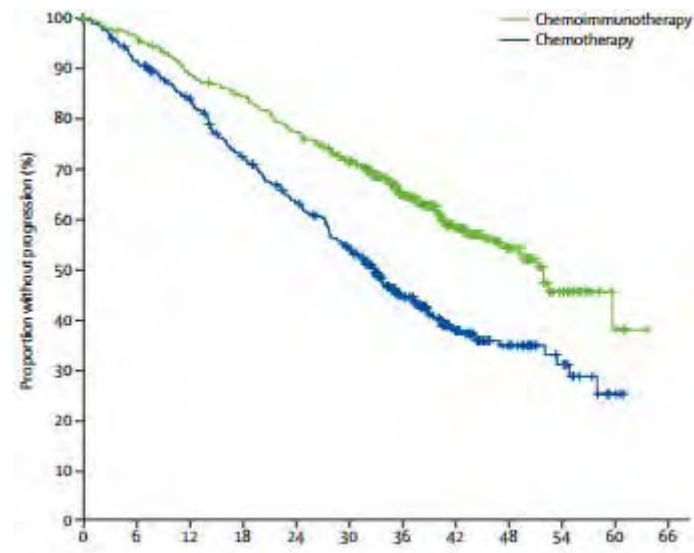


Figure 16: Survie sans progression de patients traités par RFC (courbe verte) ou FC (courbe bleue) (extrait de ¹²³).

I.E.3.1 Le rituximab (Mabthera ®)

Le Rituximab est un anticorps monoclonal chimérique anti CD20 développé par Roche ® ¹²⁴. Il est indiqué en association à une chimiothérapie pour le traitement des patients atteints de LLC, non précédemment traités ou en rechute ou réfractaires.

Le rituximab se lie spécifiquement à l'antigène transmembranaire CD20, une phosphoprotéine non glycosylée exprimée sur les lymphocytes pré-B et B matures et qui est présente sur plus de 95 % des cellules B des lymphomes non hodgkiniens. Le fragment Fab du rituximab se lie au CD20 et le fragment Fc peut générer des fonctions d'effecteurs immunitaires qui entraînent la lyse de ces lymphocytes. Le mécanisme possible de la lyse cellulaire induite par les effecteurs est une cytotoxicité dépendante du complément (CDC), faisant intervenir la liaison du fragment C1q ¹⁵¹. La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), passant par un ou plusieurs des récepteurs aux fragments constants des Ig présents notamment sur la surface des granulocytes, des macrophages et des cellules NK est également impliquée ^{125, 126}. Il a aussi été démontré que le rituximab induit une mort cellulaire directe des cellules leucémiques par apoptose ¹²⁷. L'ensemble des actions du rituximab est résumé dans la Figure 17.

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

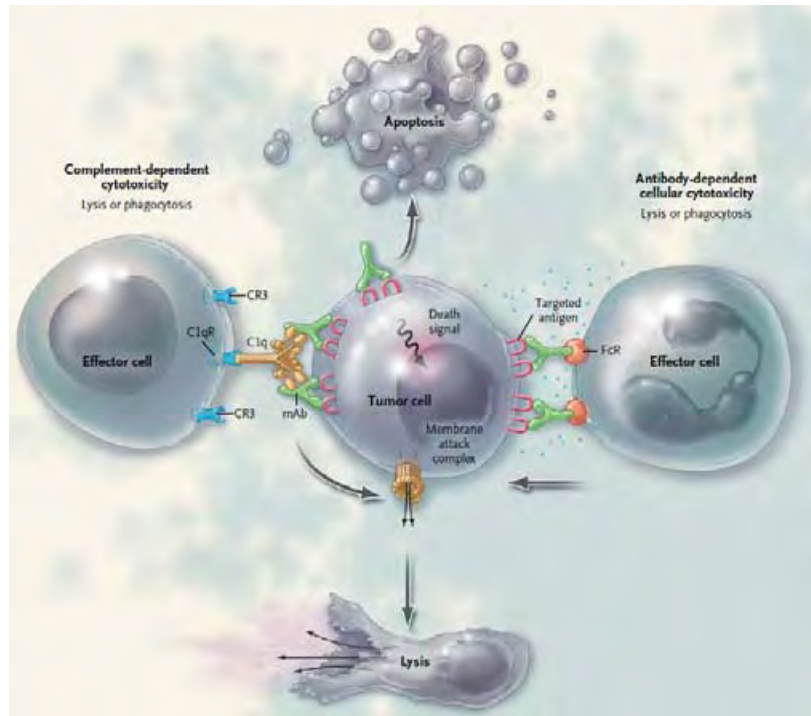


Figure 17: Représentation schématique des différents mécanismes d'action du rituximab (extrait de ¹²⁸).

I.E.3.2 La fludarabine (Fludara ®)

Indiquée dans le traitement de la LLC à cellules B chez les patients ayant des réserves médullaires suffisantes, la fludarabine est un antinéoplasique de la famille des purines commercialisé par Sanofi ® ¹²⁹. C'est un nucléotide hydrosoluble fluoré et phosphaté analogue de l'agent antiviral vidarabine, 9-β-arabinofuranosyladénine (ara-A) qui est relativement résistant à la désamination. Le phosphate de fludarabine est rapidement déphosphorylé en 2F-ara-A qui est incorporé dans la cellule puis subit une phosphorylation intracellulaire par la déoxycytidine kinase en triphosphate actif, le 2F-Ara-ATP. Il a été montré que ce métabolite agit en inhibant la ribonucléotide réductase, l'ADN polymérase alpha/delta et epsilon, l'ADN primase et l'ADN ligase, bloquant ainsi la synthèse de l'ADN. De plus, en raison d'une inhibition partielle de l'ARN polymérase II, il se produit une importante inhibition de la synthèse des protéines. Bien que certains aspects du mécanisme d'action de la 2F-ara-ATP soient encore obscurs, il est établi que ses effets sur l'ADN, l'ARN et la synthèse des protéines contribuent tous à l'inhibition de la prolifération des cellules leucémiques, l'inhibition de la synthèse de l'ADN étant le facteur principal ^{130, 131}.

I.E.3.3 Le cyclophosphamide (Endoxan®)

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

I.E.4 Le traitement de première ligne chez les patients âgés ou avec un mauvais état général sans mutation *TP53* : Rituximab + Bendamustine

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

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

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

Cycle 1: Rituximab 375 mg/m² IV à J1 et bendamustine 70 mg/m² IV à J1-2.

Cycles 2-6: Rituximab 500 mg/m² IV à J1 et bendamustine 70 mg/m² IV à J1-2.

La bendamustine est un agent alkylant antitumoral possédant une activité originale basée sur l'établissement de liaisons covalentes croisées par alkylation de l'ADN simple brin ou

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

double brin. En conséquence, les fonctions de matrice de l'ADN, sa synthèse et sa réparation sont déficientes. Il agit toutefois *in vitro* de manière différente des autres alkylants et il existe très peu de résistance *in vitro*, au moins en partie en raison de la persistance, comparativement plus longue, de l'interaction avec l'ADN.

I.E.5 Le traitement des patients avec une mutation de *TP53*, en rechute ou réfractaires : les petites molécules

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

I.E.5.1 L'ibrutinib (Imbruvica®)

L'ibrutinib est un inhibiteur suicide de la protéine Bruton Tyrosine Kinase (BTK). Pris par voie orale, il a obtenu son AMM en 2014 dans le traitement de la LLC en rechute/réfractaire (ou en première ligne avec délétion 17p/mutation *TP53*). Il est utilisé à 420 mg en une prise par jour, de façon chronique jusqu'à ce que la maladie progresse ou que les effets secondaires nécessitent l'arrêt. Il est très efficace quel que soit le caryotype, le statut IgHV, le statut de Rai et le nombre de traitements précédemment reçus (Figure 18).

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

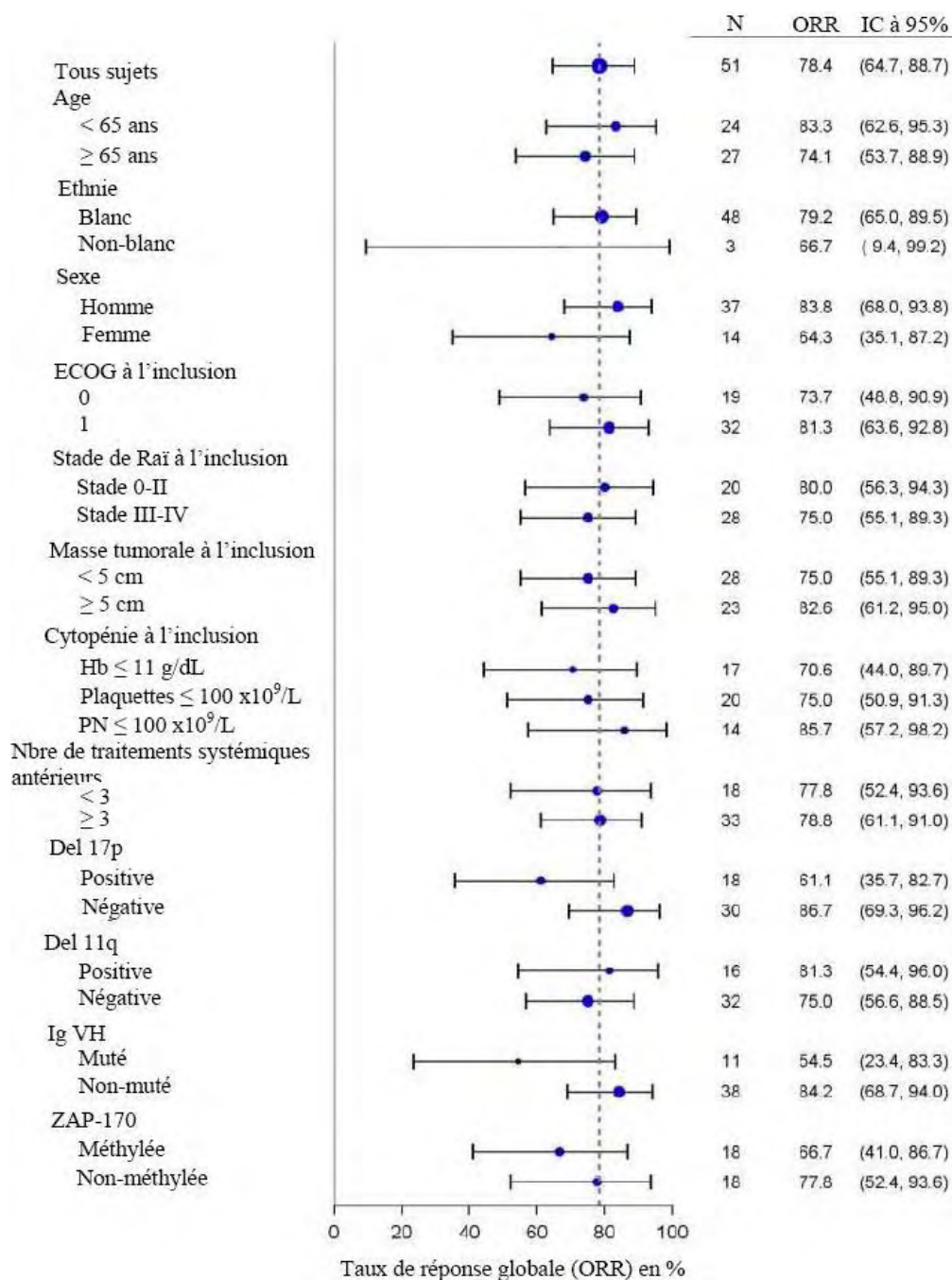


Figure 18: Analyses en sous-groupes du taux de réponse globale de patients traités par ibrutinib (Étude PCYC-1104-CA) (source: Vidal®).

BTK est une protéine kinase sans récepteur de la famille des Tec kinases, impliquée dans la signalisation du BCR mais aussi des TLR 4/9 (Toll-Like Receptors) et de CXCR4. La signalisation en aval du BCR promeut notamment la survie des cellules leucémiques *via* une activation séquentielle de protéines kinases présentées dans la Figure 19.

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

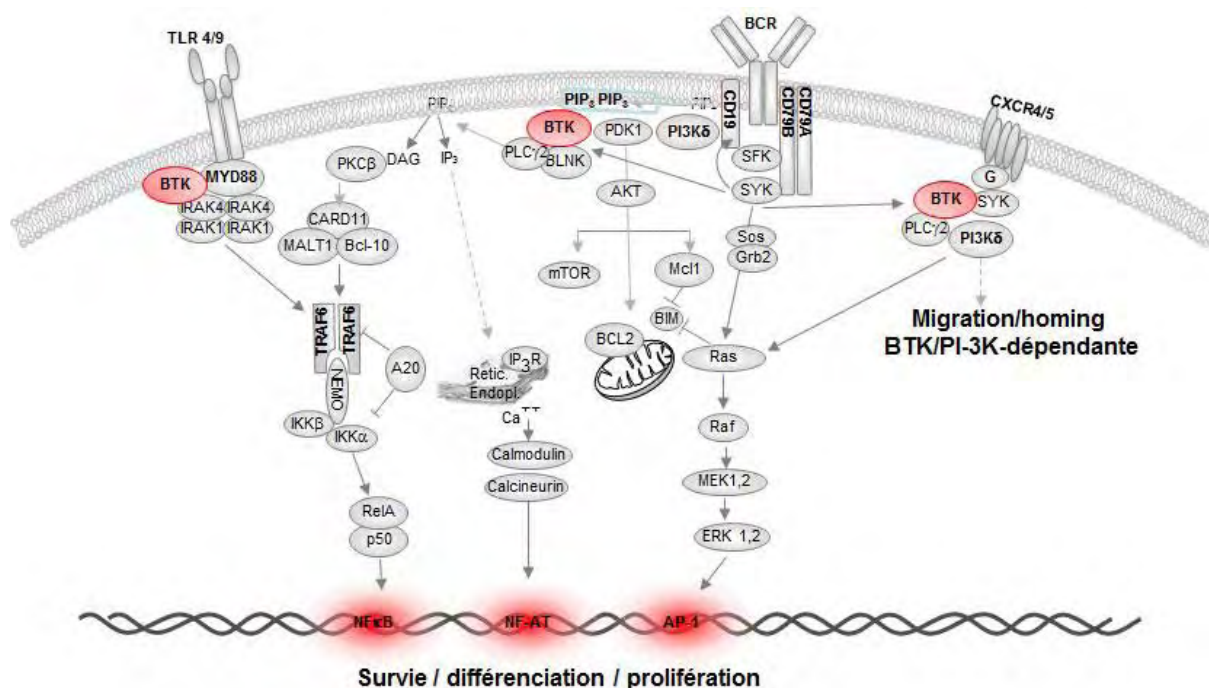


Figure 19: Implication de BTK dans les signalisations du clone leucémique (Ysebaert, non publié).

L'ibrutinib se lie de manière irréversible à BTK *via* une liaison covalente avec la cystéine 481 située dans le site actif de BTK avec une très forte affinité (IC₅₀ 0.5 nM)¹³². A 420 mg/ jour, il lie virtuellement l'ensemble des protéines BTK dans le sang périphérique¹³³. Cette inhibition est vendue comme étant très sélective¹³⁴⁻¹³⁶ et donc minimisant les effets secondaires. Les études précliniques ont montré qu'il inhibe la survie et la prolifération des cellules leucémiques¹³⁷, la migration des cellules leucémiques *via* CXCL12 (Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12) et CXCL13 (Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 13) et l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines^{138, 139}. *In vivo*, il provoque une rapide redistribution des cellules leucémiques situées notamment dans les ganglions lymphatiques vers le sang périphérique ce qui provoque une diminution rapide des adénopathies et une augmentation de la lymphocytose qui se stabilise en quelques mois¹³⁶⁻¹⁴². Malgré cela, la majorité des patients traités par ibrutinib ne sont pas en rémission complète et la lymphocytose stabilisée reste significativement plus élevée que la normale¹⁴⁰. De plus, le traitement favorise l'émergence de clones leucémiques mutants. En effet, chez des patients traités par ibrutinib, des cellules leucémiques présentant une substitution de la cystéine 481 du BTK par une sérine ont été décrites. Chez ces mutants, cette substitution rend l'ibrutinib incapable de se fixer sur la BTK et entraîne donc une résistance¹⁴³ (Figure 20). De même, chez deux patients, il a été mis en

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

évidence des mutations gain de fonction de PLC γ 2, un acteur situé en aval de BTK qui provoque une inefficacité de l'ibrutinib.

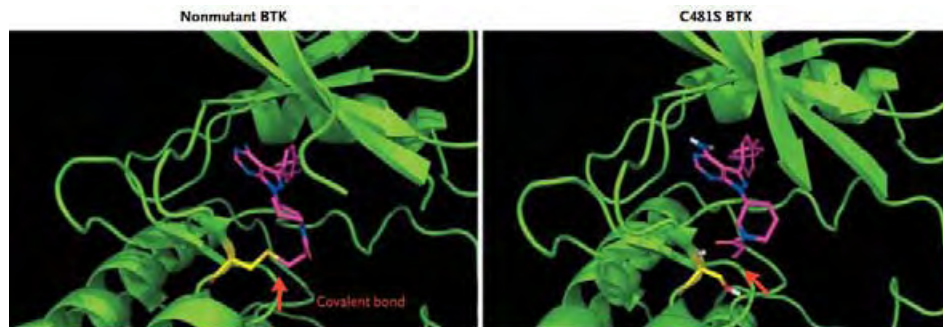


Figure 20: Modélisation structurale de l'interaction de la BTK muté ou non avec l'ibrutinib (extrait de ¹⁴³).

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

I.E.5.2 Idélalisib (Zydelig®)

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

Cette association, très efficace, améliore la survie sans progression, la réponse globale et la survie globale comme montré dans la Table 7.

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

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

Table 7: Résultats d'efficacité de l'étude 312-0116 comparant l'association rituximab et idélalisib à l'association rituximab et placebo (source: Vidal®).

L'idélalisib est un inhibiteur sélectif de l'isoforme p110 δ de la PI3K δ (Phosphoinositide 3-kinase) (IC₅₀ à 19nM) et interagit peu avec les isoformes PI3K α , PI3K β et PI3K γ .

Les PI3K forment une famille composée de trois classes (classe I, II et III) définies par leurs structures et leurs fonctions. Ces enzymes jouent un rôle majeur dans de nombreuses cascades de signalisation et sont hyperactivées dans de nombreux cancers^{144, 145}. Elles régulent des processus de prolifération, différenciation, mobilité et de métabolisme¹⁶¹.

La classe IA active des protéines couplées à des récepteurs G (GPCR) par une interaction avec les protéines Ras activées et Rho. En effet, l'activité catalytique de la PIK3 médie la transformation du PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) qui est un second messager ancré à la membrane plasmique qui active de nombreuses voies cellulaires. Elles sont formées d'un hétérodimère contenant une sous-unité régulatrice p85 et une sous-unité catalytique p110 (p110 α , p110 β , p110 δ et p110 γ). L'association de la sous-unité régulatrice et de la sous-unité catalytique forme respectivement les 4 isoformes appelée PI3K α , PI3K β , PI3K δ et PI3K γ . Dans les cellules B malignes ou non, PI3K δ régule de nombreuses voies de signalisation en aval du BCR, du récepteur aux chaînes

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique

lourdes des Ig (FcγR), des TLR, du CXCR4/5 et des récepteurs de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) ^{146, 147}.

Dans la LLC, il a été démontré que la PI3Kδ joue un rôle essentiel dans la transmission des signaux de survie, de prolifération et de « homing » par le microenvironnement ^{148, 149}. En effet, l'idélalisib est capable d'inhiber les signaux de survie *ex vivo* fournis par les NLC ¹⁶², les cellules stromales et les cellules endothéliales.

Cliniquement, l'idélalisib, comme l'ibrutinib, provoque une sortie des cellules leucémiques des compartiments résidents vers le sang ^{150, 151}, provoquant une augmentation rapide et transitoire de la lymphocytose et une diminution des adénopathies.

II Le microenvironnement tumoral

Au siècle dernier, le cancer était considéré comme une maladie résultant d'une acquisition séquentielle de mutations conduisant une cellule saine à acquérir au fur et à mesure de ses divisions, des altérations géniques aboutissant au final à l'apparition de cellules cancéreuses. Dans cette théorie, résumée par Hanahan et Weinberg en 2000 (Figure 21), la cellule cancéreuse est donc caractérisée par six grandes capacités : l'évasion à l'apoptose, un potentiel répliqueur illimité, une autosuffisance vis-à-vis des facteurs de croissance, une résistance aux signaux inhibiteurs de croissance, une promotion de l'angiogénèse pour son profit personnel et des capacités d'invasion et de métastases ¹⁵².

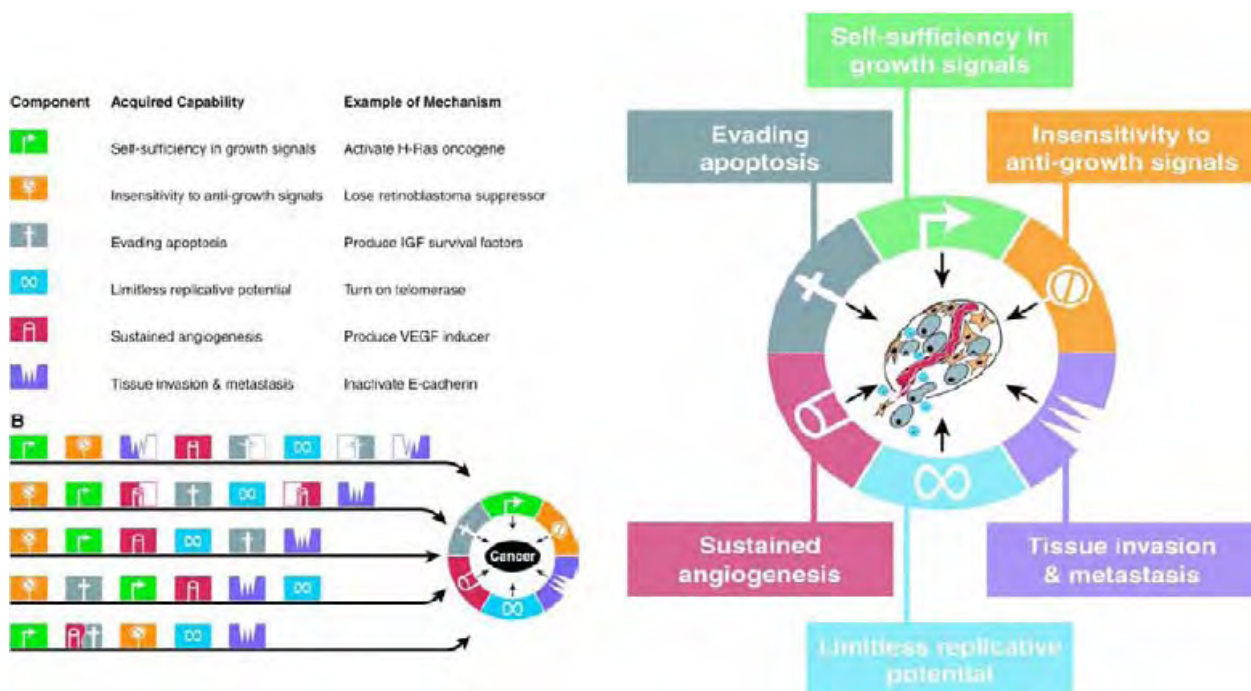


Figure 21: Acquisition et propriétés transformantes des cellules cancéreuses (extrait de ¹⁵²).

Cette théorie ne laissait aucune place à tous les facteurs extérieurs à la tumeur. Au cours des quinze dernières années, au vu des nombreuses preuves accumulées sur le fait que le cancer résultait non seulement d'altérations géniques de la cellule cancéreuse mais aussi de l'influence de tout le microenvironnement les entourant, ces auteurs ont revu leur théorie. Dans une revue datant de 2011, aux six marqueurs précédents s'ajoutent d'autres marqueurs dont notamment l'influence du microenvironnement tumoral ¹⁵³. Ce microenvironnement, dit tumoral, est

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

constitué notamment de toutes les cellules immunitaires entourant et infiltrant la tumeur, de fibroblastes de matrice extracellulaire assurant son soutien et de vaisseaux sanguins apportant nutriments et oxygène. Tous ces facteurs forment un ensemble complexe où se mélangent les cellules favorisant la survie et la prolifération tumorale, et d'autres tentant de la contenir et de la détruire.

II.A L'immunosurveillance anti tumorale

II.A.1 Concept théorique

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

Cette affirmation est notamment soutenue par des expériences effectuées chez des souris mutantes présentant un déficit immunitaire. En effet, il est possible de générer des souris n'ayant ni lymphocytes B, T ni de cellules NK en inactivant le gène *RAG2* (Recombination activating gene 2) qui code pour une enzyme nécessaire aux recombinaisons somatiques ayant lieu dans ces populations. Chez ces souris, on observe une augmentation de l'incidence des tumeurs spontanées et chimiquement induites comparativement aux souris non mutées¹⁵⁴ donc immunocompétentes ce qui sous-tend le rôle anti-tumoral du système immunitaire (Figure 22).

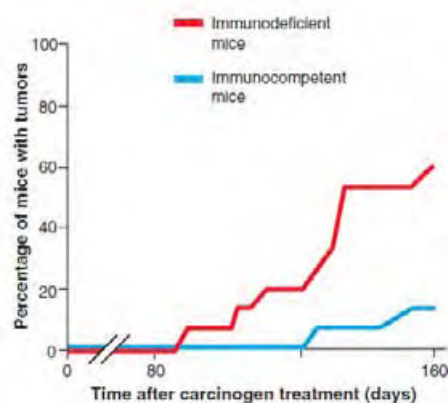


Figure 22: Courbes d'incidence des tumeurs chimiquement induites chez des souris immunodéficientes ou immunocompétentes (extrait de¹⁵⁵).

De plus, chez des patients immunodéprimés il a été relevé une forte augmentation des cancers. Par exemple, chez les greffés, où il est nécessaire d'induire une immunodépression pour éviter tous les phénomènes de rejet des greffons, plusieurs études ont montré une augmentation de l'incidence de lymphomes non Hodgkiniens, de cancers viro-induits tels que des lymphomes de Burkitt, de mélanomes, de cancers du côlon ou du poumon¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. De même, les patients au

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

stade SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) suite à une infection au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ont une incidence plus élevée de tumeurs viro-induites telles que des sarcomes de Kaposi, des lymphomes de Burkitt ou des tumeurs non viro-induites telles que des cancers prostatiques, ovariens ou du côlon ^{160, 161}.

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

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

La destruction de la cellule tumorale par les cellules de l'immunité nécessite en premier lieu une reconnaissance des cellules tumorales du « soi modifié » par les cellules de l'immunité. Comme dans toute réponse immunitaire, il est possible de distinguer les effecteurs selon qu'ils appartiennent à l'immunité innée ou acquise (Figure 23).

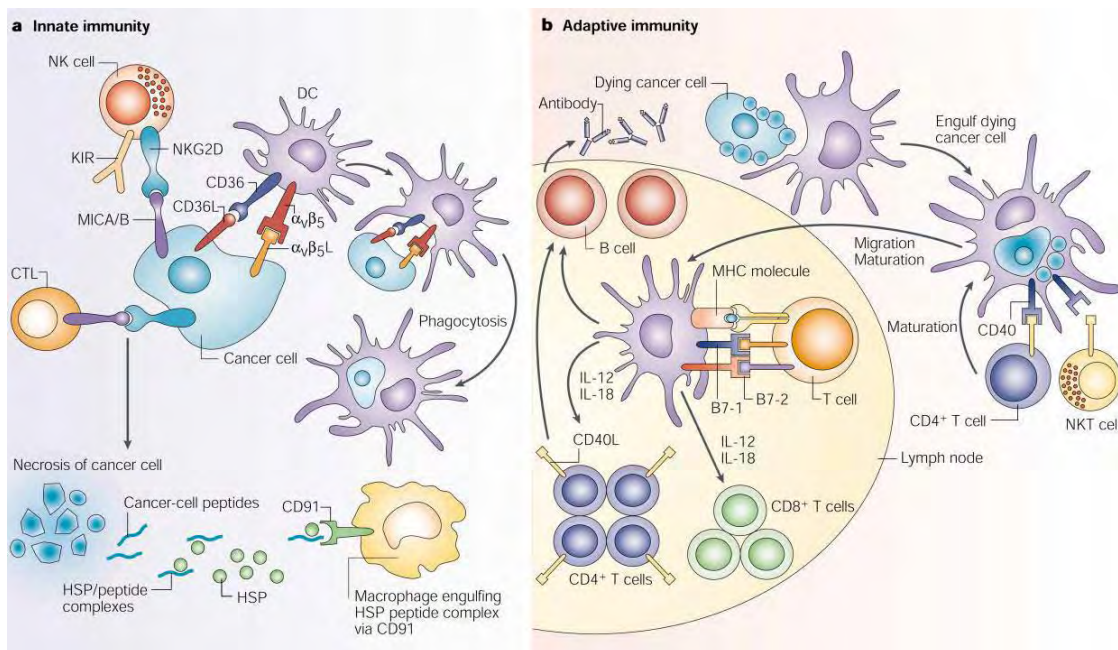


Figure 23: Représentation schématique des effecteurs de l'immunité innée (gauche) et acquise (droite) dans la réponse anti-tumorale (CTL : lymphocytes T cytotoxiques) (extrait de ¹⁶²).

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

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

Les cellules NK sont des acteurs clés dans l'immunité anticancéreuse. Elles reconnaissent les cellules tumorales car ces dernières expriment des molécules de stress comme MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) et MICB (MHC class I polypeptide-related sequence B), et présentent une faible expression des molécules de CMH de classe I¹⁶³. Les cellules NK secrètent alors des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ (Interferon γ), le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et des granules lytiques contenant de la perforine et des granzymes A et B qui induisent de manière directe ou indirecte la mort des cellules cancéreuses. De plus, elles se fixent sur les cellules cancéreuses *via* TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) ou FasL (Fas ligand) induisant ainsi une lyse des cellules cancéreuses^{164, 165}. Enfin, *via* la production d'IL-4 (interleukine 4) et d'IFN γ , elles aident à l'activation d'autres partenaires du système immunitaire.

Dans le même temps, les granulocytes vont aussi intervenir dans la réponse anti-tumorale^{166, 167}. Les neutrophiles expriment TRAIL et FasL et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont induire la mort directe des cellules tumorales. Au contact des cellules tumorales, ils sécrètent de nombreuses cytokines et chimiokines comme le TNF- α , IL-1 β , l'IL-8, CXCL1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1) et CCL3 impliquées dans l'apoptose, le recrutement et l'activation des autres cellules du système immunitaire^{195,168}. Les éosinophiles sécrètent une très grande quantité de granules lytiques contenant de la MBP (Major Basic Protein) ou l'EPO (eosinophil peroxidase) cytotoxiques pour les cellules cancéreuses, ainsi que des ROS (Reactive Oxygen Species). Ils expriment des molécules de CMH de classe II et les molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 et peuvent donc servir de CPA (Cellules Présentatrices de l'Ag) pour les lymphocytes T. Enfin, ils produisent aussi des cytokines et des chimiokines caractéristiques des réponses immunitaires Th1 comme l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN- γ ¹⁹⁶.

Les DC et les macrophages reconnaissent les cellules tumorales par leurs PRR (Pattern Recognition Receptors) qui se lient à des molécules transformées à la surface des cellules cancéreuses. Suite à cette reconnaissance, elles les phagocytent ensuite¹⁶². C'est donc tout naturellement qu'elles avaient été décrites comme étant anti-tumorales^{169 170} bien qu'aujourd'hui il paraît évident que ces cellules sont détournées par la cellule tumorale à son

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

profit et jouent un rôle pro-tumoral (voir III. Les macrophages associés aux tumeurs). De plus, ces cellules sont capables d'endocyter des peptides tumoraux tels que les alarmines par l'intermédiaire de récepteurs scavengers comme le CD91¹⁶². Elles sont aussi capables de présenter des peptides modifiés issus des cellules cancéreuses aux lymphocytes T CD8 afin de les activer.

II.A.2.2 Les acteurs à la frontière de l'immunité innée et adaptative

A la frontière des deux pans de l'immunité, on retrouve les lymphocytes non conventionnels qui partagent des caractéristiques avec les cellules de l'immunité innée et adaptative, comme les lymphocytes NKT ou les lymphocytes T $\gamma\delta$.

La cytotoxicité des lymphocytes T $\gamma\delta$ vis-à-vis de leurs cellules cibles s'exerce *via* différents mécanismes d'induction de mort cellulaire. D'une part, ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ ¹⁷¹ et TNF- α ¹⁷² et des granules lytiques¹⁷³. Ils expriment également des ligands des récepteurs de mort FasL et TRAIL. D'autre part, les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent aussi avoir une activité cytotoxique *via* le mécanisme d'ADCC.

Les lymphocytes NKT quant à eux sont activés au contact des CPA qui leur présentent un antigène glycolipidique par la molécule CD1d et leur délivre des signaux de co-stimulation *via* le CD40 et la sécrétion d'IL-12^{174, 175}. Les lymphocytes NKT activés interviennent dans la réponse antitumorale *via* deux mécanismes. D'une part, ils sécrètent de l'IFN- γ et de l'IL-4 et vont donc aider à l'activation des autres cellules du système immunitaire. D'autre part, certains lymphocytes NKT expriment les molécules TRAIL et FasL, et vont donc avoir une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales¹⁷⁶.

II.A.2.3 Les acteurs de l'immunité adaptative

Les effecteurs de l'immunité acquise sont les lymphocytes B et les lymphocytes T CD8. Cette réponse est plus tardive que celle de l'immunité innée mais est plus spécifique et plus puissante.

Les lymphocytes B sont activés lorsqu'ils rencontrent l'Ag spécifique de leur Ig de surface. Suite à cette activation, le complexe BCR/Ag est internalisé, l'Ag sera ensuite associé aux

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

molécules de CMH de classe II puis présenté aux lymphocytes T. Parallèlement, ils sont capables de se différencier en plasmocytes pour produire des Ac anti-tumoraux ¹⁷⁷.

Les lymphocytes NKT sont activés au contact des CPA. Les lymphocytes NKT activés interviennent dans la réponse antitumorale *via* deux mécanismes. D'une part, ils sécrètent de l'IFN- γ et de l'IL-4 et vont donc aider à l'activation des autres cellules du système immunitaire. D'autre part, certains lymphocytes NKT expriment les molécules TRAIL et FasL, et vont donc avoir une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales ¹⁷⁶.

La fonction principale des lymphocytes T CD4 dans la réponse anti-tumorale est la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2, l'IFN- γ et le TNF- α ¹⁷⁸. Certaines cytokines, comme le TNF- α , ou l'IFN- γ , ciblent directement les cellules cancéreuses, par induction d'apoptose ou effet anti-prolifératif respectivement ^{172, 179}. Cela dit, les lymphocytes T CD4 aussi appelés T helpers, vont surtout aider à l'activation des cellules cytotoxiques et des lymphocytes B *via* notamment le CD40L ¹⁸⁰. Cette interaction est aussi impliquée dans la maturation des lymphocytes B en plasmocytes ¹⁸¹. De plus, l'IL-2 et l'IFN- γ sont des signaux de co-stimulation impliqués dans la différenciation et l'activation des cellules NK et des CTLs.

Les lymphocytes T CD8 nécessitent pour être activés, d'être stimulés par des CPA telles que les macrophages, les DC et les lymphocytes B qui leurs présentent les Ag associés au CMH de classe I ^{170, 180}. Une fois activés les T CD8 expriment TRAIL, produisent de l'IFN γ et des granules lytiques contenant de la perforine et du granzyme B et ont donc un effet cytolytique direct sur les cellules tumorales ¹⁷⁰.

La réponse immunitaire anti-tumorale est donc un mécanisme complexe impliquant les cellules de l'immunité innée et acquise et peut être résumée par la Figure 24.

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

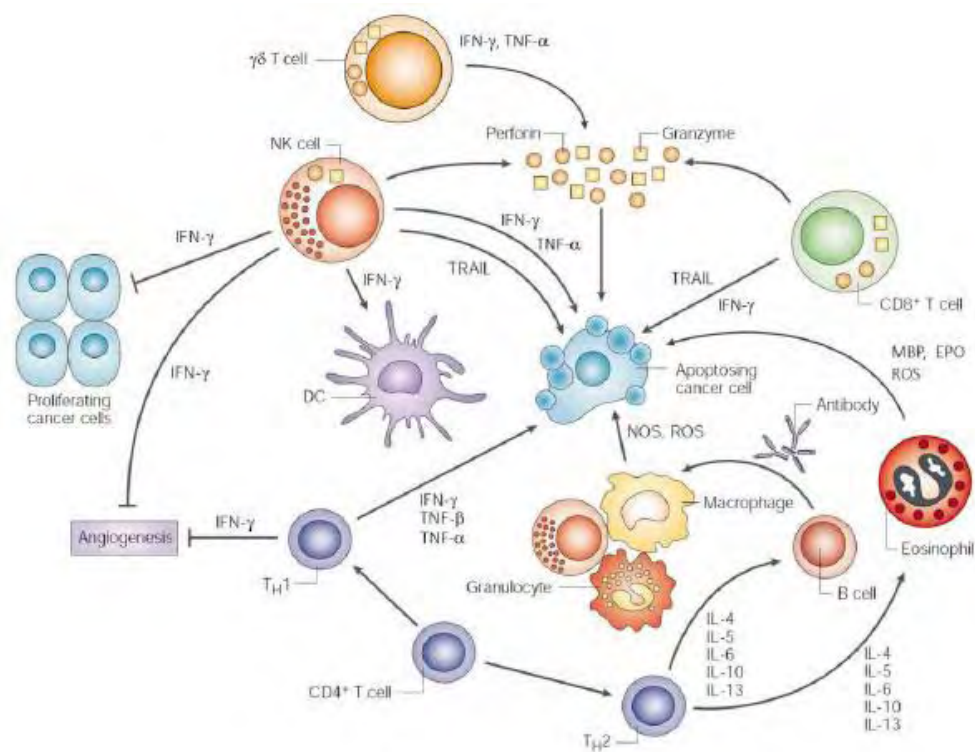


Figure 24: Représentation schématique de la réponse immunitaire anti-tumorale (extrait de ¹⁶²).

II.B Immunoédition

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

II.B.1 Concept théorique

Le concept d'immunoédition a été formulé au cours de la dernière décennie par Scriber. Il explique comment le système immunitaire façonne la tumeur en étant tour à tour pro et anti-tumoral ^{182, 183 155}. Selon cette théorie, la tumeur résulte d'une interaction complexe entre cellules immunitaires et cellules tumorales. En effet, les altérations des cellules tumorales proviennent non seulement d'elles même mais aussi des stimuli du microenvironnement.

Cette théorie a été confirmée par des expériences menées chez la souris et résumée dans la Figure 25. L'expérience, simple et brillante à la fois, consistait à induire chez des souris immunocompétentes ou immunoincompétentes des tumeurs *via* un traitement par des carcinogènes. Quand ces tumeurs furent cliniquement détectables, les souris furent sacrifiées et les tumeurs prélevées pour être ré-injectées dans des souris immunocompétentes. Le résultat fut saisissant : les tumeurs provenant de souris immunocompétentes induisaient des tumeurs chez 100 % des souris « réceptrices » tandis que les tumeurs provenant de souris immunoincompétentes ne se développaient que dans 50 % des cas. Grâce à ces expériences, ces auteurs ont pu montrer que chez les souris immunocompétentes le système immunitaire en induisant une pression de sélection avait façonné la tumeur qui était devenue « résistante » au système immunitaire tandis que chez les souris immunoincompétentes cette pression n'existant pas, les cellules tumorales n'eurent pas besoin de muter pour y échapper. Ainsi, lorsque ces deux types de tumeurs furent mises en contact avec un système immunitaire « compétent », les premières, dites immunoéditées et progressives, y étant déjà habituées y échappèrent facilement. Les secondes subirent de plein fouet la réponse anti-tumorale, certaines y échappèrent et furent alors appelées non immunoéditées et progressives, d'autres non et furent

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

alors appelées non immunoéditées et non progressives. Cette théorie explique qu'il y ait d'un côté 100 % de prise de greffe tandis que de l'autre on en observe seulement 50 %^{154, 155}.

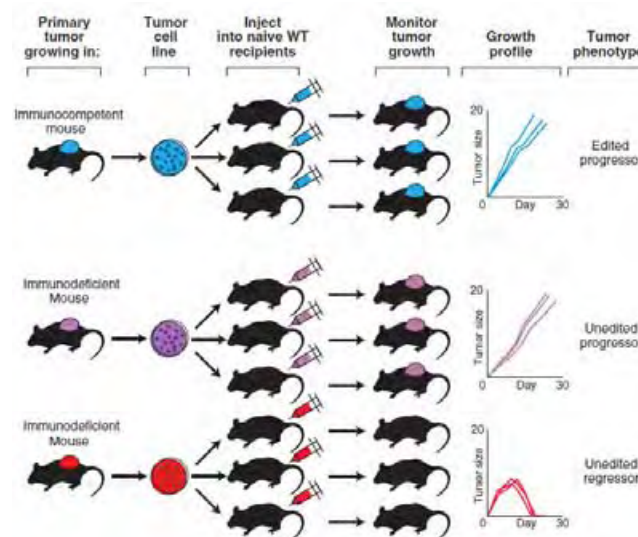


Figure 25: Les tumeurs provenant de souris immunocompétentes sont qualitativement différentes des tumeurs provenant de souris immunodéprimées (extrait de¹⁵⁵).

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

L'immunoédition peut être séparée en trois phases selon la nature des éléments qui s'y déroulent, le moment où ils surviennent et les Ag présents à la surface des cellules tumorales^{155 184}. Ces phases sont résumées dans la Figure 26. La première se produit lorsque le système immunitaire rencontre des cellules transformées potentiellement tumorales et conduit soit à l'élimination de ces cellules soit à une phase d'équilibre. Durant cette phase d'équilibre, la tumeur est soumise à la pression de sélection du système immunitaire, elle commence à acquérir des mécanismes d'échappement et devient de plus en plus hétérogène ou au contraire se fait éliminer par le système immunitaire. A ce stade, la tumeur est encore infraclinique mais pas à pas la tumeur prend le dessus sur le système immunitaire pour finalement aboutir à l'immunoéchappement. Durant cette dernière phase, on observe une forte croissance tumorale jusqu'à ce qu'elle devienne cliniquement détectable. De plus, la tumeur devient de plus en plus hétérogène et corrompt activement les cellules du système immunitaire censées les combattre en les retournant pour son propre compte.

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

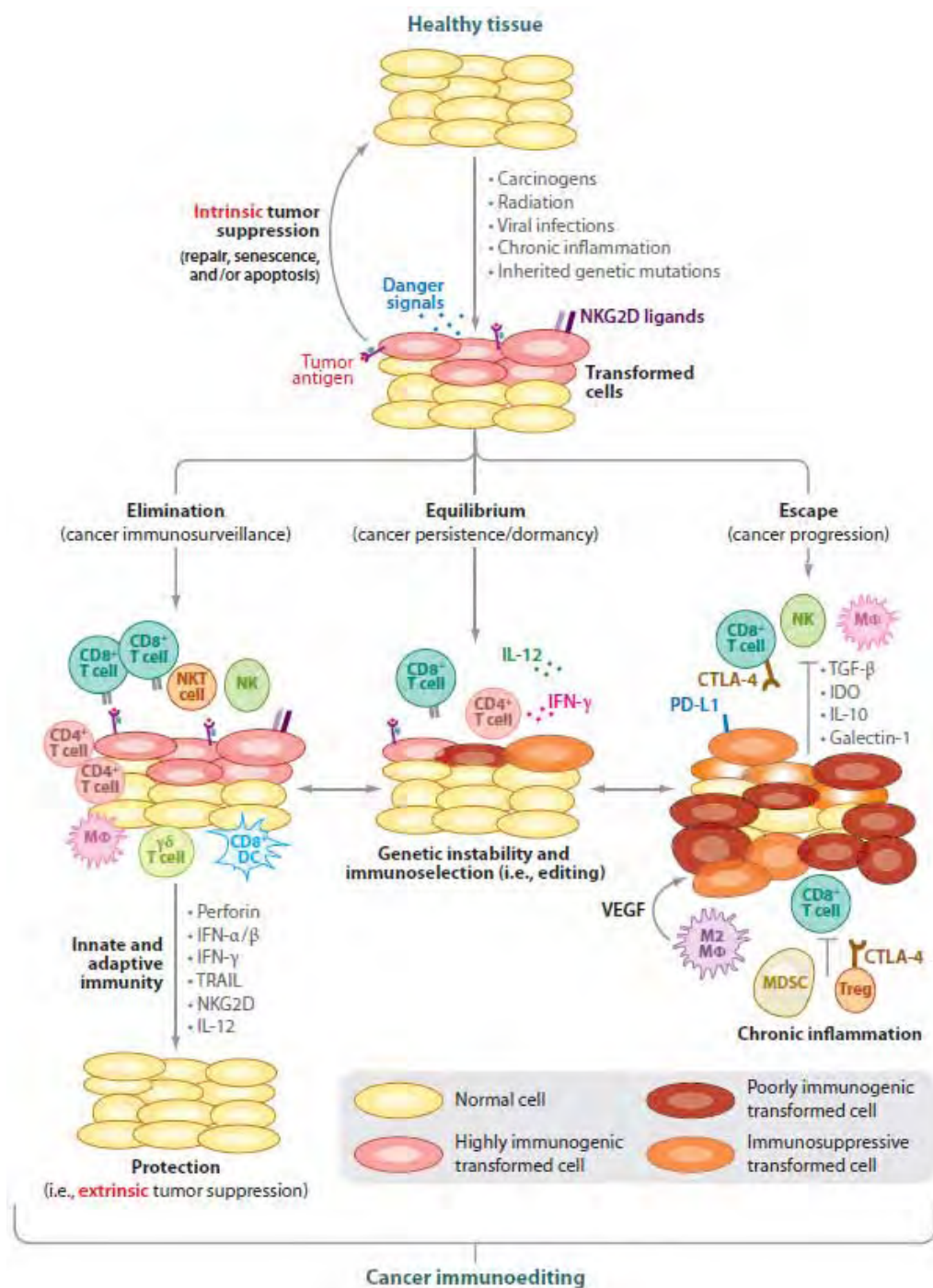


Figure 26: Représentation schématique de l'immunoédition des tumeurs (extrait de ¹⁸⁴).

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

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

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

II.C Les acteurs du microenvironnement tumoral et leurs impacts pronostiques

Comme nous l'avons vu précédemment, le microenvironnement tumoral est un milieu complexe dont les principaux acteurs sont présentés dans la Figure 27.

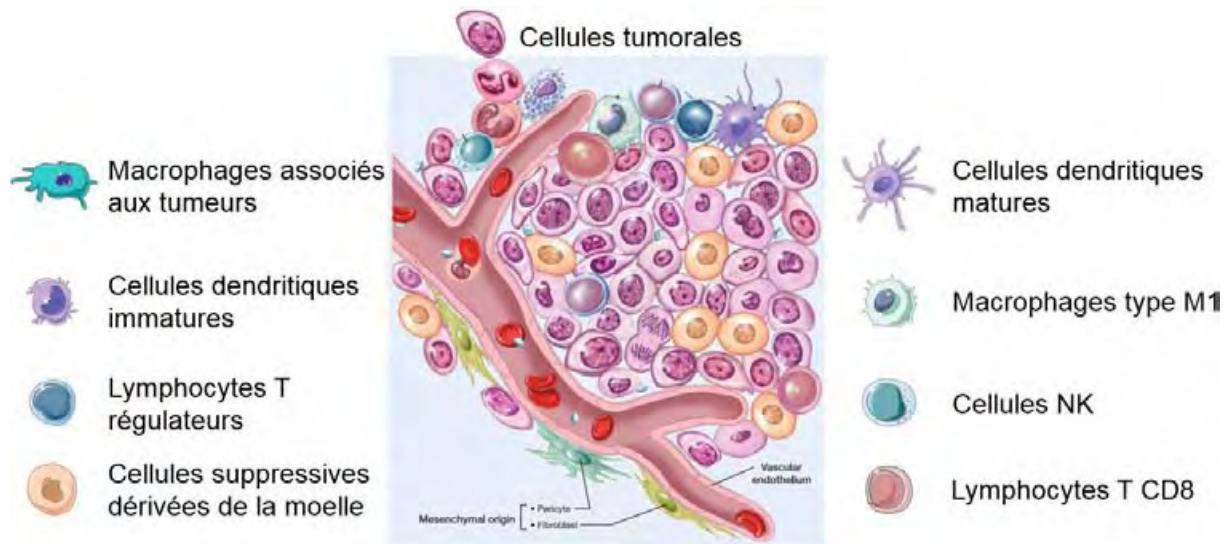


Figure 27: Les acteurs du microenvironnement tumoral (extrait de ¹⁸⁵).

Au cours de ce manuscrit nous détaillerons le rôle des lymphocytes T CD8, des cellules NK et des DC matures généralement considérés comme des acteurs anti-tumoraux. Ensuite, nous nous intéresserons aux acteurs généralement considérés comme pro-tumoraux, à savoir les cellules suppressives de la moelle (MDSC) et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Nous étudierons tous ces acteurs par le biais de leurs impacts pronostiques, des mécanismes développés par les tumeurs pour échapper aux acteurs de la réponse anti-tumorale et promouvoir les acteurs pro-tumoraux. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM), acteurs pro-tumoraux clés seront détaillés dans le chapitre III. Les macrophages associés aux tumeurs.

II.C.1 Les acteurs généralement considérés comme anti-tumoraux et les mécanismes d'échappement

II.C.1.1 Les lymphocytes T CD8

II.C.1.1.1 Impact pronostique

Les lymphocytes T sont des acteurs clés de l'immunité anti-tumorale, comme nous l'avons vu dans le paragraphe II.A.2.3 Les acteurs de l'immunité adaptative. Que ce soit par la sécrétion de multiples facteurs solubles ou par contact direct, ces cellules sont capables d'induire une mort directe des cellules tumorales.

Les lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TIL) ont un impact pronostique dans de nombreuses tumeurs. Ainsi, une infiltration tumorale par ces TIL est associée à un meilleur pronostic dans le mélanome ^{186, 187}, le cancer de l'œsophage ¹⁸⁸, de l'ovaire ¹⁸⁹ ou le cancer colorectal ¹⁹⁰. La première association entre pronostic et TIL a été observée dans le mélanome, où les auteurs de ces études ont rapporté que les patients avec de forts niveaux de lymphocytes T CD8 infiltrant les tumeurs survivaient mieux que ceux ayant une faible infiltration ^{186, 187}. Cet effet anti-tumoral de ces lymphocytes T CD8 a depuis été expliqué par la production d'Ag mélanospécifiques par la tumeur ¹⁹¹. De même, dans une étude sur des cancers ovariens, la présence de TIL est associée avec le pronostic. En effet, chez les patients présentant un nombre élevé de TIL, plus de 38 % survivaient plus de cinq ans tandis que chez les patients avec peu de TIL la survie à cinq ans n'était que de 4.5 % ¹⁸⁹. Enfin, dans les cancers du poumon ou du côlon, le type et la densité lymphocytaire infiltrant la tumeur sont des facteurs pronostiques plus puissants que les classifications anatomopathologiques pour prédire l'évolution des patients ^{192, 193}. Depuis ces études, dans ces cancers, la détermination des TIL est entrée dans la caractérisation pronostique anatomopathologique.

II.C.1.1.2 Mécanismes d'échappement

Les cellules cancéreuses sont capables de mettre en place de multiples stratégies afin d'échapper aux lymphocytes T ¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ (Figure 28). On peut ainsi retrouver des altérations dans

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

la présentation de l'Ag aux lymphocytes T avec l'absence d'expression des molécules du CMH de classe I due à la mutation du gène de la $\beta 2m$ ¹⁹⁷. De plus, les cellules tumorales ou les cellules stromales sécrètent des facteurs immunosuppresseurs et/ou des facteurs pro-apoptotiques tels que le TGF- β qui inhibe l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T¹⁹⁸. Un autre mécanisme d'échappement passe par l'activation de voies de signalisations inhibitrices des lymphocytes T telles que celles de CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocytes associated protein 4) et PD-1 (Programmed Cell Death 1)^{196, 199}. Enfin, les cellules tumorales peuvent faire proliférer, recruter et activer des populations régulatrices qui inhibent les réponses anti-tumorales comme les lymphocytes T régulateurs^{200, 201}. Aux stades avancés du cancer, l'ensemble de ces mécanismes peut coopérer et ainsi contrer l'effet anti-tumoral des lymphocytes T.

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

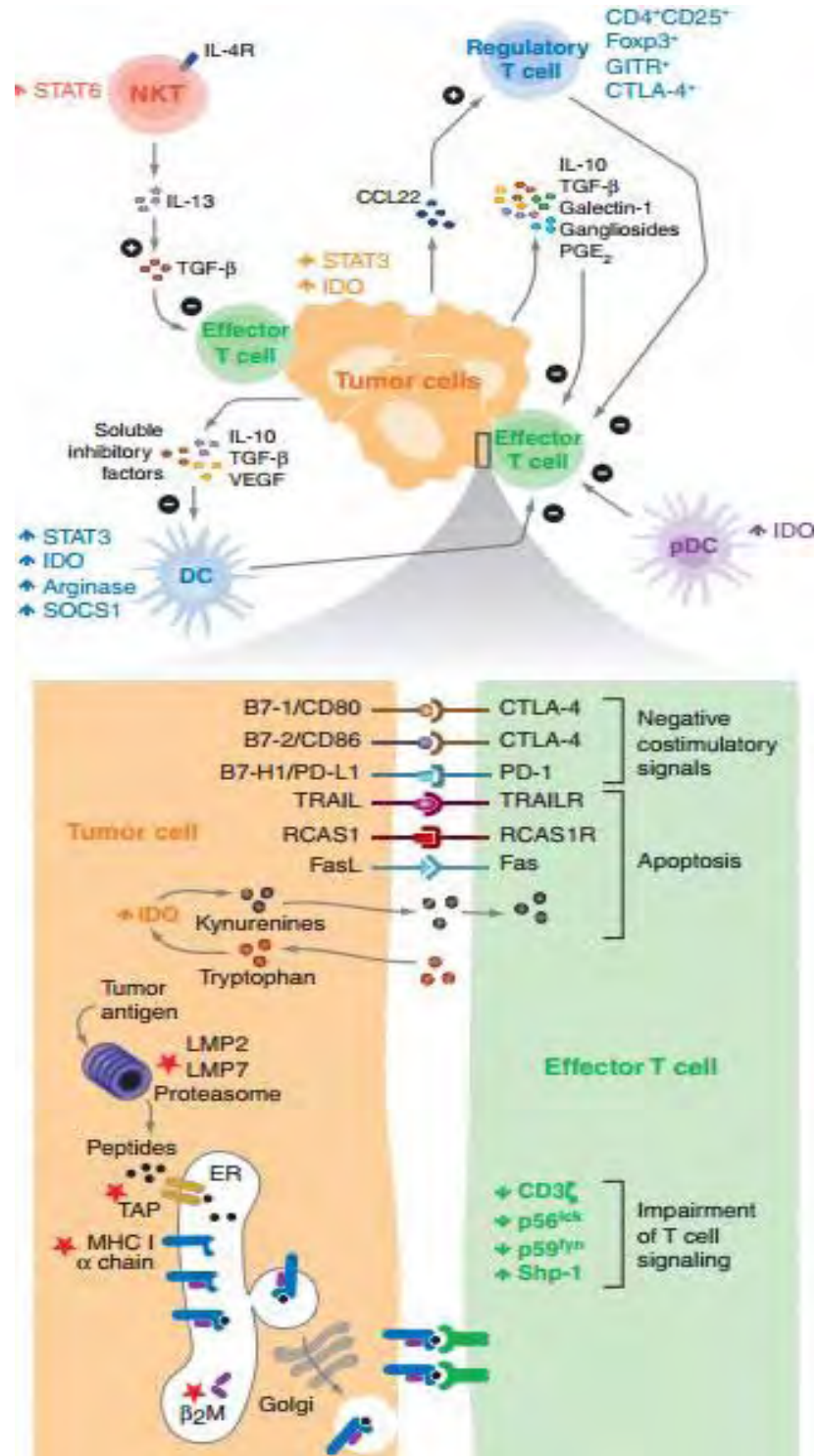


Figure 28: Stratégies immunosuppressives exploitées par les cellules tumorales pour échapper aux réponses immunitaires T (extrait de 202).

II.C.1.2 Les cellules Natural Killer

Mises en évidence en 1975 par leur réactivité contre des cellules tumorales sans sensibilisation préalable, les cellules NK sont des lymphocytes larges et granuleux. Elles tirent leur nom de leurs capacités à détruire un grand nombre de cellules tumorales *in vitro* ²⁰³.

II.C.1.2.1 Impact pronostique

Les cellules NK sont des acteurs clés dans l'immunosurveillance anti-tumorale. Ainsi, chez la souris, la déplétion de cette population *via* un Ac spécifique provoque une sensibilité accrue au développement de tumeurs spontanées ou induites par des agents carcinogènes ²⁰⁴.

Chez l'homme, plusieurs études anatomopathologiques ont montré que l'infiltration tumorale par les cellules NK peut être variable dans les cancers colorectaux, les métastases pulmonaires de cancer rénal, les cancers du poumon à petites cellules et dans les tumeurs stromales gastriques ²⁰⁵⁻²⁰⁷. De plus, dans le mélanome, l'infiltration tumorale par des cellules NK est associée à une meilleure survie des patients ²⁰⁸. A l'opposé, des études de « microarrays » ont montré que dans cette même pathologie les cellules NK infiltraient peu les tumeurs ²⁰⁹. Enfin, les cellules NK ne seraient pas en contact avec les cellules tumorales mais cantonnées dans le stroma ^{210, 211} et seraient anergiques ^{205, 212}. Ces études ont montré que malgré la pertinence de l'infiltration des cellules NK dans les tumeurs, leur efficacité reste limitée dans le contrôle de la progression tumorale.

II.C.1.2.2 Mécanismes d'échappement

L'exposition chronique des tumeurs aux cellules NK favorise la sélection ou l'induction de clones tumoraux avec une expression altérée des ligands inhibiteurs et activateurs des cellules NK résumée dans la Figure 29. Ainsi, *in vitro*, il a été montré que des cellules issues de mélanome mises en contact avec des cellules NK augmentaient leur expression de molécules du CMH de classe I canoniques et non canoniques et devenaient ainsi résistantes aux cellules NK ²¹³. De plus, *in vivo*, les cellules de mélanome en contact avec des cellules NK infiltrant ont une expression des molécules de CMH de classe I plus élevée ²¹³. Enfin, chez la souris,

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

l'expression du ligand du récepteur activateur NKp46 (Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1) peut être modulée à la surface des tumeurs. En effet, dans un modèle de souris NKp46 déficientes, les tumeurs induites au méthylcholanthrène présentent une plus forte expression des ligands de cette molécule que celle observée chez des souris non déficientes ²¹⁴. Ces résultats indiquent que sous la pression de sélection des cellules NK, les cellules tumorales se modifient en diminuant l'expression de ces ligands.

Les acteurs pro-tumoraux du microenvironnement tumoral favorisent eux aussi l'échappement des cellules tumorales aux cellules NK par deux mécanismes principaux : la suppression des fonctions effectrices des cellules NK et la sélection de clones tumoraux peu immunogènes ¹⁸⁴. Ainsi, ces cellules tumorales peuvent produire du TGF- β qui inhibe l'expression de NKp30 (Natural killer cell p30-related protein) et NKG2D (Killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1), deux récepteurs cruciaux pour la reconnaissance et la destruction de la cellule tumorale ²¹⁵. De plus, elles peuvent sécréter de l'IL-4 qui réduit les capacités lytiques des cellules NK ainsi que leur production cytokinique et leurs capacités à interagir avec les DC ²¹⁶.

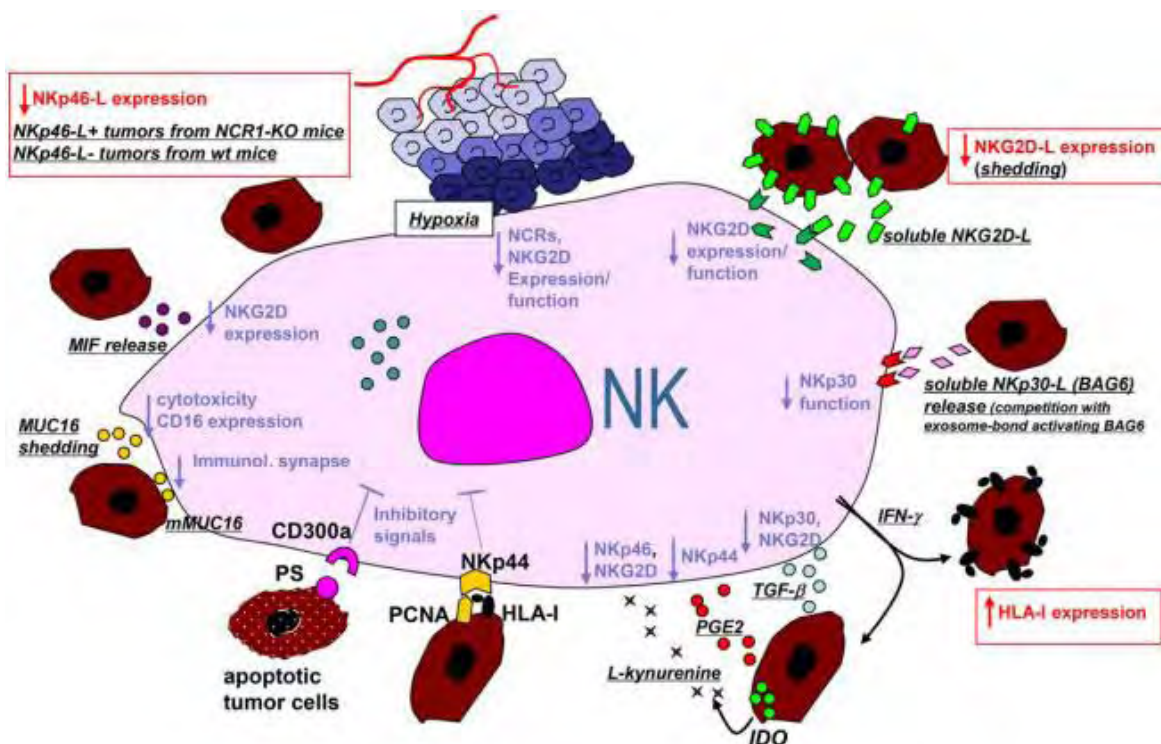


Figure 29: Mécanismes de l'évasion tumorale lors d'une attaque par les cellules NK (extrait de ²¹⁷).

II.C.1.3 Les cellules dendritiques matures

Les DC régulent l'activité des cellules T et des cellules NK, et forment un lien entre l'immunité innée et adaptative dans la réponse anti-tumorale ²¹⁸. Les DC constituent une population hétérogène, à la fois pro et anti-tumorale. En effet, les cellules matures CD141⁺, étant très efficaces pour délivrer des signaux de co-stimulation ²¹⁸, sont donc anti-tumorales tandis que les immatures, les plasmacytoïdes et les DC migratoires semblent favoriser la tolérance tumorale en partie à cause de leur faible capacité à délivrer ces mêmes signaux ^{219, 220}.

II.C.1.3.1 Impact pronostique

Vu leur rôle dual, l'impact pronostique des DC dans l'infiltration tumorale est hétérogène dans les publications étudiant l'ensemble de toutes les sous-populations de DC. Ainsi, l'infiltration tumorale par l'ensemble de cette population n'est pas associée avec les paramètres clinico-pathologiques tels que l'évolution de la maladie dans les carcinomes de l'œsophage et du poumon ^{221, 222}.

Cet impact est plus clair lorsque l'on dichotomise les DC en fonction de leurs stades de maturation. Ainsi, une forte infiltration tumorale par des DC matures ou activées est généralement corrélée à une amélioration de l'évolution clinique dans les lymphomes B diffus ²²³, les cancers de l'œsophage ²²⁴, du sein ²²⁵ ou les mélanomes ²²⁶. De plus, il est intéressant de noter que dans le cancer de l'œsophage et dans le mélanome, cette forte infiltration par les DC est aussi corrélée à une forte infiltration par les lymphocytes T ce qui augmente encore la réponse anti-tumorale ^{224 226}. A l'opposé, une forte infiltration par des DC plasmacytoïdes dans le cancer du sein ou le mélanome est associée à un mauvais pronostic ²²⁷⁻²²⁹.

A contrario, il a été rapporté dans certaines études qu'une forte infiltration par ces cellules pouvait être associée à une augmentation de la survie globale dans les carcinomes du nasopharynx et dans les cancers du poumon non à petites cellules ^{230, 231}. De même, dans des cohortes de cancers du sein ou de carcinomes gastriques, de fortes infiltrations en DC matures ont été associées à un mauvais pronostic ^{227, 232}, ces observations contredisant la théorie selon laquelle ces cellules seraient anti-tumorales.

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

Le rôle des DC dans la réponse anti ou pro-tumorale est donc complexe et difficilement évaluable aujourd'hui car on manque de marqueurs discriminants pour les sous-populations.

II.C.1.3.2 Mécanismes d'échappement

Les stratégies d'échappement tumoral au DC peuvent être séparées en trois grandes classes. La première est de diminuer la présence de DC compétentes, la seconde d'accumuler des DC immatures et la dernière d'accumuler des DC tolérantes vis-à-vis de la tumeur. Ces stratégies sont partiellement résumées dans la Figure 30.

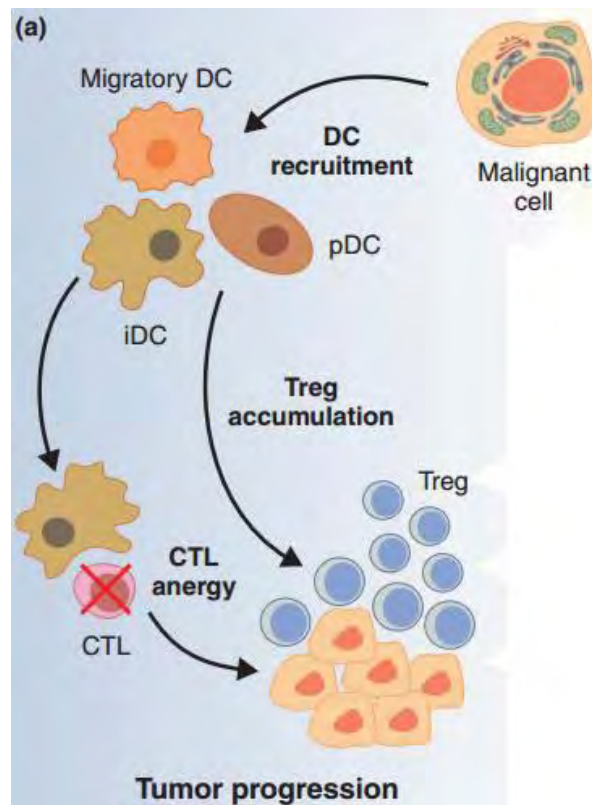


Figure 30: Corruption des DC par les cellules tumorales (extrait de ²³³).

On observe dans les carcinomes épidermoïques de la tête et du cou, à des stades précoces, une diminution de moitié du nombre de DC comparé à des donneurs sains tandis qu'aux stades tardifs ce taux est diminué d'un facteur quatre dans le sang périphérique ²³⁴. Dans une autre étude, il a été montré que la diminution concernait plus particulièrement les DC myéloïdes et non les plasmatoïdes plus immuno-tolérantes ²³⁵. De plus, dans une étude regroupant des patients atteints de cancers du sein, de la prostate et de glioblastomes, on observait une diminution de DC myéloïdes circulantes avec une accumulation concomitante de DC immatures ²³⁶. La

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

conséquence fonctionnelle de cette diminution des DC présentant les Ag est une diminution de la stimulation de l'immunité acquise et donc une réponse anti-tumorale moins efficace.

Dans la majorité des cancers, on retrouve des DC immatures. Par exemple, dans les carcinomes rénaux, on retrouve un faible taux de DC présentant elles-mêmes de faibles niveaux d'expression des molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86²³⁷. Des observations similaires ont été réalisées pour les DC isolées de métastases de mélanome et de carcinome basocellulaire²³⁸⁻²⁴⁰. De plus, ces DC infiltrantes sont incapables d'exprimer ces molécules de co-stimulation suite à des stimuli délivrés *in vitro* par le TNF- α ou le GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)²⁴⁰. Ces résultats indiquent que cette absence d'expression n'est pas seulement due à un défaut d'activation mais aussi à un défaut dans leur différenciation. Enfin, ce défaut de différenciation serait la cause de l'augmentation du nombre de DC immatures dans le sang périphérique des patients atteints de cancers du sein, du poumon, de l'œsophage et de carcinomes épidermoïques de la tête et du cou²³⁴⁻²⁴³. En favorisant non pas une réponse anti-tumorale mais une tolérance T, ces cellules immatures provoquent ainsi une tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Ainsi, les DC issues de prélèvements de cancer du côlon et de mélanome n'induisent pas de prolifération T mais leur anergie²³⁸⁻²⁴⁰.

En parallèle, on retrouve dans les tumeurs une sous-population de DC capables de supprimer les lymphocytes T et d'induire l'accumulation de lymphocytes T régulateurs. La majorité de cette population est formée de DC plasmacytoïdes²⁴⁴. Par exemple, dans le cancer ovarien, on retrouve une accumulation de ces cellules attirées par CXCL12²⁴⁵. De plus, chez la souris, au sein des ganglions drainant la tumeur, on retrouve des DC plasmacytoïdes qui favoriseraient la mort cellulaire T et interfèreraient avec l'expansion clonale T suite à la présentation de l'Ag par les CPA qu'elles soient immunosuppressives ou non²⁴⁶.

II.C.2 Les acteurs généralement considérés comme pro-tumoraux

II.C.2.1 Les cellules suppressives de la moelle

Les MDSC sont un groupe hétérogène de diverses populations d'origine myéloïde capables de supprimer la réponse immunitaire innée et acquise, de promouvoir l'angiogénèse tumorale et de favoriser les métastases²⁴⁷⁻²⁴⁹²⁵⁰ (Figure 31). En effet, elles peuvent supprimer la prolifération et les fonctions effectrices T dans différents cancers²⁵¹⁻²⁵⁴. De plus, des MDSC

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

issues d'hépatocarcinomes sont capables d'inhiber la cytotoxicité et la sécrétion cytokinique des cellules NK autologues²⁵⁵. Enfin, elles augmentent la prolifération des Treg, autres acteurs pro-tumoraux²⁵⁶.

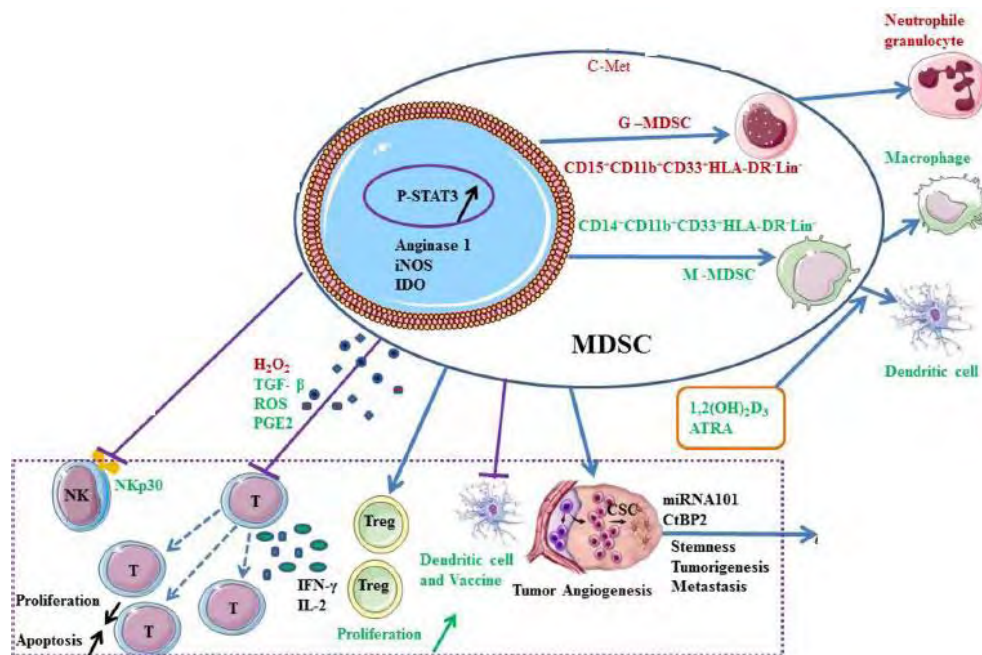


Figure 31: Effets pro-tumoraux des MDSC (extrait de²⁵⁰).

Elles comprennent les progéniteurs de cellules myéloïdes, les macrophages immatures, les granulocytes et les cellules dendritiques^{247, 257}. Elles ont de nombreux marqueurs phénotypiques communs (CD11b, CD33 et CD124) et sont classiquement divisées en deux populations: les MDSC granulocytiques et les MDSC myéloïdes, ceci grâce à l'expression de marqueurs de surface tel que le récepteur au VEGF 1 (VEGFR1) et un faible niveau d'expression du CD16²⁵⁰.

II.C.2.1.1 Impact pronostique

Les niveaux de MDSC circulantes sont altérés dans de nombreux cancers et sont souvent corrélés avec l'évolution de la maladie^{247, 258-261}. Par exemple, un faible niveau de MDSC circulantes constitue un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules avec un rôle prééminent de la sous-population monocytique²⁶². Des observations similaires ont été faites dans les cancers du sein et les carcinomes épidermoïques de la tête et du cou^{263, 264}. De plus, dans les cancers gastriques, un fort niveau de MDSC granulocytiques est le seul facteur pronostique associé avec l'évolution de la maladie²⁶⁵. A l'opposé dans une très faible cohorte de trois patients, un faible taux de MDSC circulantes a été

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

reporté chez des patients atteints de neuroblastomes ²⁶⁶. Au sein de la tumeur elle-même, l'infiltration par les MDSC est pronostique, par exemple dans les cancers ovariens, une forte infiltration est corrélée à une survie globale et une survie sans progression diminuées ²⁶⁶. De même, il existe une relation entre les MDSC et les récurrences des cancers, ainsi qu'entre MDSC et la présence de métastases. Ainsi dans les cancers du poumons non à petites cellules producteurs de GM-CSF, un fort taux est associé avec plus de récurrences et une plus forte proportion de métastases ²⁶⁷.

II.C.2.1.2 Mécanismes d'accumulation dans les cancers

Actuellement, les mécanismes par lesquels les MDSC s'accumulent dans les cancers restent peu clairs au vu de leur diversité. L'hypothèse communément admise est que les cellules tumorales sécrèteraient des cytokines et des facteurs chémoattractants afin d'attirer les MDSC. Ainsi, le GM-CSF attire des MDSC macrophagiques ou CD34⁺, comme le montre la corrélation entre le taux de MDSC et le taux de GM-CSF dans les carcinomes épidermoïques de la tête et du cou ²⁶⁸ et l'augmentation du taux de MDSC sanguins dans les mélanomes après des injections de GM-CSF ²⁶⁹. Tout n'est pas aussi simple car l'accumulation des MDSC granulocytiques ne semble pas dépendante du GM-CSF dans les carcinomes épidermoïques de la tête et du cou ²⁷⁰. De même, le VEGF semble attirer les MDSC CD34⁺ ou les MDSC granulocytiques comme le montre la corrélation existante entre VEGF et MDSC CD34⁺ dans les carcinomes épidermoïques de la tête et du cou ²⁷¹, ou la corrélation entre VEGF et MDSC granulocytiques dans les carcinomes hépatocellulaires ²⁷². Les taux d'IL-10 ou d'IL13 ont aussi été associés à des MDSC macrophagiques dans l'hépatocarcinome. ²⁷². Un fort taux d'IL-8 est associé à une augmentation du taux de MDSC macrophagiques dans le mélanome ²⁵⁶.

Cette liste non exhaustive révèle des mécanismes de recrutement très hétérogènes (Figure 32) qui semblent tumeurs-dépendants. De plus, un facteur soluble recrute seulement une ou plusieurs sous-populations de MDSC. Le recrutement de l'ensemble de ces cellules étant probablement réalisé par un cocktail complexe de cytokines et de facteurs chémoattractants dont la composition exacte n'est pas claire.

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

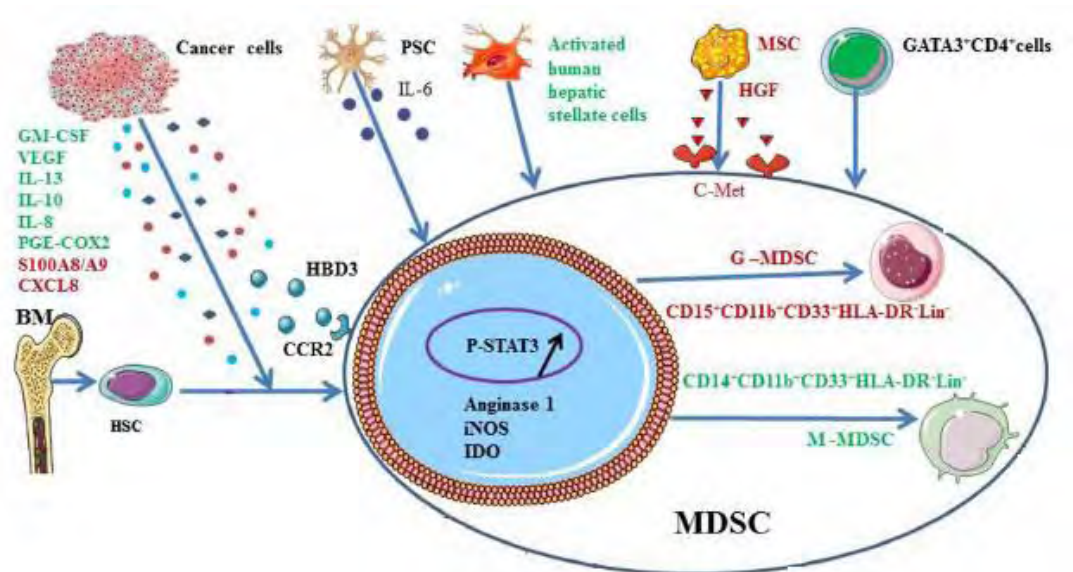


Figure 32: Mécanismes de recrutement des MDSC au sein des tumeurs (extrait de ²⁵⁰).

II.C.2.2 Les lymphocytes T régulateurs

Les Treg sont une sous-population de lymphocytes T CD4. Ils représentent environ 5 à 10 % des lymphocytes T CD4, expriment constitutivement le CD25 et inhibent la réponse T *in vivo* ²⁰⁰. Ils présentent un phénotype particulier avec notamment l'expression de Foxp3 (forkhead box P3), de GITR (glucocorticoid-induced TNF factor) et CTLA-4. Leurs actions inhibitrices passent aussi bien par la destruction des lymphocytes T que par une suppression de l'activation et de la prolifération des T CD8 ²⁷³⁻²⁷⁵ via la production d'IL-10 et de TGF- β .

II.C.2.2.1 Impact pronostique

Les premiers résultats concernant l'impact pronostique des Treg furent obtenus chez la souris. En effet, la déplétion des cellules CD4⁺ CD25⁺ provoque une réponse T anti-tumorale ²⁷⁶⁻²⁷⁸. Cet effet anti-tumoral est principalement médié par les lymphocytes T CD8 mais les lymphocytes T CD4 et les cellules NK seraient aussi impliqués.

Chez l'Homme, une augmentation des Treg (en nombre absolu ou en proportion) a été révélée dans de nombreux cancers ²⁷⁹⁻²⁸². Ainsi dans les cancers gastro-intestinaux, la proportion de Treg a même été corrélée au pronostic de la maladie ²⁸³.

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

De même, le niveau d'infiltration tumoral par des Treg semble avoir un impact pronostique. Une forte infiltration de Treg au sein de la tumeur chez des patientes atteintes de cancer du sein est ainsi associée à une évolution défavorable de la maladie^{284,285}. Dans les cancers gastriques, il semble que ce soit plus la localisation des Treg que leur nombre qui soit un facteur pronostique²⁸⁶. Cependant, dans les gliomes, les glioblastomes et les mélanomes, le nombre de Treg infiltrants n'est pas relié à l'évolution clinique de la maladie²⁸⁷⁻²⁸⁹. A l'opposé, l'infiltration par des Treg est un facteur de bon pronostic dans des cancers de la tête et du cou, dans de multiples lymphomes et dans des cancers colorectaux²⁹⁰⁻²⁹³.

L'explication de ces résultats surprenants peut être que dans les cas de forte infiltration par les Treg on retrouve le plus souvent aussi une forte infiltration par des lymphocytes T CD8 connus pour être anti-tumoraux. Ainsi, il semblerait que des scores combinant à la fois les Treg et les T CD8 seraient de meilleurs facteurs pronostiques que ces deux facteurs pris séparément.

II.C.2.2.2 Mécanismes d'accumulation dans les tumeurs

Les mécanismes d'accumulation des Treg sont encore aujourd'hui mal compris. Ils passent principalement par deux voies : un recrutement des Treg du sang périphérique et une conversion des T effecteurs. En effet, les cellules tumorales et leur microenvironnement créent un gradient cytokinique attirant les Treg au sein de la tumeur. Par exemple, dans les cancers ovariens les Treg migrent selon un gradient de CLL22 produit aussi bien par les cellules tumorales que par les TAM²⁰¹. De plus, les cellules tumorales peuvent produire du TGF- β qui peut convertir des lymphocytes T effecteurs en Treg²⁹⁴.

Cependant, le trafic et la localisation des Treg semblent aussi dépendre du stade tumoral. Dans les stades très précoces de la maladie, les Treg seraient situés dans les ganglions lymphatiques drainants tandis qu'à des stades plus avancés ils seraient dans le microenvironnement²⁰¹. L'explication proviendrait du fait qu'à des stades précoces les Treg empêcheraient l'activation des T naïfs tandis qu'aux stades tardifs ils inhiberaient la fonction des T effecteurs au sein de la tumeur²⁰¹.

II.D Le microenvironnement tumoral dans la leucémie lymphoïde chronique

Le microenvironnement tumoral dans la LLC est retrouvé au sein des organes lymphoïdes secondaires et de la moelle osseuse. Il se compose notamment de cellules T, de cellules NK, de MDSC, de cellules folliculaires dendritiques (FDC), de cellules endothéliales, de neutrophiles et des NLC qui entourent, protègent et favorisent la prolifération des cellules leucémiques résidentes (Figure 33). L'influence de toutes ces populations sur les clones leucémiques et sur la LLC sera décrite ci-dessous, à l'exception des NLC qui font l'objet d'un chapitre à part (III.C Les « nurses-like cells » : les macrophages associés aux tumeurs de la leucémie lymphoïde chronique).

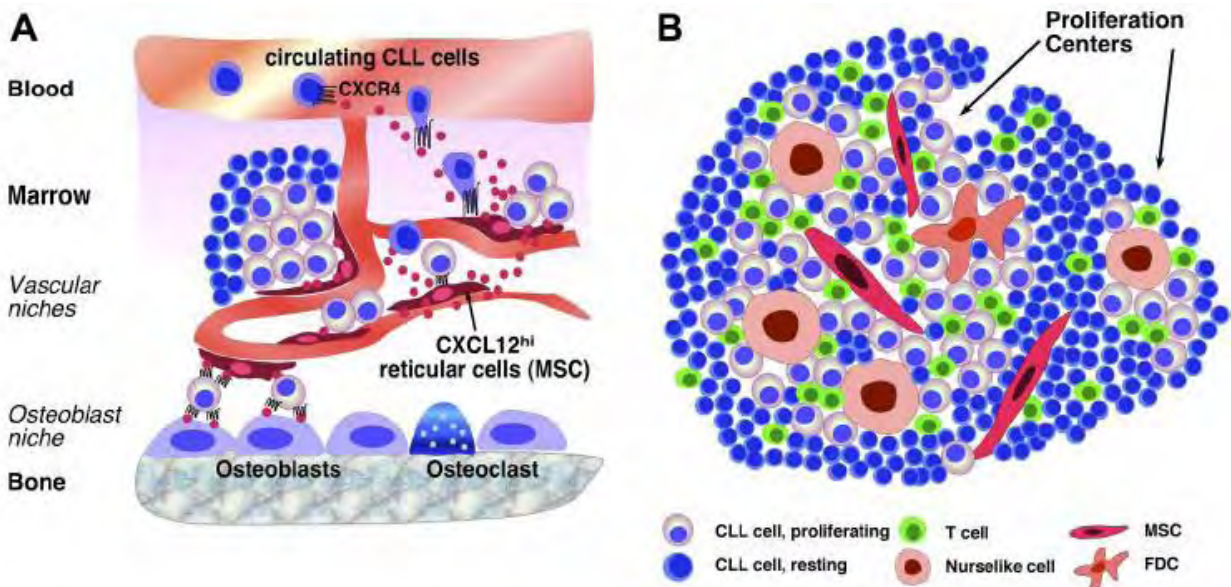


Figure 33: Les acteurs du microenvironnement tumoral dans la leucémie lymphoïde chronique. A. Au sein de la moelle osseuse. B. Au sein du ganglion lymphatique. (extrait de ²⁹⁵)

II.D.1 Les lymphocytes T dans la leucémie lymphoïde chronique

Comme nous l'avons vu précédemment, dans la majorité des cancers, le rôle des lymphocytes T est plutôt anti-tumoral. Cependant dans la LLC, ces effets anti-tumoraux sont contestés et leur rôle dans la réponse pro-tumorale de plus en plus décrit.

Cliniquement on observe une hyperlymphocytose T, particulièrement T CD8, avec un déséquilibre dans le ratio CD4/CD8 ²⁹⁶. Néanmoins, ces lymphocytes T présentent de profonds défauts fonctionnels ce qui limite leurs capacités anti-tumorales ²⁹⁷. Ils présentent ainsi un état d'activation chronique avec une surexpression de CD68, de HLA-DR et de CD57 et une

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

diminution d'expression de CD28 et de CD62L²⁹⁸. Cette activation chronique conduit ainsi à un épuisement de ces lymphocytes T caractérisé par une augmentation des marqueurs d'épuisement tels que CD244, CD160 et PD1 avec une expansion de la population PD1⁺BLIMP1^{HI}²⁹⁸. De plus, on observe des expansions olivales T chez des populations T avec un phénotype CD57⁺ activé. Leurs capacités cytolytiques sont elles aussi diminuées avec un défaut d'incorporation du granzyme au sein des vésicules et une dégranulation non polarisée (Figure 34). PD-1 et CTLA-4, qui sont surexprimés sur les lymphocytes T de patients, participent aussi au défaut d'activation qui peut être levé par les immunothérapies anti PD-L1 et anti CTLA-4^{299, 300}. Enfin, les cellules leucémiques présentent à leur surface moins de récepteurs de mort et un défaut d'apoptose intrinsèque ce qui provoque une diminution des effets cytotoxiques des lymphocytes T³⁰¹.

L'analyse transcriptomique permet d'apporter aussi des explications sur les défauts fonctionnels des lymphocytes T. En comparant des cellules T issues de patients atteints de LLC à celles de donneurs sains, Görgün *et al* ont montré que les lymphocytes T issus de patients présentent une dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans la formation du cytosquelette. Il est intéressant de noter que ce profil d'expression génique peut être acquis par des lymphocytes T issus de donneurs sains mis en contact avec des cellules leucémiques ce qui indique que ce sont ces dernières qui induisent ce changement et non pas un état préexistant des lymphocytes T chez le patient³⁰². Ces altérations transcriptomiques induisent ainsi un défaut fonctionnel de la polymérisation de l'actine conduisant à une synapse immunologique déficiente avec les CPA³⁰³. Ce même défaut de polymérisation de l'actine limite aussi les capacités migratoires intégrines dépendantes des lymphocytes T, avec une activation altérée des RhoGTPases³⁰⁴.

L'ensemble des caractéristiques des lymphocytes T chez le patient atteint de LLC montre clairement pourquoi ils ne peuvent délivrer la réponse anti-tumorale qu'ils mettent en place dans la majorité des cancers. Cependant, il est possible de restaurer la synapse et les effets cytotoxiques des lymphocytes T par un traitement au lénalidomide (Revelimid®), un agent immunomodulateur^{304, 305}.

Dans la LLC, les lymphocytes T peuvent aussi avoir des effets pro-tumoraux. Ainsi, ils peuvent stimuler la croissance des cellules leucémiques en produisant du TNF- α ³⁰⁶. De même, dans les ganglions lymphatiques, au sein des centres de prolifération, une proportion significative de lymphocytes T CD4⁺ exprime CD154 (CD40L) qui en se liant aux cellules leucémiques exprimant CD40, favorisent ainsi la survie et la prolifération de ces dernières³⁰⁶ (Figure 34).

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

Suite à cette fixation les cellules leucémiques produisent à leur tour du CCL3 et du CCL4 qui permettent le recrutement d'autres cellules du microenvironnement tels que les monocytes précurseurs des NLC³⁰⁷. Cette survie peut aussi être favorisée par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-4³⁰⁸.

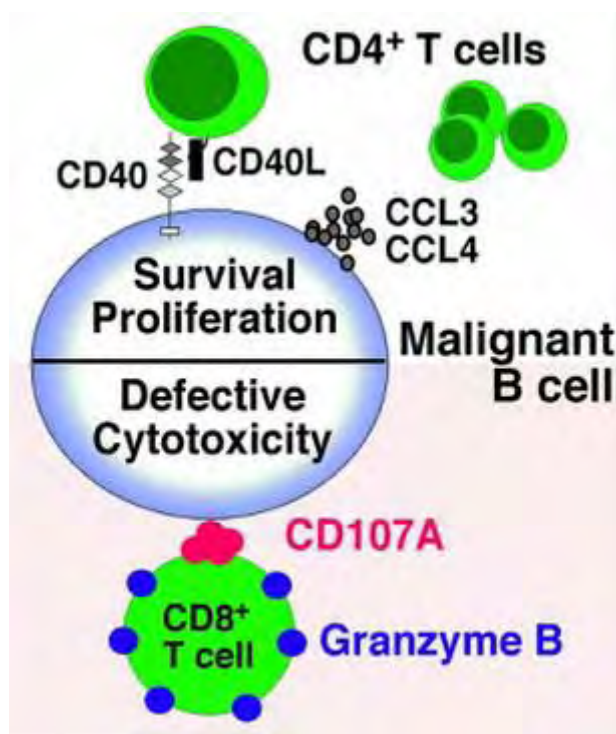


Figure 34: Interaction entre cellules leucémiques et cellules T (extrait de³⁰⁹).

Néanmoins et malgré tous leurs défauts fonctionnels, un fort taux de lymphocytes T par rapport à la lymphocytose leucémique est associé à des facteurs de bon pronostic tels que des statuts Rai faibles et un statut IgHV muté²⁹⁶. De plus, ce fort taux est associé à un allongement de la durée avant traitement. Il faut cependant noter que ce n'est pas le nombre absolu de lymphocytes T qui est pronostique mais bien le ratio T/lymphocytose leucémique et qu'il n'existe à ce jour aucune association entre lymphocytose T, relative ou non, et la survie globale³¹⁰.

Si l'on s'intéresse plus précisément aux populations T CD4 ou T CD8, on observe que les nombres relatifs des lymphocytes T CD4 ou T CD8 ont été identifiés comme étant des marqueurs indépendants pour la survie globale lors d'analyses multivariées. En effet, les patients avec des taux relatifs de T CD8 et de T CD4 (fixés respectivement à 0,074 et à 0,1) élevés sont associés à des facteurs de bon pronostic tels que des stades Rai faibles et des taux de $\beta 2m$ faibles. De plus, en utilisant ces « cutt offs », Gonzalez-Rodriguez et *al.* ont montré que

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

les patients avec des taux relatifs élevés avaient une meilleure survie globale à 5 et à 10 ans (Table 8). Finalement, en combinant le taux relatif de T CD8 et l'expression du CD38, ils ont mis en évidence trois populations aux pronostics distincts : (i) les patients avec un faible taux relatif de CD8 et une expression du CD38 forment le groupe de plus mauvais pronostic, (ii) les patients avec un fort taux relatif de CD8 et pas d'expression du CD38 représente le groupe de meilleur pronostic et (iii) les patients ne pouvant être classés dans les deux groupes précédents forment le dernier groupe de pronostic intermédiaire.

	Number of patients	5 years overall survival probability*	10 years overall survival probability*
CD8:MBC ratio ($p=0.01$)			
≤ 0.074	81	0.64 (0.06)	0.43 (0.08)
> 0.074	138	0.80 (0.04)	0.56 (0.06)
CD4:MBC ratio ($p=0.001$)			
≤ 0.1	91	0.63 (0.05)	0.41 (0.07)
> 0.1	122	0.83 (0.04)	0.58 (0.06)

Table 8: Survie globale à 5 et 10 ans en fonction du taux de lymphocytes T CD4 et T CD8 ³¹⁰.

Ainsi, malgré un rôle pro-tumoral indéniable, les lymphocytes T, qu'ils soient CD4⁺ ou CD8⁺, dans la LLC sont aussi anti-tumoraux comme le prouvent leurs influences sur la survie globale des patients.

II.D.1.1 Les sous-populations particulières de lymphocytes T dans la leucémie lymphoïde chronique

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ de patients atteints de LLC montrent, par rapport aux lymphocytes T $\gamma\delta$ de donneurs sains des capacités cytolytiques réduites ³¹¹.

Concernant les Treg, plusieurs équipes ont montré que leur nombre absolu était augmenté chez les patients atteints de LLC par rapport à des donneurs sains ³¹²⁻³¹⁶. De plus, des taux plus élevés sont retrouvés dans les stades avancés de la maladie tels que les stades Rai III et IV ³¹⁷. Ces résultats permettent de supposer que dans la LLC, ces Treg apportent une action immunosuppressive supplémentaire contre la réponse anti-tumorale. Ainsi, un taux élevé de Treg est associé à une durée avant traitement diminuée ^{318, 319}. Enfin, ce facteur pronostique est indépendant pour la durée avant traitement ^{318, 319} mais n'a pas été décrit comme ayant une influence sur la survie globale.

II.D.2 Les cellules Natural Killer dans la leucémie lymphoïde chronique

Les cellules NK présentent un défaut fonctionnel dans la LLC dont la résultante est leur capacité réduite à induire la lyse de lignées de cellules leucémiques associée à une perte de leurs granules cytolytiques³²⁰, cette capacité lytique étant supérieure chez les patients présentant une MBL³²¹. Leur activité peut néanmoins être restaurée par l'IL-2³²². Les mécanismes par lesquels les cellules leucémiques inhibent les cellules NK ne sont actuellement pas décrits mais impliqueraient des facteurs solubles^{323, 324}. Les cellules leucémiques peuvent aussi inhiber les cellules NK par contact direct. En effet, en exprimant HLA-G à leurs membranes et en le relargant sous forme soluble dans le sérum, les clones leucémiques induisent l'apoptose et/ou un défaut d'activité cytolytique des cellules NK³²⁵. De même, l'expression à la surface des cellules leucémiques des ligands de 4-1BB³²⁶, ou la diminution de l'expression de NKp30^{327, 328}, ou de NKG2D³²⁹, induisent un défaut de reconnaissance par les cellules NK ce qui favorise leur échappement. Enfin, les cellules NK issues de patients atteints de LLC présentent, tout comme les lymphocytes T, un défaut de polymérisation de l'actine et un défaut de formation de la synapse immunologique³³⁰.

Néanmoins, malgré leurs défauts fonctionnels, les cellules NK ont un impact pronostique dans la LLC. 45 % des patients nouvellement diagnostiqués présentent une hyperlymphocytose NK²⁹⁶ tandis qu'en 2010 une équipe a observé cette hyperlymphocytose NK chez 62 % des patients³¹⁰. En rationalisant cette lymphocytose NK par rapport à la lymphocytose des cellules leucémiques, les auteurs de ces publications ont observé qu'une hyperlymphocytose NK relative était associée à des facteurs de bon pronostic tels que des statuts Rai faibles, une concentration en β 2m faible et un statut IgHV muté. De plus, ce fort taux est associé à un allongement de la durée avant traitement. Il faut cependant noter que ce n'est pas le nombre absolu de lymphocytes NK qui est pronostique mais bien le ratio NK/lymphocytose leucémique et qu'il n'existe à ce jour aucune association entre lymphocytose NK, relative ou non, et la survie globale³¹⁰.

Ainsi, et ce malgré de nombreuses stratégies d'échappement mises en place par le clone leucémique, le rôle anti-tumoral des cellules NK dans la LLC est prouvé grâce notamment à leur influence sur la survie globale des patients.

II.D.3 Cellules suppressives de la moelle dans la leucémie lymphoïde chronique

Les MDSC, dans la LLC, tout comme dans la plupart des cancers, ont un rôle pro-tumoral même si à ce jour il n'existe aucune étude sur leur impact pronostique dans la LLC.

Elles sont communément retrouvées dans la moelle osseuse mais aussi au sein du ganglion lymphatique où elles délivrent au clone leucémique des signaux de migration et de survie ²⁹⁵. Via un gradient de CXCL-12 qu'elles produisent, les MDSC attirent les cellules leucémiques qui expriment le récepteur correspondant, CXCR4, par un phénomène de pseudo-empériopèse ^{331, 332}.

Les signaux de survie, quant à eux, sont délivrés par la fixation de VLA-4 (very late antigen 4) à VCAM-1 présents respectivement sur le clone leucémique et la MDSC ^{39, 333} (Figure 35). Suite à cette fixation, on observe au sein de la cellule leucémique une surexpression de MCL-1 ³³⁴, une protéine anti-apoptotique, et de TCL1 ³³⁵ et une diminution de l'expression de CXCR4 ³³⁶. L'importance de ces interactions est telle que l'expression de VLA-4 sur les cellules leucémiques a un impact pronostique *in vivo* ³³⁷. De plus, le contact avec les MDSC induit une surexpression de marqueurs d'agressivité de la LLC sur le clone leucémique tels que ZAP70 et CD38 ³³⁶ et une diminution de l'expression à sa surface du CD20, ce qui pourrait diminuer l'efficacité des thérapies anti-CD20 telles que le rituximab ³³⁸.

Cette fixation permet aussi l'activation des MDSC par les cellules leucémiques via l'induction de la PKC β 2 (proteine kinase C beta II) et l'activation de la voie de signalisation NF-KB ³³⁹. Enfin, les cellules leucémiques produisent des microvésicules enrichies en molécules de signalisation activées qui activent la voie de signalisation AKT dans les MDSC ³⁴⁰ (Figure 35).

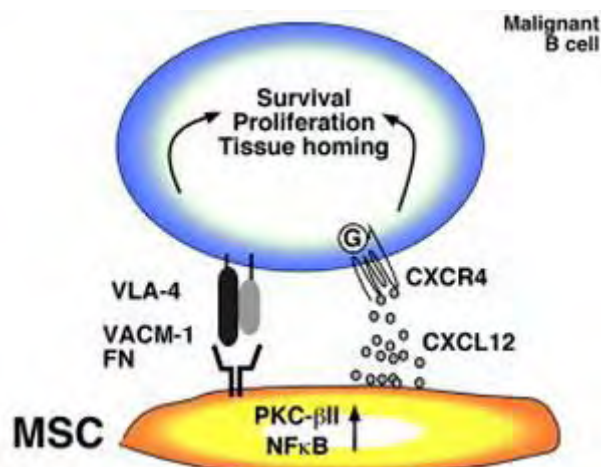


Figure 35: Le cross talk entre cellules leucémiques et MDSC (extrait de ³⁴¹).

II.D.4 Les cellules folliculaires dendritiques dans la leucémie lymphoïde chronique

Les FDC sont essentielles pour le homing et la rétention des cellules leucémiques dans les tissus résidents³⁴². En effet, il existe un dialogue réciproque entre cellules leucémiques et FDC, essentiel pour que le clone leucémique se positionne dans le centre de prolifération et permette ainsi la progression de la LLC³⁴³. Au niveau moléculaire, ce dialogue implique le couple CXCR5/CXCL13 et le couple lymphotoxine $\alpha\beta$ (LT $\alpha\beta$) et son récepteur lymphotoxine β (LT β R)³⁴³.

De plus, *in vitro*, les FDC favorisent ainsi la résistance à l'apoptose spontanée des cellules leucémiques par contact cellulaire direct impliquant la fixation de CD44. Suite à cette fixation, on observe au sein du clone une surexpression de MCL1³⁴⁴. Ce mécanisme de survie contact dépendant impliquerait aussi le couple CD100/Plexin B1³⁴⁵.

A ce jour, il n'existe aucune étude sur l'impact pronostique des FDC dans la LLC.

Au vu des travaux cités ci-dessus, les FDC sont donc clairement des acteurs pro-tumoraux dans la LLC.

II.D.5 Les cellules endothéliales dans la leucémie lymphoïde chronique

Les cellules endothéliales, elles aussi, sont essentielles pour le homing et la rétention des cellules leucémiques dans les tissus résidents³⁴². L'adhésion des cellules leucémiques sur les cellules endothéliales favorise la survie et la résistance aux agents chimiothérapeutiques des clones leucémiques³⁴⁶⁻³⁵⁰. Au niveau moléculaire, ces mécanismes pro-survie mettent en jeu la fixation des intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ ³⁴⁹, et de BAFF et d'APRIL³⁴⁷, présents à la surface des cellules leucémiques. La fixation de l'endothéline 1 (ET-1) sur le récepteur à l'endothéline de type A (ETAR), présent respectivement sur le clone leucémique et la cellule endothéliale, favorise elle aussi la survie des clones et leur résistance aux chimiothérapies, cet effet pouvant être inhibé par le blocage de ETAR³⁵⁰.

L'ensemble des effets des cellules endothéliales sur le clone leucémique en font donc des acteurs pro-tumoraux dans cette pathologie.

A ce jour, il n'existe aucune étude sur l'impact pronostique des cellules endothéliales dans la LLC.

II.D.6 Les neutrophiles dans la leucémie lymphoïde chronique

Le rôle des neutrophiles dans la LLC a été mis en évidence dans une étude décrivant les mécanismes nécessaires à la transition entre inflammation dans un contexte auto-immun, et lymphoprolifération maligne. Dans ce travail, Sangaletti et *al.* ont montré que dans un contexte inflammatoire chronique chez la souris, la mutation du gène de l'ostéonectine provoque notamment une désorganisation structurelle et un grossissement des organes lymphoïdes secondaires dû en partie à une lymphoprolifération CD19⁺CD5⁺CD43⁺. Cette désorganisation spatiale permet des interactions entre neutrophiles et lymphocytes B CD5⁺ qui favorisent la survie, et la prolifération NF-KB dépendante de ces derniers. Au niveau moléculaire, ces effets pro-survie et prolifératifs sont permis notamment par BAFF, l'IL-21 et des ligands des TLR. Or dans la LLC, le gène de l'ostéonectine est très souvent muté et l'on observe une désorganisation spatiale des ganglions lymphatiques donc par analogie le rôle pro-tumoral des neutrophiles dans cette pathologie est donc plus que probable ³⁵¹.

II.D.7 Un microenvironnement tumoral largement pro-tumoral

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, le microenvironnement de la LLC est très majoritairement pro-tumoral. Il est intéressant de noter que les interactions entre les cellules leucémiques et le microenvironnement tumoral ressemblent beaucoup à celles observées entre lymphocytes B normaux et microenvironnement normal. La survie et la prolifération des clones malins sont ainsi permises par ce microenvironnement tumoral *via* des Ag, des cytokines et des interactions cellulaires directes tandis que les réponses anti-tumorales sont inhibées (Figure 36).

INTRODUCTION

Le microenvironnement tumoral

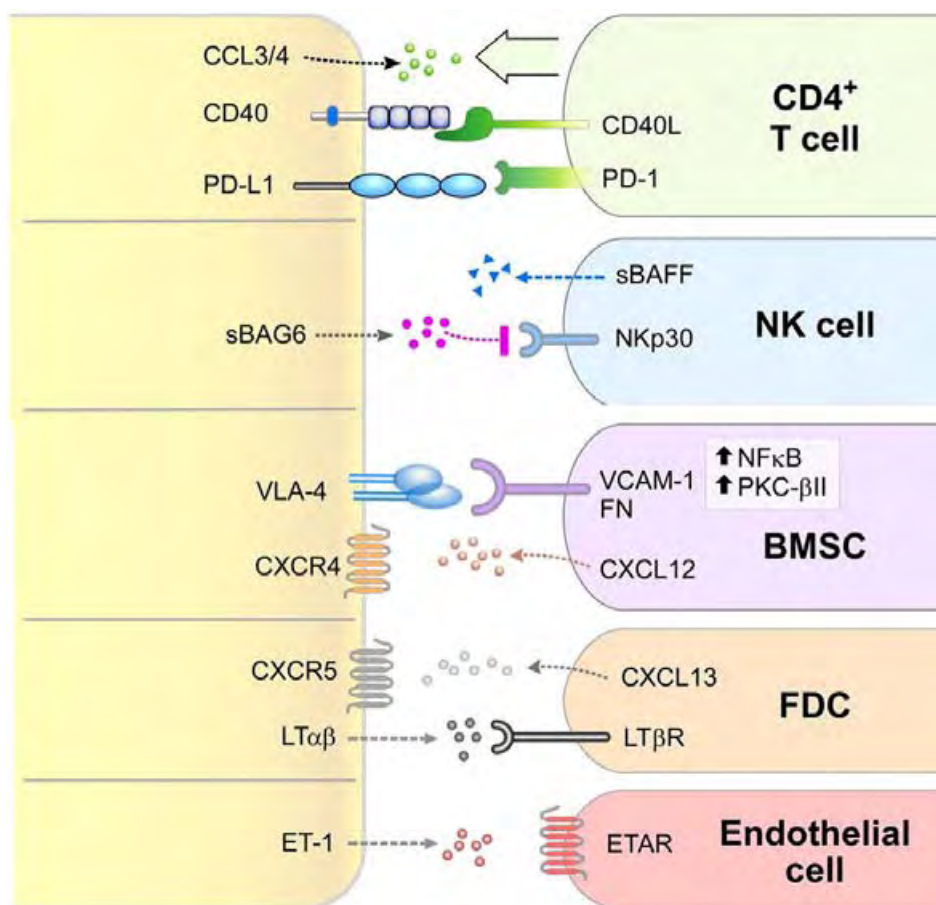


Figure 36: Composants cellulaires et moléculaires du microenvironnement tumoral dans la leucémie lymphoïde chronique (extrait de ³⁴²).

III. Les macrophages associés aux tumeurs

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

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

Les macrophages (littéralement les gros mangeurs du grec makros « gros » et phagein « mangeur ») sont des cellules myéloïdes retrouvées dans les tissus et proviennent de la différenciation des monocytes circulants après leur extravasation ³⁵². Acteurs de l'immunité innée, les macrophages exercent leur activité phagocytaire en captant des particules opsonisées ou non telles que des débris cellulaires ou des bactéries, qu'ils endocytent puis dégradent. De plus, les macrophages sont des CPA et sont donc capables de présenter les Ag aux acteurs de l'immunité adaptative ³⁵².

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

Les M1 sont pro-inflammatoires et ont une très forte activité antimicrobienne et anti-tumorale. La différenciation des monocytes en M1 est classiquement induite par l'INF- γ , les LPS (lipopolysaccharides) ou les agonistes des TLR ³⁵³. Ils sont caractérisés par un fort niveau de production de TNF- α et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-23 ³⁵⁴ (Figure 37). Ce sont également de très bons CPA, car ils expriment de forts niveaux de molécules du CMH de classe I ou de classe II, et des molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86 ³⁵³. Ils promeuvent ainsi les réponses T et sont physiologiquement retrouvés dans les phases d'inflammation.

A l'opposé, les M2 ou macrophages activés alternativement, sont caractérisés par une forte capacité phagocytaire, un fort niveau d'expression de protéines « scavengers » et par la

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

production de fortes quantités de prostaglandines, de TGF- β et de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10³⁵⁴ (Figure 37). Physiologiquement, ils sont retrouvés dans les phases de résolution de l'inflammation. Les TAM sont classiquement associés à la sous-classe M2d des M2^{355, 356}.

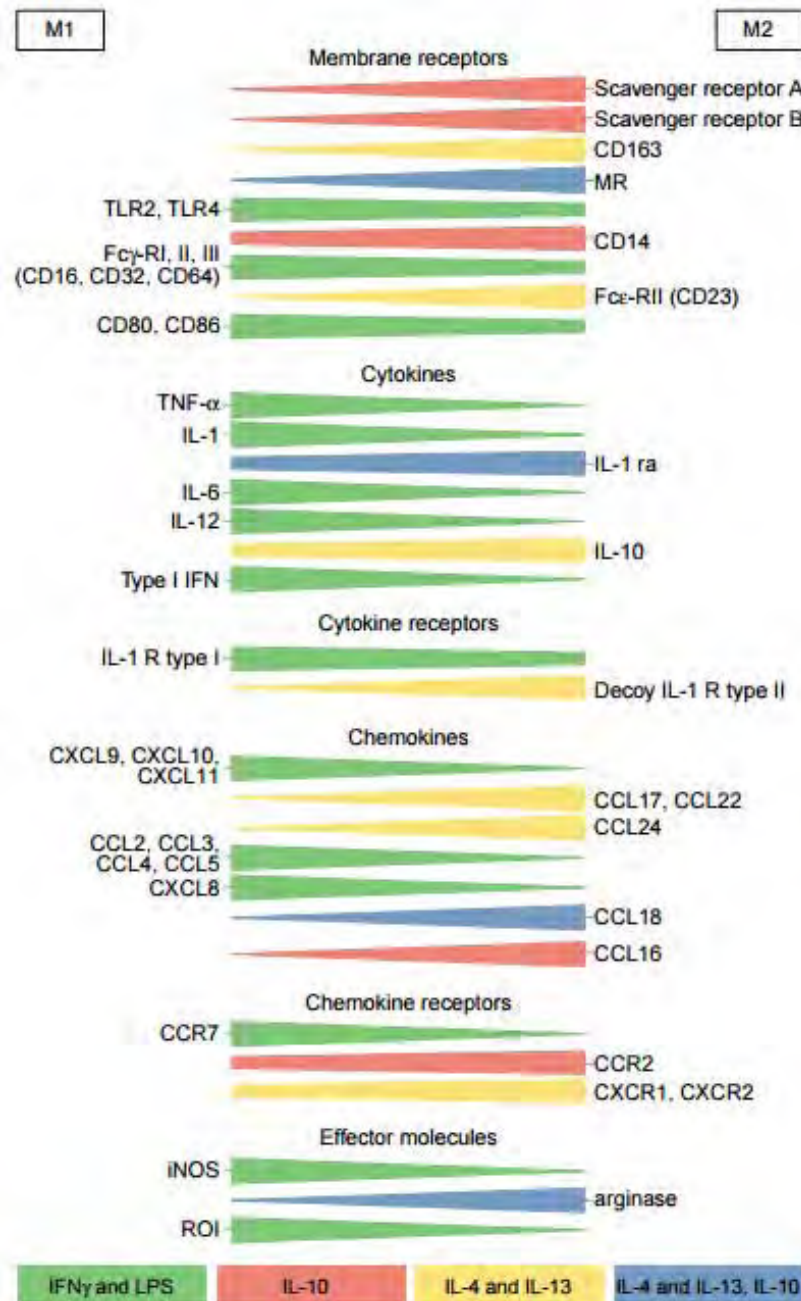


Figure 37: Phénotype des macrophages suivant leurs états de polarisation (extrait de³⁵⁴).

III.B Les macrophages et les tumeurs

III.B.1 Définition des macrophages associés aux tumeurs

Les TAM sont des macrophages retrouvés au sein du microenvironnement tumoral. Cette large définition comprend aussi bien des M1 anti-tumoraux que des M2 pro-tumoraux. De plus, il a été montré que le « switch » entre M1 et M2 au sein du microenvironnement est associé à la progression cancéreuse³⁵⁷⁻³⁵⁹. Ainsi, si durant la phase d'équilibre ou d'élimination, les M1 contribuent à l'activation T et à la réponse anti-tumorale, ils adopteront un phénotype M2 et faciliteront la progression tumorale aux stades plus tardifs¹⁵⁵. Actuellement, environ 80 % des études montrent que les TAM ont un effet pro-tumoral et seulement 10 % démontrent un effet anti-tumoral³⁶⁰.

III.B.2 Recrutement et différenciation

Les TAM dérivent de précurseurs monocytiques circulants et non pas d'une prolifération macrophagique au sein de la tumeur chez l'homme³⁶¹.

III.B.2.1 Le recrutement des monocytes

Le recrutement des monocytes au sein des tumeurs est régulé principalement par des cytokines, des chémokines et des facteurs de croissance produits par les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement (Figure 38)^{361, 362}. En effet, les tumeurs sécrètent de manière constitutive des chémokines inflammatoires³⁶³, la plus fréquente étant probablement CCL2. Elle est retrouvée aussi bien dans des sarcomes, des gliomes, des mélanomes, des cancers pulmonaires, du sein, ou de l'ovaire^{354, 361}, au point qu'elle fut appelée le facteur chémoattractant des tumeurs. Ainsi, sa neutralisation par un Ac anti-CLL2 réduit significativement la croissance tumorale chez la souris³⁶⁴. De nombreuses autres chémokines sont aussi produites afin d'attirer ces monocytes. Ainsi, l'IL-4 et l'IL-13 rendent les monocytes extrêmement sensibles à des attractants tels que CXCL8 et CXCL1³⁶⁵. En plus des facteurs

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

précédemment cités, le CSF-1 (colony stimulating factor 1) et PDGF (platelet-derived growth factor) qui sont des facteurs de croissance, participent aussi à ce recrutement, ³⁶⁶⁻³⁶⁸.

Certaines molécules de la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que leurs fragments protéolytiques permettent aussi le recrutement des monocytes. Ainsi, les fragments générés suite au clivage de l'élastine par MMP9 (matrix metalloprotéinase) et MMP12 ou des fragments dénaturés de collagène de type I peuvent attirer des monocytes ³⁶⁹. Enfin, le VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) produit lors de situations hypoxiques au sein de la tumeur, est aussi un attractant des monocytes. En effet, on retrouve au sein des zones hypoxiques un grand nombre de TAM ³⁷⁰.

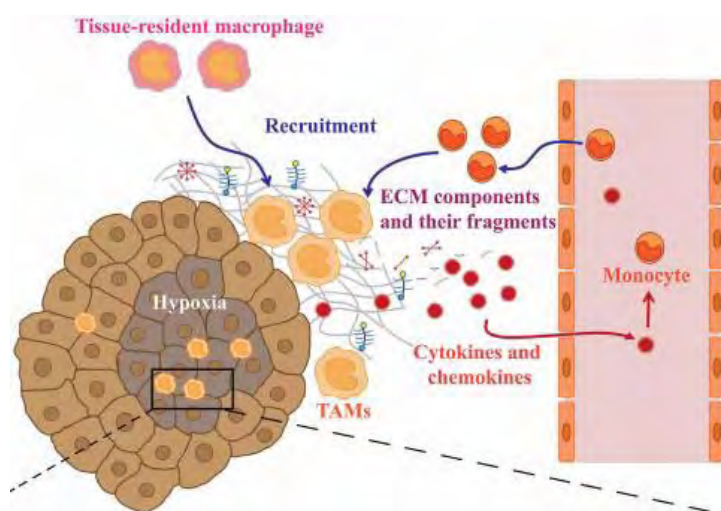


Figure 38: Mécanismes de recrutement des monocytes au sein des tumeurs (extrait de ³⁵³).

III.B.2.2 Différenciation

La différenciation des monocytes mobilisés en TAM est un mécanisme complexe et encore mal élucidé. Là encore, l'environnement cytokinique produit par les cellules tumorales et leur microenvironnement semble capital (Figure 39). Ainsi, CCL2 en plus de son rôle d'attractant, permet la polarisation des monocytes recrutés en M2 ^{371, 372}. L'IL-6, souvent rapportée comme étant présente dans les fluides tumoraux et sécrétée par les cellules tumorales, provoque quant à elle, la différenciation *in vitro* de monocytes en TAM ³⁷³⁻³⁷⁶. CSF-1, lui aussi, permet cette différenciation *in vitro* ³⁷⁷. Les COX-2 (cyclooxygénase 2) *via* leur production de PGE-2 (prostaglandin E2) induisent également cette différenciation ^{373, 378}. De plus, dans le cancer du poumon, lorsque les COX-2 sont surexprimées on retrouve une production accrue

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

d'IL-6³⁷⁹. L'IL-10 produite notamment par les cellules tumorales promeut elle aussi la différenciation en TAM. HSP-27 (heat shock protein 27), produite et relarguée par de nombreuses cellules tumorales³⁸⁰, induit une différenciation de ces monocytes en macrophages immunotolérants et pro-angiogéniques³⁸¹.

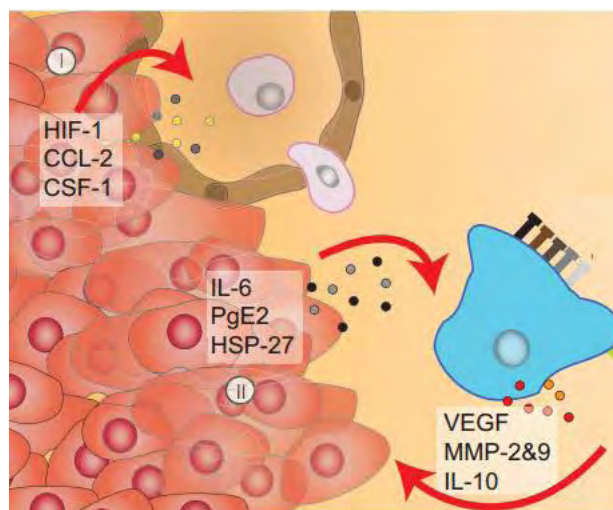


Figure 39: Mécanismes de différenciation des monocytes en TAM au sein des tumeurs (extrait de³⁸²).

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

III.B.3 Phénotype

Bien que leurs phénotypes soient étroitement liés aux signaux de différenciation qu'ils reçoivent, la majorité des TAM sont proches des M2³⁸³. Actuellement, il n'existe ni de marqueur unique permettant leur caractérisation ni de liste exhaustive de tous leurs marqueurs. Ainsi, comme toutes les cellules myéloïdes, ils expriment le CD14, le CD11b, et comme les M2 ils expriment des faibles taux de CD64, de molécules du CMH de classe I et II et des molécules de co-stimulation telles que CD80, CD86. Dans de nombreuses publications, les TAM sont assimilés aux cellules CD68⁺³⁸⁴⁻³⁸⁶, bien que le CD68 puisse être exprimé par des cellules non myéloïdes³⁸⁷. De plus, il a été montré que des cellules CD68⁺ n'étaient pas positives pour le CSF-1R (récepteur au CSF-1) ou le CD45, deux autres marqueurs utilisés en combinaison pour la caractérisation des TAM. Le CD163 et le CD204, deux récepteurs scavengers, ainsi que le CD206 un récepteur au mannose, sont aussi utilisés pour mettre en

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

évidence les TAM³⁸², avec une spécificité qui semble plus forte que le CD68 dans le cancer du sein, de l'ovaire et du pancréas³⁸⁸⁻³⁹⁰. Les TAM peuvent également être caractérisés par leur production de cytokines telles que le TGF- β , le VEGF ou l'IL-10³⁹¹.

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

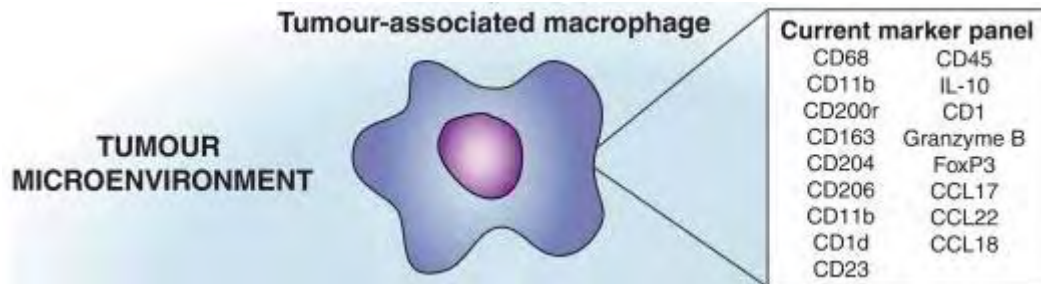


Figure 40: Exemple de phénotype de TAM (extrait de³⁹¹).

III.B.3.1 Le CD163

Le gène codant pour le CD163 est situé sur le chromosome 12 en p13 codant pour une protéine de 35kDa transmembranaire appartenant à la superfamille des récepteurs « scavengers »³⁹². Lors de la traduction, un épissage alternatif peut conduire à deux variants de la protéine qui diffèrent seulement par la longueur de leur queue N-terminale cytoplasmique sur laquelle se trouvent des sites de phosphorylation putatifs³⁹².

Son expression est limitée aux cellules du lignage monocytaire/myéloïde chez l'Homme³⁹³. Physiologiquement, il est exprimé sur les cellules de Kupffer, sur les macrophages de la pulpe rouge dans la rate, sur les macrophages corticaux dans le thymus, sur les macrophages matures résidents de la moelle osseuse et sur les macrophages méningés dans le tissu nerveux central³⁹³.

Le CD163 est impliqué dans de multiples processus tels que la clairance de l'hémoglobine, la régulation de l'érythropoïèse. Il a de plus un rôle potentiel dans les fonctions anti-inflammatoires et enfin il peut agir comme récepteur pour des bactéries.

-Lors d'une hémolyse intra-vasculaire, l'hémoglobine (Hb) est relarguée lors de la lyse érythrocytaire et se dissocie en deux dimères $\alpha\beta$. Ces dimères sont ensuite captés par

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

l'haptoglobine (Hp), une protéine plasmatique, et forment donc un complexe Hb-Hp. Le CD163 se fixe alors sur l'Hp complexée à l'Hb ce qui provoque l'endocytose du complexe par les macrophages et la production d'IL-10³⁹⁴. Dans les vésicules d'endocytose précoce, le CD163 est récupéré pour être recyclé à la membrane plasmatique tandis que le complexe Hb-Hp sera dégradé libérant ainsi le fer et du monoxyde de carbone (CO) qui ont aussi des propriétés anti-inflammatoires³⁹⁵.

-Lors de l'érythropoïèse, les macrophages sont en contact intime avec les érythroblastes dans la niche hématopoïétique. Le CD163 interagit dans ce cas avec ces cellules et favorise alors leur survie et leur prolifération³⁹⁶.

-Le rôle potentiel du CD163 dans les processus anti-inflammatoires repose sur de multiples évidences. Premièrement, les macrophages exprimant fortement le CD163 constituent la population macrophagique prédominante lors des phases de résolution de l'inflammation³⁹⁷. Deuxièmement, l'expression du CD163 à la surface de ces cellules est fortement induite par des médiateurs anti-inflammatoires tels que les corticoïdes, l'IL-6 et l'IL-10³⁹⁸. De plus, lors de la dégradation du complexe Hb-Hp, on observe une libération de métabolites de l'hème comme la biliverdine, la bilirubine et le CO qui ont des rôles anti-inflammatoires³⁹⁹. Enfin, la fixation d'un Ac agoniste sur le CD163 induit une production cytokinique pro et anti-inflammatoire par les macrophages avec une production d'IL-1 β et de TNF- α d'un côté et d'IL-6 et de NO de l'autre⁴⁰⁰.

-Le CD163 est aussi décrit comme un récepteur aux bactéries. Suite à cette fixation, on observe une production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α ce qui contribue donc à l'initiation de la réponse inflammatoire⁴⁰¹.

Enfin, il existe une forme soluble du CD163 appelée sCD163 qui provient de la dégradation du CD163 membranaire par des métalloprotéinases⁴⁰². Sa fonction est inconnue à ce jour, bien qu'il semble qu'il ait des fonctions anti-inflammatoires et que son niveau soit un reflet du pool total du CD163 membranaire. Il est intéressant de noter que cette concentration est augmentée dans les maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante^{403, 404}, caractérisées par un déséquilibre entre effecteurs pro et anti-inflammatoires.

III.B.4 Fonctions

III.B.4.1 Immunosuppression

Il existe de nombreux mécanismes d'immunosuppression médiés par les TAM qui inhibent les réponses anti-tumorales et favorisent les réponses pro-tumorales comme détaillé dans la Figure 41. Tout d'abord, les TAM, étant très proches des M2, sont de très mauvais CPA donc n'activent pas la réponse anti-tumorale. *Via* l'expression de molécules de CMH I non classiques telles que HLA-E et HLA-G, ils inhibent l'activation des cellules NK⁴⁰⁵ qui en retour inhibent l'activation des lymphocytes T CD8 dans les ganglions sentinelles⁴⁰⁶.

Ensuite, les TAM expriment les ligands des récepteurs inhibiteurs de PD-1 et CTLA-4 présents sur les lymphocytes B et T. Ainsi, l'expression de PD-L1 (programm cell death ligand 1) est induite à la surface des TAM, par CSF-1, l'IL-4 INF- γ ou encore l'hypoxie^{407,408}. La fixation de ces ligands sur leurs récepteurs respectifs induit une inhibition directe de la signalisation liée à l'activation du TCR et du BCR et donc une absence de réponse anti-tumorale B et T.

Les TAM sécrètent aussi de nombreuses cytokines, chémokines et enzymes (l'IL-10, TGF- β et PGE-2) qui inhibent les réponses T CD4 et CD8^{409,410}. De plus, ils induisent la différenciation des T en Treg et le recrutement des Treg en produisant de l'IL-10, du TGF- β ⁴¹¹ et du CCL22⁴¹² dans le cancer ovarien ou *via* CCL20 dans le cancer colorectal⁴¹³.

Enfin, en métabolisant la L-arginine du microenvironnement tumoral, *via* la sécrétion d'arginase I, ils inhibent encore une fois la réponse anti-tumorale T⁴¹⁴.

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

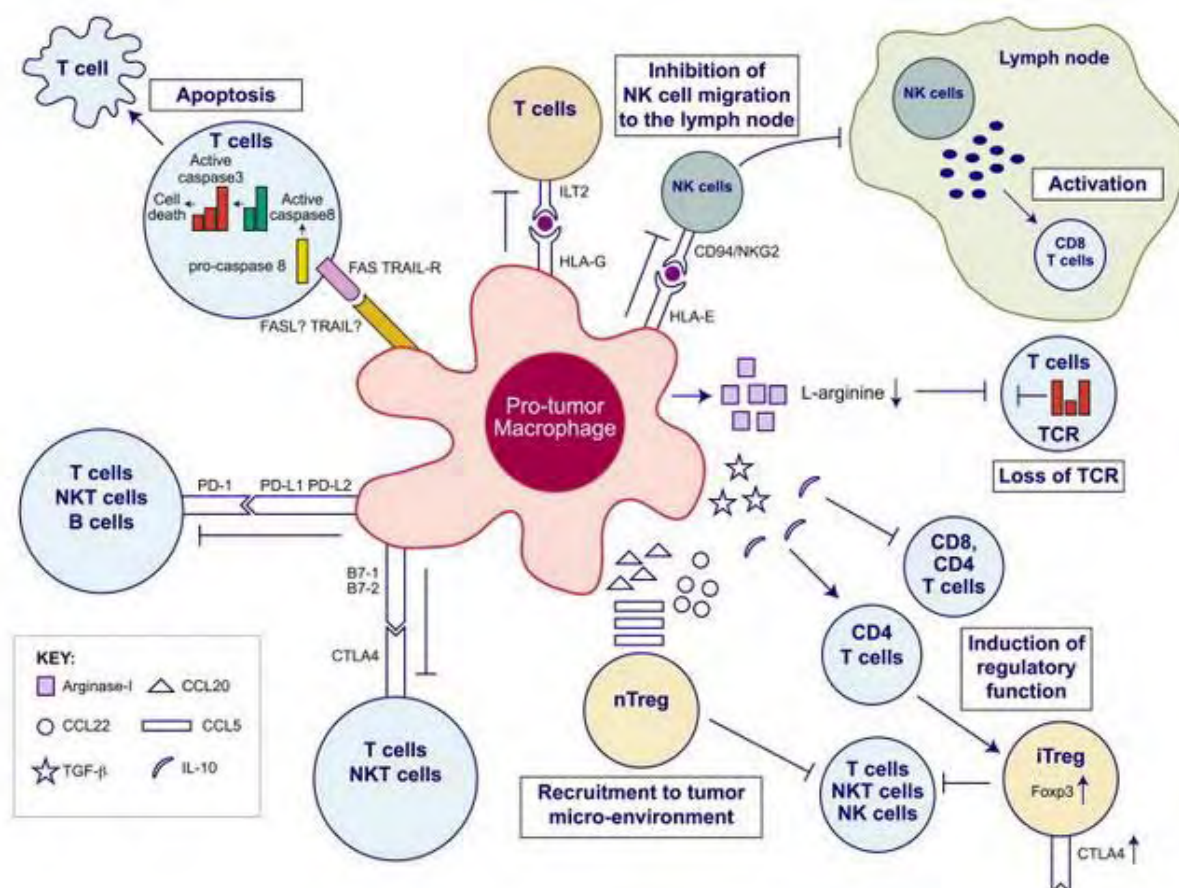


Figure 41 : Mécanismes d'immunosubversion médiés par les TAM (extrait de ⁴¹⁵).

III.B.4.2 Rôle pro-angiogénique

La néovascularisation des tumeurs dépend en partie de l'infiltration macrophagique ⁴¹⁶⁻⁴¹⁸. Ainsi, au cours d'expériences de déplétion des macrophages grâce à des liposomes contenant du clodronate chez la souris, on observe une réduction de l'angiogénèse dans les tumeurs ⁴¹⁹.

Les TAM sécrètent en effet de nombreux facteurs pro-angiogéniques tels que le bFGF (basic fibroblast growth factor), l'uPA (urokinase-type plasminogen activator), l'ADM (adrénomedulline). Par exemple, l'ADM augmente la prolifération des cellules endothéliales et la formation vasculaire en stimulant l'oxyde nitrique synthase ⁴²⁰.

Les TAM retrouvés dans les zones hypoxiques sont aussi capables de sécréter du VEGF-A *via* une activation de HIF-1 α ⁴²¹⁻⁴²³. Au sein de ces zones, ils sécrètent des enzymes protéolytiques telles que MMP-1 ⁴²⁴ et MMP-7 ⁴²⁵ ce qui favorise l'angiogénèse en libérant le VEGF séquestré dans la MEC.

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

Il existe au sein des TAM une sous-population, appelée Tie2⁺ TAM (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains) qui est capable de réguler l'intravasation des cellules tumorales au sein de la circulation ⁴²⁶. Ces TAM sont alignés sur la face externe des vaisseaux sanguins où Tie2 se lie à son récepteur ANG2 (Angiopoitrine 2) exprimé par les cellules endothéliales ⁴²⁷. En fait, la cellule tumorale secrète du CSF-1 et les TAM de l'EGF (epidermal growth factor), ce qui provoque un déplacement de ces deux types cellulaires le long des fibres de collagène jusqu'aux vaisseaux ⁴²⁸. Les macrophages sont alors capables de former une brèche dans la paroi vasculaire permettant à la cellule tumorale de passer au sein de la circulation ce qui augmente ainsi le nombre de cellules tumorales circulantes et les risques métastatiques (Figure 42). Ainsi la déplétion des TAM induit une diminution du nombre de ces cellules circulantes et une diminution des métastases ⁴²⁶. Preuve supplémentaire, chez la femme une structure histologique particulière, le TMEM (tumor microenvironment for metastasis), composée de macrophages, de cellules endothéliales et de cellules cancéreuses, est prédictive du potentiel métastatique dans le cancer du sein ⁴²⁹.

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

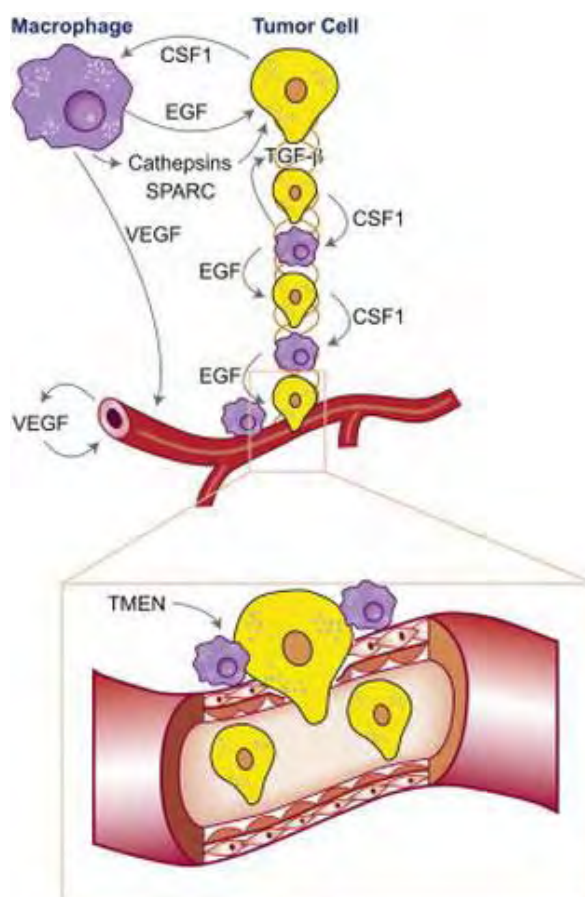


Figure 42: Les TAM contribuent au potentiel invasif des cellules tumorales (extrait de ⁴¹⁵).

Les TAM produisent aussi des molécules telles que l'ostéonectine, le TGF- β ou de la cathepsine impliquées dans le phénotype invasif des cellules tumorales. En produisant de l'ostéonectine ou du TGF- β , ils favorisent la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales ⁴³⁰, ⁴³¹. La cathepsine permet, quant à elle, la dégradation de la MEC et le relargage des facteurs de croissance solubles qui y étaient séquestrés ⁴³², ⁴³³ et donc favorise la croissance tumorale.

III.B.5 Impact pronostique

Il existe de multiples études associant l'infiltration tumorale par des TAM et l'évolution de la maladie. Une partie de ces études est présentée dans la Table 9. Il faut néanmoins différencier trois types d'études : celles réalisées avec un marqueur pan macrophagique tel que le CD68 et celles réalisées avec des marqueurs plus spécifiques des TAM comme le CD163 ou le CD204 et enfin celles présentant l'impact pronostique des macrophages de type I dans les cancers. A ce jour, il n'existe pas de référentiel précis pour la mise en évidence des TAM dans

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

des coupes histologiques, les études étant contradictoires, chacune définit son seuil de positivité et choisit son marqueur.

III.B.5.1 Impact pronostique des TAM

Organ	Cancer type	Number of patients analyzed	Markers	Link to course disease
Lymph node	Hodgkins lymphoma	265	CD68 CD163	No link ⁴³⁴ .
		130 and 166	CD68 MMP11	High CD68+ macrophages or high MMP-11 expression correlates with poor disease specific survival ⁴³⁵ .
	Diffuse large B-cell lymphoma	101	CD163 CD68 HLA-DR	High CD68+ macrophages or high CD68+ CD163+ macrophages correlated with poor overall survival ⁴³⁶ .
		61	CD163 CD68 HLA-DR	High CD68+ CD163+ macrophages correlated with poor overall survival ⁴³⁷ .
	Follicular Lymphoma	180+335	CD68 CD163	CD163+ or CD68+ macrophages predict outcome in follicular lymphoma but their prognostic impacts is highly dependent on treatment received ⁴³⁸ .
		59	CD31 CD68 LYVE-1 Podoplanin, CD11c CD163	Elevated CD163+ macrophages correlate and are in close proximity with angiogenic sprouts in poor prognosis follicular lymphoma ⁴³⁹ .
Colon	colorectal cancer	17	CCL2 CD68 IL-8	Tumor cell produced CCL2 correlates to macrophages count and advanced disease stage
		478	CD68	High macrophages count at tumor front associates with better prognosis
		118	CD68 MMP-2 MMP-9	Intratumoral TAM correlate with invasion, LN status and staging
		40	CD68 S100 CD163	Significant better survival for patient with high DC count and trend for high CD163 count.
		159	CD68 CD206 CD3	High peritumoral CD68 better prognosis; low intratumoral M1/M2 ratio more recurrent disease

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

Intestinal tract	gastro intestinal stroma tumor	47 (19 metastatic)	CD68 CD163 CD14 CD1a CD20 S100 HLA-DR CD3 CD8 FoxP3 CD33	Presence of M2 is correlated with FoxP3 positive infiltrate
	gastric cancer	105	hypoxia CD68 CD34 VEGF MMP2 +9	Hypoxia and more macrophages correlates with shorter survival
Lung	non squamous cells lung cancer	100	CD68 HLA-DR CD163	Patients with long survival have higher number of M1 type macrophages
		50	CD68 IL-10	High IL-10 positive macrophages in advanced disease and therefore correlated to poor prognosis
		40	CD68 CD163 VEGF TNFa iNOS	More macrophages in tumor islets correlate with better prognosis
		20	CXCR-1,2,3 CCL-1	Higher CXCR-2, CXCR-3 and CCL-1 expression in patients with extended survival
Mesothelioma	pleural mesothelioma	52	CD68 CD163 CD206 CD124	High macrophages number in non-epithelial tumors is associated with bad prognosis
Breast	breast cancer	110 + 106	CD68 anti-PCNA	High number of proliferating macrophages associated with decreased survival
		127	CD68 CD163 MAC387	High CD163 correlates with more distant disease recurrence
Ovarian and Peritoneum	epithelial ovarian carcinoma	40 (21 serous, 19 mucinous)	CD68 CD163 CD204 CSF-1	High M2 correlates with disease stage

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

Uterus	endometrioid carcinoma	64	CD163 CD31 HIF-1A	In paired LN metastatic lesion same pattern for CD163 and CD31 is found
	endometrioid adeno cancer	61	MMP-12 CD68	Higher MMP-12 and macrophages in advanced disease
Skin	stage 1/2 melanoma	227 blood 190 tumors	CD68 CD163	High CD163 in tumor front or stroma correlates with poor survival
Eye	eye melanoma	43	CD68 CD163	Less macrophages is associated with better survival
	intra-hepatic cholangiocarcinoma	39	CD68 CD163 CD34 FoxP3	High CD163+ correlates to poor disease free survival
Brain	glioma	79	CD68 CD163 CD204 M-CSF	More CD163+CD204+ macrophages and high M-CSF in advanced stages
Pancreas	pancreatic head cancer invasive ductal cancer	76	CD68 CD163 CD204	High M2 infiltration associated with LN metastasis
Soft tissues	leiomyosarcoma	76 gynecologic and 73 non-gynaecologic	CD68 CD163	In non-gynecologic tumors, high CD163+ number correlate with poor prognosis
Peripheral Lymphoma	angioimmunoblastic T cell lymphoma	42	CD68 CD163	CD163/CD68 ratio correlates to overall survival

Table 9: Relation entre TAM et pronostic dans différents cancers (adapté de ³⁷³).

Il est intéressant de noter que le CD163, en plus d'être un bon marqueur de TAM, peut être retrouvé sous forme soluble (voir III.B.3.1 Le CD163). Ce sCD163 (soluble CD163) est même corrélé aux stades pathologiques dans le lymphome de Hodgkin ⁴⁴⁰. D'autres études doivent être menées afin de définir si ce facteur soluble est ou non un facteur pronostique dans d'autres cancers tels que la LLC.

III.B.5.2 Impact pronostique des macrophages de type I

Il existe peu de travaux se focalisant sur l'impact pronostique des M1 en cancérologie ou en hématologie. Une étude a montré que dans les cancers colorectaux, une forte infiltration

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

par des cellules CD14⁺ et CD40⁺ est de bon pronostic et constitue un marqueur indépendant dans l'évolution de la maladie ⁴⁴¹.

A ce jour, différentes études tentent d'évaluer l'impact pronostique et prédictif des M1 et des M2 dans des cancers du poumon (NCT00690261), dans des lymphomes folliculaires (NCT00896922) ou dans des tumeurs de Wilm's (NCT01493817). Malheureusement, les résultats de ces études restent inconnus, la plus récente ayant été mise à jour en 2011.

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

III.B.6.1 Chimiothérapie

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

Le doxetaxel, un taxane, provoque ainsi une déplétion des TAM immunosuppresseurs et une activation ainsi qu'une expansion des TAM M1 favorisant la réponse T anti-tumorale dans des tumeurs de sein greffées chez la souris ⁴⁴². La trabectédine, elle aussi, déplete les monocytes et les TAM aussi bien chez la souris que chez les patients atteints de sarcome des tissus mous levant ainsi l'inhibition des effets pro-tumoraux qu'ils avaient ^{442, 443}.

A l'opposé, les TAM peuvent limiter l'action de ces agents. Ainsi, lorsque l'on déplete les TAM par un Ac anti CSF-1, on augmente l'efficacité du cyclophosphamide, du méthotrexate et du 5 fluorouracile dans des xéno greffes de tumeurs mammaires ⁴⁴⁴. La chimiothérapie peut aussi augmenter le recrutement et la différenciation des monocytes en TAM limitant par là même leur efficacité. Ainsi, le paclitaxel, provoque une augmentation de sécrétion de CSF-1 au sein du microenvironnement tumoral, provoquant ainsi une augmentation de la différenciation des monocytes en TAM ^{445, 446}. De plus, ces TAM sécrètent alors des facteurs chémoprotectifs tels que les cathepsines B et S qui protègent les cellules tumorales contre le paclitaxel. Enfin, les TAM peuvent protéger les cellules souches initiatrices du cancer contre des chimiothérapies. En effet dans le cancer du côlon, elles relarguent du MFG-E8 (milk fat globule-epidermal growth factor 8 protein) qui protège ces cellules souches du cisplatine ⁴⁴⁷.

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

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

III.B.6.2 Radiothérapie

Les TAM diminuent aussi l'efficacité de la radiothérapie. La première découverte de ce rôle des TAM fut une corrélation entre un fort nombre de TAM et une mauvaise réponse à l'irradiation chez la souris ⁴⁴⁸. Depuis, de nouvelles preuves ont été apportées. Ainsi, le traitement par un inhibiteur de CSF-1 augmente l'efficacité de la radiothérapie dans le cancer de la prostate ⁴⁴⁹. La radiothérapie peut aussi augmenter le recrutement des cellules myéloïdes, dans des modèles de greffes orthotopiques de glioblastomes ⁴⁵⁰. Enfin, les TAM peuvent augmenter la rechute tumorale. Ainsi, la déplétion des cellules myéloïdes diminue la croissance des tumeurs suite à une irradiation dans un modèle de greffe de tumeurs de la tête et du cou chez la souris immunodéprimée ⁴⁵¹.

Ces résultats suggèrent que les TAM retrouvés dans les zones irradiées pourraient aider à la reconstruction du microenvironnement tumoral, comme les M2 aident à la réparation tissulaire dans les cas d'infarctus du myocarde, et favoriseraient ainsi la rechute post-irradiation ⁴⁵².

III.B.6.3 Thérapies ciblées

Comme avec les chimiothérapies, les TAM peuvent moduler l'efficacité des thérapies ciblées. Ainsi, au vu de leur rôle dans l'angiogénèse, leur déplétion *via* le clodrolip ou un inhibiteur de CSF-1R augmente l'effet des thérapies anti-angiogéniques telles que les Ac anti VEGF ou VEGF2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2) dans des modèles de tumeurs greffées chez la souris ^{453, 454}.

Les TAM expriment à leur surface le récepteur au fragment Fc des Ig et sont donc capables de médier des réactions d'ADCP (phagocytose dépendante des anticorps) ou d'ADCC. Ainsi, l'action du trastuzumab, un Ac monoclonal anti HER-2, passe aussi par une activation de la cytotoxicité des macrophages et augmente la capacité de ces cellules à présenter les Ag aux lymphocytes T ^{455, 456}. De même, dans des xénogreffes de cellules issues de lymphomes,

INTRODUCTION

Les macrophages associés aux tumeurs

l'ADCP médiée par les macrophages participe à la réponse anti-tumorale ^{457, 458}, à tel point qu'un fort nombre de TAM est synonyme de meilleur pronostic chez les patients atteints de lymphome folliculaire ⁴⁵⁹. A l'opposé, l'engagement de ces récepteurs sur les TAM lors de thérapies à base de cétuximab, un Ac anti-EGFR (epidermal growth factor receptor), peut augmenter les fonctions immunosuppressives, pro-angiogéniques et pro-tumorales des TAM ^{460, 461}.

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

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

Pour comprendre les NLC, il est tout d'abord nécessaire de comprendre une caractéristique importante des cellules leucémiques. Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules leucémiques sont très résistantes à l'apoptose *in vivo*. Paradoxalement, elles meurent rapidement lorsqu'elles sont cultivées seules *in vitro*^{462, 463}. Rapidement, l'hypothèse selon laquelle cette mort *in vitro* ne serait pas due à des caractéristiques intrinsèques des cellules leucémiques mais à une perte des signaux pro-survie délivrés par les cellules du microenvironnement tumoral a été formulée⁴⁶⁴. Ainsi, dès 1989, Lagneaux et son équipe ont montré que les cellules stromales de moelle osseuse sont capables d'empêcher l'apoptose des cellules leucémiques *in vitro*³⁹. Ce mécanisme, contact dépendant, est spécifique des cellules leucémiques, la mort des lymphocytes B normaux n'étant pas inhibée par ces cellules stromales. Depuis, d'autres publications ont décrit que cette apoptose *in vitro* pouvait être inhibée par des fibroblastes surexprimant CD31 et/ou CD40L (CD40 ligand)³⁴⁸, des cellules endothéliales³⁴⁸, des lignées de cellules dendritiques³⁴⁴ ou par les NLC (Figure 43)⁴¹.

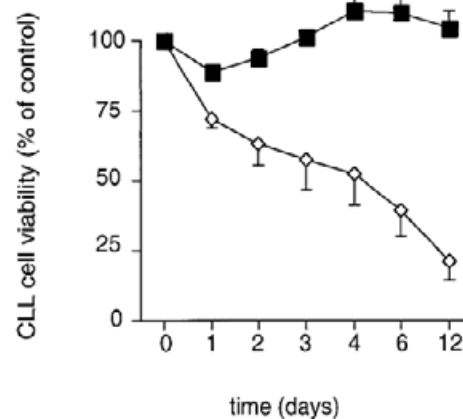


Figure 43: Les NLC protègent les cellules leucémiques de l'apoptose *in vitro* (courbe noire: co-culture de NLC et de cellules leucémiques, courbe blanche: cellules leucémiques cultivées seules) (extrait de⁴¹).

Les NLC furent caractérisées *in vitro* en 2000 par l'équipe de Burger. Morphologiquement, ce sont soit des cellules larges, rondes et adhérentes ou soit des cellules ressemblant à des fibroblastes, toutes de caryotype normal (Figure 44). Le nom de « nurse-like » provient de la similarité que ces cellules partagent avec les « nurses cells » présentes dans

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

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



Figure 44: Morphologie des NLC (extrait de ⁴¹).

III.C.1 Profil d'expression génique et phénotype

Phénotypiquement, les NLC présentent tous les marqueurs caractéristiques des TAM. Elles sont CD14 positives et expriment ainsi fortement le CD68, le CD163 et le CD206 ^{41, 465-467}. Tout comme les TAM, elles présentent un faible niveau d'expression des molécules de CMH de classe II telles que HLA-DRA et CD74 suggérant un défaut de leurs capacités de présentation de l'Ag ⁴⁶⁸. On retrouve aussi une forte transcription du gène *FCGR2B* (Fc fragment of IgG, low affinity Iib, receptor) ce qui indique que les NLC ont un défaut de leur capacité d'opsonisation ⁴⁶⁸. De plus, elles présentent de faibles niveaux de transcription de gènes typiques de M1 tels que *LYZ* codant pour le lysozyme, impliqué dans la dégradation des bactéries gram positives ⁴⁶⁸. De plus, le lénalidomide, agent immunomodulateur, est capable de transformer les NLC en M1, en restaurant leurs capacités de CPA, de phagocytose, et leur production cytokinique pro-inflammatoire ⁴⁶⁹.

Les NLC présentent aussi d'autres points communs avec les TAM comme l'expression de l'IDO ⁴⁷⁰. Cette enzyme, impliquée dans le métabolisme du tryptophane, est connue pour moduler l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Les NLC ont aussi un chémokinome de M2/TAM avec une forte production de TGF- β , d'IL-10 de CCL17 et de CCL22 ^{465, 470}. Tout comme les TAM, elles peuvent produire du VEGF ⁴⁷¹.

Enfin, la meilleure preuve que les NLC sont les TAM de la LLC est sans doute l'étude transcriptomique réalisée par L. Ysebaert. Lors de cette étude, l'analyse par PCA (principal

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

component analysis) comparant des monocytes, des M1, des M2, des TAM et des NLC a en effet révélé que les NLC avaient un profil transcriptomique de TAM like ⁴⁶⁵ (Figure 45).

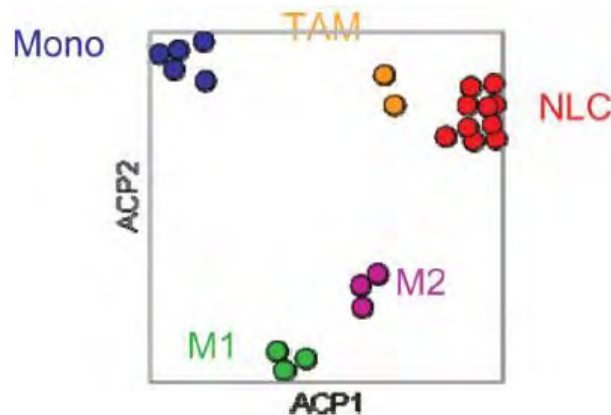


Figure 45: Les NLC ont un profil transcriptomique de TAM like (extrait de ⁴⁶⁵).

III.C.2 Origine et différenciation

Les NLC proviennent de la différenciation des cellules CD14⁺ du sang périphérique, en contact avec des cellules leucémiques ^{466, 472}. Cliniquement, on retrouve une corrélation entre la monocytémie chez le patient et la différenciation des cellules CD14⁺ en NLC *in vitro* ⁴⁷¹. De plus, la différenciation des monocytes en NLC est indépendante de la plupart des paramètres clinico-biologiques de la LLC mis à part la β 2m ⁴⁷¹. Une autre publication indiquait que les monocytes provenant de patients IgHV non mutés se différencieraient moins en NLC *in vitro*, mais cette étude n'a pas pris en compte la monocytémie, qui pourrait expliquer ces différences ⁴⁷³. Si les premières études montraient que les NLC étaient différenciées après quinze jours de culture avec les cellules leucémiques ^{41, 466, 472}, il semble aujourd'hui que la différenciation des monocytes en NLC *in vitro* se fasse en huit jours ⁴⁷¹.

Le profil transcriptomique des monocytes de patients LLC étant différent de celui de monocytes de donneurs sains, notamment au niveau de leurs capacités phagocytiques et pro-inflammatoires ⁴⁷⁴, l'hypothèse selon laquelle les NLC ne proviendraient pas d'une différenciation active mais d'une prédisposition des monocytes de patients a été posée. En mettant en contact *in vitro* des monocytes de donneurs sains avec des cellules leucémiques de patients, Bhattacharya a montré que ces monocytes « sains » étaient capables de se différencier en NLC dites hétérologues. Ces NLC hétérologues ont un profil transcriptomique très proche des NLC différenciées à partir de monocytes de patients avec une faible expression de HLA-DR, de lysozyme et une forte expression de FCGR2B ⁴⁶⁸. De plus, ces NLC hétérologues sont

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

aussi capables d'inhiber l'apoptose des cellules leucémiques *in vitro* ⁴⁷⁵. L'ensemble de ces résultats prouvent que la différenciation des monocytes en NLC est bien un phénomène actif et non pas une prédisposition des monocytes de patients.

Les mécanismes de différenciation sont quant à eux peu clairs mais deux mécanismes sont d'ores et déjà décrits. Le premier implique l'enzyme NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) mais pas par son activité enzymatique. Cette enzyme est présente dans le surnageant de lymphocytes activés et est en fait une adipokine présentant des effets insuline like ^{476, 477}. Elle est retrouvée en concentration plus importante dans le plasma de patients que dans celui des donneurs sains. Le NAMPT extracellulaire sécrété par les cellules leucémiques, active les cellules leucémiques qui produisent, suite à ce stimulus du CCL3 capable d'attirer les monocytes et de provoquer leur différenciation en cellules CD163⁺ et CD206⁺. De plus, le NAMPT agit directement sur les monocytes par un mécanisme inconnu. Enfin, le NAMPT induit une production de cytokines anti-inflammatoires par les NLC telles que l'IL-6, l'IL-10 et CCL-3, ce qui indique que cette enzyme participe au maintien du phénotype M2 des TAM ⁴⁶⁷.

Le second mécanisme de différenciation des NLC est dépendant de sHMGB1 (soluble high mobility group box 1). HMGB1, une alarmine, est une protéine nucléaire très conservée, qui peut être sécrétée par les cellules de l'immunité innée ou relarguée passivement par les cellules lors d'une mort nécrotique ^{478, 479}. sHMGB1, tout comme NAMPT, est présente en plus forte quantité dans le sérum des patients que dans celui des donneurs sains. Le mécanisme d'action indique qu'au début de la culture *in vitro*, la mort de certaines cellules leucémiques induit un relargage de sHMGB1. Cette molécule se lie alors à ses récepteurs TLR9 et RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) sur les monocytes et induit la différenciation en NLC *via* une activation de phospho STAT-3 et de NF-KB dans la cellule leucémique.

Aujourd'hui, tous les mécanismes de différenciation décrits pour la différenciation des monocytes en NLC impliquent des facteurs solubles, or il a été prouvé que cette différenciation est contact-dépendante ⁴⁶⁶. D'autres études sont donc nécessaires pour mettre en évidence les mécanismes par lesquels le contact permet la différenciation des NLC.

III.C.2.1 L'impact pronostique des monocytes dans la leucémie lymphoïde chronique

Dans la LLC, en dichotomisant les patients suivant leur taux de monocytes, au moment du diagnostic, supérieur ou inférieur à $0,91 \times 10^9$ cellules/L, Mazumdar *et al* ont montré que les patients présentant un taux élevé de monocytes ont une survie globale et une durée avant traitement diminuées⁴⁸⁰ (Figure 46). Cette forte monocytémie est associée avec les facteurs pronostiques tels que la délétion 11q22-23 et 17p13, l'hypermutation somatique d'IgHV et des stades de Binet B et C. Enfin ce taux, s'il est élevé après chimiothérapie, est lui aussi associé à une diminution de la survie globale. Il est, de plus, considéré comme un facteur pronostique indépendant dans la LLC. L'influence du taux de monocytes sur la survie globale a aussi été rapportée par Herishanu *et al* en séparant dans sa cohorte les patients en trois groupes selon leur taux de monocytes, le groupe avec le taux le plus élevé ($>750/\mu\text{L}$) étant celui avec le plus mauvais pronostic⁴⁸¹. Il est cependant intéressant de noter que le groupe des patients avec le taux de monocytes le plus faible ($<250/\mu\text{L}$) a un plus mauvais pronostic que celui avec un taux intermédiaire. Cette différence inattendue pourrait être expliquée par le fait que ces patients présentent plus d'infections que les autres groupes⁴⁸¹.

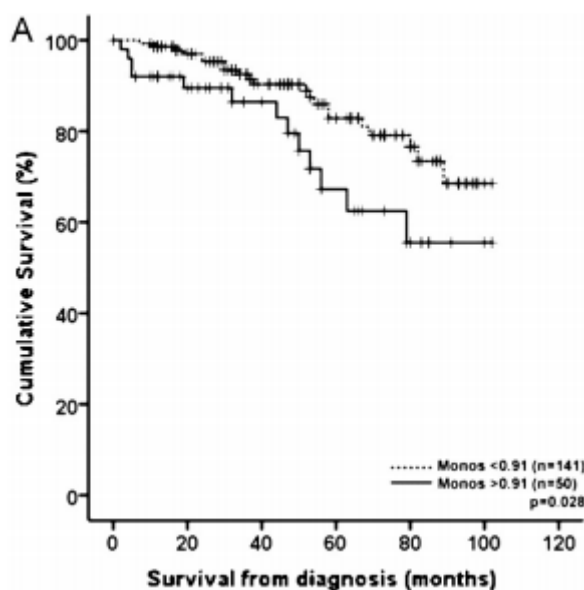


Figure 46: Courbes de survie globale en fonction du taux de monocytes sanguins (extrait de⁴⁸⁰).

III.C.3 Fonctions

III.C.3.1 Attraction des cellules leucémiques

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

La première décrite fut CXCL12, une chémokine qui est normalement produite par les cellules stromales dans la moelle, plus précisément au site de la différenciation B précoce où elle permet leur survie et empêche leur sortie précoce^{331, 482, 483}. Dans la LLC, CXCL12 est notamment produite par les NLC et les cellules stromales^{41, 332}. CXCL12 est ainsi relargué dans le milieu intercellulaire selon un gradient qui attire ainsi les cellules leucémiques *via* leur récepteur, le CXCR4. Une fois en contact avec les NLC, ces cellules diminuent leur expression de CXCR4 afin de rester en contact avec les NLC⁴³. Il est intéressant de noter que les cellules leucémiques ZAP-70⁺ migrent plus en réponse à CXCL12 que les cellules ZAP-70⁻ malgré un même taux d'expression de CXCR4⁴⁸⁴. On retrouve ainsi dans les cellules leucémiques une activation plus longue de la voie de signalisation d'ERK en réponse au CXCL12 chez les cellules ZAP-70⁺⁴⁸⁵. Enfin, lors de la chémoattraction des cellules leucémiques *via* CXCL12, et une fois celles-ci en contact avec les NLC, on observe sur les clones leucémiques une diminution de la S1PR1 (sphingosine-1-phosphate receptor 1) et une diminution de leur migration induite par S1P (sphingosine-1-phosphate)⁴⁸⁶. La S1P est un sphingolipide bioactif, contrôlant la sortie ganglionnaire des lymphocytes^{487, 488}. La diminution de son récepteur à la surface des cellules leucémiques permet à ces dernières de rester en contact avec les NLC afin de recevoir leurs signaux pro-survie⁴⁸⁶.

Le même type de mécanisme existe avec d'autres chémokines telles que CXCL13, exprimées par les NLC, qui attirent les cellules leucémiques *via* son récepteur CXCR5⁴⁸⁹. Là encore, il s'agit d'un détournement d'un phénomène normal, car cette chémokine permet normalement le recrutement des lymphocytes B dans les follicules^{490, 491}.

Enfin, le couple CX3CR1 et son ligand CX3CL1 est impliqué dans un double chémoattractisme⁴⁹² car ces molécules sont exprimées à la fois par les NLC et les cellules leucémiques. Ainsi, les cellules leucémiques migrent encore une fois selon le gradient de CX3CL1 afin d'atteindre les NLC. De plus, la fixation de son ligand sur CX3CR1 sur le clone malin induit une surexpression de CXCR4 favorisant encore ce chémoattractisme⁴⁹².

III.C.3.2 Protection contre l'apoptose des cellules leucémiques *in vitro*

Les NLC protègent les cellules leucémiques de l'apoptose *in vitro*, c'est même ainsi qu'elles furent caractérisées⁴¹. Cette protection complexe passe à la fois par des facteurs solubles et des interactions contact-dépendantes.

III.C.3.2.1 Protection *via* les facteurs solubles

Concernant les facteurs solubles il est possible de différencier les cytokines des autres facteurs solubles. La première cytokine décrite produite par les NLC protégeant les cellules leucémiques est CXCL12. On observe, suite à la fixation de CXCL12 sur CXCR4, une activation des voies de signalisation d'Akt et ERK au sein de la cellule leucémique. L'ajout de CXCL12 dans une culture de cellules leucémiques augmente leur survie, ce mécanisme ne passant pas par une augmentation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1^{41, 472}. On peut aussi noter que CXCL13 et CX3CL1, les deux autres cytokines impliquées dans le chémotactisme des cellules leucémiques n'ont, quant à elles, aucun effet sur la survie de ces cellules^{489, 492}.

Les NLC, tout comme les cellules leucémiques, sont capables de produire de l'HGF (hepatocyte growth factor) lorsque les deux types cellulaires sont en co-culture. L'HGF ainsi produit a un rôle dual ; il permet de maintenir le phénotype M2 des NLC et favorise la survie des B leucémiques car les deux types cellulaires expriment aussi c-Met, le récepteur de l'HGF. Le clone leucémique favorise ainsi les NLC qui les protègent en retour⁴⁷⁰.

III.C.3.2.2 Protection *via* des interactions contact-dépendantes

Concernant les mécanismes contact-dépendants, leur influence sur la survie des cellules leucémiques est plus incertaine. Les NLC, comme les cellules leucémiques, expriment BAFF (B-cell activating factor) et APRIL (A proliferation-inducing ligand) deux molécules de la famille du TNF, impliquées dans la survie des lymphocytes B⁴⁹³. La fixation de ces molécules sur leurs récepteurs induit dans la cellule tumorale une surexpression de Mcl-1 *via* une activation de la voie canonique de NF-KB et non *via* les voies ERK et Akt. Malheureusement, l'expérience consistant à bloquer directement BAFF et APRIL sur les NLC afin de démontrer

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

que ces molécules favoriseraient la survie des cellules leucémiques n'a pas été réalisée, ce qui laisse un doute sur leur rôle pro-survie. De plus, l'expression de BAFF et APRIL semble dépendante de l'ancrage des NLC à la MEC. Ainsi, lorsque que l'on diminue l'expression de la galectine 1, une lectine liant le β galactoside, on inhibe l'expression de BAFF et APRIL ⁴⁹⁴. On peut noter qu'il existe un effet additif entre BAFF, APRIL et CXCL12 sur la survie des cellules leucémiques mais que l'ensemble de ces facteurs ne suffit pas à expliquer la totalité de l'effet pro-survie des NLC ⁴⁷² (Figure 47).

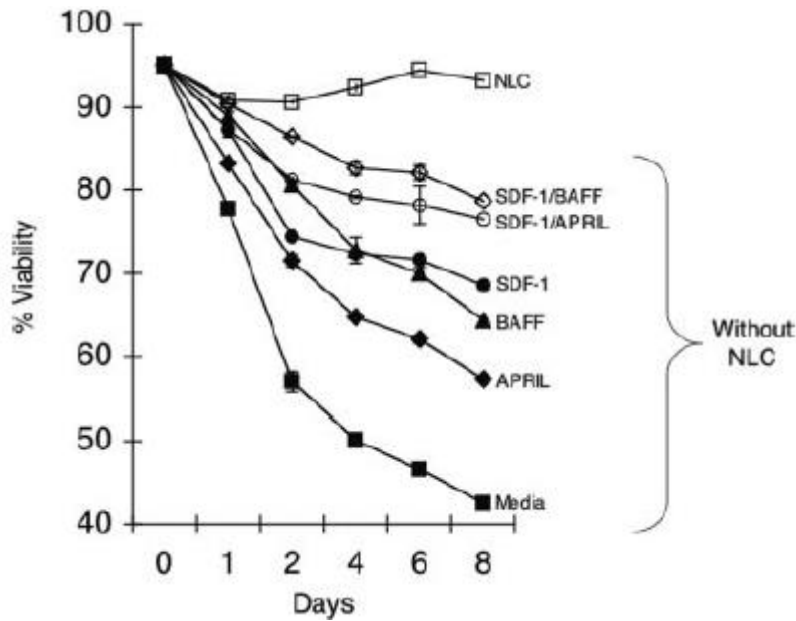


Figure 47: BAFF, APRIL et CXCL12 sont moins efficaces que les NLC pour protéger les cellules leucémiques de l'apoptose (extrait de ⁴⁷²).

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

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

les NLC⁴⁹⁵. Néanmoins, CCL3 et CCL4 étant des chémoattractants pour les lymphocytes^{496, 497}, on peut tout à fait imaginer que les cellules leucémiques en contact avec les NLC secrèteraient ces facteurs solubles ce qui permettrait une attraction supplémentaire des cellules leucémiques vers les NLC et favoriserait leur survie par un autre mécanisme.

Les NLC expriment aussi CD31⁴⁹⁸. En interagissant avec son récepteur CD38 présent sur les cellules leucémiques, il délivrerait ainsi un signal de survie aux cellules leucémiques^{120, 498}. Actuellement, le rôle du couple CD31/CD38 pour inhiber l'apoptose des cellules leucémiques fait encore débat, certaines publications ayant montré que ce couple n'avait aucune influence⁴⁹⁹. La rencontre de CD31 et de CD38 provoque aussi au sein de la cellule leucémique une surexpression de CD100 et une sous-expression de CD72, deux ligands de Plexin-B1, respectivement de forte et de faible affinité. L'interaction forte de Plexin-B1 et de CD100, délivrerait ainsi un signal pro-survie aux cellules leucémiques^{345, 498}.

III.C.3.3 Favorisation de l'immunoéchappement

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

Via la production de cytokines telles que l'IL-10 ou le TGF- β , on observe que le surnageant provenant de la co-culture NLC/ cellules leucémiques de patients Binet stade A, provoque l'expansion des lymphocytes Treg. L'ensemble Treg et facteurs solubles de co-culture inhibe ainsi l'expansion des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺⁴⁶⁵. De manière similaire, une expansion des Treg a été observée chez tous les patients indépendamment du stade de Binet avec une implication supposée des facteurs solubles. Les NLC *via* la production et l'expression d'IDO et d'IL-10 ont en elles-même une activité immunosuppressive capable de moduler la prolifération et l'activation des lymphocytes T⁵⁰⁰. De plus, les lymphocytes T en contact avec des NLC expriment de plus forts taux de PD-1, molécule délivrant des signaux inhibiteurs aux cellules T, lorsque cette co-culture est faite avec du NAMPT⁴⁶⁷. Ce résultat nous montre que les cellules leucémiques en favorisant les cellules pro-tumorales, favorisent en même temps leur survie de manière indirecte en inhibant les lymphocytes T qui sont inactivés par les NLC.

De manière paradoxale, les NLC attirent et activent aussi des lymphocytes T CD4⁺ *via* CXCL12. Cependant, lorsque les cellules leucémiques sont en contact avec ces lymphocytes T

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

CD4⁺, on observe une augmentation de leur prolifération *in vitro* indiquant que dans ce cas les lymphocytes T CD4⁺ ont un effet pro-tumoral ⁵⁰¹.

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

III.C.3.4 Rôle dans la pathogénèse et dans l'évolution de la leucémie lymphoïde chronique

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

Le modèle appelé E μ TCL1 repose sur la surexpression de TCL1 dans la lignée B en le plaçant sous la dépendance de la région régulatrice « enhancer » des Ig (E μ). Régulateur de la voie PI3K/Akt, chez l'Homme, la surexpression de TCL1 dans les cellules leucémiques est associée au statut IgHV muté et ZAP-70⁺ ⁵⁰². Les souris E μ TCL1 montrent une accumulation progressive de lymphocytes B CD5⁺ IgM⁺ avec un BCR stéréotypique et réactif contre des auto-Ag et des Ag microbiens ⁵⁰³. Cliniquement, on observe une infiltration de ces cellules au niveau du péritoine, de la rate puis de la moelle osseuse pour aboutir à une maladie symptomatique et agressive avec adénopathies et hépato/splénomégalie vers 20 mois ⁵⁰³.

Afin de confirmer le rôle des macrophages dans la LLC, les souris E μ TCL1 furent croisées avec des souris MIF^{-/-} (macrophage migration inhibitor factor). MIF est une cytokine pro-inflammatoire principalement sécrétée par les macrophages suite à divers stimuli ⁵⁰⁴. Elle permet notamment une activation des lymphocytes B et le recrutement des cellules myéloïdes pour maintenir les B matures au sein de la moelle osseuse ^{505, 506}. Chez les souris E μ TCL1^{+/wt} MIF^{-/-}, on observe une augmentation de la survie globale avec une diminution de l'hépatosplénomégalie sans modification de la lymphocytose. Au sein de la rate, on observe une

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

diminution des cellules CD68⁺ décrites comme TAM dans cette publication ⁵⁰⁷. Cette diminution semble être due à une diminution du potentiel migratoire des macrophages, notamment *via* CCL4 connu pour être produit par les cellules leucémiques ⁵⁰⁷.

Les souris E μ TCL1 furent aussi croisées avec des souris RhoH^{-/-}. RhoH est un membre de la famille des GTPases spécifique de la lignée hématopoïétique et est impliqué dans les hémopathies malignes B ⁵⁰⁸⁻⁵¹¹. Chez les souris E μ TCL1^{Tg} RhoH^{-/-}, les cellules leucémiques migrent moins bien suite aux stimuli délivrés par CXCL12 et CXCL13 et il s'établit un mauvais contact de ces cellules avec les NLC de souris CD68⁺. Cliniquement, on observe une diminution de l'infiltration médullaire, une diminution de la lymphocytose et une diminution de la splénomégalie, associées à une meilleure survie des souris ⁵¹².

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

III.C.4 Localisation tissulaire chez le patient

Longtemps observées seulement *in vitro*, les NLC commencent à être bien caractérisées *in vivo* chez le patient atteint de LLC. En 2011, une coupe histologique de ganglion lymphatique de patient montre qu'il existe dans ce tissu une population cellulaire CD163⁺ au sein et autour des pseudo-follicules ⁴⁶⁵ (Figure 48), résultat confirmé plus tard dans une autre étude ⁴⁶⁷. Depuis, de nombreuses études ont montré qu'il existait au sein des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse des cellules présentant tous les marqueurs caractéristiques des NLC obtenues *in vitro* ^{470 427}. Ainsi, il existe dans ces deux tissus des cellules CD68⁺ et indoleamine 2-3 dioxygénase (IDO) positives ^{470, 513}, tout comme les NLC ⁴⁷⁰.

Néanmoins, aucun de ces marqueurs, lorsqu'il est utilisé seul, n'est spécifique des NLC. De nouvelles études sur des coupes histologiques avec des co-marquages CD68 et CD163 semblent nécessaires afin de prouver que ces cellules observées *in vivo* correspondent bien aux NLC obtenues *in vitro*.

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

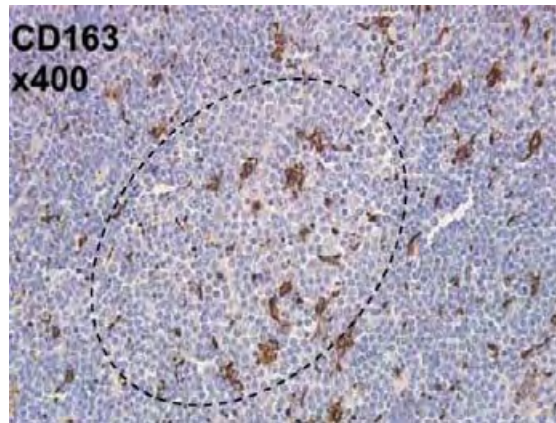


Figure 48: Cellules CD163⁺ (marron) au sein d'un ganglion de patient (la zone entourée correspond au pseudo-follicule) (extrait de ⁴⁶⁵).

III.C.5 Impact pronostique

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

La première publication concerne CCL3 ⁵¹⁴. Dans la LLC, la production de CCL3 est augmentée lorsque les cellules leucémiques sont co-cultivées avec des NLC ou lorsqu'elles sont activées comme nous l'avons vu précédemment ⁵¹⁵⁻⁵¹⁷. La concentration plasmatique de CCL3 est augmentée chez les patients comparés aux donneurs sains ^{515, 518}. De plus, en séparant les patients en deux groupes, l'un pour une concentration sérique de CCL3 inférieure à 10 pg/mL et l'autre supérieure à ce taux, Burger et son équipe ont montré que les patients avec un taux élevé de CCL3 étaient de plus mauvais pronostic. En effet, cette forte concentration est associée à une maladie avancée, les patients présentant des stades de Rai élevés, des statuts IgHV non mutés, une positivité du CD38 et de ZAP-70, de fortes concentrations de β 2m et des caryotypes avec des délétions 11q22-23 et 17p13. Enfin, ils ont montré que ce fort taux est corrélé à une durée avant traitement réduite ⁵¹⁴. Nous avons donc ici une preuve indirecte de l'impact des NLC sur la durée avant traitement, une forte infiltration par les NLC induisant la production de forts taux de CCL3.

La seconde publication concerne sHMGB1 ⁵¹³. Ce facteur qui permet la différenciation des monocytes en NLC est augmenté chez les patients Binet stades B et C, ce qui pourrait indiquer qu'il y a plus de NLC aux stades tardifs de la maladie. Des études sur des « micro-arrays » de ganglions lymphatiques de patients ont montré qu'une forte infiltration (supérieure à 10 %) est

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

associée à une survie globale des patients plus courte. Néanmoins, deux critiques majeures peuvent être émises à propos de ces résultats. Tout d'abord, en effectuant un simple marquage CD68⁺ sur ces coupes, les auteurs ont probablement surestimé le nombre de NLC, car comme nous l'avons vu précédemment, il existe des cellules CD68⁺ non myéloïdes³⁸⁷. Ensuite, cette étude a été réalisée sur des « micro-arrays » et peuvent ne pas être totalement représentatifs de l'ensemble du ganglion.

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

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

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

III.C.6.1 Effets sur les thérapies classiques

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

La première montre que les NLC ne protègent pas les cellules leucémiques de la fludarabine⁵¹⁹. Ces expériences montrent que la fludarabine à 50 µM tue les cellules CD14⁺ précurseurs de NLC. De même, lorsque l'on traite des NLC par la même drogue à la même concentration, on induit leur mort. Enfin, lors de la co-culture de NLC et de cellules leucémiques, on observe le même niveau d'apoptose de cellules leucémiques que dans la condition où ces dernières sont cultivées seules, indiquant que les NLC ne peuvent protéger les cellules leucémiques de la fludarabine⁵¹⁹. La seule critique que l'on peut faire à cette étude est qu'elle fut réalisée sur un très faible nombre de patients.

La seconde concerne l'effet des NLC sur un traitement à la dexaméthasone et au chlorambucil (Chloraminophène ®)⁵²⁰. La dexaméthasone est un corticoïde utilisé notamment dans le traitement des patients avec de fortes atteintes ganglionnaires ou lors de complications auto-immunes. Le chlorambucil quant à lui est une moutarde à l'azote, utilisé chez le patient très âgé

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

ou en rechute après plusieurs lignes. Ces deux thérapies ont une efficacité modeste mais significative dans la LLC. Filip *et al* ont observé que ces deux thérapies n'ont que peu d'effets sur la survie des NLC ⁵²⁰. De plus, les NLC permettent de protéger partiellement les cellules leucémiques contre ces drogues, notamment *via* CXCL12 ⁵²⁰.

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

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

L'ibrutinib perturbe les interactions du clone leucémique avec son microenvironnement ⁵²¹. Les cellules leucémiques sont ainsi moins sensibles aux stimuli délivrés par CXCL12 et CXCL13 et leurs capacités d'adhésion sont elles aussi diminuées ¹³⁹. De même, la survie de ces cellules induite par BAFF est diminuée, à des doses très élevées et non pertinentes cliniquement ¹³⁷. Enfin, en bloquant la signalisation du BCR, l'ibrutinib permet d'induire l'apoptose de cellules leucémiques, malgré le contact avec les NLC ¹³⁸. Néanmoins, aucune étude n'a observé si lors du traitement par ibrutinib, les NLC pouvaient conférer un avantage de survie, même minime, aux cellules leucémiques en co-culture avec des NLC, par rapport aux cellules leucémiques cultivées seules.

L'idélalisib perturbe lui aussi les interactions entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement ⁵²¹. Il induit lui aussi un défaut de migration des cellules leucémiques *via* CXCL12 et CXCL13 et une diminution de la production de CCL3 et CCL4 par ces mêmes cellules grâce à un blocage de la signalisation dépendante du BCR ⁵²². Enfin, concernant les NLC, le traitement par l'idélalisib induit une apoptose des cellules leucémiques, mais là encore aucune étude n'a été menée pour établir si les NLC confèreraient ou non un avantage de survie aux cellules leucémiques lors de ce traitement.

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

Au vu de leur importance dans la survie des cellules leucémiques, plusieurs molécules ont été utilisées afin de cibler les NLC.

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

La première consiste à promouvoir la différenciation des monocytes en M1 anti-tumoraux plutôt qu'en NLC, grâce au légalidomide, qui permet notamment de restaurer les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T dans la LLC^{303,304,523}. Ainsi, *in vitro*, cette drogue permet non seulement d'augmenter l'adhésion des cellules CD14⁺ lors de co-culture avec des cellules leucémiques mais aussi de diminuer la migration de ces monocytes suite à des stimuli cytokiniques tels que CCL2 et CLL3. Le profil transcriptomique de ces NLC traitées par légalidomide montre une activation des gènes codant pour des protéines impliquées dans les réponses immunitaires, l'activation et la prolifération des cellules T et les mécanismes de présentation de l'Ag. Phénotypiquement, ces cellules ont un phénotype de M1 avec une plus forte expression de marqueurs spécifiques tels que MAC-1 (Macrophage-1 antigen) et CD11b et une plus faible expression de marqueurs de M2 tels que le CD163. Les capacités de ces cellules traitées sont aussi modifiées. On observe que ces cellules sont de nouveau capables de stimuler la prolifération T indiquant que leurs capacités de CPA sont restaurées. De plus, leurs capacités phagocytiques sont elles aussi augmentées. Enfin leur profil cytokinique est proche de celui des M1, avec une forte expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 et s'éloigne de celui des M2 avec une diminution de la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10⁴⁶⁹. L'ensemble de ces résultats indique que les monocytes de LLC peuvent, lors du traitement par du légalidomide, devenir des M1.

L'autre stratégie vise le récepteur CXCR4 qui se lie à CXCL12, la chémokine produite par les NLC qui est impliquée dans la migration et la survie des cellules leucémiques⁴¹. Ainsi les deux antagonistes de CXCR4, l'AMD3100 et le T41 qui sont de petits peptides, diminuent la migration des cellules leucémiques induite par CXCL12⁵²⁴. Parallèlement, on observe une diminution de l'activation des voies de signalisation dépendantes de Erk au sein de ces cellules conduisant à un antagonisme des effets pro-survie des cellules du microenvironnement telles que les NLC *via* une diminution de l'expression de Mcl-1 et de FLIP, deux protéines anti-apoptotiques^{524, 525}. L'ensemble de ces travaux indiquent clairement qu'en inhibant la migration et les effets pro-survie de CXCL12, les antagonistes de CXCR4 permettent de combattre les effets pro-survie des NLC. L'AMD3100 ou PERIXAFOR® est actuellement en essai clinique de phases I et II notamment dans le traitement de la LLC en rechute en association au rituximab (NCT00694590), en association avec le légalidomide (NCT01373229), ou dans la mobilisation des cellules souches en pré-greffe de moelle osseuse (NCT01076270, NCT01408043, NCT01097057, NCT01610999, NCT00241358, NCT01068301). Les résultats

INTRODUCTION

Les « nurses-like cells »

des études de phase II nous permettront de connaître l'efficacité de cette molécule et donc son intérêt futur dans le traitement de la LLC.

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

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

Cette question, volontairement provocatrice, s'appuie sur deux publications. Dans la première, Bhattacharya et son équipe ont montré qu'il existait au sein des ganglions de donneurs sains des cellules CD14⁺, CD68⁺ tout comme les NLC chez le patient⁴⁷⁵. De même, leur étude montre qu'*in vitro*, les cellules CD14⁺ de donneurs sains en contact avec des lymphocytes B normaux peuvent se différencier en cellules NLC « like » exprimant BAFF, APRIL et CD31. Ces cellules sont capables de promouvoir la survie des lymphocytes B, tout comme les NLC promeuvent la survie des cellules leucémiques⁴⁷⁵. Les NLC ne seraient en fait que des macrophages similaires à ceux observés chez les donneurs sains et donc absolument non spécifiques de la LLC. Néanmoins, dans une deuxième publication cette année-là, ces mêmes auteurs ont montré que les NLC diffèrent de ces NLC « like » notamment *via* une diminution de l'expression des molécules de CMH de classe II telles que HLA-DR et CD74, une diminution de la production de lysozyme et une augmentation de l'expression de FCGR2B⁵²⁶. Au niveau transcriptomique, les NLC sous-expriment différentes voies de signalisation par rapport aux NLC « like » notamment celle de la présentation de l'Ag, de la dégradation des bactéries gram+ et celle de la captation des particules opsonisées⁵²⁶. Ces voies de signalisation étant typiques des M1, on peut raisonnablement penser que les NLC sont des M2 tandis que les « NLC like » sont plus des M1.

OBJECTIFS DE LA THESE

Malgré les avancées thérapeutiques de la dernière décennie, la LLC reste toujours une maladie incurable. Si le caryotype ou les mutations récurrentes des cellules leucémiques ont des impacts pronostiques bien définis dans la maladie et permettent une prise en charge personnalisée des patients, l'influence du microenvironnement tumoral de la LLC, notamment des TAM, reste encore peu étudiée que ce soit dans la rechute ou dans l'impact pronostique. Les NLC, qui semblent être les TAM de la LLC, ont un impact pronostique incertain et les mécanismes par lesquels elles promeuvent la survie des cellules leucémiques, potentielles cibles de nouveaux traitements, ne sont pas tous décrits. Ma thèse fut donc divisée en deux grands axes. Le premier était de définir si les NLC sont effectivement les TAM de la LLC, quels étaient leur impact pronostique dans cette pathologie et quel était leur influence sur la chimiorésistance ? Le second, découlant des réponses du premier, fut de savoir si le ciblage des NLC pouvait potentiellement conduire à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques dans la LLC.

Premièrement, nous avons voulu confirmer que les NLC étaient bel et bien spécifiques de la LLC et pouvaient être définies comme les TAM de la LLC. Dans cet objectif, nous avons recherché d'éventuelles différences entre les NLC et les NLC « saines » lorsque les conditions de culture miment le ratio monocytes/ cellules leucémiques chez le patient. Nous avons pour cela comparé leur morphologie, leur phénotype, et leur capacité à induire la survie des cellules leucémiques ou des lymphocytes B.

Dans un second temps, vu l'impact pronostique des TAM et du lien entre TAM et NLC, nous avons émis l'hypothèse que les NLC pouvaient, elles aussi, prédire l'évolution de la LLC. Dans cette étude nous avons deux objectifs. i) Définir s'il existait un lien entre les NLC et la progression de la LLC. ii) Rechercher d'éventuel(s) marqueur(s) sérique(s) relargué(s) par les NLC pouvant faire office de marqueur(s) pronostique(s) simple(s) d'accès, potentiellement réalisable en routine hospitalière, reflétant les NLC et leurs effets sur l'agressivité de la LLC

Les TAM pouvant aussi favoriser la résistance aux traitements, nous avons voulu connaître le potentiel effet chimioprotecteur des NLC sur les cellules leucémiques notamment vis-à-vis de l'ibrutinib, une thérapie innovante dans la LLC. En effet, avec ce traitement on observe de multiples résistances chez les patients dont la plupart ne sont pas expliquées à ce jour. Nous avons donc émis l'hypothèse que les NLC pourraient être impliquées dans cet

échappement. Afin de le démontrer, nous avons étudié si, le traitement par ibrutinib, chez le patient, induisait une modification de la localisation, de l'apparition, du phénotype et des capacités pro-survie des NLC. Puis, nous nous sommes intéressés aux potentiels effets chimioprotecteurs des NLC sur les cellules leucémiques, lorsque celles-ci sont traitées *in vitro* par les agents classiquement utilisés dans le traitement de la LLC.

Enfin, après avoir démontré que les NLC avaient un impact pronostique certain et un rôle chimioprotecteur, nous avons cherché de nouvelles cibles thérapeutiques dans la LLC en ciblant les interactions entre cellules leucémiques et NLC. Notre hypothèse de travail était que si l'on perturbait ces interactions nous pourrions également perturber les effets pro-survie des NLC sur les cellules leucémiques, ceci en étudiant l'influence du contact entre NLC et cellules leucémiques sur la survie de ces dernières *in vitro*. La méthode était de déterminer les partenaires moléculaires impliqués dans ces interactions grâce à un criblage transcriptomique puis d'étudier leurs impacts sur la survie des cellules leucémiques.

RESULTATS

I. Les « nurse-like » cells : les macrophages associés aux tumeurs dans la leucémie lymphoïde chronique

En 2011, deux publications de Bhattacharya et son équipe ont décrit des cellules semblables aux NLC, au sein du ganglion de donneurs sains^{475,526}. Ces cellules, appelées NLC « saines » expriment aussi des marqueurs de NLC et favorisent la survie des lymphocytes B tout comme les NLC favorisent la survie des cellules leucémiques. Néanmoins, ces travaux peuvent être critiqués: i) les méthodes de culture *in vitro* ne sont pas pertinentes de ce que l'on observe chez le patient. En effet, les auteurs ont utilisé un ratio de deux cellules B (leucémiques ou non) pour un monocyte ce qui n'est jamais observé chez le patient. ii) Les auteurs n'ont pas étudié si les NLC pouvaient ou non promouvoir la survie des lymphocytes B normaux et inversement si les NLC « saines » favorisaient la survie des cellules leucémiques.

Nous avons donc décidé d'effectuer une étude déterminant si, à un ratio entre cellules B (leucémiques ou non) et monocytes identiques à celui observé chez le patient, les NLC et les NLC « saines » différaient au niveau morphologique, phénotypique et de leurs capacités pro-survie sur les cellules leucémiques ou sur les lymphocytes B.

Cette étude a fait l'objet d'une publication en 2015 dans *Leukemia and Lymphoma* et fût présentée en 2013 l'IwCLL (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukaemia) à Cologne.

Nurse like cells: chronic lymphocytic leukemia associated macrophages

Frédéric Boissard^{1,2,3}, Jean-Jacques Fournié^{1,2,3}, Camille Laurent^{2,4,5}, Mary Poupot^{1,2,3} & Loïc Ysebaert^{1,2,3,4}

¹INSERM UMR1037 – Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France, ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France, ³ERL 5294 CNRS, BP3028, Hospital Purpan, Toulouse, France, ⁴Department of Hematology, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse Purpan, Toulouse, France and ⁵INSERM UMR1043 – Center of Physiopathology of Toulouse Purpan, Toulouse, France

Abstract

CD14 + cells are able to differentiate into large and adherent cells if in contact with chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells or healthy B lymphocytes. In CLL these cells, called CLL-nurse like cells (NLCs), express a very high amount of CD163 and CD68 and are able to rescue CLL cells through CCL4 production. Adherent cells derived from healthy donors, called HD-NLCs, express very little CD163 and CD68, do not produce CCL4 and are unable to rescue CLL cells. This study reveals that CLL-NLCs are the specific nurse cells in CLL, protecting CLL cells from death.

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia, tumor-associated macrophages, nurse like cells, CD163

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the accumulation of CD5 + B cells resistant to apoptosis *in vivo* in blood, secondary lymphoid organs and bone marrow [1]. However, *in vitro* CLL cells die spontaneously by apoptosis, suggesting that *ex vivo* conditions lack signals necessary for leukemia cell survival. This *in vitro* apoptosis can be prevented by co-culture of CLL cells with different accessory cells from the microenvironment, including nurse like cells (CLL-NLCs) [2] or stroma cells [3]. These cells differentiate from CD14 + cells from CLL donors [4] into large, round and adherent cells. CLL-NLCs protect CLL cells from apoptosis by CXCL12 [2], BAFF (B-cell activating factor), APRIL (a proliferation inducing ligand) [5], CCL3, CCL4 [6], CD31 and Plexin B1 [7]. CLL-NLCs are characterized by a high level of expression of CD68 [4] and CD163 [8], and by a gene expression pattern resembling that of tumor associated macrophages (TAMs) [8]. In 2011, two publications described cells derived from CD14 + cells of healthy donors (HDs) expressing CD68, displaying a similar morphology [9], and a gene expression profile close to CLL-NLCs [10]. *In vitro*, these cells were generated with a co-culture of normal CD14 + cells with normal B lymphocytes, and were called HD-NLCs. Finally, these authors showed that HD-NLCs can support *in vitro* normal B lymphocyte survival [9] as CLL-NLCs with CLL cell survival. However, in this study, the generation of HD-NLCs and

CLL-NLCs was performed at a ratio not observed in patients with CLL, with one CD14 + cell for two B cells. These results raised the question of the specificity of CLL-NLCs in CLL.

In our study we proposed to confront CLL-NLCs with HD-NLCs at a ratio observed in patients with CLL, with more than 95% of CLL cells and less than 2% of CD14 + cells.

CD14 + cells from patients with CLL or from HDs were cultivated in contact with their autologous peripheral blood lymphocytes (PBLs). After 14 days of co-culture, CD14 + adherent cells were first analyzed for their morphology. In the case of samples from patients with CLL or HDs, we found large, round and adherent cells [Figure 1(a)], as described by Bhattacharya and colleagues [9]. No difference in morphology between CLL-NLCs and HD-NLCs was shown. Since contact between CLL cells and CD14 + cells was described as essential for CLL-NLC differentiation [4], we hypothesized that HD-NLC differentiation could also depend on interactions between PBLs and CD14 + cells from HDs. PBLs and CD14 + cells from patients with CLL, or HDs, were cultured either separated or not by a Transwell membrane. As shown in Figure 1(a), in both cases, CD14 + cells did not acquire NLC morphology. Thus, contact between CD14 + and B cells is essential for CLL-NLC or HD-NLC differentiation.

We further compared the phenotype of CLL-NLCs and HD-NLCs. CLL-NLCs displayed a higher expression of CD68 and CD163 than HD-NLCs [Figure 1(b)] but expressed the same level of CD33, CD11b and CD204 [Figure 1(b)]. This phenotype with a high expression of CD68 and CD163 has been already described as a TAM phenotype by Medrek *et al.* [11] in breast cancer and by Marchesi *et al.* in diffuse large B-cell lymphoma [12], suggesting that the CLL-NLC is the TAM of CLL. We can hypothesize that in CLL, these CD163^{high} positive cells have an influence on overall survival and progression-free survival, as in other cancers [11,12].

Interestingly, at day 0, CD14 + cells from patients with CLL were very similar to CD14 + cells from HDs, as reported by Maffei and colleagues [13]. Indeed, both of these cells displayed the same weak level of CD68 but did not express

Correspondence: Dr. Loïc Ysebaert, MD, PhD, INSERM UMR1037 – Cancer Research Center of Toulouse, 31024, Toulouse, France. Tel: +335-6274-8368. E-mail: ysebaert.l@chu-toulouse.fr

Received 11 November 2014; accepted 16 November 2014

RESULTATS

I. Les « nurse-like » cells : les macrophages associés aux tumeurs de la leucémie lymphoïde chronique

2 F. Boissard et al.

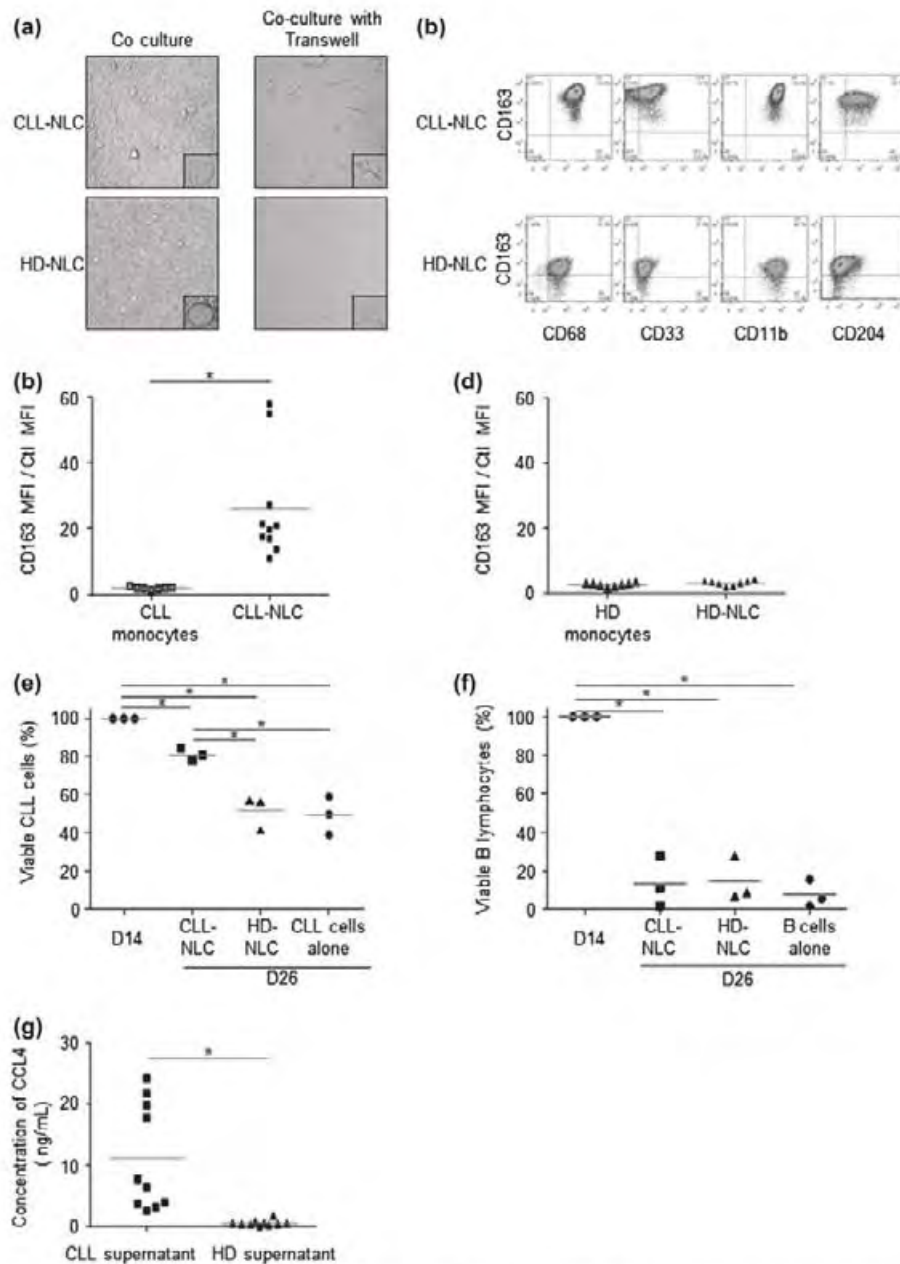


Figure 1. CLL-NLCs express high levels of CD68 and CD163 and promote CLL cell survival. (a) Phase contrast microphotograph of CD14+ cells co-cultured 14 days with PBLs from patients with CLL (top) or from healthy donors (HDs) (bottom) with or without Transwell (right and left, respectively). (b) Flow cytometry analysis of expression of CD68, CD163, CD33, CD11b and CD204 by CLL-NLCs (top) or HD-NLCs (bottom) compared to isotype control (dotted line) at day 14 (representative result from eight independent experiments). (c) Flow cytometry analysis of expression of CD163: marker mean fluorescence intensity (MFI)/isotype control MFI ratio for monocytes from patients with CLL or CLL-NLCs. (d) Flow cytometry analysis of expression of CD163: marker MFI/isotype control MFI ratio for monocytes from HDs or HD-NLCs. (e) Viability percentage of CLL cells when cultured with CLL-NLCs, HD-NLCs or alone after 12 days of co-culture (three independent experiments). (f) Viability percentage of healthy B lymphocytes when cultured with CLL-NLCs, HD-NLCs or alone over 12 days of co-culture (three independent experiments). (g) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test of soluble CCL4 in supernatant of CCL-NLC/CCL cell or HD-NLC/B lymphocyte co-culture after 14 days.

CD163 [Figures 1(c) and 1(d)]. These results suggest that B lymphocytes from HDs induce a physiological differentiation of CD14+ cells into macrophages. In contrast, the acquisition of CD163, described as a TAM marker, when CD14+ cells were in contact with CLL cells suggested a pathological

modification of CD14+ cells into TAMs induced by CLL cells [Figures 1(c) and 1(d)].

In terms of functionality of CLL-NLCs and HD-NLCs, we compared their capacity to support CLL cell survival. We performed long-term co-cultures of CLL-NLCs or HD-NLCs

with CLL cells. After 12 days of co-culture, we observed that only CLL-NLCs could rescue CLL cells, compared to HD-NLCs [Figure 1(e)]. Then, we analyzed the rescue of healthy B lymphocytes by the two types of NLC and showed that neither CLL-NLCs nor HD-NLCs were able to promote B lymphocyte survival [Figure 1(f)]. These results are in contrast to those presented by Bhattacharya and colleagues [9], which can be explained by experimental differences.

In order to understand the mechanism of CLL rescue by NLCs, we investigated the expression of factors known to influence cell survival [5,7]. CLL-NLCs and HD-NLCs displayed the same expression of CD31, BAFF and APRIL (not shown), as reported by Bhattacharya *et al.* [9]. However, we showed a higher level of CCL4 in the supernatant of the CLL-NLC/CCL cell co-culture compared to that of HD-NLC/B lymphocyte co-culture [Figure 1(g)], suggesting that CLL-NLCs secrete more CCL4 than HD-NLCs. Collectively, these results indicated that only CLL-NLCs can promote CLL cell survival due at least to the production of CCL4, while expression of CD31, BAFF and APRIL would not be sufficient to promote CLL cell survival. In addition, Hoellenriegel and colleagues showed that CCL4 could not entirely explain the effect of NLCs on CLL survival [6]. Moreover, for Deaglio and his colleagues determining the importance of the couple CD100/Plexin B1 in CLL survival, the different functionality of HD-NLCs and CLL-NLCs could also be explained by a differential expression of Plexin B1 [7]. Further studies to better understand the mechanism of CLL rescue by NLCs should be investigated.

Given the apparently opposite results induced by the different culture models, we raised the question of the best experimental conditions to study NLCs *in vitro*. Indeed, the cell concentration and ratio are important to approximate pathological conditions. Here we used a high cell concentration and a cell ratio observed in blood in patients with CLL, where CLL cells are predominant and other cell types such as CD14+ cells are greatly reduced compared to HDs. Our experimental model and that of Bhattacharya *et al.* [9,10] are two approaches which may appear opposing but are in fact complementary. We could consider the model of Bhattacharya as a mimicry of the early stage of pathology (monoclonal B lymphocytosis or Rai 0 CLL), whereas our model is more relevant for later stages of the pathology.

Finally, our study reveals that CLL-NLCs are the specific TAMs of CLL with a high expression of CD68 and CD163. Despite a similar morphology and the same contact-dependent

mechanisms of differentiation, CLL-NLCs have a distinct TAM phenotype and are able to rescue CLL cells compared to HD-NLCs.

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

References

- [1] Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;352:804–815.
- [2] Burger JA, Tsukada N, Burger M, et al. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000;96:2655–2663.
- [3] Lagneaux L, Delforge A, Bron D, et al. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 1998;91:2387–2396.
- [4] Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, et al. Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:1030–1037.
- [5] Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* 2005;106:1012–1020.
- [6] Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118:3603–3612.
- [7] Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, et al. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005;105:3042–3050.
- [8] Ysebaert L, Fournié JJ. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011;52:1404–1406.
- [9] Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, et al. Non-malignant B cells and chronic lymphocytic leukemia cells induce a pro-survival phenotype in CD14+ cells from peripheral blood. *Leukemia* 2011;25:722–726.
- [10] Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, et al. Nurse-like cells show deregulated expression of genes involved in immunocompetence. *Br J Haematol* 2011;154:349–356.
- [11] Medrek C, Pontén E, Jirström K, et al. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* 2012;12:306.
- [12] Marchesi E, Cirillo M, Bianchi A, et al. High density of CD68+/CD163+ tumour-associated macrophages (M2-TAM) at diagnosis is significantly correlated to unfavorable prognostic factors and to poor clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2014 Apr 8. [Epub ahead of print]
- [13] Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, et al. The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica* 2013;98:1115–1123.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

Si le rôle des NLC *in vitro* est aujourd'hui clairement défini, leur impact pronostique reste peu clair. En effet, CCL3 et sHMGB1, bien qu'ayant un impact pronostique, ne sont reliés qu'indirectement aux NLC car ils sont produits ou relargués par les cellules leucémiques⁵¹³,⁵¹⁴. De plus, la seule étude histologique réalisée sur des ganglions lymphatiques de patients a été réalisée avec un marquage CD68, peu spécifique, et sur des tissus « micro-arrays », peu représentatifs des ganglions entiers⁵¹³. Nous avons donc voulu déterminer l'impact pronostique des NLC dans la LLC. Pour cela, nous avons cherché quel pourrait être le marqueur le plus spécifique des NLC *in vitro* et *in vivo*. A l'aide de ce marqueur, nous avons ensuite sur des coupes histologiques de ganglions de patients, regardé s'il existait une corrélation entre NLC et progression de la maladie. Puis, nous avons corrélé le taux de ces facteurs solubles relargués par les NLC et retrouvés dans le sérum, à des facteurs pronostiques précédemment établis dans la LLC. Enfin, nous avons associé leur taux à l'évolution de la LLC.

Une partie de ces résultats fut présentée à l'IwCLL à Cologne en 2013 durant la session poster. L'ensemble de ces résultats a été soumis à Leukemia le 10 juin 2015.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

CD163 : a new tumor microenvironment-related prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia

Frédéric Boissard ¹, Camille Laurent ^{1,2}, Alan G. Ramsay ³, Anne Quillet-Mary ¹, Jean-Jacques Fournié ¹, Mary Poupot ^{1*} and Loic Ysebaert ^{1,2*}

¹ CRCT, UMR1037 Inserm-Univ. Toulouse III Paul Sabatier-ERL5294 CNRS, 2 avenue Hubert Curien Oncopole de Toulouse, CS53717, 31037, Toulouse, France.

² Department of Haematology, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopôle, 31059 Toulouse, France.

³ Department of Haemato-Oncology, Division of Cancer Studies, Faculty of Life Sciences & Medicine, King's College London, London, United Kingdom.

Corresponding authors: Mary Poupot and Loic Ysebaert. 2 avenue Hubert Curien Oncopole de Toulouse, CS53717, 31037, Toulouse, France. phone: +335 82 74 16 62, fax: +335 82 74 16 85.

ysebaert.loic@iuct-oncopole.fr; mary.poupot@inserm.fr

* These authors contributed equally to this work

Abbreviations: CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL-NLCs: CLL-nurse-like cells, HD-NLCs: healthy donor NLCs, Het-NLCs: heterologous NLCs, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, TAMs: tumor-associated macrophages. IgHV: immunoglobulin variable region heavy chain, sCD163: soluble CD163, sCD68: soluble CD68, sHMGB1: soluble HMGB1.

Words count (Abstract): 233; Words count (Text): 3975; Table count: 3; Figures count: 4; Reference count: 35

Conflicts of Interest Disclosure: The authors declare no conflicts of interest.

Running Title: *soluble CD163 and CLL prognosis*

KEY POINTS: High level of soluble CD163 in patients' serum predicts CLL clinical outcome.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

ABSTRACT

The prognostic importance of tumor-associated macrophages (TAM) has been recognized for many solid cancers, but is still unknown or under debate for B-cell lymphomas. Here, we studied nurse-like cells (NLC), the TAM in chronic lymphocytic leukemia (CLL), to evaluate which markers should be used for the prognostic assessment of the tumoral microenvironment (TME) in CLL. Antibodies against CD163, a TAM marker, were used to show a different pattern of macrophage infiltration in normal and CLL lymph nodes. Importantly, CD163⁺ NLC numbers increased upon disease progression and closely interacted with proliferating CLL cells only in the TME, showing that this marker correlated with an active CLL disease. Soluble CD163 (sCD163) shed from NLC was also found to correlate with adverse prognostic factors. In a Cox proportional hazards regression model, sCD163 was significantly linked to progression-free and overall survival in a series of 78 patients receiving frontline immunochemotherapy. Multivariate analysis confirmed sCD163 as a new independent TME-derived prognostic marker for both progression-free survival and time to next-treatment. Collectively, our data provide evidence that CD163 expression deserves further evaluation in the CLL frontline setting, especially now that targeted therapies that disrupt CLL-NLC interactions *in vivo* are commonly used in the clinic.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most common B-cell malignancies in adults and is characterized by the accumulation of monoclonal CD5⁺ mature B-cells in lymphoid tissues, bone marrow and peripheral blood (PB)¹. The complex interplay between malignant CLL cells and their surrounding bystander tumor microenvironment (TME)^{2, 3} is critical for their survival and facilitates both their resistance to drug therapy and their orchestration of an immunosubversive milieu⁴. CLL cells proliferate in distinct microanatomical tissue sites, termed proliferation centres, that allow intimate interactions with TME components⁵. The TME consists of extracellular matrix, chemokines, cytokines and non-malignant cells such as CD4⁺ helper T-cells⁶, mesenchymal stromal cells⁷ and monocyte-derived cells known as 'nurse-like cells' (NLCs)⁸.

Many *in vitro* co-culture systems have been developed in order to study pro-survival intercellular signaling between leukemic cells and the cellular components of the TME^{9, 10}. NLCs have been shown to induce mRNA transcriptome changes in PB-derived CLL cells (via direct contact interaction) that show close similarity to the gene expression profiles of CLL cells obtained from patient lymph nodes (LNs)^{4, 11}. Long-term *in vitro* cultures of untouched PB mononuclear cells (PBMCs) from patients with CLL have also been shown to allow the outgrowth of autologous NLCs (referred to as CLL-NLCs in this manuscript)⁸. CLL-NLCs are thought to represent a leukemia-associated counterpart of tissue-associated macrophages and express the markers CD14, CD11b, CD68, and HLA class II molecules¹². Critically, co-culturing CLL cells with CLL-NLCs has been shown to protect leukemic cells from spontaneous and drug-induced apoptosis via CXCL12^{8, 13}, BAFF, APRIL¹⁴, CD31, plexin-B1¹⁵ and activation of BCR signaling⁴. Based on our previous studies, CLL-NLCs appear to be CD163^{high} tumor-associated macrophages (TAMs) with a distinct pro-leukemic functional specificity compared to other subsets of macrophages found in healthy or CLL blood or lymph nodes^{16, 17}. Although TAMs have been associated with a worse outcome in many solid cancers, the clinical impact of NLC outgrowth in the TME has not been definitively addressed to date. The question of whether TAM infiltration mirrors the more aggressive features of cancer cells also remains unanswered.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

The sublocalization of macrophages in the TME has been extensively studied in several solid cancers such as breast cancer¹⁸, melanoma^{19, 20} and colorectal cancer²¹, as well as in haematological malignancies including diffuse large B-cell lymphoma²² and Hodgkin's lymphoma²³. However, there are conflicting results with regards to which cell surface marker provides the best prognostic impact. The TAM markers CD68 and CD163 can be shed as soluble forms (sCD68 and sCD163) which may be useful for prognostication purposes²⁴. There is no such data for CLL, but soluble factors induced by NLC+CLL co-cultures (e.g. the chemokines CCL-3 and CCL-4) have been used to indirectly quantify cellular interactions and, as a consequence, the efficacy of idelalisib or ibrutinib in disrupting CLL/TME contacts *in vitro* and *in vivo*^{25, 26}. Moreover, studies from Burger's group have shown that CCL3 (MIP-1 α) levels are associated with shorter times to first treatment²⁷. Very recently, Gribben's group described that the soluble high mobility group protein B-1 (sHMGB1), an alarmin that promotes the differentiation of CLL-NLCs *in vitro*, was increased in the sera of relapsed patients. Furthermore, using immunohistochemistry (IHC) studies, HMGB1 and CD68 expression levels in the TME have been correlated with overall survival (OS) in a series of CLL patients²⁸. These studies collectively suggest that infiltration of NLC into the CLL TME may have an impact on disease course.

In the present study we have attempted to correlate CD163 expression with CLL proliferation in lymph nodes, and sCD163 levels with biological risk factors that characterize CLL aggressiveness. We compared three released soluble factors (sCD68, sCD163, sHMGB1) to determine which serum NLC marker is the most relevant for predicting outcomes. Our results clearly indicate that CD163 in the TME, or in its cleaved form in sera, is linked with the worst prognostic factors in this disease, namely *TP53* mutations, complex karyotypes and unmutated IgHV status. This shows that CD163 is an independent, reliable prognostic marker of CLL disease course after frontline immunochemotherapy.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

MATERIALS AND METHODS

Cell preparation and culture

Blood samples were obtained after informed consent and stored at the HIMIP collection. The HIMIP collection was declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1) and a transfer agreement (AC 2008-129) was obtained after approbation by the "Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II" (ethical committee). Clinical and biological annotation of samples was declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés, i.e. The Data Processing and Liberties National Committee).

To generate NLC and HD-NLC, Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from CLL patients and HD donors were cultured (10^7 /mL) as previously described^{8, 10}. CLL cells were removed discarded by vigorous pipetting. Adherent cells such as NLC and HD-NLCs were thoroughly washed then collected using a scraper.

Het-NLCs were obtained by co-culturing CD14⁺ cells (purified from healthy donor PBMC using a Dynabeads Untouched Human Monocyte kit (Invitrogen, France)) with PBL from CLL patients with a ratio of 0.7% CD14⁺ to 99.3% PBL.

Determination of IGHV status, FISH abnormalities and recurrent mutations

Fluorescence in situ hybridization (FISH) and IGHV mutational analysis, were realized at the University Hospital of Purpan,

The mutation hotspots of the *TP53* (exons 4-9; RefSeq NM_000546.5), *SF3B1* (exons 14, 15, 16; RefSeq NM_012433.2) and *NOTCH1* (exon 34; RefSeq NM_017617.2) genes were screened by polymerase chain reaction (PCR), followed by high resolution fusion in 10 μ L on a LightCycler LC 480 (Roche, Basel, Switzerland) (details of primers are provided in Supplemental Table 1). For *TP53* and *SF3B1*, recurrent mutations were validated by Sanger sequencing (3130 XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA) of positive amplicons. For patients with a 17p deletion, *TP53* Sanger sequencing was systematically performed. The recurrent mutation delCT of *NOTCH1* (c.7544_7545delCT) was validated by capillary electrophoresis of amplicons. *TP53* mutations and/or *TP53* deletion were pooled together as *TP53* alterations.

Flow cytometry

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

NLCs and leukemic cells were staining with the following antibodies or relevant isotype control. Monoclonal antibodies used were: PC7 anti-CD5, APC-Cy7 anti-CD14, PE anti-CD68, APC anti-CD163, PE anti-APRIL, PE anti-BAFF and their relevant isotype controls, purchased from Ozyme (France); PC7 anti-CD11b, APC-Cy7 anti-CD19, Alexa-fluor 647 anti-CD31, APC anti-CD86, PE anti-CD163 and their relevant isotype controls, purchased from BD Pharmigen (France).

Cell viability

NLC, Het-NLC and HD-NLC were co-cultured with CLL cells or healthy PBL at 1 M/mL. The viability of CLL cells or B-cells was measured every couple of days by their ability to exclude propidium iodide.

Immunohistochemistry and confocal microscopy

Samples from CLL lymph node biopsies or reactive tonsils fixed in 10% buffered formalin were retrieved from the tissue bank of the department of pathology at the Purpan Hospital, Toulouse, between 2000 and 2011. The use of these samples (n=27), was validated by the institutional review board of the Toulouse University Hospital. Specimens were fixed and embedded in paraffin then processed for routine histopathological examination.

For immunohistochemistry, 3 µm-thick sections were stained with hematoxylin and eosin, CD163 primary antibody (clone 10D6, dilution 1:100; DAKO) and Ki67 primary antibody (clone MIB-1, dilution 1:100 Dako). Sections were then scanned using brightfield scan mode with a 20X/NA0.80 Zeiss Plan-Apochromat dry objective and images were acquired with a two megapixel 3CCD color camera (CIS Cam RefVCC-F52U25CL, CIS Americas Inc., Tokyo, Japan), achieving a 0.22 µm/pixel resolution, corresponding to a x56.09 magnification at the highest optical resolution in conventional microscopy. After having manually delineated the proliferation center areas in CLL lymph nodes or germinal centers in reactive lymph nodes using Ki67 staining on each digitalized slide, CD163 staining of each LN sample was manually scored by an expert pathologist.

For confocal microscopy, samples were pre-treated by microwave incubation in pH 6.0, 0.1 M sodium citrate and then permeabilized with 0.1% saponin (in PBS containing 3% BSA/HEPES, 10% goat serum), and incubated overnight at 4°C with the following two primary antibodies: CD68 (clone PGM1; dilution 1:20; DAKO) and CD163 (clone 10D6, dilution 1:10; DAKO) in PBS containing 3% BSA/HEPES, 0.1% saponin. Primary antibodies were followed by goat anti-mouse isotype-specific

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

antibodies labelled with Alexa 488 and Alexa 555 (Molecular Probes) for 2 hours at RT. Samples were mounted in Fluorescence Mounting Medium® (DAKO) and examined using a Zeiss LSM 710 confocal microscope (Zeiss, Germany) with a 63x Plan-Apochromat objective (1.4 oil). An argon laser at 488 nm was used to detect the Alexa 488 fluorochrome. To detect Alexa 555 fluorescence a helium laser was filtered at 543 nm. Under standard imaging conditions no signal from one fluorochrome could be detected with the other filter set. For each pair of antibodies used, standardized conditions for pinhole size, and for gain and offset (brightness and contrast), were used for image capture.

Serum collection and ELISA

Sera used were obtained from patients during their first visit to our center. Peripheral blood samples were drawn using a BD Vacutainer (BD Biosciences), and serum was collected after centrifugation and stored at -80°C before use.

ELISA from soluble CD163 (sCD163) (RD systems, UK), soluble HMGB1 (sHMGB1) (Cusabio, Wuhan, Hubei Province, China) and soluble CD68 (sCD68) (Wuhan EIAab Science, Wuhan, China) were realized on patient sera or on age-matched healthy donor sera, according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Continuous variables were summarized with descriptive statistics, such as mean, SD, median, and range. Categorical variables were tabulated with frequency and percentage. The Fisher's exact test was used to evaluate the association between categorical variables; the Wilcoxon rank-sum test was applied to compare each of the continuous variables between two different categories of dichotomized factors. Spearman correlation coefficients were computed to evaluate the correlation between two continuous variables.

The time to first treatment (TTFT) was defined as the time from diagnosis to the date of first therapy if patients had received any, or was otherwise censored on the last visit date. The time to next treatment (TTNT) was defined as the time from prior treatment to the date of the second therapy if patients had received any or was otherwise censored on the last visit. The overall survival (OS) was defined as the time from diagnosis or from the first treatment, for the OS diagnosis and OS post treatment

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

respectively, to the date of death if patients died or was otherwise censored on the last visit.

Progression-Free Survival (PFS) was defined as the time since treatment decision or sampling and either relapse or death. TTFT, TTNT, OS and PFS were estimated by the Kaplan and Meier method and assessed by the log-rank test using Statistica ® software. For multivariable analysis, we used a Cox proportional hazards model with stepwise selection.

Throughout this process, clinical and laboratory variables were retained only if their Wald P values were <0.05 . (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). The statistical analyses were performed with PRISM software.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

RESULTS

Pro-survival capacities of CD68⁺ and CD163⁺ NLC in vitro

We first generated three types of NLC: CLL-NLC, Healthy Donor NLCs (HD-NLCs) and Heterologous NLCs (Het-NLCs, generated by co-culturing normal donor monocytes with CLL cells) (Figure 1A). Notably, CLL-NLC expressed significantly higher levels of surface CD163 than the two other subtypes, and CD68 levels were also higher in Het-NLC and CLL-NLC compared to HD-NLC. On the other hand, HD-NLC had higher levels of CD14 and CD86, suggesting that these two markers could not be reliably used for IHC studies detection of NLC in CLL tissues (Figure 1B). Interestingly, CLL survival (Figure 1C) but not normal B-cell survival (Figure 1D) was supported by CD68^{high} CD163^{high} Het- and CLL-NLC *in vitro*, suggesting that these markers were suitable for subsequent analyses. Of note, we found that the previously reported pro-survival molecules CD31, BAFF and APRIL were expressed at similar levels across the three subtypes (Figure 1E). This is in agreement with what Bhattacharya *et al* have published in normal lymph nodes¹⁰, suggesting that other molecules/secreted factors were responsible for the pro-survival effects of CLL-educated NLC.

In vivo CD163⁺ TAM-like CLL-NLC infiltration

We next examined the *in vivo* anatomical pattern of expression of CD163⁺ macrophages in both healthy donors (reactive tonsils, Figure 2A) and CLL LN tissue sections (Figure 2B). In accordance with previously published reports, in normal LNs and tonsils CD163⁺ macrophages were confined to the sub-capsular areas and along the lymphatic sinuses, while the B-cell zones were devoid of CD163⁺ cells. On the other hand, in CLL LNs CD163⁺ macrophages were present in the medulla, intertwined with leukemic cells and pseudofollicles. Confocal microscopy was then employed to assess CD68/CD163 co-staining in tumoral LNs (Figure 2C). We found that CD163⁺ cells were consistently CD68⁺, while some CD68⁺ macrophages were devoid of CD163 expression. Furthermore, we found that cleaved CD163 (sCD163), cleaved CD68 (sCD68) and sHMGB1 levels in the sera of CLL patients were significantly higher than in age-matched, normal donor sera (Figure 2D). As normal circulating monocytes in both HD and CLL patients do not express CD163¹⁷ (and display low levels of CD68), we next questioned the reliability of these surrogate markers of TME infiltration by macrophages on predicting outcome.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

CD163⁺ cell infiltration into the TME correlates with active CLL disease

We performed immunohistochemistry analyses on 27 previously untreated CLL patients for whom nodal tissue biopsies were available in our institution. These patients had either had a suspicion of disease transformation or were biopsied before CLL was evidenced from the immunophenotyping of circulating lymphocytes. As shown in Figure 3A, some patients (e.g. Patients 1 and 2) had few Ki67⁺ proliferating CLL cells within pseudofollicles (and few CD163⁺ cells), and had indolent CLL. On the other hand, patients with active CLL (as defined by IWCLL2008 criteria) surging therapy presented with an increased frequency and size of pseudofollicles (e.g. Patients 3 and 4, Figure 3A), a higher fraction of Ki67⁺ CLL cells and a greater number of CD163⁺ cells intertwined with proliferating CLL cells. Altogether, these preliminary data from 27 patients suggested that CD163⁺ cell infiltration into the TME was significantly higher as CLL progressed towards first line of treatment. The limited availability of LN biopsies, and the absence of CD163 expression by circulating monocytes in CLL patients, prompted us to evaluate sCD163 levels in the serum for our subsequent studies.

Soluble CD163⁺ levels correlate with IgHV status, complex karyotypes and TP53 abnormalities

We measured sCD163, sCD68 or sHMGB1 levels in 94 patients naïve to therapy (for a thorough analysis of patient characteristics, see Table 1). As shown in Figure 2D, all of these markers were elevated in CLL patient sera when compared to normal donors, so for our correlation studies we decided to compare soluble factor levels with classical CLL-related prognostic factors. We found a statistically significant association between high sera levels of sCD163 and poor prognostic markers, such as unmutated IgHV status, complex karyotypes (defined by >3 anomalies), and the presence of TP53 mutations, and a trend towards an association with del(17p) and NOTCH1 mutational status ($p=0.055$) (Table 2). Interestingly, we found no such correlations with Binet stage, age, gender, and FISH results other than del(17p) (Table 2 and Supplemental Figure 1A). We did not find any evidence of association between sCD68 or HMGB1 levels and CLL prognostic factors (Table 2). Lymphocytosis (i.e. circulating tumor bulk) or monocytosis (i.e. putative precursors of NLC once recruited to tumor niches) also had no impact on the levels of the three soluble factors studied (Supplemental Figure 1B-C).

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

Altogether, as sCD163 levels did not correlate with sCD68/HMGB1 levels (Supplemental Figure 1D), our data suggest for the first time that aggressive CLL modulate their TME to increase the education of monocytes into CD163⁺ cells.

High soluble CD163 levels correlate with therapy outcome

Of the 94 patients included in our study, 78 required treatment, according to the IWCLL2008 criteria for active disease. Median time to first treatment (TTFT) in the entire cohort was short (36 months) (Supplemental Table 1). At the time of therapy, progression-free survival (PFS), time to next treatment (TTNT) and overall survival (OS) were calculated from day 1 of cycle 1. We used a ROC analysis to study which threshold of soluble factor level better defined prognosis. Using the first quartile (>1500 ng/ml), sCD163 was the only parameter linked to TTNT ($p=0.01$, 30 versus 60 months), PFS ($p=0.04$, 19 versus 42 months) and OS post-treatment ($p=0.007$, 54 months versus not achieved), but not TTFT ($p=0.24$) (Figure 4A-D), whereas sCD68 (high if >21ng/ml) and sHMGB1 (high if >227ng/ml) were not associated with outcomes (Supplemental Figure 2A-D). Univariate analysis revealed that sCD163 levels and *TP53* mutational status were associated with reduced PFS and TTNT (Figure 4B-C and Supplemental Table 2A-B). Multivariate analysis suggested that sCD163 was the best predictor for a shorter PFS (HR=1.96, $p=0.06$) and TTNT (HR=2.26, $p=0.04$) (Table 3).

Taking into account the 56 patients who were treated with the most efficient frontline regimens (FCR (fludarabine-cyclophosphamide-rituximab, $n=40$), FR (fludarabine-rituximab, $n=11$), and PCR (pentostatine-cyclophosphamide-rituximab, $n=5$)), a high sCD163 still correlated with a shorter TTNT, PFS and OS, following Kaplan-Meier analysis. Again, multivariate analysis suggested that it was the only factor that predicted PFS (in this cohort, no patients with del(17p) were included).

Altogether, our data suggest that, despite being associated with *TP53* mutations, IgHV unmutated status and complex karyotypes, sCD163 is an independent TME-related risk factor associated with shorter survival after frontline immunochemotherapy, and therefore should be investigated in independent cohorts of patients.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

DISCUSSION

NLC support CLL survival and drug resistance and are found in various TME (spleen, bone marrow, lymph nodes) but not blood, making them attractive candidates to investigate any correlation between NLC markers and CLL prognosis. Pioneering work from Burger and colleagues has shown that the chemokines CCL3 and CCL4, released by both subsets of cells during co-culture, are reliable surrogates for assessing prognosis, and moreover for demonstrating the efficacy of ibrutinib or idelalisib in disrupting these interactions in patients²⁵⁻²⁷. These two agents have striking effects on debulking the lymph nodes and spleen in the first weeks of therapy, through both direct apoptosis and release from the TME within blood (which explains the observed rapid hyperlymphocytosis)^{30,31}.

The literature on TAM and cancer prognosis is overwhelming in solid tumors, but scarcer in hematological cancers, with sometimes conflicting results for immunochemotherapies on which marker (CD68 or CD163) to use for prognostication purposes. In the context of CLL, a recently study by J.Gribben's group suggested that the alarmin HMGB1, released by CLL cells, educates monocytes to differentiate into survival-supporting NLC, making it an elegant marker for studying the importance of TME in CLL disease course²⁸. However, with the paucity of tumoral tissues available for CLL (few lymph node biopsies are performed in routine practice since diagnosis is usually made from circulating tumoral lymphocytes), we could not use soluble HMGB1 as a surrogate (their study and ours converge on this point). In a previous study we used the same co-culture systems as those published by T.Kipps' and J.Burger's groups more than ten years ago and were able to emphasize the transcriptional relationship between CLL cells and M2-skewed, TAM-like macrophage subsets. In the present study we show more specifically that only CD163^{high} NLC strongly support CLL (and not normal B-cell) survival *in vitro*, and therefore that this marker should be used in preference to CD14, CD68 or BAFF/APRIL in tissue staining. The latter combination of markers has been shown to stain normal macrophages in a normal lymph node environment, and should thus not be applied to CLL TME. CD163⁺ macrophages are found in normal lymph nodes, but at specific anatomical sites (i.e. outside B-cell zones, lining lymphatic structures and in sub-capsular areas), whereas we found that CD163⁺ cells in CLL TME are interspersed with tumoral cells, including those within proliferating centers, and are significantly increased in numbers in the active phase of CLL (as defined by the IWCLL2008 consensus criteria for therapy indication). Alterations in nodal architecture according to disease stage have not been extensively studied to date, except for the measurement of proliferation

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

center size in highly proliferating *versus* indolent CLL³². By using confocal imaging techniques, we found that CD68⁺ cells were not always stained with CD163, while CD163⁺ cells were largely CD68⁺. The CD68 marker can also be expressed by non-myeloid cells³³, so we hypothesized that CD68 staining might over-interpret the exact quantity of NLC in lymph nodes. This is the first time that CD163⁺ cell quantification has been linked to CLL proliferation (by Ki-67) within TME, urging an assessment of easy-to-measure serum biomarkers mirroring this macrophage infiltration.

To this end, we compared soluble CD68, HMGB1 and CD163 expression levels and found increased quantities of all markers in CLL *versus* normal donors. Notably, we confirmed the increased sHMGB1 levels published by J.Gribben's group, suggesting the comparability of both studies. In a series of 92 CLL patients (naive to therapy), we were able to show that sCD163 levels are linked to well-established adverse biological factors such as the presence of *TP53* mutations (*NOTCH1* mutational status also tended to be associated with sCD163), IgHV mutational status, and complex karyotypes. However, in our cohort sHMGB1 levels did not correlate neither with lymphocytosis nor disease course. The only soluble factor that correlated with clinical outcome was sCD163. Indeed, using the higher quartile (>1500ng/ml, calculated from ROC analysis for better specificity) to define the high expression group, patients with high levels of sCD163 had a shorter TTNT, PFS, and OS post-treatment. This result does not compare with sCD163 levels in a recently published study in a smaller cohort, even if we apply their threshold (2.45mg/L)³⁴. In this latter report, sCD163 was found to be expressed at similar levels in both normal and CLL donors, making firm conclusions from that study. Moreover, in our dataset sCD163 was found to be independently associated with PFS and TTNT and was the most powerful independent marker for TTNT (HR2.26, p=0.04) in our cohort. These data reinforce the view that sCD163 is a unique TAM-like NLC marker for CLL. Correlations between sCD163 serum levels and disease stage have been reported in myeloma³⁵ and melanoma¹⁹, but not in hepatocellular carcinoma³⁶. These discrepancies in sCD163 likely reflect the impact of various phenotypes of TAMs (i.e. CD68⁺ *versus* CD163⁺) in various cancers.

In summary, we have demonstrated for the first time that CD163 and its soluble counterpart sCD163 are the best markers for studying the clinical impact of NLC *in vivo*. Our data confirm that cancer cells induce a specific differentiation transcription program in monocytes (autologous or heterologous and across all patient samples tested). In CLL, like in follicular lymphoma or Hodgkin's

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

lymphoma, a study of CD163⁺ TAM-like NLCs or sCD163 should now be carried out in a bigger cohort

to validate the clinical impact of NLC in CLL disease course.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

Acknowledgments

This work was partly funded by the LABEX project (Investissements d'Avenir ANR11-PHUC001).

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

REFERENCES

1. Caligaris-Cappio F, Gottardi D, Alfarano A, Stacchini A, Gregoret MG, Ghia P, *et al.* The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* 1993; **19**(3): 601-613.
2. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 1998 Apr; **91**(7): 2387-2396.
3. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999 Dec 1; **94**(11): 3658-3667.
4. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Burkle A, Wierda WG, Keating MJ, *et al.* High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse-like cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009 Mar 26; **113**(13): 3050-3058.
5. Bertilaccio MT, Scielzo C, Muzio M, Caligaris-Cappio F. An overview of chronic lymphocytic leukaemia biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010 Mar; **23**(1): 21-32.
6. Patten PE, Buggins AG, Richards J, Wotherspoon A, Salisbury J, Mufti GJ, *et al.* CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* 2008 May; **111**(10): 5173-5181.
7. Giannoni P, Scaglione S, Quarto R, Narcisi R, Parodi M, Balleari E, *et al.* An interaction between hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) prolongs the survival of chronic lymphocytic leukemic cells through STAT3 phosphorylation: a potential role of mesenchymal cells in the disease. *Haematologica* 2011 Jul; **96**(7): 1015-1023.
8. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000 Oct; **96**(8): 2655-2663.
9. Hamilton E, Pearce L, Morgan L, Robinson S, Ware V, Brennan P, *et al.* Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2012 Sep; **158**(5): 589-599.
10. Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, Barth TF, Rauen J, Habermann A, *et al.* Non-malignant B cells and chronic lymphocytic leukemia cells induce a pro-survival phenotype in CD14+ cells from peripheral blood. *Leukemia* 2011 Apr; **25**(4): 722-726.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

11. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Jan; **117**(2): 563-574.
12. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Feb; **99**(3): 1030-1037.
13. Burger M, Hartmann T, Krome M, Rawluk J, Tamamura H, Fujii N, *et al.* Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005 Sep 1; **106**(5): 1824-1830.
14. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, *et al.* Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* 2005 Aug; **106**(3): 1012-1020.
15. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, Bonello L, Horenstein AL, Tamagnone L, *et al.* CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005 Apr; **105**(8): 3042-3050.
16. Ysebaert L, Fournié JJ. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011 Jul; **52**(7): 1404-1406.
17. Boissard F, Fournié JJ, Laurent C, Poupot M, Ysebaert L. Nurse Like Cells: Chronic Lymphocytic Leukemia Associated Macrophages. *Leuk Lymphoma* 2015 Jan: 1-8.
18. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* 2012; **12**: 306.
19. Jensen TO, Schmidt H, Moller HJ, Hoyer M, Maniecki MB, Sjoegren P, *et al.* Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol* 2009 Jul 10; **27**(20): 3330-3337.
20. Shabo I, Stal O, Olsson H, Dore S, Svanvik J. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *Int J Cancer* 2008 Aug 15; **123**(4): 780-786.
21. Shabo I, Olsson H, Elkarim R, Sun XF, Svanvik J. Macrophage Infiltration in Tumor Stroma is Related to Tumor Cell Expression of CD163 in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron* 2014 Aug; **7**(1-2): 61-69.
22. Marchesi F, Cirillo M, Bianchi A, Gately M, Olimpieri OM, Cerchiara E, *et al.* High density of CD68+/CD163+ tumour-associated macrophages (M2-TAM) at diagnosis is

RESULTATS

- II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique
- significantly correlated to unfavorable prognostic factors and to poor clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2014 Apr.
23. Harris JA, Jain S, Ren Q, Zarineh A, Liu C, Ibrahim S. CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical Hodgkin lymphoma. *Diagn Pathol* 2012; **7**: 12.
 24. Jones K, Vari F, Keane C, Crooks P, Nourse JP, Seymour LA, *et al.* Serum CD163 and TARC as disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 2013 Feb; **19**(3): 731-742.
 25. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 2012 Feb; **119**(5): 1182-1189.
 26. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, *et al.* The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Sep; **118**(13): 3603-3612.
 27. Sivina M, Hartmann E, Kipps TJ, Rassenti L, Krupnik D, Lerner S, *et al.* CCL3 (MIP-1 α) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Feb; **117**(5): 1662-1669.
 28. Jia L, Clear A, Liu FT, Matthews J, Uddin N, McCarthy A, *et al.* Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014 Mar; **123**(11): 1709-1719.
 29. Oberic L, Vaillant W, Hebraud B, Recher C, Suc E, Houyau P, *et al.* Clinical activity of a new regimen combining gemcitabine and alemtuzumab in high-risk relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia patients. *Eur J Haematol* 2014 Jun.
 30. Byrd JC, O'Brien S, James DF. Ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Sep; **369**(13): 1278-1279.
 31. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, *et al.* Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014 Mar; **370**(11): 997-1007.
 32. Giné E, Martínez A, Villamor N, López-Guillermo A, Camos M, Martínez D, *et al.* Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* 2010 Sep; **95**(9): 1526-1533.
 33. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Müller A, *et al.* Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 2008 May; **67**(5): 453-463.
 34. Nederby L, Roug AS, Knudsen SS, Skovbo A, Kjeldsen E, Moller HJ, *et al.* Soluble CD163 as a prognostic biomarker in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2015 Mar: 1-3.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

35. Andersen MN, Abildgaard N, Maniecki MB, Møller HJ, Andersen NF. Monocyte/macrophage-derived soluble CD163: a novel biomarker in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2014 Jul; **93**(1): 41-47.
36. Kong LQ, Zhu XD, Xu HX, Zhang JB, Lu L, Wang WQ, *et al.* The clinical significance of the CD163+ and CD68+ macrophages in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2013; **8**(3): e59771.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CLL-NLCs have a close but distinct phenotype to HD-NLCs and Het-NLCs. (A) PBMCs from CLL patients (left) or healthy donors (right) were cultured for 14 days, or sorted CD14⁺ cells isolated from healthy donor PBMCs were cultured for 14 days with sorted CD5⁺ cells from the same CLL patient to obtain Het-NLCs (center). (B) Flow cytometry analysis of the expression of different markers. Marker MFI / isotype control MFI ratios are shown for CLL-NLCs (■), Het-NLCs (▲) or HD-NLCs (●) after 14 days of culture. (C) Percentage of viable CLL cells when cultured alone (x) or in co-culture with CLL-NLCs (■), Het-NLCs (▲) or HD-NLCs (●) for 12 days (3 independent experiments). (D) Percentage of viable healthy B-cells when cultured alone (x) or in co-culture with CLL-NLC (■), Het-NLC (▲) or HD-NLCs (●) for 12 days (3 independent experiments). (E) Flow cytometry analysis of the expression of different markers. Marker MFI / isotype control MFI ratios are shown for CLL-NLCs (■), Het-NLCs (▲) or HD-NLCs (●) after 14 days of culture. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 2: Location of CLL-NLC infiltration. (A) CD163⁺ staining from one representative (n=7) healthy donor lymph node tissue section. CD163⁺ cells were present in the lymphatic sinuses and along the sub-capsular area but were excluded from the germinal center remnants (pink) in the normal lymph node (x200). (B) CD163⁺ staining from one representative (n=27) CLL lymph node tissue section. CD163⁺ cells (brown) were spread throughout the parenchyma, infiltrating proliferation centers (pink) in the CLL lymph node (x200). CD163⁺ cells were stained with a CD163 antibody (brown) and germinal center cells/proliferating CLL cells with a Ki-67 antibody (pink). (C) Tissue sections of CLL lymph nodes were stained for CD68 (green) and CD163 (red) then viewed by confocal microscopy revealed that CD68⁺ cells are CD163⁺ or CD163⁻, suggesting staining of myeloid cells other than true NLC, and therefore prompting the use of CD163 staining to track NLC *in vivo* (Bar = 50µm). One representative experiment (of 3) is shown. (D) Quantification (by ELISA testing) of soluble CD163 (left), soluble CD68 (center) or soluble HMGB1 (right) in serum from healthy donors (●) or CLL patients (■) shows a significant increase of all three markers only in CLL patients (mirroring NLC-CLL interactions in the TME). Soluble HMGB1 levels show very few disparities among patient samples, while standard deviations of the CD163 and CD68 dosages are broader.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

Figure 3: Quantification of CD163⁺ cells in CLL lymph nodes (LN) correlates with CLL proliferation and active disease. (A) Representative pictures showing the density and distribution of CD163⁺ in CLL LN from two patients with indolent CLL (Pt#1 and #2), and two patients with therapy-urging CLL (Pt#3 and #4) (x100). **(B)** According to disease aggressiveness, the number of CD163⁺ cells both outside and within proliferating centers significantly differs, suggesting that the number of NLC within the TME may be used for prognostication purposes. NLC were stained with a CD163 antibody (brown) and proliferation centers with a Ki-67 antibody (pink). Relative quantification of Ki-67⁺ cells or CD163⁺ cells was made by two blinded separate analyses.

Figure 4: High soluble CD163 levels correlate with shorter time to next treatment (TTNT), progression-free survival (PFS) and shorter overall survival (OS) post-treatment. (A-D) Kaplan-Meier curves showing the probability of **(A)** treatment-free survival (TTFT), **(B)** PFS, **(C)** TTNT and **(D)** OS post-treatment. **(E-H)** Kaplan-Meier curves showing the probability of **(E)** TTFT, **(F)** PFS, **(G)** TTNT and **(H)** OS post-treatment for patients treated with FCR (fludarabine-cyclophosphamide-rituximab), FC (fludarabine-cyclophosphamide) or PCR (pentostatine-cyclophosphamide-rituximab). CLL patients were divided into groups of patients with low (<1500 ng/mL, blue curve) or high (>1500ng/mL, red curve) levels of sCD163. These categories were determined by ROC curves.

RESULTATS

II.CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

TABLE 1

Characteristics	Category	n (%)
Sex	Female	29 (30.9)
	Male	65 (69.1)
Binet Stage	A	38 (40.4)
	B	29 (30.9)
	C	22 (23.4)
IgHV status	Mutated	44 (46.8)
	Unmutated	38 (40.4)
Cytogenetics	Tri 12	13 (13.9)
	Del(13q)	29 (30.9)
	Del(11q)	11 (11.7)
	Del(17p)	6 (6.4)
	Complex karyotype	15 (15.9)
Recurrent mutations	<i>SF3B1</i>	5 (5.3)
	<i>NOTCH1</i>	14(14.9)
	<i>TP53</i>	8 (8.5)

Table 1: Clinical characteristics of 94 patients with CLL. Del: deletion, IgHV: immunoglobulin heavy chain variable segment mutational status, tri 12: trisomy 12.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

TABLE 2

Characteristics	Category	Median sCD163 p (range) (CD163)	Median sCD68 p (range) (CD68)	Median sHMGB1 p (range) (HMGB1)		
Age	<65y	887.4 (326.4-2312)	26.54 (10.1-26.5)	192.3 (167.3-390.7)		
	>65y	985 (302-4944)	0.6619 (11.6-124.6)	28.14 (11.6-124.6)	0.1918	190.7 (160.7-274.0)
Sex	Female	686 (375.2-3427)	28.30 (15.9-73.5)	190.7 (160.7-274.0)		
	Male	1098 (235-4944)	0.2586 (10.1-124.6)	26.16 (10.1-124.6)	0.3106	190.7 (167.3-390.7)
IgHV satus	Mutated	669 (302-4944)	22.3 (11.6-124.6)	190.7 (160.7-274)		
	Unmutated	1308 (235-2662)	0.0031 (12.7-73.5)	28.1 (12.7-73.5)	0.3858	194 (167.3-390.7)
Cytogenetics	Tri 12	1227 (376-1558)	0.1152 (12.7-28.4)	25.2 (12.7-28.4)	0.8279	180.7 (174.0-197.3)
	Del(13q)	946 (375.2-2359)	0.7053 (15.9-68.9)	30.4 (15.9-68.9)	0.1632	190.7 (174.0-214.0)
	Del(11q)	597 (565-4944)	0.6617 (15.9-52.9)	31.1 (15.9-52.9)	0.5963	200.7 (174-390.7)
	Del(17p)	1775 (995-1922)	0.0743 (15.5-19.4)	17.5 (15.5-19.4)	0.2142	187.3 (184.0-190.7)
	Complex karyotype	184 5 (1162-1922)	0.0236 (15.5-19.4)	18.4 (15.5-19.4)	0.0799	189.0 (184.0-190.7)
Recurrent mutations	SF3B1	1308 (621.1-2298)	0.2611 (18.2-68.9)	32.3 (18.2-68.9)	0.5839	185.7 (167.3-204.0)
	NOTCH1	1562 (416-4944)	0.0555 (12.7-52.9)	32.8 (12.7-52.9)	0.1399	197.3 (184.0-254.0)
	TP53	1764 (995-4944)	0.0093 (15.5-80.0)	35.1 (15.5-80.0)	0.4309	190.7 (180.7-204.0)

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

Table 2: Correlation between levels of sCD163, sCD68 or sHMGB1 and established prognostic markers in CLL. In our series, high sCD163 levels were found to be correlated with *TP53* mutational status, unmutated IgHV, and complex karyotypes, the three most predictive variables for survival (PFS and OS) in CLL. A trend towards significance was also seen with del(17p) and *NOTCH1* mutations, suggesting that these CLL cases modulate their TME towards an increase in CD163⁺ cells. Del: deletion, IgHV: immunoglobulin heavy chain variable segment mutational status, tri 12: trisomy 12.

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

TABLE 3

A

Characteristics	Category	n	HR (95 CI)	p
<i>TP53</i>	Wild type	55	Baseline	
	Mutated	7	0.77 (0.43-5.21)	0.38
sCD163	low (<1500 ng/mL)	57	Baseline	
	high (>1500 ng/mL)	21	2.26 (1.04-4.91)	0.04

B

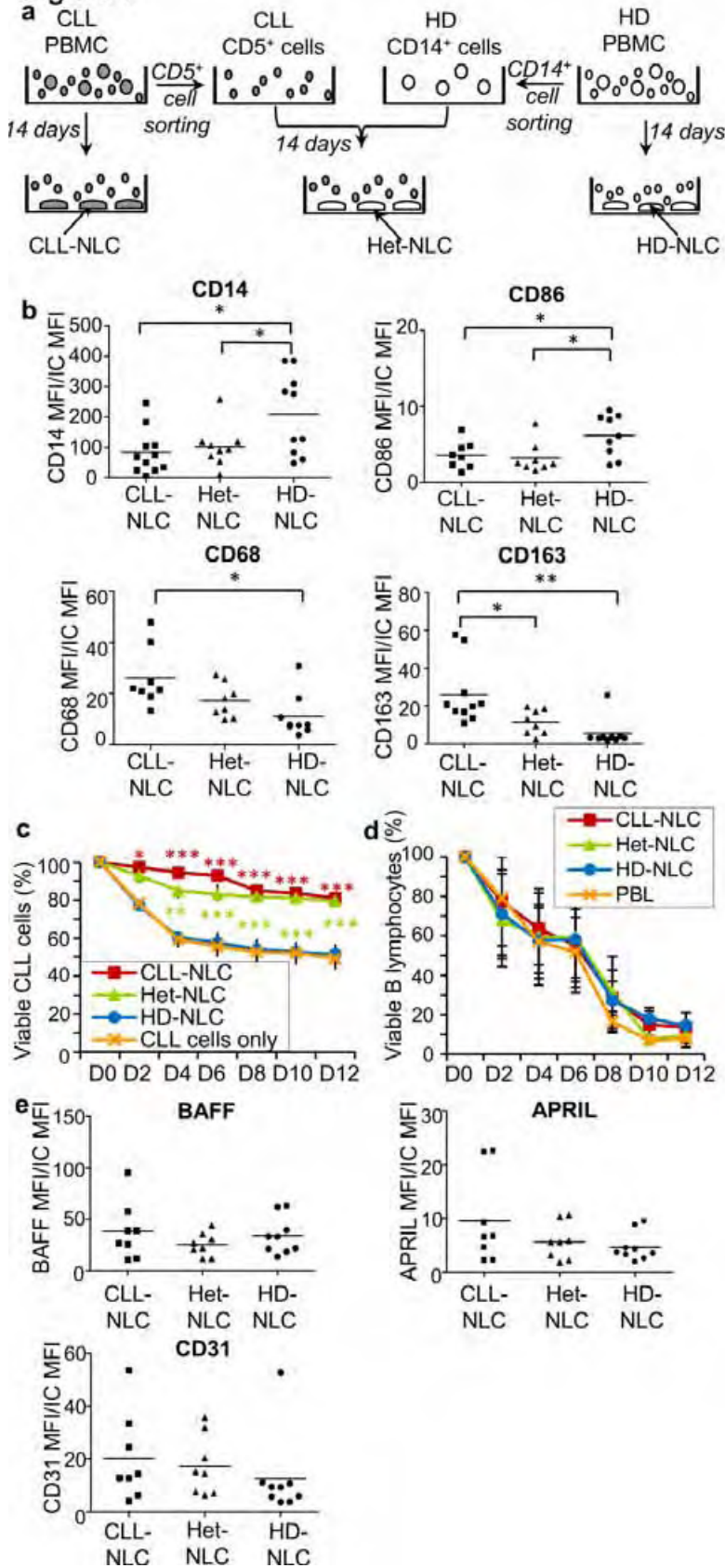
Characteristics	Category	n	HR (95 CI)	p
<i>TP53</i>	Wild type	55	Baseline	
	Mutated	7	2.17 (0.74-9.11)	0.14
sCD163	low (<1500 ng/mL)	57	Baseline	
	high (>1500 ng/mL)	21	1.96 (0.96-4.00)	0.06

Table 3: Multivariate analysis of time to next treatment (A) and progression-free survival (B).

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

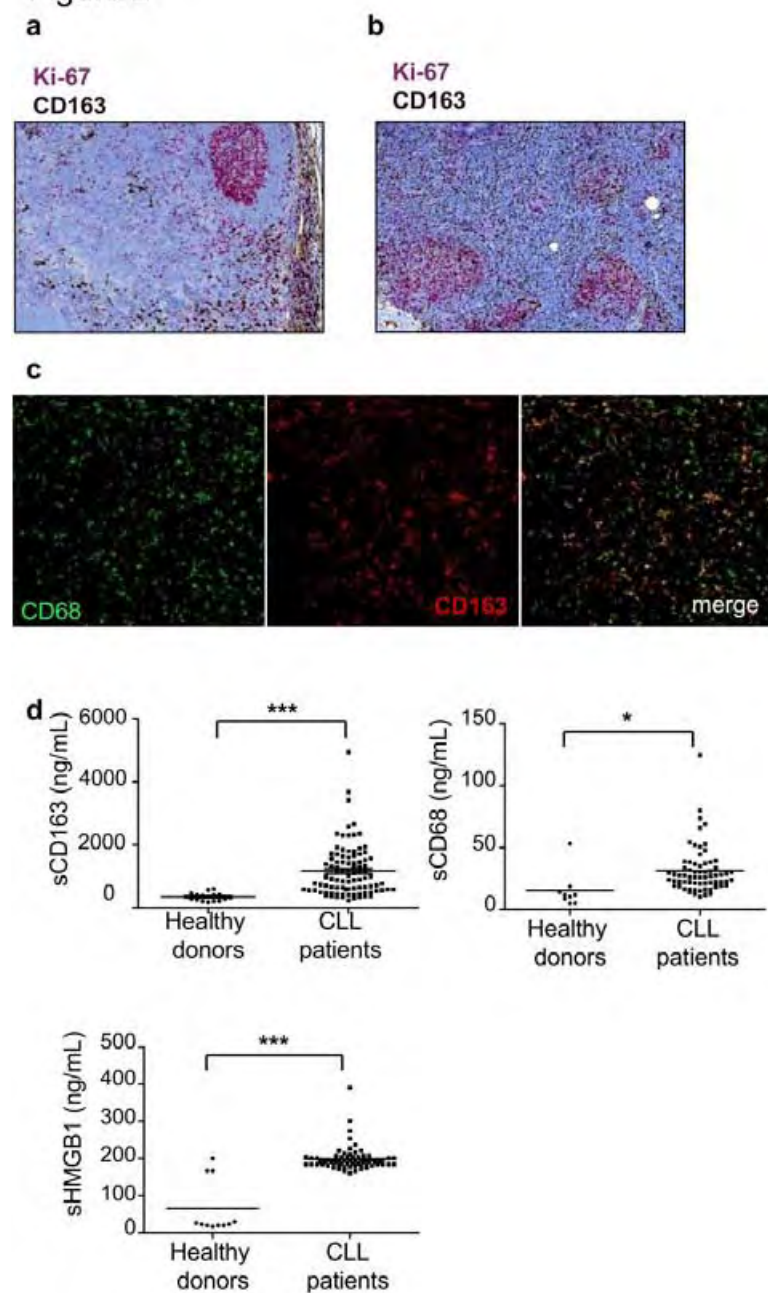
Figure 1



RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

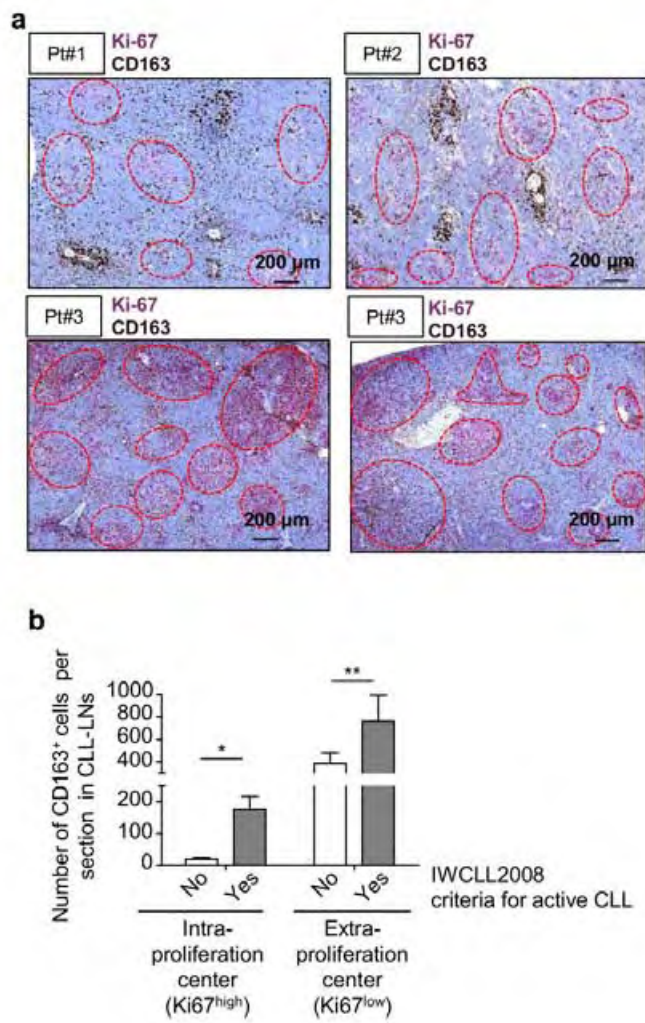
Figure 2



RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

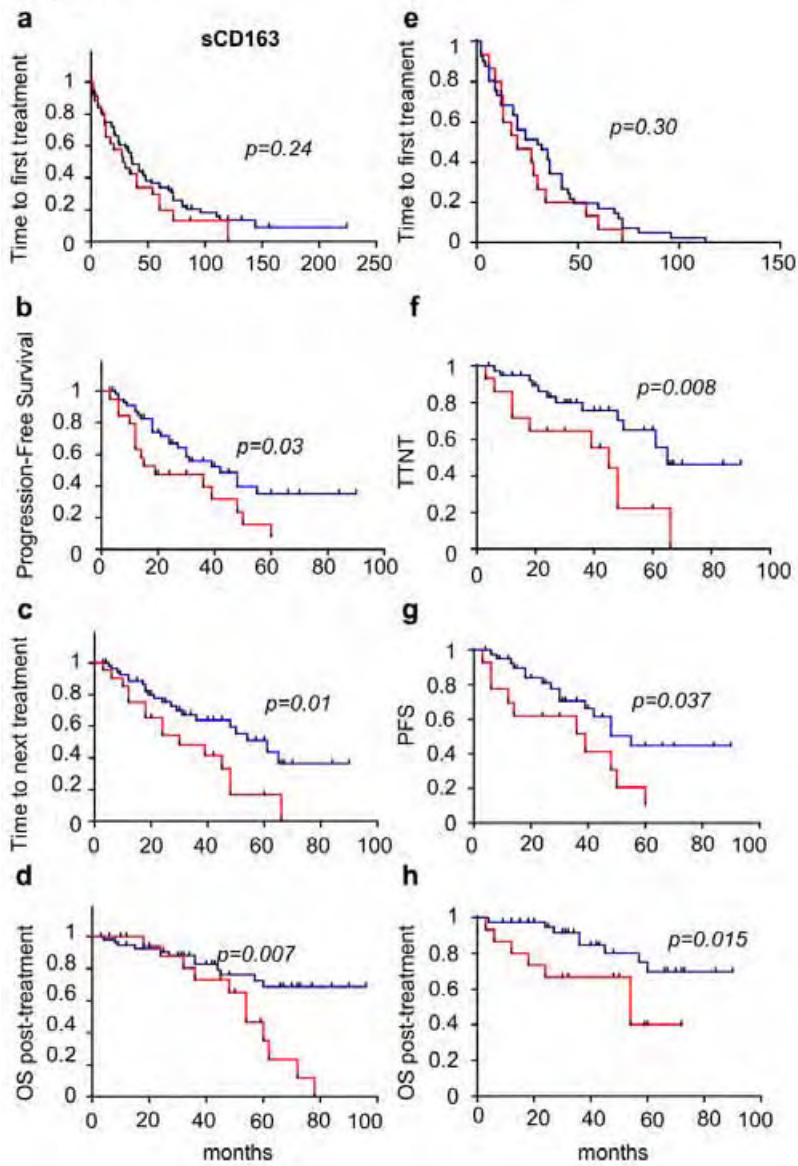
Figure 3



RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

Figure 4

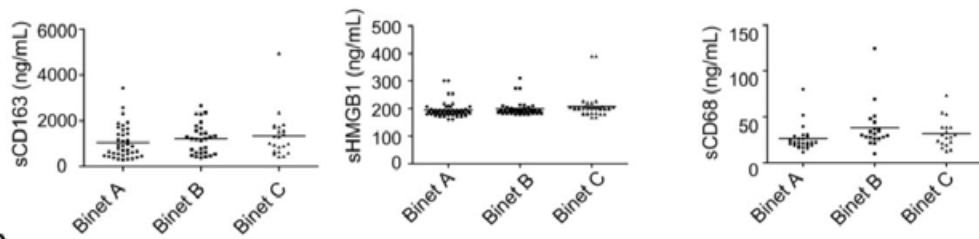


RESULTATS

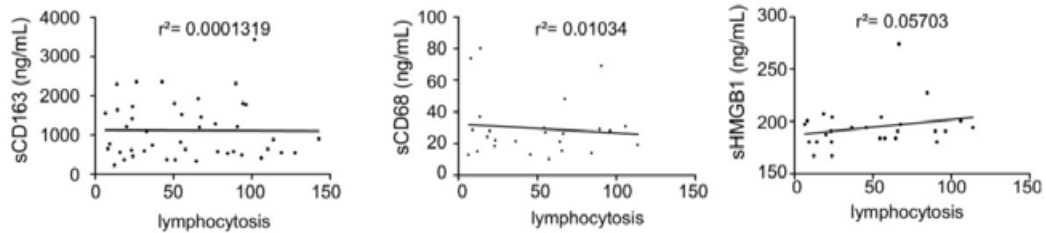
II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

Supplemental Figure 1

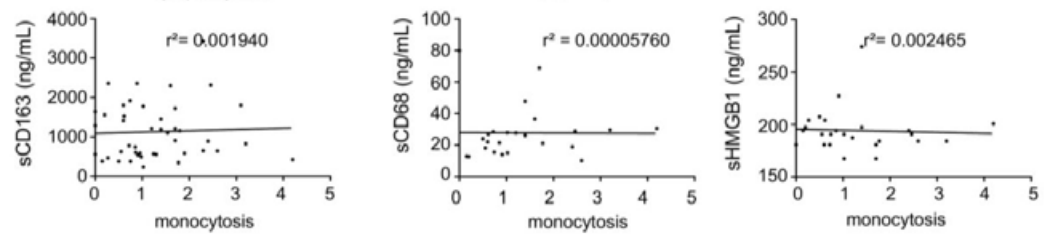
a



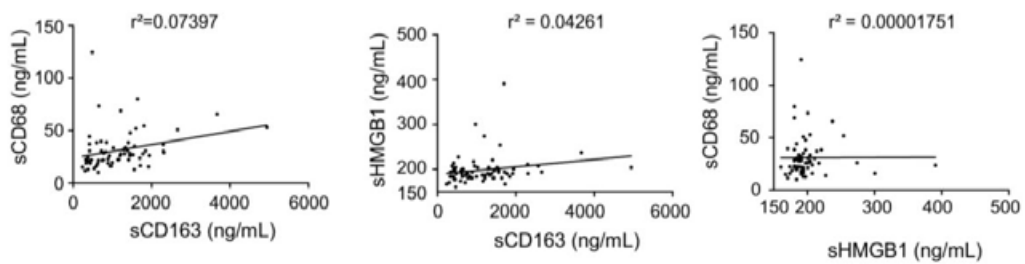
b



c



d

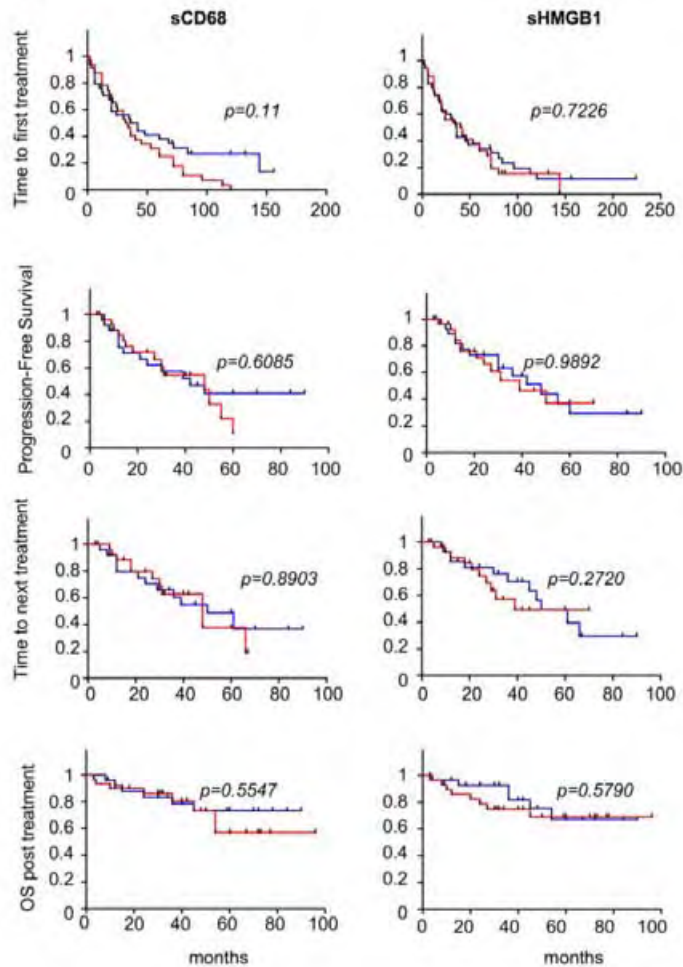


Supplemental Figure 1: No relationship exists between sCD163 (left), sCD68 (center), sHMGB1 (right) and Binet Stage (A), lymphocytosis (B), or monocytosis (C). No relationship was found between each of the soluble markers (D).

RESULTATS

II. CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2: No relationship exists between sCD68 (left) or sHMGB1 (right) and clinical outcome. Kaplan-Meier curves showing the probability of treatment-free survival (A), progression-free survival (B), next treatment free-survival (C) and overall survival post-treatment (D). CLL patients were divided into groups of patients with low (blue curves) or high (red curves) levels of sCD68 or sHMGB1 (high levels taken as >21ng/mL or >227ng/mL, respectively). These categories were determined by ROC curves.

RESULTATS

II.CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

Supplemental Table 1

Characteristics	Category	Patients treated	Median TTFT, mo	p
	All patients	78	36	-
Binet Stage	A	27	54	0.01
	B	26	30	
	C	22	22.5	
IgHV status	Mutated	31	43.5	0.1208
	Unmutated	38	25	
Cytogenetics	Tri 12	13	30	0.2778
	Del(13q)	26	32	0.4268
	Del(6q)	-	-	-
	t(IgH-Bcl2)	-	-	-
	Del(11q)	10	20	0.6592
	Del(17p)	3	60	0.2814
	Complex karyotype	14	27	0.5433
Recurrent mutations	SF3B1	5	13	0.048
	NOTCH1	13	38	0.6337
	TP53	8	24	0.1606

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

Supplemental Table 1: Time to first treatment (TTFT) according to the different prognostic subgroups and breakdown of drugs received at the first treatment. In our series, only B/C Binet stage or the presence of the *SF3B1* mutation correlated with shorter TTFT. Del: deletion, IgHV: immunoglobulin heavy chain variable segment mutational status, tri 12: trisomy 12.

RESULTATS

II.CD163: un nouveau marqueur pronostique relié au microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique

Supplemental Table 2

a

Characteristics	Category	Total	Patients treated	Median TTNT, mo	p
	All patients	78	34	48	-
Binet Stage	A	28	10	54	-
	B	26	10	61	0.27
	C	20	14	31	0.1
IgHV status	Mutated	29	13	48	
	Unmutated	38	19	45	0.8
Cytogenetics	Tri 12	13	7	24	0.09
	Del(13q)	26	13	36	0.93
	Del(11q)	9	4	36	0.55
	Del(17p)	3	2	30	0.29
	Complex karyotype	14	7	30	0.67
Recurrent mutations	<i>SF3B1</i>	5	4	45	0.47
	<i>NOTCH1</i>	12	6	39	0.42
	<i>TP53</i>	7	4	20	0.049

b

Characteristics	Category	Total	Patients relapsed	Median PFS, mo	p
	All patients	73	10	39	
Binet Stage	A	27	10	60	
	B	26	14	42	
	C	20	14	31	0.26
IgHV status	Mutated	29	14	48	
	Unmutated	38	23	36	0.59
Cytogenetics	Tri 12	13	8	18	0.39
	Del(13q)	26	16	30	0.49
	Del(11q)	9	4	36	0.83
	Del(17p)	3	2	15	0.23
	Complex karyotype	14	8	21	0.86
Recurrent mutations	<i>SF3B1</i>	5	4	31	0.72
	<i>NOTCH1</i>	12	8	24	0.22
	<i>TP53</i>	7	4	6	0.025

Supplemental Table 2: Time to next treatment (TTNT) (A) or progression-free survival (PFS) (B) according to the different prognostic subgroups. In our series, only the presence of the *TP53* mutation correlated with shorter PFS and shorter TTNT. Del: deletion, IgHV: immunoglobulin heavy chain variable segment mutational status, tri 12: trisomy 12.

III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique

Au cours de l'étude précédente, nous avons montré que les NLC ont un impact pronostique chez les patients traités par chimiothérapie classique. Or, comme nous l'avons vu précédemment, de nouvelles thérapies ciblées ont été développées dans le traitement de la LLC (I.E.5.1 L'ibrutinib (Imbruvica ®) et I.E.5.2 Idélalisib (Zydelig ®)). Dans la majorité des cas, les patients traités rechutent, cela ne pouvant pas seulement s'expliquer par l'émergence de clones mutants résistants à l'ibrutinib. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette rechute pouvait, en partie, être expliquée par les effets protecteurs du microenvironnement sur les cellules leucémiques.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet du traitement par ibrutinib sur la différenciation des monocytes en NLC, leur phénotype et leur capacité à favoriser la survie des cellules leucémiques. Enfin, *in vitro*, nous avons étudié l'effet chimioprotecteur des NLC sur les cellules leucémiques vis-à-vis des principales thérapies utilisées dans la LLC à savoir le rituximab, le dasatinib, la bendamustine, l'idélalisib, le vénétoclax et l'ibrutinib, seul ou en combinaison.

Ce travail a été partiellement présenté lors de la session poster de l'ASH en 2014 et a été accepté chez Blood Cancer Journal en 2015.

RESULTATS

III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique

Nurse-like cells mediate ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia patients

Frédéric Boissard ^{1,2}, Jean-Jacques Fournié ^{1,2}, Anne Quillet-Mary ^{1,2}, Loïc Ysebaert ^{1-3*} and Mary Poupot ^{1,2*}

¹ Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM UMR1037, Université Toulouse III Paul-Sabatier, ERL 5294 CNRS, Toulouse, France

² Laboratoire d'Excellence 'TOUCAN', Programme Hospitalo-Universitaire en Cancérologie CAPTOR, Institut Carnot Lymphome CALYM

³ Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopole, CHU de Toulouse, France

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors: ysebaert.loic@iuct-oncopole.fr; mary.poupot@inserm.fr; phone: +335 82 74 16 62, fax: +335 82 74 16 85.

Abbreviations: BCR: B-cell antigen receptor, BTK: Bruton tyrosine kinase, CLL: chronic lymphocytic leukemia, NLC: nurse-like cell, LN: lymph node, PB: peripheral blood, PBMC: peripheral blood mononuclear cells, PI3K δ : phosphoinositide 3-kinase delta, TAM: tumor-associated macrophages, TME: tumor microenvironment.

Key words: Nurse-Like Cells, Ibrutinib, Chemoresistance.

No conflicts of interest

Running Title: *Nurse-like cells and ibrutinib*

RESULTATS

III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most common B-cell malignancies in adults, characterized by an accumulation of monoclonal CD5⁺ mature B-cells in lymphoid tissues and peripheral blood (PB). Clonal expansion and invasive migration typically lead to CLL cell involvement in the lymph nodes (LNs), spleen and bone marrow¹.

Signaling from the B-cell antigen receptor (BCR) regulates multiple cellular processes in CLL cells, such as proliferation, differentiation, apoptosis, and cell migration². Bruton tyrosine kinase (BTK), a member of the Tec kinase family, is a signaling molecule positioned early on the BCR signaling cascade, in close proximity to Syk and phosphoinositide 3-kinase delta (PI3K δ). Ibrutinib is a selective and irreversible BTK inhibitor which inactivates this kinase through covalent binding to Cys-481 in its ATP-binding domain³. It is widely used in CLL chemotherapy regimens and produces remarkable initial responses in patients with relapsed and refractory CLL. Indeed, ibrutinib not only induces early CLL cell apoptosis in tissues, but also the redistribution of tissue-resident CLL cells into the peripheral blood with a rapid resolution of enlarged LNs, the improvement of cytopenia (potentially due to egress from the bone marrow (BM)) and a surge in lymphocytosis⁴. The emergence of ibrutinib-resistant BTK mutants has been observed in a subset of patients with prolonged exposure to this drug, although such mutants alone cannot account for the rapid disease progression and lack of complete response seen in virtually all CLL patients⁵. The tumor microenvironment (TME) has been widely shown to be critical for tumor cell survival, chemoresistance, homing and proliferation^{6, 7}. The TME is a complex milieu made up of extracellular matrix, chemokines, cytokines, non-malignant cells including CD4⁺ helper T-cells, mesenchymal stromal cells⁸ and nurse-like cells (NLC)^{9, 10}. The persistence of CLL TME interactions despite ongoing therapy may contribute to relapse and thus could play a role in ibrutinib resistance. Although the induction of CLL apoptosis has been reported with high concentrations of ibrutinib despite co-culture with NLC¹¹, at clinically-achievable concentrations, i.e. 0.1-0.4 μ M, ibrutinib-induced apoptosis in CLL cells was blocked *in vitro* by HS-5 or NKTert stromal cell lines¹². The CD68⁺ CD163⁺ NLC subset of macrophage cells have been described as tumor-associated macrophages (TAM) in CLL and are found in various tumoral niches (lymph nodes, spleen, bone marrow)^{10, 13}. Little is known on how anti-leukemic agents impact on drug-exposed patient monocytes *in vivo*, and whether this translates into a perturbed NLC differentiation program and reduced CLL survival *in vitro*. In this work, we raise the hypothesis that ibrutinib resistance arises from its lack of efficiency in blocking CLL-monocyte interactions in ibrutinib-treated patients, leaving NLC

RESULTATS

III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique

induction and pro-survival capacities unaffected and thus emphasizing the role of the TME in persistent residual disease.

In this study, we report for the first time that (i) ibrutinib does not induce detectable NLC egress into the bloodstream, (ii) monocytes remain miseducated to differentiate into fully-functional NLC by CLL cells in ibrutinib-treated patients, and (iii) these NLC efficiently promote CLL survival.

Ibrutinib induces an egress of CLL cells from their resident tissue niches into the blood⁴, therefore we first wondered if such a re-localization would also be observed for NLC. We analyzed freshly-isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from ibrutinib-exposed relapsed CLL patients (420 mg/d). As shown in Figure 1a, CD14⁺ monocytes did not express the NLC marker CD163 at the time of blood sampling, similar to what has been shown in untreated patients¹⁰. This suggested that ibrutinib does not induce the egress of fully-differentiated NLC from niches, leaving a potential capacity for their interaction with residual CLL cells. We then cultured PBMCs from ibrutinib-treated patients to assess NLC morphology and phenotype at day 15. Indeed, *in vitro* culture of PBMC from CLL patients lead to the differentiation of monocytes in NLC. NLC morphology did not differ between ibrutinib-exposed and non-exposed PBMCs (not shown). Accordingly, the expression levels of many cell surface markers were comparable, including CD14, CD68, CD163, CD33 and CD11b^{10, 13} (Figure 1b). To investigate further, we determined the functional capacity of NLC *in vitro* generated from PBMC of ibrutinib-treated patients. Interestingly, NLC obtained *in vitro* from ibrutinib-treated patients promoted *in vitro* CLL cell survival (Figure 1c) as well as that of NLC from untreated patients (Figure 1d). Moreover, in the absence of NLC, CLL cells cultivated from ibrutinib-treated patients were more sensitive to apoptosis compared to CLL cells from untreated patients (Figure 1d). Altogether, these results show that ibrutinib treatment does not alter the capacity of CLL cells to induce monocyte differentiation into NLC, suggesting that this process is BTK-independent.

Next, we evaluated the chemoprotective effects of NLC from untreated patients against a variety of anti-leukemic agents: rituximab (10 µg/mL), bendamustin (10 µM), dasatinib (30 nM), idelalisib (4 µM), venetoclax (ABT-199) (0.5 nM) and ibrutinib (0.5 µM). After a week of coculturing patient CLL cell with NLC, CLL viability was measured. To make sure that the *in vitro* data were relevant, drug concentrations were chosen according to the maximum achievable concentrations reported in clinical trials. At these selected doses, apoptosis was detectable for all anti-leukemic agents when CLL cells were treated without NLC, with the expected inter-patient heterogeneity (Figure

RESULTATS

III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique

2a). However, apoptosis induced by ibrutinib was significantly rescued by co-culture of CLL cells with NLC, a protective effect that was not observed with rituximab, bendamustin, dasatinib, venetoclax or idelalisib (Figure 2a). Interestingly, this protective effect of NLC seemed to be dependent on the concentration of ibrutinib used. Indeed, in accordance with the results of Herman et al.¹¹, NLC were unable to protect CLL cells against a high concentration of ibrutinib (10 μ M) whereas at a clinically-relevant concentration (0.5 μ M) NLC induced ibrutinib resistance, as observed with a stromal cell line¹² (Figure 2b). Finally, we tested the combination efficacy of bendamustin (10 μ M) with idelalisib (4 μ M) or ibrutinib (0.5 μ M) on CLL cell death when cultured with or without NLC. The addition of idelalisib or ibrutinib improved cell death induced by bendamustin irrespective of NLC support (Figure 2c-d). Thus, the chemoprotective effect induced by NLC in ibrutinib-treated patients was lost upon co-treatment with bendamustin (Figure 2d).

Together, our *in vitro* experiments suggest that the pro-apoptotic effects of ibrutinib may be at least partially rescued by NLC present in the TME. Combination studies warrant further thorough analysis from *in vitro* co-culture studies since our data support recent clinical evidence of the superiority of R-bendamustine-ibrutinib combination treatment in relapsed patients. Furthermore, our results show that venetoclax, a Bcl-2 antagonist with cytotoxic effects against CLL cells, is active in the presence of NLC, suggesting that this compound can effectively replace bendamustin in combination studies.

RESULTATS

III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique

REFERENCES

1. Caligaris-Cappio F, Gottardi D, Alfano A, Stacchini A, Gregoret MG, Ghia P, *et al.* The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* 1993; **19**(3): 601-613.
2. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol* Dec; **34**(12): 592-601.
3. Pan Z, Scheerens H, Li SJ, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, *et al.* Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* 2007 Jan; **2**(1): 58-61.
4. Byrd JC, O'Brien S, James DF. Ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Sep; **369**(13): 1278-1279.
5. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Jul; **369**(1): 32-42.
6. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 1998 Apr; **91**(7): 2387-2396.
7. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999 Dec 1; **94**(11): 3658-3667.
8. Giannoni P, Scaglione S, Quarto R, Narcisi R, Parodi M, Balleari E, *et al.* An interaction between hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) prolongs the survival of chronic lymphocytic leukemic cells through STAT3 phosphorylation: a potential role of mesenchymal cells in the disease. *Haematologica* 2011 Jul; **96**(7): 1015-1023.
9. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000 Oct; **96**(8): 2655-2663.
10. Ysebaert L, Fournié JJ. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011 Jul; **52**(7): 1404-1406.
11. Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA, Pittaluga S, Chang S, Chang B, *et al.* Ibrutinib inhibits BCR and NF- κ B signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood* 2014 May; **123**(21): 3286-3295.

RESULTATS

III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique

12. Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, *et al.* BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia* 2014 Mar; **28**(3): 649-657.
13. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Feb; **99**(3): 1030-1037.

RESULTATS

III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique

FIGURE LEGENDS

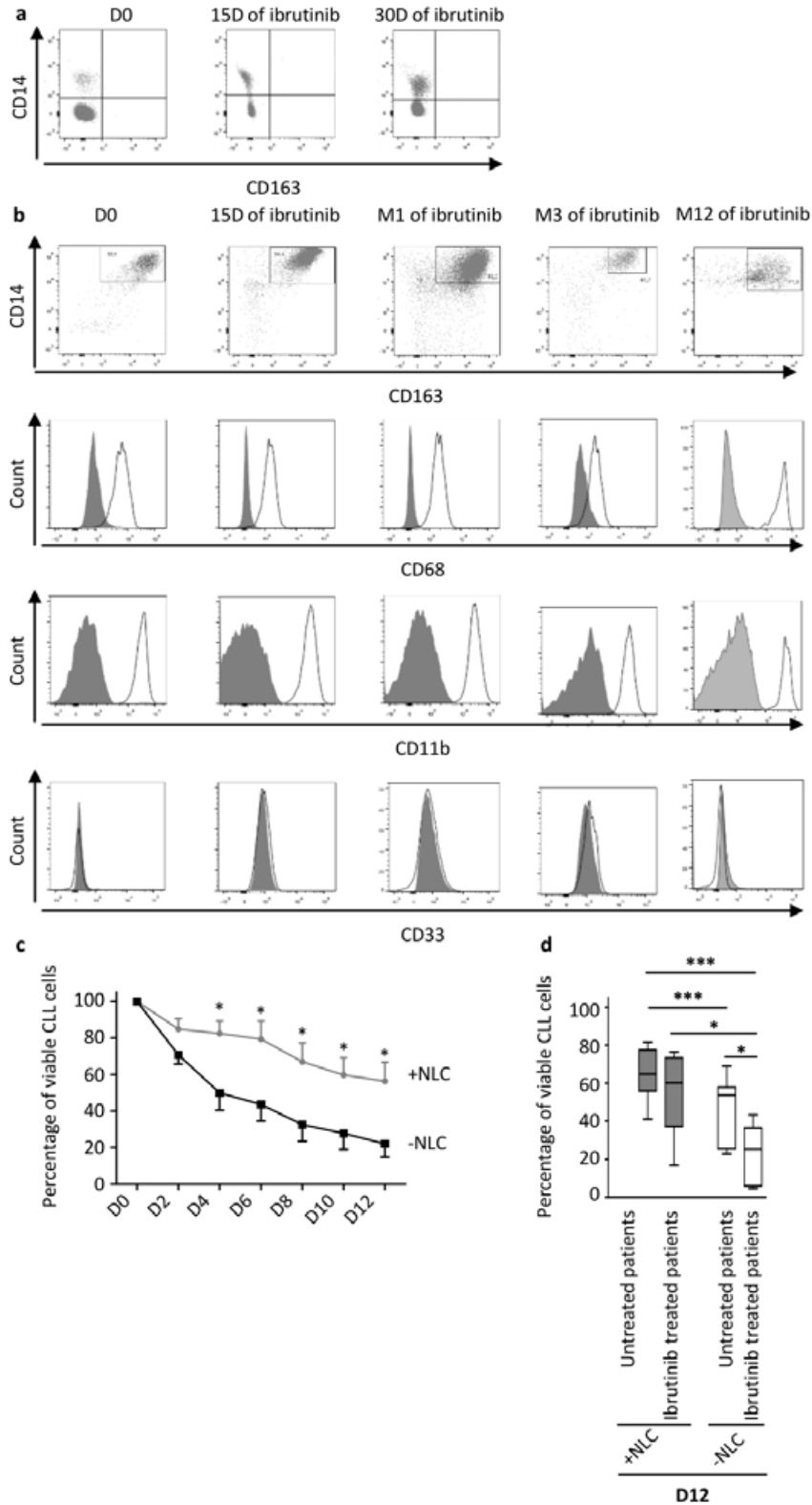
Figure 1: *In vivo* ibrutinib treatment does not hamper NLC phenotype and function. **A)** NLC were absent from the peripheral blood during ibrutinib treatment at the time of blood sampling (left: before ibrutinib treatment, center and right: 15 days and 30 days of ibrutinib treatment, respectively). (Representative results from 5 independent experiments). **B)** Flow cytometry analysis of the expression of CD14, CD163, CD68, CD11b and CD33 by NLC before (day 0, D0) or after ibrutinib treatment of the patient for the times shown (15 days or 1, 3, or 12 months), compared to isotype control (grey) after 15 days of differentiation. (Representative results from 5 independent experiments). **C)** Percentage viability of CLL cells from ibrutinib-treated patients when cultured alone (black line) or with their own NLC (grey line). (Data taken from 5 independent experiments). **D)** Percentage viability of CLL cells from untreated or ibrutinib-treated patients after 12 days of culture either alone or in the presence of NLC from untreated or ibrutinib-treated patients. (Data taken from 5 independent experiments for ibrutinib-treated patients, 7 independent experiments for untreated patients). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 2: NLC protect CLL cell survival against ibrutinib at clinical concentrations *in vitro*. **A)** Percentage viability of CLL cells after 7 days of culture either alone or in the presence of NLC treated or not (untreated, UT) with the indicated drugs. **B)** Percentage viability of CLL cells after 7 days of culture either alone or in the presence of NLC treated or not (UT) with ibrutinib at the indicated concentrations. (Data taken from 8 independent experiments for each indicated drug). **(C)** Percentage viability of CLL cells after 7 days of culture either alone or in the presence of NLC treated or not (UT) with bendamustin, idelalisib or both. (Data taken from 8 independent experiments for each indicated drug). **(D)** Percentage viability of CLL cells after 7 days of culture either alone or in the presence of NLC treated or not (UT) with bendamustin, ibrutinib or both. (Data taken from 8 independent experiments for each indicated drug). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

RESULTATS

III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique

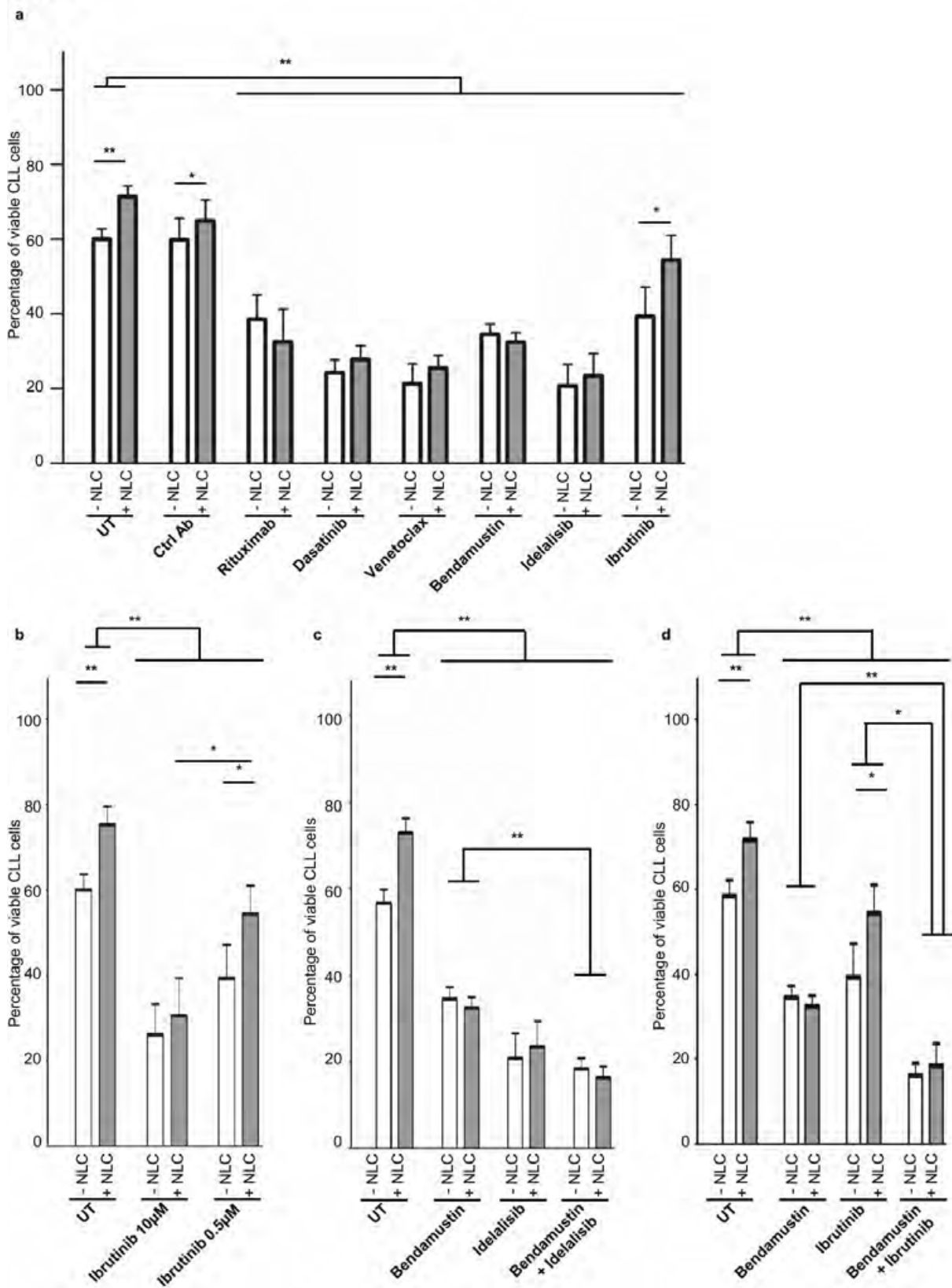
Figure 1



RESULTATS

III. Les « nurse-like » cells favorisent la résistance à l'ibrutinib dans la leucémie lymphoïde chronique

Figure 2



RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

IV. LFA-3 : facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

L'ensemble des résultats précédents présente les NLC comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour de nouveaux traitements dans la LLC. Comme nous l'avons vu précédemment, les NLC n'expriment pas de marqueur spécifique, la stratégie consistant à en faire une cible thérapeutique directe provoquerait sans doute de fortes toxicités. C'est pourquoi nous avons plutôt décidé de nous focaliser sur la perturbation des interactions entre NLC et cellules leucémiques.

Dans ce travail, nous avons tout d'abord observé l'influence du contact entre NLC et cellules leucémiques sur la survie de ces dernières. Nous avons ensuite mis en évidence les couples moléculaires potentiellement impliqués grâce à une approche transcriptomique. Puis nous avons confirmé l'implication des couples moléculaires ainsi obtenus et leurs influences sur la survie des cellules leucémiques cultivées avec des NLC et sur leurs voies de signalisation.

Ce travail fut présenté lors d'une conférence orale à Paris en 2014 lors de la Journée Jeune Expert de la LLC et lors de la session poster à l'ASH en 2014. Il est actuellement soumis à Blood.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

LFA-3: a new player in CLL cells survival.

Frédéric Boissard ^{1,2}, Jean-Jacques Fourmié ^{1,2}, Anne Quillet-Mary ^{1,2}, Loïc Ysebaert ^{1,2,3,*} and Mary Poupot ^{1,2}

¹ Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM UMR1037, Université Toulouse III Paul-Sabatier, ERL 5294 CNRS, Toulouse, France

² Laboratoire d'Excellence 'TOUCAN', Programme Hospitalo-Universitaire en Cancérologie CAPTOR, Institut Carnot Lymphome CALYM

³ Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopole, CHU de Toulouse, France

* These authors contribute equally to this work

Corresponding authors: Mary Poupot and Loïc Ysebaert.

2 avenue Hubert Curien Oncopole de Toulouse, CS53717, 31037, Toulouse, France.

ysebaert.loic@iuct-oncopole.fr, mary.poupot@inserm.fr

phone: +335 82 74 16 62, fax: +335 82 74 16 85.

Words count (Text): 3837

Table count: 0

Figures count: 7

Reference count: 47

Running Title: LFA-3 and CLL

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by an accumulation of monoclonal CD5⁺ mature B-cells in lymphoid tissues, bone marrow and peripheral blood ¹. Before circulating, CLL cells proliferate in proliferation centers of lymph nodes where they are in intimate proximity with the surrounding tumor microenvironment (TME) ²⁻⁴. The TME is critical for CLL cells survival including resistance to drug therapy ⁵. It consists of extracellular matrix, chemokines, cytokines, non-malignant cells including CD4⁺ helper T-cells ⁶, mesenchymal stromal cells ⁷ and monocyte-derived cells known as 'nurse-like cells', (NLC) ⁸. NLC represent in CLL the counterpart of tumour associated macrophages (TAMs) in solid cancer ^{9,10}. Like TAMs, NLC display a predominately M2 phenotype with the expression of CD14, CD11b, CD68, HLA class II and CD163 molecules ⁹⁻¹¹. In several cancers, TAMs are able to promote tumour cells survival in a direct manner ^{12,13} or through the immunomodulation of the immune system ¹⁴⁻¹⁶. Moreover, TAMs can induce tumour resistance to several chemotherapies including cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil and paclitaxel ¹⁷⁻¹⁹. In a lymphoma context, high lymphoma associated macrophages content in the microenvironment is associated with the aggressiveness of the disease ²⁰. Moreover, NLC infiltration in LNs is associated with CLL course disease ²¹. In long-term *in vitro* cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from CLL patients, NLCs have been shown to protect CLL cells from spontaneous apoptosis via CXCL12 ^{8,22} or the BAFF/ APRIL couple ²³, and indirectly via CCL3 or CCL4 ⁵. However, additional factors must be involved in this protection, when soluble factors only partially protect CLL cells from apoptosis.

We therefore hypothesized that in addition to soluble factors, contacts between CLL cells and NLC could be essential to support CLL cells survival *in vitro*. Indeed, some studies have shown in follicular lymphoma a supporting role of cell-cell interactions between lymphoma cells and lymphoma associated macrophages for the neoplastic B cells growth ^{20,24,25}. Moreover, TAMs protect both myeloma cell lines and primary myeloma cells from spontaneous and chemotherapy drug-induced apoptosis in a strict contact dependant manner ²⁶. In CLL, one controversial study showed a contribution of the CD38 binding to CD31 expressed by NLC, to the anti-apoptotic state of CLL cells ^{27,28}. Thus, contribution of CLL cells - NLC interactions to the CLL cells survival remains unclear.

In this study, we investigated these interactions at a molecular level. First, we used an approach based on a gene's transcriptomic screening of surface molecules on NLC and CLL cells. We found that the LFA-3 (lymphocytes function-associated antigen 3)/CD2 axis was involved in the CLL cells survival in an AKT-dependant pathway, when other couples as LFA-1/ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) or CD38/CD31 were not involved in the sustaining of CLL cells survival. Then, we wondered if the level of LFA-3 expression

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

by CLL cells could be correlated to the overall survival. Actually, we showed that LFA-3 was more expressed by CLL cells compared to healthy B lymphocytes and that high level of soluble LFA-3 in the serum of patients with CLL was associated with a shorter overall survival.

These novel finding demonstrate the importance of the LFA-3 molecule for the CLL cells survival through protective interactions with CD2 on NLC and its high release in serum of patients with a bad prognosis.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

MATERIALS AND METHODS

Cells preparation and culture

Blood samples were obtained after informed consent and stored at the HIMIP collection. According to the French law, HIMIP collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1) and obtained a transfer agreement (AC 2008-129) after approbation by the "Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II" (ethical committee). Clinical and biological annotations of samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés, i.e. Data processing and Liberties National Committee).

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), isolated by density-gradient centrifugation from blood samples of CLL patients or healthy donors (HD). To generated NLC, Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from CLL patients were cultured (10^7 /mL) as previously described⁸. Before each experiments, CLL cells were separated from NLC by vigorous pipetting (purity of CLL cells and NLC checked by flow cytometry). When NLC were analyzed, they were collected using scraper.

Determination of IGHV status, FISH abnormalities and recurrent mutations

Fluorescence in situ hybridization (FISH) and IgHV mutational analysis, were realized at the University Hospital of Purpan,

The mutation hotspots of the *TP53* (exons 4-9; RefSeq NM_000546.5), *SF3B1* (exons 14, 15, 16; RefSeq NM_012433.2) and *NOTCH1* (exon 34; RefSeq NM_017617.2) genes were screened by polymerase chain reaction (PCR), followed by high resolution fusion in 10 μ L on a LightCycler LC 480 (Roche, Basel, Switzerland) (details of primers are provided in Supplemental Table 1). For *TP53* and *SF3B1*, recurrent mutations were validated by Sanger sequencing (3130 XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA) of positive amplicons. For patients with a 17p deletion, *TP53* Sanger sequencing was systematically performed. The recurrent mutation delCT of *NOTCH1* (c.7544_7545delCT) was validated by capillary electrophoresis of amplicons. *TP53* mutations and/or *TP53* deletion were pooled together as *TP53* alterations.

CLL cells viability

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

After 15 days of culture of PBMC from CLL patients, CLL cells, at 10^6 /mL, were co-cultured with NLC, alone or isolated by a Transwell membrane (Corning, NY, USA) to NLC or in the presence of drugs or blocking antibodies according to the experiment. Every couple of days or after 7 days of co-culture, CLL cells were counted and viability was measured (propidium iodure).

Reagents and blocking antibodies

Cytochalasin D, SU6656, LY-294002 and wortmaninn (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used at 10 μ M, 1 μ M, 1 μ M and 10 μ M respectively. Blocking antibody anti-CD2 (clone TS2/18), anti-CD31 (clone HEC7), anti-ICAM-1 (clone W-CAM-1), anti-LFA-3 (clone TS2/9) and relevant isotype controls were purchased from Thermofisher (Villebon sur Yvette, France) and used at 10 μ g/mL. All reagents, blocking antibodies were pre-incubated 30 minutes with CLL cells before the experiment.

Flow cytometry

Cells were labelled with 5 μ g/ml of antibodies or isotype controls for 20 minutes at 4°C and analyzed on a LSRII cytometer (BD Biosciences, Pont de Claix, France). Data were analyzed using BD FACSDiva software, FlowJo software or Cytobank software (<https://www.cytobank.org/cytobank/>).

PC7 anti-CD5, APC-Cy7 anti-CD14, APC anti-CD163, FITC anti-CD2 and the relevant isotype controls were purchased from Ozyme (France); APC-Cy7 anti-CD19, Alexa-fluor 647 anti-CD31, PE anti-LFA-1 and their relevant isotype controls were from BD Pharmigen (France); PE anti-CD38, PE anti-ICAM-1, PE anti-LFA-3 and their relevant isotype controls were from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA); APC-Cy7 anti-CD3 and this relevant isotype control were from Tonbo Biosciences (San Diego, CA, USA).

Trogocytosis experiments

PBMC from CLL patient were cultured 15 days on a LAB TECH II Chamber Slide (NUNC, NY, USA), at 10^6 /mL in 500 μ L. CLL cells were discarded then stained with CMTMR (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and adherent NLC were stained with PKH67 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instruction manual. PKH67⁺ NLC and CMTMR⁺ CLL cells (0.4×10^6) were co-culture 5 min or 4 hours in the presence or not of different inhibitors or blocking antibodies, at 37°C or at 4°C. Then, cells were analyzed by flow cytometry or fixed with PBS containing 4% p-formaldehyde, washed and mounted in PBS containing 90%

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

glycerol and 2% 1-4-diazabicyclooctane (DABCO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to be examined using a Carl Zeiss LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss, Mary le Roi, France).

Gene expression analysis and data mining

The raw data (Affymetrix CEL files), previously produced in the laboratory using HG U133-Plus 2.0 platform from 19 samples of purified NLC (>90% purity) and from 5 samples of CD14⁺ monocytes freshly isolated from blood of healthy individuals ²⁹, were together normalized in batch with the RMA software. The 54,676 probe sets were then reduced to a total of 20,606 genes (HUGO symbols) by using the GSEA's collapse function set on maximal probe mode (GSEA, <http://www.broadinstitute.org/gsea>). After log (base 2) transformation, normalization and collapse, the expression level of different adhesion molecules were analyzed. 52 additional raw data files were downloaded from the NCBI repository GEO database. These comprised datasets from 41 untreated CLL patients and 11 age-matched control subjects ([GSE22529](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE22529)) ³⁰. Altogether, the 52 raw data were normalized, reduced, transformed, collapsed and analyzed with the same method described above. Lists from KEGG who described adhesion phenomenon (KEGG adherent junctions, KEGG cell adhesion molecules, KEGG focal adhesion, KEGG gap junctions and KEGG tight junctions) were downloaded from <http://www.genome.jp/kegg/>.

Phosphoflow analysis

0.4x10⁶ CLL cells, pre-treated or not with a blocking antibody, are co-cultivate 4h with NLC in 500µL complete culture medium, at 37°C. Then, CLL cells were washed, fixed with 2% paraformaldehyde and permeabilized with 1% saponin plus 5% bovine serum albumin (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) prior to washing. Both PC7 anti-CD5, Ozyme (France), APC-Cy7 anti-CD19 (BD Pharmigen, France) and conjugated phosphoprotein-specific antibodies (Alexa Fluor 647 anti-AKT1, PE anti-AKT (pT308), and V450 anti-AKT (pS473)) were added for 30 min at room temperature. Cells were then washed and analyzed with a LSRII cytometer (BD Biosciences).

Serum collection and ELISA

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Sera used were obtained from patients. Peripheral blood samples were drawn using BD Vacutainer (BD Biosciences), and serum was collected after centrifugation and stored at -80°C before use. ELISA from soluble LFA-3 (sLFA-3) (Cusabio, Wuhan, Hubei Province, China) was realized according to the manufacturer recommendations on Patient's serum or on age matched healthy donors' serum.

Statistics

Data shown represent mean \pm SEM with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. Data of transcriptomic analysis were analyzed using unpaired two-tailed Student's t-test with a Welsh correction. Cell viability was analyzed using a paired two-way Anova test. Data of trogocytosis experiments were analyzed using paired two-tailed Student's t-test. CLL cell survival experiments were analyzed using paired one-tailed Student's t-test.

The overall survival post-treatment (OS) was defined as the time from the first treatment to the date of death if patients died or censored on the last visit. OS post treatment were estimated by the method of Kaplan-Meier and assessed by the log-rank test.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

RESULTS

NLC protect CLL cells from *in vitro* apoptosis in a contact dependent manner

The protective effect of NLC for CLL cells survival *in vitro* was shown as partially explained by soluble factors (SDF1, CCL3, CCL4,) produced by NLC ^{5,8}. To go further in the elucidation of the mechanism, we investigated if CLL survival was also dependent on the contact with NLC. Thus, we performed co-cultures of CLL cells, isolated from patients, with NLC separated or not by a Transwell membrane. NLC were obtained beforehand by an *in vitro* culture of PBMC from CLL patients ¹⁰. We measured the viability percentage of CLL cells every two days for 12 days. As expected, the presence of NLC in the culture increased the viability of CLL cells; however their separation with a Transwell membrane led to a decreased of the viable CLL cells percentage (Figure 1). Thus, in addition to protective soluble factors production, NLC protect CLL cells from apoptosis in a contact dependent manner.

Then, in order to determine the molecular mechanism of this pro-survival interaction, we analyzed first the strength of the contact between CLL cells and NLC. For this purpose, we used the trogocytosis test which reflects specific and strong interactions between two cells through an exchange of membrane patches between the two cells. To analyze this exchange, after 14 days of culture of CLL patient's PBMC, CLL cells were discarded from the culture and labeled with the intracellular red marker, CMTMR. NLC which were adherent to the bottom of the well, were stained with the stable green membrane marker, PKH-67. After co-culture of red CLL cells and green NLC, acquisition of green PKH-67 by CLL cells from PKH-67⁺ NLC was analyzed by confocal microscopy and flow cytometry. We showed an acquisition of green fluorescence (increase of PKH-67 MFI) by CLL cells after 4h of contact with PKH-67⁺ NLC while no transfer were visualized after only 5 min. This was visualized by confocal microscopy (Figure 2A) and measured by flow cytometry (Figure 2B). Then, we performed the same experiment with a pretreatment with different inhibitors known to prevent trogocytosis. Actually, trogocytosis is an active phenomenon dependent on the actine cytoskeleton, the PI3K signaling and the temperature ^{31,32}. We showed here, a decrease of PKH67 MFI expressed by CLL cells after 4h of co-culture with NLC at 4°C or in the presence of cytochalasin D or SU6636 but no impact of the treatment by LY294002 or wortmaninn (Figure 2C and 2D). Trogocytosis of NLC by CLL cells is thus dependent on src kinases and actin polymerization but independent on PI3K.

CLL cells are thus protected from *in vitro* apoptosis by NLC and are able to trogocyte NLC.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Contact between NLC and CLL cells is LFA-3 dependent

Regarding the strong and specific interactions between CLL cells and NLC, we analyzed the molecular determinants involved in these interactions. For this purpose, we began by searching molecules expressed on cell membrane involved in adhesion phenomenon, particularly high expressed by NLC and CLL cells by a gene's transcriptomic screening. First, we compared the gene expression profile from NLC to that of monocytes from healthy donors ²⁹ and the gene expression profile of CLL cells to that of healthy B lymphocytes isolated from PBMC from healthy donors from Gutierrez work ([GSE22529](#)) ³⁰. For NLC/monocytes, transcriptome encompassed 3708 genes differentially expressed and for CLL/ B lymphocytes, 5271 genes ($p < 0.05$) (Figure 3A and 3B). Among these genes, applying a fold change (\log_2) above 1.25 and a comparison with a KEGG list based on adhesion phenomena's, 66 genes for NLC/monocytes and 12 genes for CLL/ B lymphocytes were found differentially expressed. Finally, among these adhesion-related genes, we selected only those corresponding to membrane proteins, ie 27 genes for NLC/monocytes and 3 genes for CLL/B lymphocytes. Then, we selected among these proteins, those of the receptor/ligand couples possibly involved in the NLC/CLL cells interaction as VCAM1, CD28, CD31 (PECAM-1 gene), LFA-1 (SELPLG gene), CD2, CD86, CTLA4, CD62 (SELP gene), LFA-3 (CD58 gene) (Supl table 2), and added other adhesion molecules described in the literature as found expressed by NLC and/or CLL cells such as OX40/OX40L ³³ and CD40/CD40L ³⁴. By the flow cytometry analysis, we found the membrane expression of ICAM-1/LFA-1 and CD38/CD31 couples on the two cell types, while CD2 was expressed only by NLC and its ligand LFA-3 only by CLL cells (Figure 3C). In order to determine which of these couples is really involved in the strong NLC/CLL cells interaction, we used blocking antibodies. We compared then, trogocytosis of PKH-67⁺ NLC by CLL cells in the presence or not of blocking antibodies specific to LFA-3 or ICAM-1 or CD31 or to the respective isotype control. We found that PKH67 MFI expressed by CLL cells after 4 hours of contact, decreased significantly in the presence of anti-LFA-3 compared to the control antibody (Figure 4A) while blocking of ICAM-1 or CD31 didn't affect trogocytosis (Figure 4B and 4C). LFA-3 is thus involved in the interaction between NLC and CLL cells while ICAM-1 and CD31 are not.

NLC protect CLL cells from apoptosis by contact through the interaction between LFA-3 and CD2

Since NLC protect CLL cells from apoptosis in a contact dependant manner, we asked if LFA-3 was essential in sustaining CLL cells survival by NLC. We tested CLL cells viability in the presence of NLC and a LFA-3 blocking antibody. Surprisingly the addition of the anti-LFA-3 antibody totally inhibited the pro-survival effect of NLC on CLL cells (Figure 5A). Indeed, as expected ICAM-1 or CD31 blocking didn't affect the CLL cells survival with or without NLC (Figure 5B and 5C). CD2 being the receptor of LFA-3, we analyzed the

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

impact of the CD2 blocking on the CLL cells viability in contact with NLC. The figure 6D shows a strictly identical decrease of the viable CLL cells percentage either with anti-LFA-3 or with anti-CD2 compared to the control antibody or the untreated conditions. In addition, we checked the non-toxicity of the anti-LFA-3 antibody to healthy PBMC by the measure of the viability percentage of B lymphocytes, CD4 T and CD8 T lymphocytes cultivated for seven days in the presence of the anti-LFA-3 antibody (Figure 5E).

NLC protect partially CLL cells from apoptosis thanks to a contact through the interaction between LFA-3 and CD2.

LFA-3 induce AKT phosphorylation on S473 in CLL cells during the contact with NLC

AKT being activated during the protection against apoptosis of CLL cells by NLC ^{8,23}, we analyzed by flow cytometry the phosphorylation level of AKT in CLL cells following the blocking of NLC / CLL cells interactions with the anti-LFA-3. The figure 6A shows a basal expression of AKT and p-AKT in CLL cells alone which is not modified by the presence of the anti-LFA-3 antibody or by the contact with NLC for 4 hours (Figure 6B, untreated condition: UT). However, LFA-3 blocking in the co-culture NLC / CLL cells induced a decrease of the expression in CLL cells of p-AKT on S473 but not on T308, reflecting a decrease of AKT activation (Figure 6B). As expected, blocking of ICAM-1 or CD31 didn't decrease the AKT activation after 4 hours of contact (Figure 6C and 6D). NLC also protecting CLL cells against apoptosis through the activation of ERK ²³ or the BCR pathways ⁵. However, we showed that blocking of LFA-3, ICAM-1 and CD31 didn't affect the BTK, SYK or ERK activation with no modification of the expression by CLL cells of p-BTK, p-SYK or p-ERK after 4 hours of contact with NLC, indicating that the ERK and BCR pathways are not involved (Supl figure 1).

Altogether, our results showed that LFA-3 and CD2 interaction orchestrate the pro-survival effect of NLC on CLL cells through an AKT-dependant pathway.

CLL patients with high level of soluble LFA-3 in serum are associated with poor overall survival post-treatment.

LFA-3 can be released as a soluble factor with a modified rate in some pathology such as Hodgkin lymphomas or hepatitis ³⁵. We tested thus the LFA-3 rate in CLL patients and analyzed its clinical impact. First, we compared the membrane expression of LFA-3 by CLL cells to that of healthy B lymphocytes. We found that CLL cells of 40 patients expressed much more LFA-3 than healthy B lymphocytes (Figure 7A). Moreover, this expression was not correlated with established prognosis markers such as Binet stage, karyotype abnormalities and IgHV status (not shown).

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Then, we analyzed the amount of soluble LFA-3 (sLFA-3) in the serum of 71 untreated CLL patients (described in Supp table 3 and 4) compared to the serum of age-matched healthy donors. The figure 7B shows no significant difference of sLFA-3 concentration in serum of CLL patients compared to healthy donors. However, association analysis between sLFA-3 levels and previously established prognostic markers revealed only a correlation between high level of sLFA-3 and del(17p) (Supl table 5).

Out of the 71 patients included in our study, 60 required treatment according to IWCLL2008 criteria for active disease. At the time of therapy, overall survival post-treatment (OS) was calculated from day 1 cycle 1. We used a ROC analysis to study which threshold of soluble factor level better defined prognosis and determined this at 16.7 ng/mL. Then, log rank test showed that patients with high level of sLFA-3 presented a significantly shorter OS post-treatment than patients with low level ($p= 0.0422$) (Figure 7C).

LFA-3 is thus more expressed by CLL cells compared to healthy B lymphocytes and high level of sLFA-3 is associated with a bad prognosis for CLL patients.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

DISCUSSION

NLC, specific TAM in CLL disease, were found to sustain partially CLL cells survival through soluble factors as CXCL12^{8,22} or BAFF and APRIL²³. To go further in the defining of the mechanism of the pro-survival effect of NLC, we investigated the interactions between NLC and CLL cells and their molecular determinants. First, we showed that separation of NLC from CLL cells by a Transwell system led to a decrease of the CLL cells survival in *in vitro* culture. Actually, strong and specific interactions revealed by trogocytosis of NLC by CLL cells were involved in the protection of CLL cells against *in vitro* apoptosis. So, we searched the molecular determinants of these interactions with a gene's transcriptomic screening of surface molecules on NLC and CLL cells. We focused on adhesion-related genes and found up-regulation of several genes in NLC vs healthy monocytes and in CLL cells vs healthy B lymphocytes corresponding to different adhesion molecules. Analysis by flow cytometry of the proteins expression revealed a co-expression by NLC and CLL cells of the LFA-1/ICAM-1 and CD38/CD31 couples, and an expression of LFA-3 by CLL cells and CD2 by NLC. However, the only blockade of LFA-3 or CD2 had an impact on the CLL survival. Actually, blockade with an antibody against LFA-3 decreased the contact between CLL cells and NLC and antagonized the pro-survival effect of NLC on CLL cells *in vitro* when blockade of ICAM-1 or CD31 had no impact on the viability of CLL cells. Indeed, we didn't find the contribution of the interaction CD38/CD31 as previously described²⁷. Interestingly, LFA-3 blocking totally inhibited the pro-survival effect of NLC on CLL cells suggesting that soluble factors which were described as involved in the survival mechanism^{9,22,23} might be produced following the contact between CLL cells and NLC.

CD2 / LFA-3 interaction was already described in the literature as crucial in the immune responses and notably in the stabilisation of the immune synapse between T lymphocytes and antigen presenting cells or in the natural killer cells cross-talk, essential to their effector functions development³⁶⁻³⁸. However, it's the first time that interactions between CLL cells and NLC through LFA-3 / CD2 were shown as involved in the protection of the CLL cells survival. CLL cells over-expressing LFA-3, their binding with NLC could therefore be facilitated and could also contribute to the reduction of the engagement of CLL cells in the immunological synapse with T cells reinforcing the deficiency of effector T cells cytotoxic effect in CLL^{39,40}.

Furthermore, LFA-3 can be shaved from the surface by specific phospholipases⁴¹ but its level in the serum of patients was not correlated in our cohort with the lymphocytosis. However, we found a correlation between high level of sLFA-3 and shorter OS post-treatment which might be link to the immunosuppressive properties of this factor inhibiting T cell proliferation as described in the literature⁴²⁻⁴⁴. High sLFA-3 concentration was already found increased in patients with liver cirrhosis and with hepatocellular carcinomas compared to healthy

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

donors ⁴⁵, while insufficient release of this molecule in patients with rheumatoid arthritis might result in T cell accumulation and perpetuation of inflammation ⁴⁶. LFA-3 could be thus considered as a natural inhibitor of T-cell activation in CLL pathology as demonstrated in Hodgkin's disease ⁴⁷.

In conclusion, our results demonstrated an important role of LFA-3 in CLL with the correlation of its level in the serum of patients and a bad prognosis, and its involvement in the pro-survival interactions with NLC. Despite the lack of specificity of LFA-3, neutralizing NLC in CLL is still a promising runway to find news therapeutic target in CLL.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Acknowledgments

This work was funded by the LABEX project (Investissements d'Avenir ANR11-PHUC001).

Authorship Contributions

FB realized all the experiments. LY and AQM collected and processed the clinical sample. JJF participated to the design of experiments. MP and LY supervised this study, designed experiments and wrote the manuscript.

Conflicts of Interest Disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

REFERENCES

1. Caligaris-Cappio F, Gottardi D, Alfarano A, et al. The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells*. 1993;19(3):601-613.
2. 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):2387-2396.
3. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. 1999;94(11):3658-3667.
4. Bertilaccio MT, Scielzo C, Muzio M, Caligaris-Cappio F. An overview of chronic lymphocytic leukaemia biology. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(1):21-32.
5. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood*. 2009;113(13):3050-3058.
6. Patten PE, Buggins AG, Richards J, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*. 2008;111(10):5173-5181.
7. Giannoni P, Scaglione S, Quarto R, et al. An interaction between hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) prolongs the survival of chronic lymphocytic leukemic cells through STAT3 phosphorylation: a potential role of mesenchymal cells in the disease. *Haematologica*. 2011;96(7):1015-1023.
8. 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):2655-2663.
9. Ysebaert L, Fournié JJ. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(7):1404-1406.
10. Boissard F, Fournié JJ, Laurent C, Poupot M, Ysebaert L. Nurse Like Cells: Chronic Lymphocytic Leukemia Associated Macrophages. *Leuk Lymphoma*. 2015:1-8.
11. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(3):1030-1037.
12. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

13. Qian BZ, Li J, Zhang H, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;475(7355):222-225.
14. Elger KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol*. 1998;64(3):275-290.
15. Kelly GL, Strasser A. The essential role of evasion from cell death in cancer. *Adv Cancer Res*. 2011;111:39-96.
16. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, et al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med*. 2006;203(4):871-881.
17. Paulus P, Stanley ER, Schäfer R, Abraham D, Aharinejad S. Colony-stimulating factor-1 antibody reverses chemoresistance in human MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 2006;66(8):4349-4356.
18. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov*. 2011;1(1):54-67.
19. Shree T, Olson OC, Elie BT, et al. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev*. 2011;25(23):2465-2479.
20. Byers RJ, Sakhinia E, Joseph P, et al. Clinical quantitation of immune signature in follicular lymphoma by RT-PCR-based gene expression profiling. *Blood*. 2008;111(9):4764-4770.
21. Jia L, Clear A, Liu FT, et al. Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(11):1709-1719.
22. Burger M, Hartmann T, Krome M, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005;106(5):1824-1830.
23. Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*. 2005;106(3):1012-1020.
24. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*. 2005;106(6):2169-2174.
25. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004;351(21):2159-2169.
26. Zheng Y, Cai Z, Wang S, et al. Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood*. 2009;114(17):3625-3628.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

27. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, et al. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood*. 2005;105(8):3042-3050.
28. Tonino SH, Spijker R, Luijckx DM, van Oers MH, Kater AP. No convincing evidence for a role of CD31-CD38 interactions in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(3):840-843.
29. Fruchon S, Poupot M, Martinet L, et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bioactive dendrimer. *J Leukoc Biol*. 2009;85(3):553-562.
30. Gutierrez A, Tschumper RC, Wu X, et al. LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is expressed in the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood*. 2010;116(16):2975-2983.
31. Aucher A, Magdeleine E, Joly E, Hudrisier D. Capture of plasma membrane fragments from target cells by trogocytosis requires signaling in T cells but not in B cells. *Blood*. 2008;111(12):5621-5628.
32. Lis R, Capdet J, Mirshahi P, et al. Oncologic trogocytosis with Hospicells induces the expression of N-cadherin by breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2010;37(6):1453-1461.
33. Biagi E, Dotti G, Yvon E, et al. Molecular transfer of CD40 and OX40 ligands to leukemic human B cells induces expansion of autologous tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 2005;105(6):2436-2442.
34. Zaborsky N, Holler C, Geisberger R, et al. B cell receptor usage correlates with the sensitivity to CD40 stimulation and the occurrence of CD4+ T cell clonality in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2015.
35. Hoffmann JC, Dengler TJ, Knolle PA, et al. A soluble form of the adhesion receptor CD58 (LFA-3) is present in human body fluids. *Eur J Immunol*. 1993;23(11):3003-3010.
36. Espagnol N, Depoil D, Zaru R, et al. CD2 and TCR synergize for the activation of phospholipase Cgamma1/calcium pathway at the immunological synapse. *Int Immunol*. 2007;19(3):239-248.
37. Kim EO, Kim TJ, Kim N, Kim ST, Kumar V, Lee KM. Homotypic cell to cell cross-talk among human natural killer cells reveals differential and overlapping roles of 2B4 and CD2. *J Biol Chem*. 2010;285(53):41755-41764.
38. Gokhale A, Weldeghiorghis TK, Taneja V, Satyanarayanajois SD. Conformationally constrained peptides from CD2 to modulate protein-protein interactions between CD2 and CD58. *J Med Chem*. 2011;54(15):5307-5319.
39. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2427-2437.
40. Ramsay AG, Gribben JG. Immune dysfunction in chronic lymphocytic leukemia T cells and lenalidomide as an immunomodulatory drug. *Haematologica*. 2009;94(9):1198-1202.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

41. Kirby AC, Cahen P, Porter SR, Olsen I. Soluble and cell-associated forms of the adhesion molecule LFA-3 (CD58) are differentially regulated by inflammatory cytokines. *Cell Adhes Commun.* 2000;7(6):453-464.
42. Yamashita K, Parish CR, Warren HS, Harrison LC. A multimeric form of soluble recombinant sheep LFA-3 (CD58) inhibits human T-cell proliferation. *Immunology.* 1997;92(1):39-44.
43. Yamashita K, Kakutani T, Ohashi T, Saibara T. A dimeric form of soluble recombinant sheep LFA-3(CD58) inhibits human T-cell proliferation by generating regulatory T cells. *Immunopharmacology.* 1997;37(2-3):209-220.
44. Sultan P, Schechner JS, McNiff JM, et al. Blockade of CD2-LFA-3 interactions protects human skin allografts in immunodeficient mouse/human chimeras. *Nat Biotechnol.* 1997;15(8):759-762.
45. Hoffmann JC, Bahr MJ, Tietge UJ, et al. Detection of a soluble form of the human adhesion receptor lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) in patients with chronic liver disease. *J Hepatol.* 1996;25(4):465-473.
46. Hoffmann JC, Räuher HJ, Krüger H, Bayer B, Zeidler H. Decreased levels of a soluble form of the human adhesion receptor CD58 (LFA-3) in sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1996;14(1):23-29.
47. Roux M, Schraven B, Roux A, Gamm H, Mertelsmann R, Meuer S. Natural inhibitors of T-cell activation in Hodgkin's disease. *Blood.* 1991;78(9):2365-2371.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

FIGURES LEGEND

Figure 1: NLC protect CLL cells from *in vitro* apoptosis in a contact dependent manner. Viability percentage of CLL cells cultured alone (●) or with NLC separated with a Transwell (Tw) membrane (■) or not (▲) for 12 days (7 independent experiments).

Figure 2: Strong and specific interactions between NLC and CLL cells dependent of Src kinases and actin polymerisation. PKH-67 (green) acquisition by CLL cells (red) after 5 min or 4h of contact with PKH67⁺ NLC observed: **A.** by confocal microscopy at 37°C (left: 5 min of contact, right: 4 h of contact), **B.** by flow cytometry at 37°C (ratio of PKH67 MFI at 4 hour vs PKH67 MFI at 5 min, 11 independent experiments), **C-D.** by flow cytometry at 4°C or in the presence of different inhibitors (**C:** one representative experiment. **D:** 9 independent experiments, ratio PKH67 MFI at 4h with inhibitor treatment vs PKH67 MFI at 4h without treatment (UT)).

Figure 3: Expression of adhesion membrane proteins by NLC and CLL cells. Gene's transcriptomic screening of molecules expressed on cell membrane involved in adhesion phenomenon. Based on KEGG list of adhesion phenomenon, comparison of genes of NLC (from 19 CLL patients) to genes of healthy donors (HD) monocytes (from 5 healthy donors) (**A**) and genes of CLL cells (from 41 CLL patients) to genes of HD B lymphocytes (from 11 healthy donors) (**B**). Flow cytometry analysis of adhesion molecules expressed by NLC (upper) and by CLL cells (lower) (**C**).

Figure 4: LFA-3 is involved in the NLC / CLL cells contact. Representative experiment (left) or cumulative histogram (right) of PKH67 acquisition by CLL cells treated or not (UT) by blocking antibodies or by respective isotypic control antibodies (ctrl Ab) after 5 min or 4h of contact with PKH67⁺ NLC, measured by flow cytometry (ratio PKH67 MFI vs PKH67 MFI UT 5 min). **A.** anti-LFA3 (12 independent experiments). **B.** anti-ICAM-1 (10 independent experiments). **C.** anti-CD31 (10 independent experiments).

Figure 5: NLC protect CLL cells from apoptosis by contact through LFA-3. Viability percentage of CLL cells after 7 days of culture alone or in the presence of NLC treated or not (UT), by a blocking antibody (anti-LFA-3 (**A**), anti-ICAM-1 (**B**) or anti-CD31 (**C**)) or the respective control antibody (8 independent

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

experiments). (D) Viability percentage of CLL cells after 7 days in culture with NLC treated or not (UT) by blocking antibody (anti-LFA-3 or anti-CD2) or the respective control antibody (8 independent experiments). (E) Viability percentage of B lymphocytes (left), T CD4⁺ (center) or T CD8⁺ cells (right) for 7 days of culture treated or not (UT) by blocking anti-LFA-3 or the control antibody (4 independent experiments).

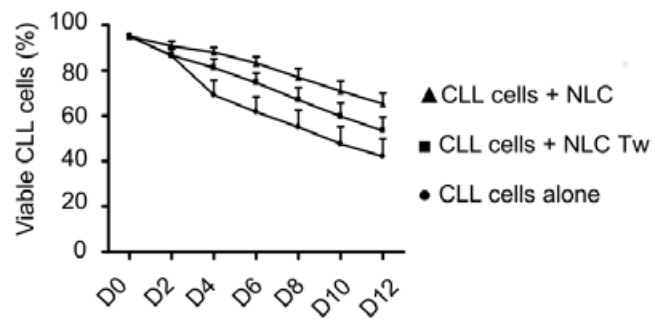
Figure 6: Contact of CLL with NLC through LFA-3 is dependent on AKT phosphorylation on S473 in CLL cells. A. Expression of signalling proteins by CLL cells alone treated or not (UT) by a blocking anti-LFA-3 or the control antibody, measured by flow cytometry and compared to the respective isotopic control (IC). Expression of signaling proteins by CLL cells after a 4 hours of contact with NLC treated or not (UT) by anti-LFA-3 (B), anti-ICAM-1 (C) or anti-CD31 (D), or with the respective control antibody (B,C,D), measured by flow cytometry and compared to the respective isotopic control (IC). Greyscale bar: MFI.

Figure 7: High level of soluble LFA-3 in serum of CLL patients associated with poor overall survival. A. Expression of membrane LFA-3 by B lymphocytes of healthy donors (B-HD, n = 25) and by CLL cells (n = 40) measured by flow cytometry (ratio: LFA-3 MFI / isotopic control MFI). B. Elisa test of soluble LFA-3 in serum from healthy donors (n = 9) or CLL patients (n = 71). C. Kaplan-Meier curves showing the probability of overall survival since the first treatment. CLL patients were divided into two groups according to the level of sLFA-3 (cut-off = 16.7 ng/mL): low sLFA-3 (blue) and high sLFA-3 (red).

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

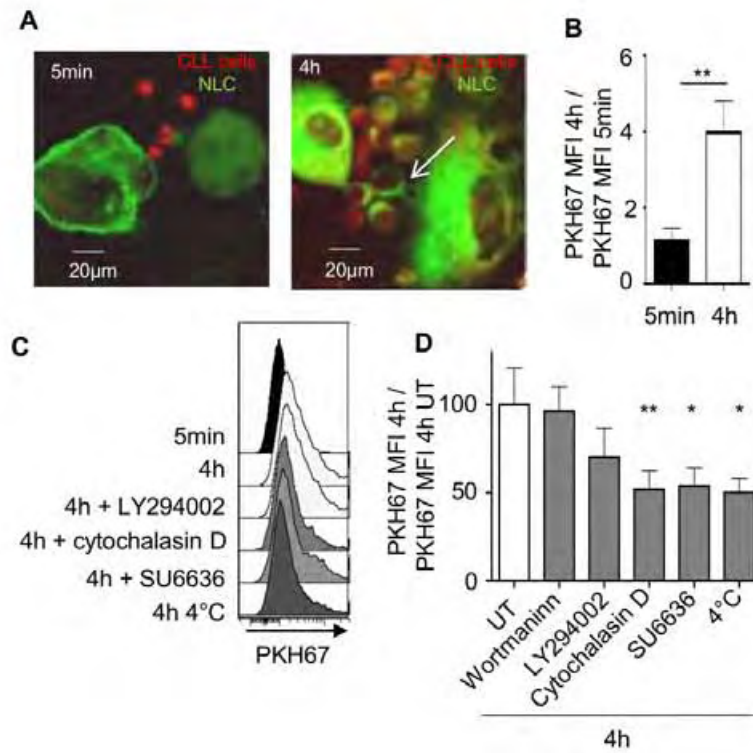
Figure 1



RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

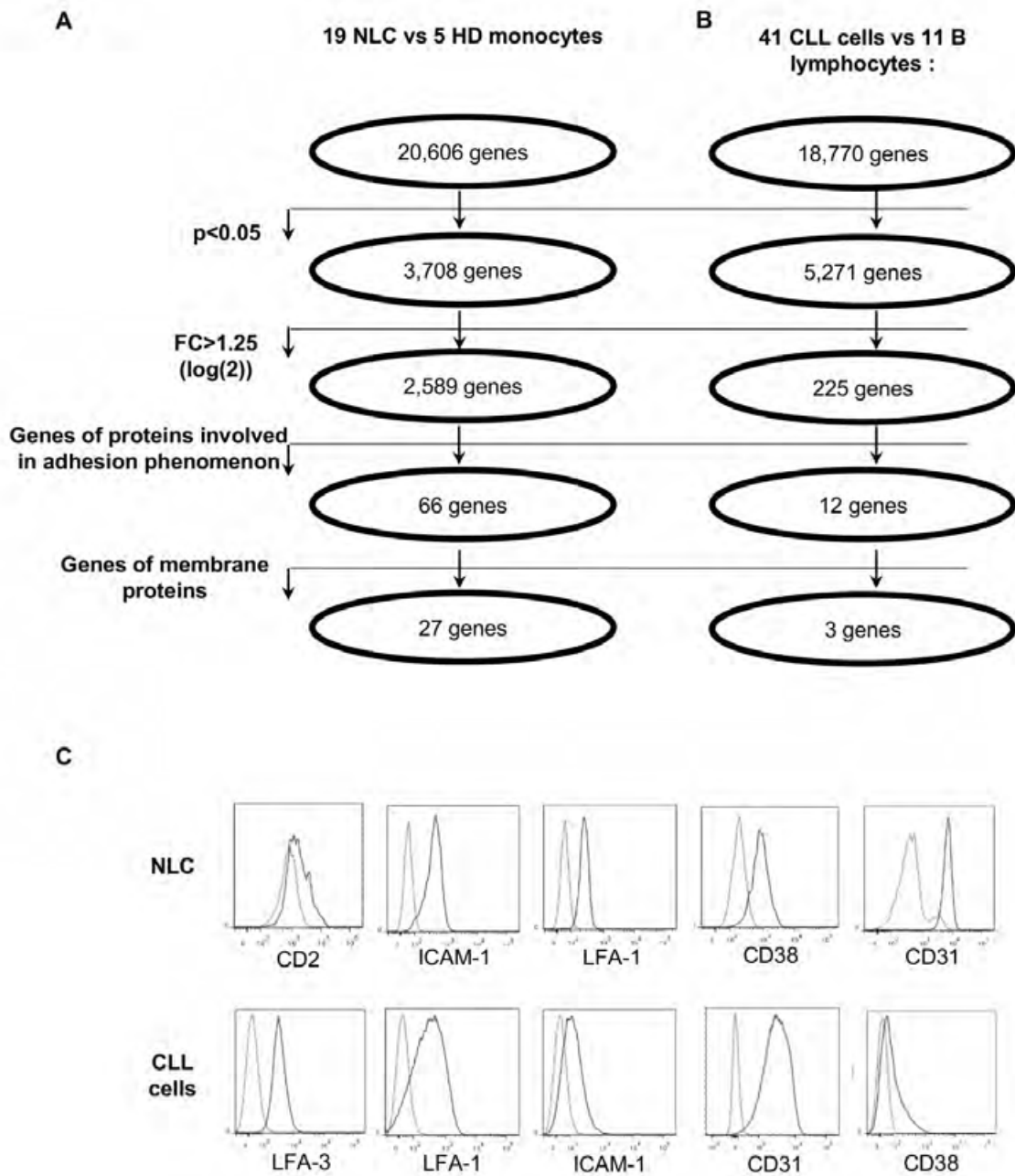
Figure 2



RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

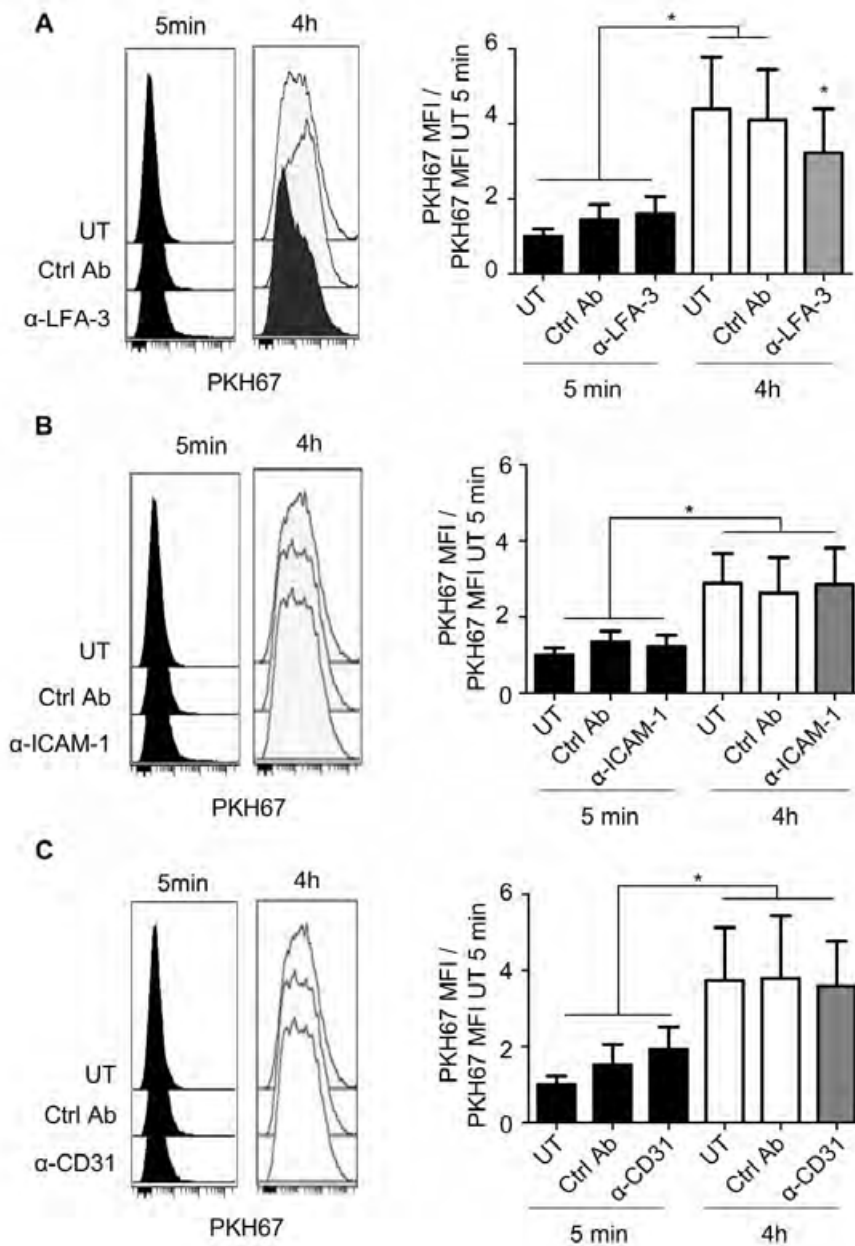
Figure 3



RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

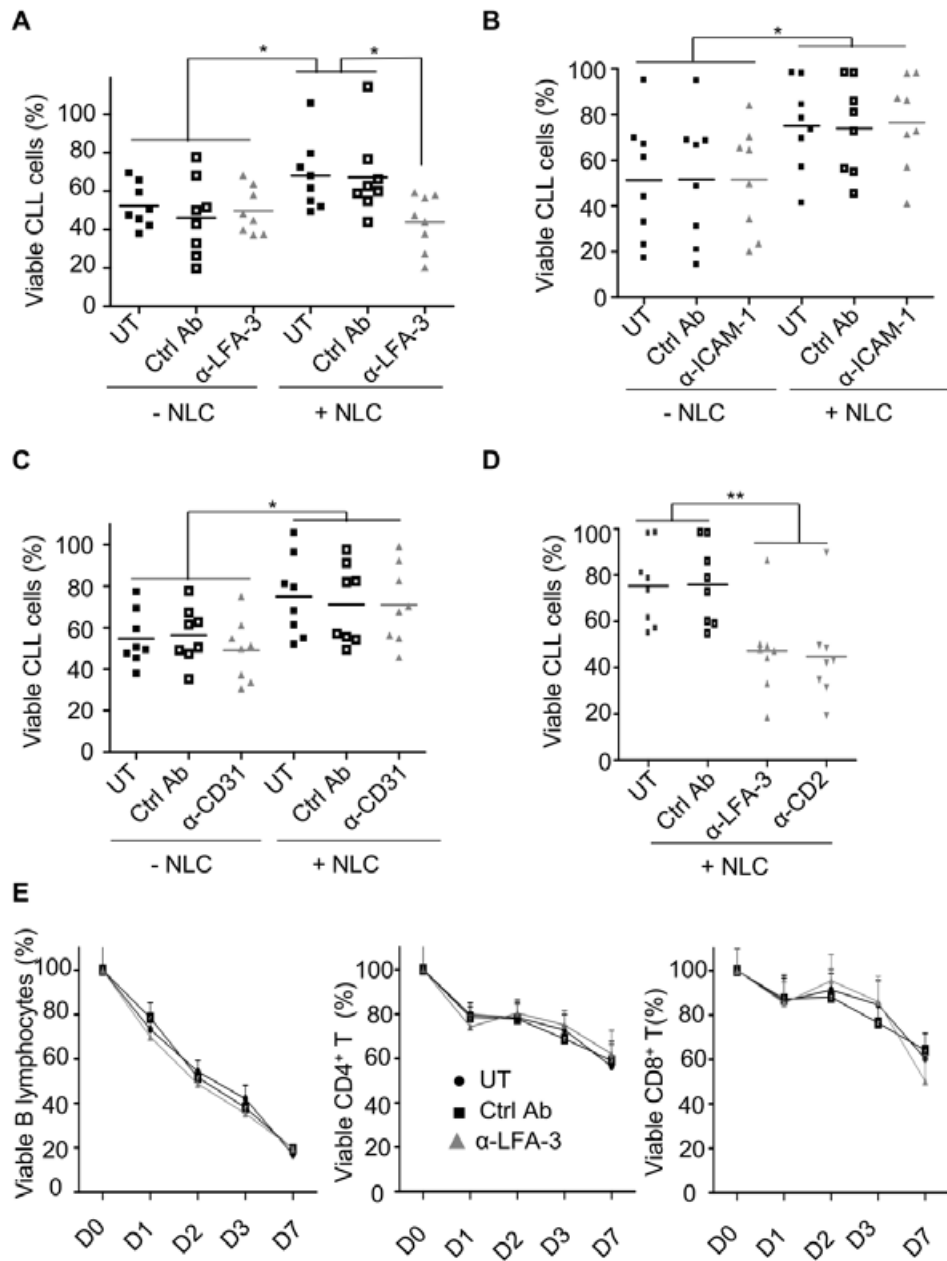
Figure 4



RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

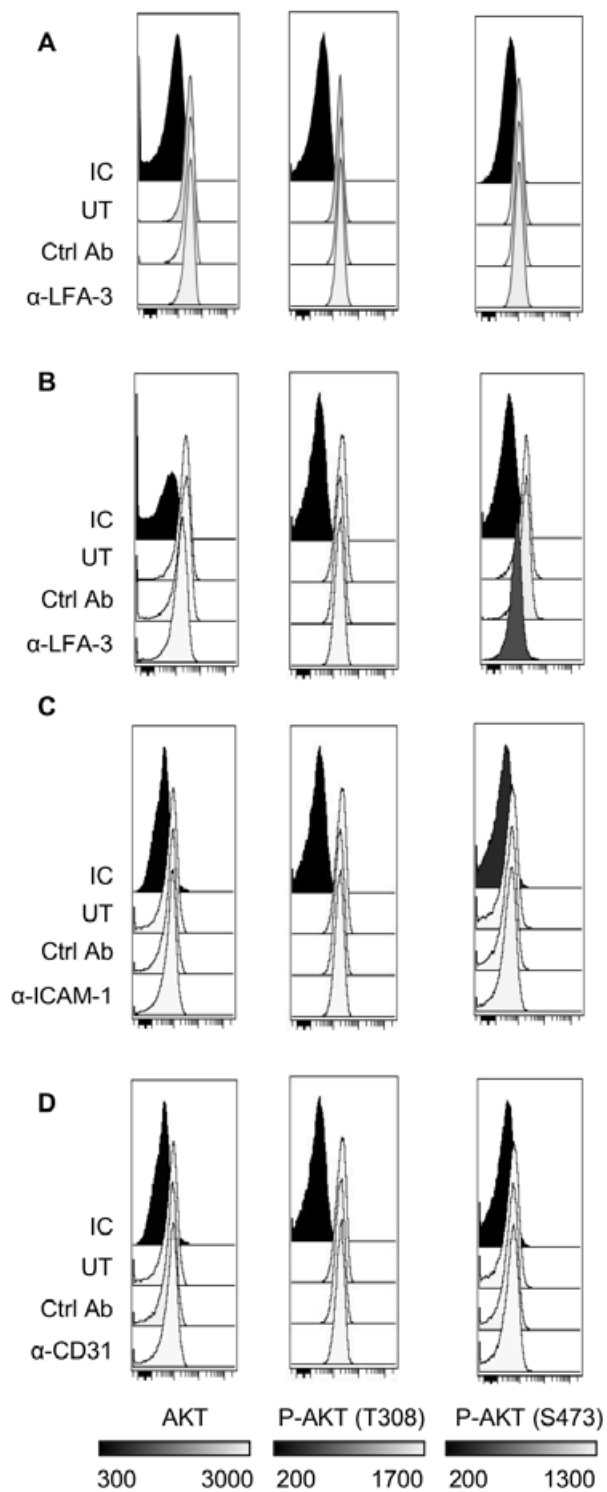
Figure 5



RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

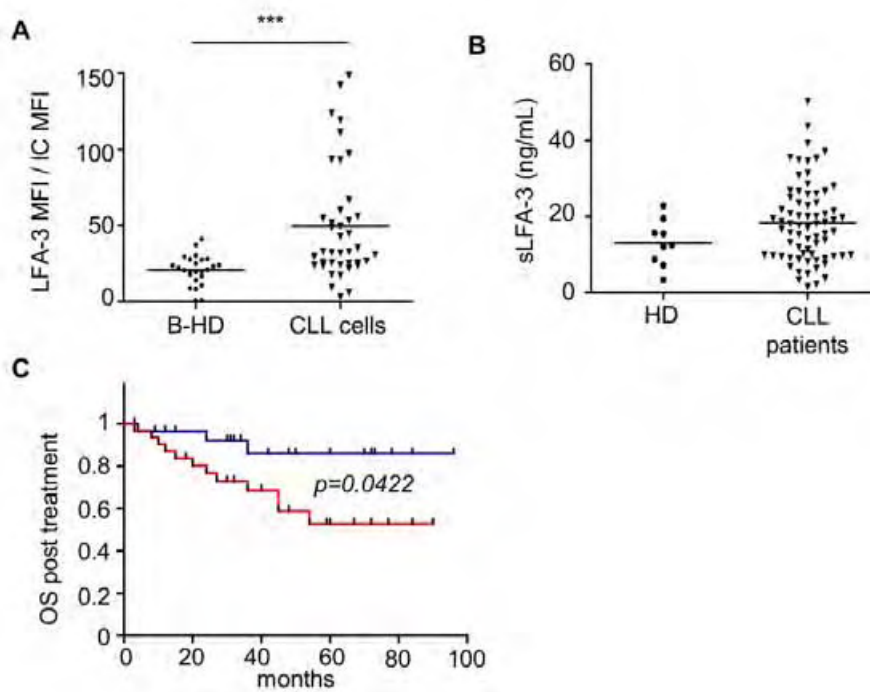
Figure 6



RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Figure 7



RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Supplemental Table 1

Gene	Exon	Details
TP53	Exon 4	S : CTGCACCAGCAGCTCCTACA AS : CAGGCATTGAAGTCTCATGGAA
	Exon 5	S : CAACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTAC AS : GTCGTCTCTCCAGCCCCAGC
	Exon 6	S : CCTCTGATTCCCTCACTGATTGC AS : CTTAACCCCTCCTCCCAGAG
	Exon 7	S : CCTCATCTTGGCCTGTGTTA AS : GCTTCTTGCCTGCTTGCTT
	Exon 8	S : TTGCTTCTCTTTTCCTATCCTGA AS : GCTTCTTGCCTGCTTGCTT
	Exon 9	S : CCTTTCCTTGCCTCTTTCCT AS : CCACTTGATAAGAGGTCCCAAG
	Exon 10	S : TCCCCTCCTCTGTTGCT AS : GAATCCTATGGCTTTCACCTAG
SF3B1	Exon 14	S : GTCTGGCTACTATGATCTCTACCATGA AS : GATGTGGCAAGATGGCACAG
	Exon 15	S : TGAATAGTTGATATATTGAGAGAATCTGGA AS : AGGTAATTGGTGGATTTACCTTCC
	Exon 16	S : TGTGTAAAGCCTTTATGGAAGGGTAT AS : ACATATCCAGTTTACATTAACAAATCTGGA
NOTCH1	Exon 34	S : GTGACCGCAGCCCAGTTC AS : GGCGATCTGGGACTGCAT

Supplemental Table S1 Details of primers (S: sense, AS: antisense).

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Supplemental Table 2

A

Symbol	Description	Fold change (log(2))	p value
HTR2B	HTR2B:5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	1.82	1.45E-05
HLA-DMB	HLA-DMB:major histocompatibility complex, class II, DM beta	1.76	1.02E-05
VCAM1	VCAM1:vascular cell adhesion molecule 1	1.72	9.74E-05
VCL	VCL:vinculin	1.65	2.53E-07
HLA-DMA	HLA-DMA:major histocompatibility complex, class II, DM alpha	1.60	3.02E-04
ITGB5	ITGB5:integrin, beta 5	1.59	2.09E-05
ITGA6	ITGA6:integrin, alpha 6	1.57	5.71E-05
CD28	CD28:CD28 molecule	1.52	7.14E-05
CD276	CD276:CD276 molecule	1.48	1.06E-07
ITGAM	ITGAM:integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	1.48	2.59E-04
F11R	F11R:F11 receptor	1.47	4.90E-06
PECAM1	PECAM1:platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	1.47	1.51E-05
ITGB2	ITGB2:integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	1.47	1.40E-03
SELPLG	SELPLG:selectin P ligand	1.38	8.93E-08
EPB41	EPB41:erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked)	1.36	1.14E-04
ITGA4	ITGA4:integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	1.34	2.14E-03
HLA-DQB1	HLA-DQB1:major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	1.34	6.76E-03
CD2	CD2:CD2 molecule	1.32	4.72E-04
ITGA3	ITGA3:integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	1.31	1.03E-04
CD86	CD86:CD86 molecule	1.30	5.62E-04
HLA-DPB1	HLA-DPB1:major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	1.30	1.03E-03
HLA-DOA	HLA-DOA:major histocompatibility complex, class II, DO alpha	1.30	9.43E-07
HLA-DRB4	HLA-DRB4:major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	1.29	1.73E-02
HLA-DQA1	HLA-DQA1:major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	1.27	2.46E-03
HLA-DPA1	HLA-DPA1:major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	1.27	2.41E-02

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

B

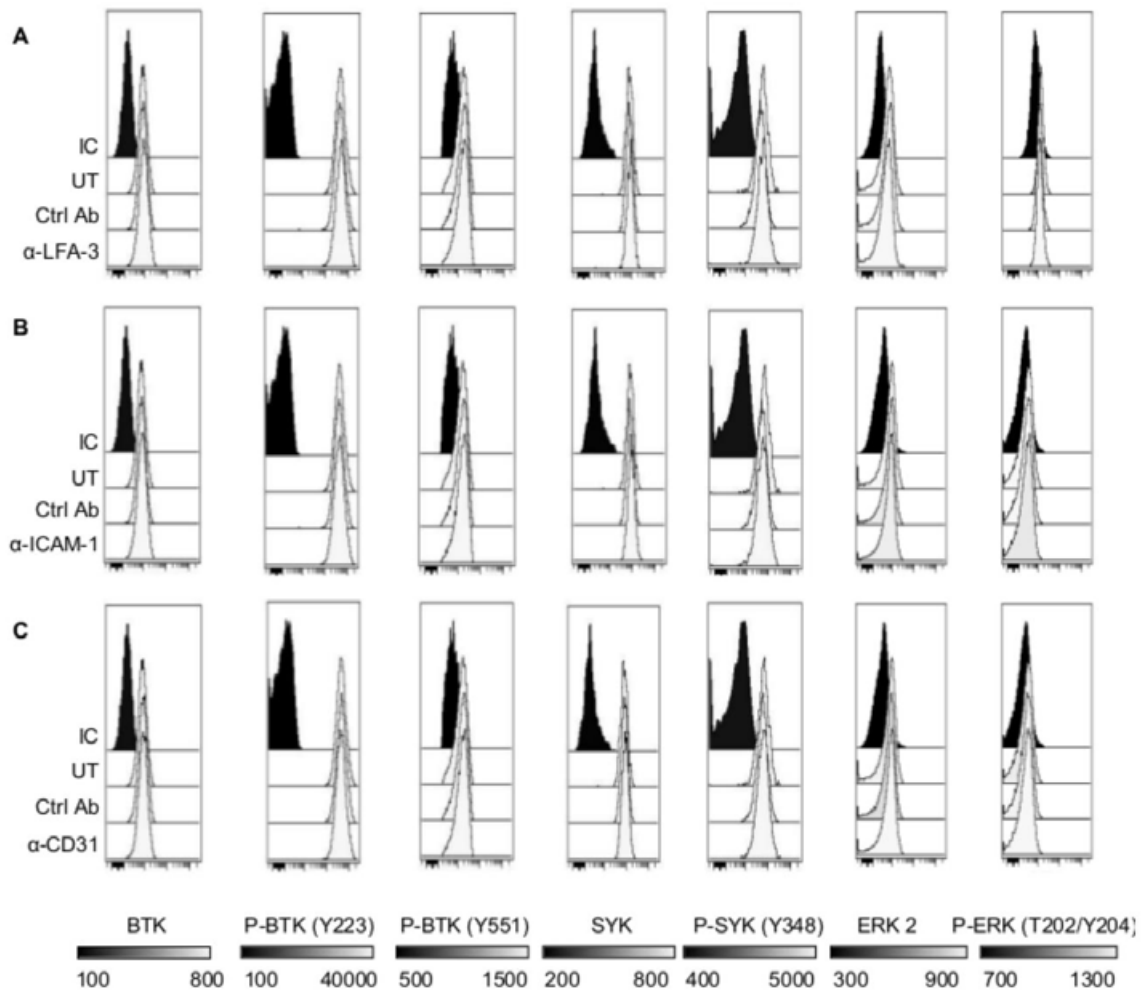
Symbol	Description	Fold change (log(2))	p value
CTLA4	CTLA4:cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	1.89	8.38E-06
SELP	SELP:selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	1.32	9.38E-06
CD58	CD58:CD58 molecule	1.28	4.98E-03

Supplemental table 2: Upregulated genes in NLC (19 CLL patients) compared to HD monocytes (5 healthy donors) (a) or in CLL cells (41 CLL patients) compared to B-HD (11 healthy donors) (b) involved in the adhesion phenomenon.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Supplemental Figure 1



Supplemental figure 1: Contact of CLL with NLC through LFA-3 don't induce a BTK, a SYK or a ERK phosphorylation in CLL cells. a-c. Expression of signalling proteins by CLL cells after a 4 hours contact with NLC in the presence or not of anti-LFA-3 (A) or anti-ICAM-1 (B) or anti-CD31 (C), or with the respective antibody control (A,B,C), measured by flow cytometry and compared to the respective isotopic control (IC). Greyscale bar: MFI.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Supplemental Table 3

A

Characteristics	Category	n (%)
Sex	Female	21 (29.6)
	Male	50 (70.4)
IgHV status	Mutated	29 (46.0)
	Unmutated	34 (54)
Cytogenetics	Tri 12	9 (12.6)
	Del(13q)	21 (30.6)
	Del(6q)	3 (4.2)
	t(BCL2)	3 (4.2)
	Del(11q)	8 (11.2)
	Del(17p)	3 (4.2)
	Complex karyotype	13 (18.3)
Recurrents mutations	<i>SF3B1</i>	3 (7)
	<i>NOTCH1</i>	11 (15.4)
	<i>TP53</i>	6 (8.4)

B

Characteristics	Mean (SD)	Median (range)
Age	66.3 (9.00)	66 (41-86)
Lymphocytosis (G/L)	47.89 (33.40)	45.8 (6.5-113.8)
Monocytosis (G/L)	1.30 (1.01)	1.02 (0-4.2)

Supplemental table 3: Clinical characteristics of 71 patients with CLL: categorical variables (A)

and continuous variables (B). Del: deletion, IgHV: immunoglobulin heavy chain variable segment mutational status, tri 12: trisomy 12.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Supplemental Table 4

Characteristics	Category	Total	Patients death	p
	All patients	71	15	-
Binet Stage	A	27	5	-
	B	21	4	0.7201
	C	19	4	0.9024
IgHV status	Mutated	29	4	-
	Unmutated	34	9	0.1013
Cytogenetics	Tri 12	9	2	0.9001
	Del(13q)	21	6	0.2993
	Del(6q)	3	1	0.7979
	t(BCL2)	3	0	0.4794
	Del(11q)	8	2	0.259
	Del(17p)	3	2	0.008
	Complex karyotype	13	3	0.7728
Recurrents mutations	<i>SF3B1</i>	3	1	0.8503
	<i>NOTCH1</i>	11	2	0.7367
	<i>TP53</i>	6	3	0.1183

Supplemental table 4: Overall survival in the different prognostic subgroups. In our series, only del(17p) were correlated with shorter overall survival post treatment. Del: deletion, IgHV: immunoglobulin heavy chain variable segment mutational status, tri 12: trisomy 12.

RESULTATS

IV. LFA-3 facteur clé des interactions entre cellules leucémiques et « nurse-like » cells dans la leucémie lymphoïde chronique

Supplemental Table 5

Characteristics	Category	Median sLFA-3 (range)	p sLFA-3
	All patients	17.72 (1.65-50.26)	-
Binet stage	A	15.73 (1.65-50.26)	-
	B	18.11 (2.24-43.71)	
	C	17.12 (3.83-50.26)	0.6704
Age	<65y	12.46 (3.43-50.26)	-
	>65y	18.12(1.65-43.71)	0.1229
IgHV status	Mutated	17.12 (3.43-39.35)	-
	Unmutated	19.21 (2.24-50.26)	0.3545
Cytogenetics	Tri 12	9.58 (2.24-34.98)	0.1134
	Del(13q)	17.72 (3.43-50.26)	0.3011
	Del(6q)	20.10 (8.99-26.85)	0.8217
	t(BCL2)	10.18 (2.24-50.26)	0.5397
	Del(11q)	18.12 (12.96-50.26)	0.2163
	Del(17p)	30.81 (20.69-34.98)	0.0478
	Complex karyotype	18.71 (2.24-50.26)	0.6464
Recurrents mutations	<i>SF3B1</i>	18.12 (13.75-50.26)	0.4315
	<i>NOTCH1</i>	25.06 (2.24-37.16)	0.5662
	<i>TP53</i>	18.9 (13.15-30.81)	0.37

Supplemental table 5: Level and correlation between high sLFA-3 (> 16.7 ng/mL) and established prognostics markers in CLL. In our series, only del(17p) were correlated with high sLFA-3 levels. Del: deletion, IgHV: immunoglobulin heavy chain variable segment mutational status, tri 12: trisomy 12.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de mes travaux de Thèse, nous avons tout d'abord montré que les NLC étaient effectivement les TAM de la LLC. Ces résultats confirment ainsi une hypothèse qui semblait de plus en plus évidente. En effet, si les NLC « saines » et les NLC sont morphologiquement semblables, ces dernières présentent un phénotype de TAM avec notamment une forte expression du CD163. De plus, cette expression est acquise au cours de la différenciation des monocytes de patients en NLC et ne résulte donc pas d'une prédisposition des monocytes de patients. Enfin, les NLC confèrent un avantage de survie aux cellules leucémiques contrairement aux NLC « saines ». L'ensemble de ces résultats démontre que les NLC sont les TAM de la LLC. Les principales questions soulevées par ce travail sont d'ordre méthodologique. En effet, afin de mener des études *in vitro* mimant au mieux la LLC chez le patient, un bon modèle est primordial. Le modèle parfait n'existant pas, différentes stratégies ont été mises en place *in vitro* et chez l'animal (ce point ne sera pas abordé). On peut distinguer deux grands modèles *in vitro* : les prélèvements issus de patients (donc composés de cellules primaires) et les lignées cellulaires.

Beaucoup plus faciles d'accès, les lignées cellulaires présentent néanmoins un désavantage majeur : ce sont des cellules qui prolifèrent et qui ne miment pas les cellules leucémiques sanguines quiescentes qui sont bloquées en phase G₀/G₁. Ensuite, ces lignées, comme la plupart de leurs consœurs, dérivent par des mutations génétiques s'accumulant au cours des divisions ce qui les éloignent de plus en plus des cancers qu'elles sont censées représenter. De plus, une lignée ne mime pas un type cancéreux (adénocarcinome mammaire, tumeur colique...), mais le cancer d'un individu à partir duquel le prélèvement fut isolé et la lignée établie. Au vu de tous ces arguments, les lignées cellulaires ne sont donc pas un bon modèle d'étude de la LLC.

Abordons maintenant le ratio avantages/inconvénients des cellules primaires issues de prélèvements sanguins de patients. Premièrement, comme nous l'avons déjà évoqué, ces cellules sont quiescentes et ne peuvent pas mimer la partie proliférante de la LLC qui a lieu au sein des ganglions lymphatiques mais permettent de très bonnes études sur ces populations quiescentes. Une autre critique est que dans le sang périphérique, les cellules du microenvironnement, notamment les NLC, sont absentes au moment du prélèvement⁴⁶⁵. Par définition, les échantillons issus de patients reflètent la grande hétérogénéité des patients. Il s'agit donc d'un bon modèle pour l'étude de la LLC, si l'on ne désire pas étudier les interactions entre cellules leucémiques et microenvironnement tumoral.

Pour les études avec le microenvironnement se pose ensuite la question du ratio cellules du microenvironnement / cellules leucémiques. Comme dans les travaux de Bhattacharya^{475, 526}, un fort taux entre monocytes et cellules leucémiques peut être utilisé pour mimer les stades précoces de la maladie tels que la MBL tandis que lorsque l'on utilise un ratio plus faible, comme dans notre étude, nous nous rapprochons des conditions de la LLC. Enfin, il faut citer les modèles d'études synthétiques combinant des cellules leucémiques issues de patients avec des lignées mimant les cellules du microenvironnement tumoral. Ces modèles sont, à mon sens, moins pertinents car étant par essence synthétiques.

Pour terminer, nous pouvons imaginer le modèle d'étude *in vitro* parfait pour la LLC. Il s'agirait alors de prélèvements issus de ganglions de patients, dont la biopsie n'est que très rarement réalisée dans la LLC, cultivés en trois dimensions avec leur propre MEC, et leurs cellules du microenvironnement tumoral dont les NLC.

Nous avons ensuite étudié l'impact pronostique des NLC dans la LLC. Si des études avaient déjà mis en évidence de manière indirecte l'implication des NLC dans la progression de cette pathologie^{513, 514}, nous avons, pour la première fois, démontré qu'au sein du ganglion lymphatique, il existait des cellules CD68⁺, CD163⁺ pouvant être la contrepartie *in vivo* des NLC observées *in vitro*. De plus, au sein de ces mêmes ganglions, ces cellules CD163⁺ ont un profil d'infiltration différent selon l'état de la maladie. Lorsque cette dernière est progressive, le ganglion est très fortement infiltré par ces cellules, tandis que lorsque le ganglion n'est que peu infiltré la maladie est stable. En démontrant que le sCD163, relargué dans le sang périphérique par les NLC, est un facteur pronostique aussi bien du TTFT que du TTNT, de la PFS et de l'OS, nous avons mis en évidence le rôle des NLC dans la progression de la maladie. Il est intéressant de noter que ce facteur pronostique indépendant est en corrélation avec des facteurs de mauvais pronostic préétablis dans la LLC tels que le statut IgHV non muté, le caryotype complexe ou la mutation *TP53*.

La corrélation entre le sCD163 et les facteurs de mauvais pronostic pose la question des différences éventuelles au sein du microenvironnement tumoral en fonction de l'agressivité du clone leucémique. Ce lien, très peu étudié aujourd'hui, est en effet établi au vu de nos résultats. Dans la littérature, il semble que, chez les patients IgHV non muté, les cellules leucémiques soient plus sensibles aux signaux pro-survie du microenvironnement bien que chez ces patients, on retrouve moins de NLC que chez les patients IgHV muté^{473, 484}. De plus, au sein du laboratoire, des études transcriptomiques de NLC provenant de la différenciation *in vitro* de

cellules CD14⁺ de patients, révèlent une hétérogénéité de profils en fonction du statut IgHV mais pas en fonction du caryotype (Figure 49). Des études supplémentaires semblent nécessaires afin de comprendre les différences qui pourraient exister au sein du microenvironnement tumoral, notamment au sein des NLC, en fonction du statut IgHV, du caryotype et de la présence de mutations récurrentes des cellules leucémiques. Enfin, nos résultats nous questionnent sur la causalité entre clone leucémique et microenvironnement tumoral : est-ce le clone leucémique qui se crée un microenvironnement tumoral en fonction de son agressivité ou est-ce le microenvironnement qui fournit un environnement plus favorable ce qui induit un clone plus agressif ? Ces questions, à l'heure actuelle, sont difficilement élucidables.

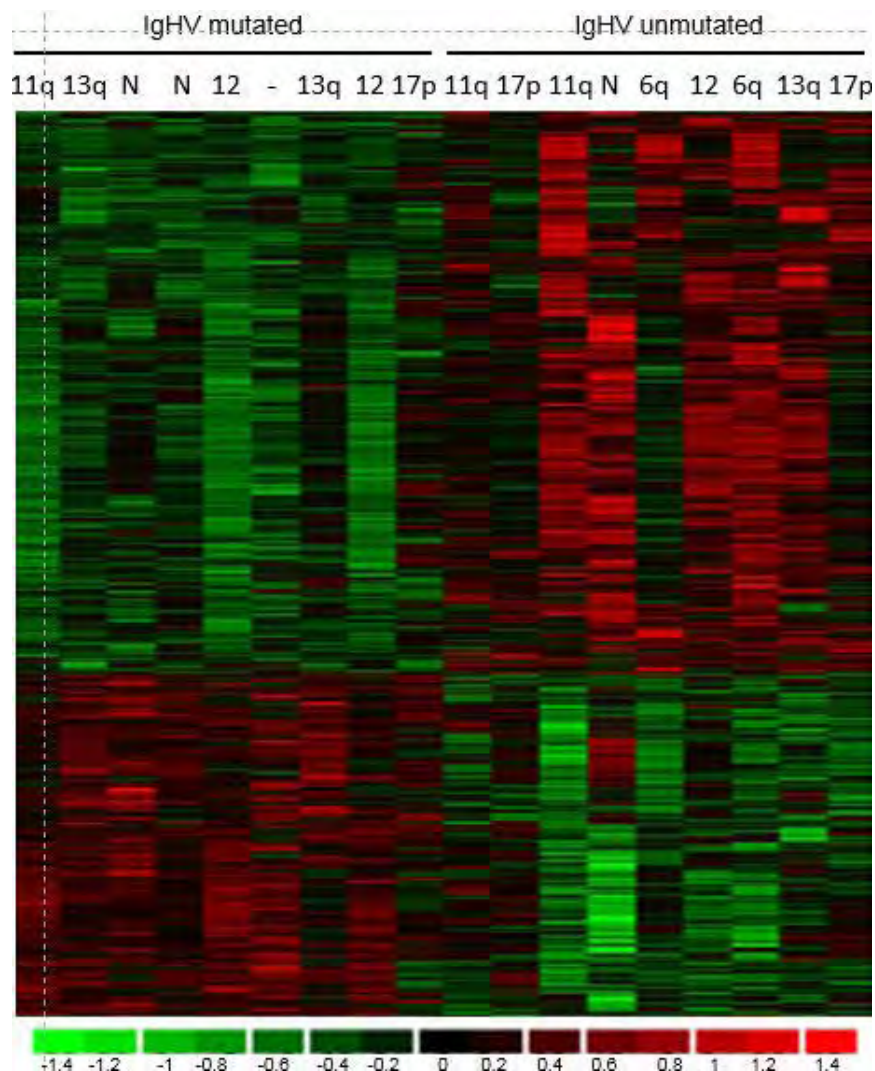


Figure 49: Profil transcriptomique de 19 NLC en fonction du statut IgHV et du caryotype des cellules leucémiques. Pour valider le sCD163 comme marqueur pronostique dans la LLC et sa puissance pronostique dans la LLC, une étude sur un nombre de patients plus élevé est nécessaire afin de démontrer

sa réelle utilité. Notre étude réalisée sur 94 patients seulement ouvre ainsi une piste que nous allons tenter d'approfondir avec le « German CLL Study Group », qui possède une banque de plus de 800 sérums de patients traités par FCR ou par FC. Grâce à ce groupe qui permettra de faire des statistiques plus poussées, nous allons tout d'abord pouvoir affiner les corrélations entre sCD163 et les facteurs pronostiques préétablis tels que la délétion 17p13 ou la mutation *NOTCH1* pour lesquels nous observons dans notre cohorte des corrélations fortes mais non significatives. Nous pourrions également confirmer si le sCD163 est bel et bien un facteur pronostique indépendant de la LLC. De plus, grâce à cette collaboration, nous allons pouvoir observer si, dans des populations recevant un traitement plus homogène, le sCD163 est un facteur pronostique aussi bien chez les patients traités par le gold standard de la LLC, le FCR que chez ceux traités seulement par FC. En effet, comme dans le cas du lymphome folliculaire, l'impact pronostique des TAM peut être gommé par l'ajout aux chimiothérapies classiques de rituximab ⁵²⁷.

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

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

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

Pour terminer, si le sCD163 se révèle bien être le marqueur pronostique indépendant qu'il semble être, toute la validation de méthode restera à mettre au point pour que ce dosage puisse être utilisé en routine hospitalière dans le suivi des patients atteints de LLC. Tout en ayant un coût diminué par rapport au marqueur cytogénétique classique, il permettrait ainsi un suivi

personnalisé, avec une prise en charge plus régulière des patients avec de fortes concentrations en sCD163, tandis que le suivi serait moins fréquent chez les patients avec des faibles taux.

Au cours de ma Thèse, nous avons également étudié l'impact direct des NLC sur les traitements utilisés dans la LLC, qu'il s'agisse, des chimiothérapies classiques, des Ac monoclonaux ou des nouvelles thérapies. Nous avons mis en évidence que les NLC étaient capables *in vitro* de protéger les cellules leucémiques seulement contre l'ibrutinib. A partir de prélèvements de patients traités par ibrutinib, nous avons mis en évidence que ce traitement ne modifie ni la localisation, ni la différenciation, ni même le phénotype des NLC qui peuvent toujours délivrer des signaux pro-survie aux cellules leucémiques. L'ensemble de nos résultats met en lumière le rôle du microenvironnement dans la résistance à l'ibrutinib ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, que la majorité de ces patients rechute lors de cette thérapie ¹⁴⁰. Une autre explication de ces rechutes pourrait être d'ordre pharmacocinétique. En effet, l'absorption de l'ibrutinib est augmentée lors de la prise pendant les repas. De même, il est métabolisé par le cytochrome C 3A4 et dans une moindre mesure par le cytochrome C 2D6. Les patients étant des personnes âgées traitées pour de multiples pathologies, tous les inducteurs ou les inhibiteurs enzymatiques pourraient ainsi modifier la biodisponibilité de cette molécule. Enfin, le défaut d'observance pourrait aussi expliquer la progression de la LLC. On estime ainsi aujourd'hui que dans la LMC, seuls 70% des patients traités par imatinib (un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant spécifiquement Bcr-Abl) prennent correctement ce traitement au long court. Tout comme dans cette pathologie, un défaut d'observance de l'ibrutinib pourrait expliquer une autre partie des résistances aujourd'hui observées.

Néanmoins, à l'avenir, ces thérapies ciblées ne seront plus utilisées en monothérapie. Des essais cliniques tentent d'ores et déjà de prouver la supériorité d'une association vis-à-vis des monothérapies. Ainsi, les essais comparant l'efficacité de l'ibrutinib *versus* l'association ibrutinib + rituximab (NCT02007044) et celui comparant l'efficacité de l'ibrutinib *versus* ibrutinib + bendamustine (NCT01886872) ont commencé et sont respectivement en phase II et III. *In vitro*, nous avons démontré que les NLC perdaient cet effet pro-survie sur les cellules leucémiques avec l'association ibrutinib + bendamustine. De plus, l'efficacité de la combinaison de ces molécules est supérieure à ces deux drogues utilisées seules. Au vu de ces travaux, l'utilisation de polyimmunochimiothérapies, combinant des cytotoxiques classiques avec des Ac monoclonaux et des traitements innovants, semble donc totalement justifiée. A

terme, si les essais cliniques de phase II et III prouvent cette supériorité, ces associations pourraient donc s'imposer comme les nouveaux « gold standard » de la LLC.

De plus, pour confirmer que les NLC ne sortent pas du ganglion chez les patients traités par ibrutinib, une étude histologique de ces tissus avant et au cours du traitement pourrait être réalisée afin de mettre en évidence la présence de cellules CD163⁺ et CD68⁺. Grâce à notre marqueur pronostique facile d'accès, le sCD163, une étude longitudinale pourrait être effectuée chez les patients traités par ibrutinib. L'observation d'une potentielle corrélation entre de forts taux de sCD163 et une diminution de l'efficacité du traitement, voire une progression, pourrait permettre une prise en charge thérapeutique plus adaptée. Nous pouvons d'ores et déjà émettre l'hypothèse que le sCD163 pourrait être un bon marqueur dans ce cas, car de forts taux de sCD163 sont associés au caryotype complexe, et ce paramètre est le seul qui permet de prédire une résistance au traitement par ibrutinib ⁸⁸.

Au vu de leur impact pronostique et de leur influence dans le microenvironnement tumoral, les NLC sont des cibles potentielles de choix dans le traitement de la LLC. Nous avons décidé de ne pas cibler le CD163 pour deux raisons. Premièrement, il est présent sous forme soluble à de très forts taux chez le patient, ce qui limiterait son efficacité sur les NLC car l'Ac serait piégé par le sCD163. Enfin, l'Ac perturberait les rôles physiologiques du CD163 comme dans la réponse aux infections, la résolution de l'inflammation et la captation de l'Hb complexée à l'Hp. Nous avons donc préféré cibler les interactions entre NLC et cellules leucémiques. Nous avons tout d'abord démontré le rôle clé des interactions entre NLC et cellules leucémiques dans la survie de ces dernières *in vitro*. Ce contact implique la fixation de LFA-3, présent sur les cellules leucémiques, au CD2, présent sur les NLC, et active la voie de signalisation AKT mais pas les voies ERK et la voie de signalisation dépendante du BCR. Lorsque la liaison entre LFA-3 et CD2 est inhibée par exemple par un Ac bloquant, l'effet pro-survie des NLC est totalement antagonisé. Ce résultat semble indiquer au premier abord que seul le contact est nécessaire et donc que les facteurs solubles n'ont aucune influence. Il apparaît clairement en contradiction avec un pan de la littérature des NLC ^{41, 470}. Afin de réconcilier ces résultats qui *a priori* semblent opposés nous pouvons émettre une hypothèse : suite à la fixation des cellules leucémiques sur les NLC *via* LFA-3, on observe en plus de l'activation de voies de signalisation dans le clone leucémique, une activation des NLC *via* CD2. Cette activation conduirait ainsi à la libération par celles-ci de facteurs solubles qui favoriseraient dans un second temps la survie des cellules leucémiques. Dans un contexte plus physiologique, lors de la synapse immunologique entre lymphocyte B et T, on observe en effet suite à la fixation de CD2 sur

LFA-3 une activation des deux types cellulaires (http://www.uniprot.org/uniprot/P19256#section_comments). Ce parallèle que comme dans le lymphocyte T dans la NLC il existe une signalisation dépendante de CD2, permettrait ainsi d'étayer cette théorie.

Dans un second temps, nos résultats permettent une réflexion sur les thérapies dites ciblées. Dans les années 2000, avec l'avènement de l'imatinib, thérapie ciblée par excellence, la recherche en oncologie et en hématologie a tenté de développer une multitude de thérapies dites ciblées, le plus souvent des Ac monoclonaux ou des inhibiteurs de tyrosine kinase. L'objectif était de trouver pour chaque cancer, une protéine exprimée spécifiquement et de la cibler, comme Bcr-Abl dans la LMC, ce qui améliorerait grandement l'efficacité et diminuerait les effets secondaires par rapport aux chimiothérapies dites classiques. En clinique, ces thérapies ont, pour la plupart, montré leurs efficacités seules ou en association avec des chimiothérapies, on peut ainsi citer l'exemple du rituximab et de l'ibrutinib dans la LLC. C'est au niveau de la spécificité et la diminution des effets secondaires que ces thérapies ciblées montrent leurs limites. Pour reprendre les deux exemples précédemment cités, le rituximab cible toutes les cellules CD20⁺, tumorales ou non, et donc aussi les lymphocytes B normaux. L'ibrutinib, quant à lui, inhibe aussi les Tec kinases présentes notamment dans les plaquettes et provoque donc des défauts d'agrégation plaquettaire et un fort risque hémorragique.

Des thérapies ciblées agissant sur les interactions entre cellules tumorales et microenvironnement furent aussi développées et mises sur le marché. Là encore, l'efficacité est clairement démontrée et c'est dans la spécificité et les effets secondaires que l'on retrouve les principaux problèmes liés à leurs utilisations. L'ipilimumab, un Ac monoclonal anti CTLA-4, a ainsi obtenu son AMM dans le traitement du mélanome métastatique, mais présente des toxicités très importantes au vu de l'expression quasi ubiquitaire de CTLA-4. Dans le cadre de la LLC, on peut notamment citer les essais cliniques de l'AMD31000, un antagoniste de CXCR4, qui permet d'inhiber la survie des cellules leucémiques et leur migration vers les NLC. Bien que très fortement exprimé sur les cellules leucémiques, il est néanmoins retrouvé sur la plupart des cellules hématopoïétiques et les essais cliniques montreront probablement de fortes toxicités sur ce système, toxicités qui limiteront probablement son usage.

Dans notre cas, même si LFA-3, là encore surexprimé sur les cellules leucémiques, apparaît à première vue comme une cible idéale pour court-circuiter l'effet protecteur des NLC, le développement d'un Ac monoclonal ne présente que peu d'intérêt au vu du profil d'expression de cette molécule. En effet, LFA-3 est lui aussi présent sur toutes les cellules du système

hématopoïétique et provoquerait donc probablement d'importantes toxicités. Nos résultats *in vitro*, obtenus avec l'Ac murin anti LFA-3, ne semblent pas provoquer de déplétion des populations B et T et pourraient laisser présager une bonne tolérance de l'Ac. Cependant, il faut garder en mémoire que nous n'avons absolument pas étudié ces effets sur d'autres types cellulaires, tels que les cellules NK et ses effets sur l'activation de ces cellules immunitaires. Ces expériences apparaissent donc primordiales avant de commencer un quelconque développement de cette thérapie.

Au vu de l'ensemble de nos résultats, les NLC sont des facteurs clés dans la LLC. Leur nombre est directement corrélé à l'évolution de la maladie et ont un effet chimioprotecteur certain vis-à-vis de l'ibrutinib. Elles constituent donc une cible thérapeutique de choix afin de développer de nouveaux traitements dans cette pathologie. Cependant, comme nous l'avons montré dans notre étude ciblant leurs interactions avec les cellules leucémiques, les mécanismes par lesquels elles favorisent la survie de ces dernières ne mettent pas en jeu des molécules dont l'expression leur est restreinte mais au contraire corrompent des mécanismes physiologiques. La conséquence de ce manque de spécificité est qu'un ciblage perturberait non seulement la tumeur mais aussi l'équilibre physiologique. Néanmoins, les NLC restent toujours une cible thérapeutique très intéressante à condition de trouver un marqueur dont l'expression soit vraiment spécifique de ce type cellulaire, ou tout du moins qui ne perturberait que peu l'équilibre physiologique. Cette réflexion peut être étendue à toutes les thérapies dites ciblées dans tous les cancers. La chimie et les biotechnologies permettent la synthèse d'une quasi infinité de composés ciblant une protéine spécifique, le problème étant aujourd'hui de trouver ladite protéine.

REFERENCES

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

REFERENCES

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

REFERENCES

27. Chu CC, CATERA R, Hatzi K, Yan XJ, Zhang L, Wang XB, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood* 2008 Dec 15; **112**(13): 5122-5129.
28. Seiler T, Woelfle M, Yancopoulos S, CATERA R, Li W, Hatzi K, *et al.* Characterization of structurally defined epitopes recognized by monoclonal antibodies produced by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2009 Oct; **114**(17): 3615-3624.
29. Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* 2012 Sep; **489**(7415): 309-312.
30. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005 Feb; **352**(8): 804-815.
31. Chappell CP, Draves KE, Giltiay NV, Clark EA. Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. *J Exp Med* 2012 Sep; **209**(10): 1825-1840.
32. Pepper C, Hoy T, Bentley DP. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer* 1997; **76**(7): 935-938.
33. Buggins AG, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2010 Jul; **34**(7): 837-842.
34. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993 Sep; **82**(6): 1820-1828.
35. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Sep 27; **102**(39): 13944-13949.
36. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008 Mar; **371**(9617): 1017-1029.
37. Aguilar-Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M. Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *Int J Cancer* 1996 Apr 22; **69**(2): 114-119.
38. Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, *et al.* Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 2008 Nov; **112**(9): 3807-3817.
39. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 1998 Apr; **91**(7): 2387-2396.
40. Giannoni P, Scaglione S, Quarto R, Narcisi R, Parodi M, Balleari E, *et al.* An interaction between hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) prolongs the survival of chronic lymphocytic leukemic cells through STAT3 phosphorylation: a potential role of mesenchymal cells in the disease. *Haematologica* 2011 Jul; **96**(7): 1015-1023.
41. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000 Oct; **96**(8): 2655-2663.

REFERENCES

42. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005 Mar; **115**(3): 755-764.
43. Sellmann L, de Beer D, Bartels M, Opalka B, Nüchel H, Dührsen U, *et al.* Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Hematol* 2011 Jan; **93**(1): 74-82.
44. Véronèse L, Tournilhac O, Callanan M, Prie N, Kwiatkowski F, Combes P, *et al.* Telomeres and chromosomal instability in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2013 Feb; **27**(2): 490-493.
45. Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, Tobin G, Aleskog A, Thunberg U, *et al.* Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005 Jun; **105**(12): 4807-4812.
46. Rampazzo E, Bonaldi L, Trentin L, Visco C, Keppel S, Giunco S, *et al.* Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *Haematologica* 2012 Jan; **97**(1): 56-63.
47. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, *et al.* Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 2004 Jan; **103**(2): 375-382.
48. Giné E, Martinez A, Villamor N, López-Guillermo A, Camos M, Martinez D, *et al.* Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* 2010 Sep; **95**(9): 1526-1533.
49. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Jan; **117**(2): 563-574.
50. Mittal AK, Chaturvedi NK, Rai KJ, Gilling-Cutucache CE, Nordgren TM, Moragues M, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells in a lymph node microenvironment depict molecular signature associated with an aggressive disease. *Mol Med* 2014; **20**(1): 290-301.
51. Sic H, Kraus H, Madl J, Flittner KA, von Münchow AL, Pieper K, *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis. *J Allergy Clin Immunol* 2014 Mar.
52. Avalos AM, Meyer-Wentrup F, Ploegh HL. B-cell receptor signaling in lymphoid malignancies and autoimmunity. *Adv Immunol* 2014; **123**: 1-49.
53. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* 2014 Apr; **14**(4): 219-232.
54. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001 Dec; **194**(11): 1639-1647.
55. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretto G, Husson H, *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001 Dec; **194**(11): 1625-1638.

REFERENCES

56. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, *et al.* Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Dec 15; **100**(13): 4609-4614.
57. Bossard N, Velten M, Remontet L, Belot A, Maarouf N, Bouvier AM, *et al.* Survival of cancer patients in France: a population-based study from The Association of the French Cancer Registries (FRANCIM). *Eur J Cancer* 2007 Jan; **43**(1): 149-160.
58. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987 Mar; **69**(3): 929-936.
59. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol* 1989 Jun; **72**(2): 141-149.
60. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981 Jul; **48**(1): 198-206.
61. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975 Aug; **46**(2): 219-234.
62. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol* 2011 Jan; **8**(1): 38-47.
63. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987 Dec; **60**(11): 2712-2716.
64. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Sep; **94**(6): 1848-1854.
65. Aurran-Schleinitz T, Arnoulet C, Ivanov V, Coso D, Rey J, Schiano JM, *et al.* [Chronic lymphocytic leukaemia: current management]. *Rev Med Interne* 2008 May; **29**(5): 424-435.
66. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010 Jan; **17**(1): 28-40.
67. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010 Jan; **10**(1): 37-50.
68. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000 Dec; **343**(26): 1910-1916.
69. Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, Schröder M, Schlegelberger B, Fischer K, *et al.* Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Oct; **93**(21): 11837-11841.
70. Gunn SR, Hibbard MK, Ismail SH, Lowery-Nordberg M, Mellink CH, Bahler DW, *et al.* Atypical 11q deletions identified by array CGH may be missed by FISH panels for prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009 May; **23**(5): 1011-1017.
71. Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, Göransson H, Cahill N, Jansson M, *et al.* Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011 Aug; **96**(8): 1161-1169.

REFERENCES

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

REFERENCES

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

REFERENCES

101. Gunnarsson R, Mansouri L, Rosenquist R. Exploring the genetic landscape in chronic lymphocytic leukemia using high-resolution technologies. *Leuk Lymphoma* 2013 Aug; **54**(8): 1583-1590.
102. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, *et al.* Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012 Mar; **119**(12): 2854-2862.
103. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, *et al.* Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Mar; **93**(5): 1732-1737.
104. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005 Mar; **90**(3): 391-399.
105. Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1999 Feb; **62**(2): 117-122.
106. Källander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1984 Dec; **54**(11): 2450-2455.
107. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, *et al.* Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996 Aug; **22**(5-6): 439-447.
108. Matthews C, Catherwood MA, Morris TC, Kettle PJ, Drake MB, Gilmore WS, *et al.* Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur J Haematol* 2006 Oct; **77**(4): 309-317.
109. Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S, Emmerich B. Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann Hematol* 1992 Jul; **65**(1): 1-5.
110. Zilber MT, Gregory S, Mallone R, Deaglio S, Malavasi F, Charron D, *et al.* CD38 expressed on human monocytes: a coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Mar; **97**(6): 2840-2845.
111. 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 Sep; **94**(6): 1840-1847.
112. Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G, *et al.* The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* 2003 Feb; **101**(4): 1262-1269.
113. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, *et al.* Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008 Sep; **112**(5): 1923-1930.
114. Hamblin TJ, Orchard JA, Gardiner A, Oscier DG, Davis Z, Stevenson FK. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* 2000 Apr; **95**(7): 2455-2457.

REFERENCES

115. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, *et al.* V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Aug; **100**(4): 1410-1416.
116. Matrai Z, Lin K, Dennis M, Sherrington P, Zuzel M, Pettitt AR, *et al.* CD38 expression and Ig VH gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001 Mar; **97**(6): 1902-1903.
117. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, *et al.* CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002 Feb; **99**(3): 1023-1029.
118. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, Robillard N, Ifrah N, Mahe B, *et al.* CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002 Jan; **116**(1): 142-150.
119. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev* 2009 Jan; **23**(1): 25-47.
120. Poggi A, Prevosto C, Catellani S, Rocco I, Garuti A, Zocchi MR. Engagement of CD31 delivers an activating signal that contributes to the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2010 Nov; **151**(3): 252-264.
121. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, Tschumper RC, Witzig TE, Nowakowski GS, *et al.* CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol* 2008 Mar; **140**(5): 537-546.
122. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, *et al.* Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010 Oct; **376**(9747): 1164-1174.
123. Mahipal A, Weiss M. The addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide improves progression-free survival in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Curr Oncol Rep* 2010 Nov; **12**(6): 352-354.
124. Robak T. Rituximab for chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Biol Ther* 2012 Apr; **12**(4): 503-515.
125. Capietto AH, Keirallah S, Gross E, Dauguet N, Laprévotte E, Jean C, *et al.* Emerging concepts for the treatment of hematological malignancies with therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Drug Targets* 2010 Jul; **11**(7): 790-800.
126. Amoroso A, Hafsi S, Militello L, Russo AE, Soua Z, Mazzarino MC, *et al.* Understanding rituximab function and resistance: implications for tailored therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011; **16**: 770-782.
127. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 2007 Sep; **44**(16): 3823-3837.
128. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2008 Aug; **359**(6): 613-626.
129. García-Escobar I, Sepúlveda J, Castellano D, Cortés-Funes H. Therapeutic management of chronic lymphocytic leukaemia: state of the art and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011 Oct; **80**(1): 100-113.

REFERENCES

130. Pettitt AR. Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003 Jun; **121**(5): 692-702.
131. Johnson SA. Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies. *Expert Opin Pharmacother* 2001 Jun; **2**(6): 929-943.
132. Chang BY, Huang MM, Francesco M, Chen J, Sokolove J, Magadala P, *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells. *Arthritis Res Ther* 2011; **13**(4): R115.
133. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, *et al.* Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 2013 Jan; **31**(1): 88-94.
134. Pan Z, Scheerens H, Li SJ, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, *et al.* Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* 2007 Jan; **2**(1): 58-61.
135. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Jul; **107**(29): 13075-13080.
136. Burger JA, Buggy JJ. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765). *Leuk Lymphoma* 2013 Nov; **54**(11): 2385-2391.
137. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, *et al.* Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011 Jun; **117**(23): 6287-6296.
138. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 2012 Feb; **119**(5): 1182-1189.
139. de Rooij MF, Kuil A, Geest CR, Eldering E, Chang BY, Buggy JJ, *et al.* The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012 Mar; **119**(11): 2590-2594.
140. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Jul; **369**(1): 32-42.
141. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2013 Aug; **369**(6): 507-516.
142. Burger JA. Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors in clinical trials. *Curr Hematol Malig Rep* 2014 Mar; **9**(1): 44-49.
143. Furman RR, Cheng S, Lu P, Setty M, Perez AR, Guo A, *et al.* Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014 Jun; **370**(24): 2352-2354.
144. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2014 Feb; **13**(2): 140-156.
145. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 2010 Feb; **28**(6): 1075-1083.
146. Puri KD, Gold MR. Selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase delta: modulators of B-cell function with potential for treating autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Front Immunol* 2012; **3**: 256.

REFERENCES

147. Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, Piekorz R, Chao JR, Wang D, *et al.* Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* 2002 Dec; **22**(24): 8580-8591.
148. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, *et al.* The phosphoinositide 3-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Sep; **118**(13): 3603-3612.
149. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase- δ inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 2010 Sep; **116**(12): 2078-2088.
150. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, *et al.* Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014 Mar; **370**(11): 997-1007.
151. Keating GM. Idelalisib: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia and indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Target Oncol* 2015 Feb.
152. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan; **100**(1): 57-70.
153. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar; **144**(5): 646-674.
154. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001 Apr; **410**(6832): 1107-1111.
155. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011 Mar; **331**(6024): 1565-1570.
156. Gatti RA, Good RA. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 1971 Jul; **28**(1): 89-98.
157. Sodemann U, Bistrup C, Marckmann P. Cancer rates after kidney transplantation. *Dan Med Bull* 2011 Dec; **58**(12): A4342.
158. Fernberg P, Edgren G, Adami J, Ingvar A, Bellocco R, Tufveson G, *et al.* Time trends in risk and risk determinants of non-Hodgkin lymphoma in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2011 Nov; **11**(11): 2472-2482.
159. Weiss NS. Risk of breast cancer after renal or cardiac transplantation. *Lancet* 1995 Nov; **346**(8987): 1422; author reply 1423.
160. Carbone A, Vaccher E, Gloghini A, Pantanowitz L, Abayomi A, de Paoli P, *et al.* Diagnosis and management of lymphomas and other cancers in HIV-infected patients. *Nat Rev Clin Oncol* 2014 Apr; **11**(4): 223-238.
161. Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2002 May; **2**(5): 373-382.
162. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 Jan; **4**(1): 11-22.
163. Iannello A, Raulet DH. Immune surveillance of unhealthy cells by natural killer cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2013; **78**: 249-257.
164. Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res* 2013 Sep; **62**(9): 823-834.

REFERENCES

165. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006 Oct; **6**(10): 715-727.
166. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 2013 Nov; **218**(11): 1402-1410.
167. Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S, Capron M. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunol Immunother* 2012 Sep; **61**(9): 1527-1534.
168. Tecchio C, Scapini P, Pizzolo G, Cassatella MA. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Semin Cancer Biol* 2013 Jun; **23**(3): 159-170.
169. Whitworth PW, Pak CC, Esgro J, Kleinerman ES, Fidler IJ. Macrophages and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1990 Feb; **8**(4): 319-351.
170. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 2006; **90**: 1-50.
171. Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, *et al.* Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* 2003 Aug; **198**(3): 433-442.
172. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003 Sep; **3**(9): 745-756.
173. Sayers TJ, Brooks AD, Ward JM, Hoshino T, Bere WE, Wiegand GW, *et al.* The restricted expression of granzyme M in human lymphocytes. *J Immunol* 2001 Jan; **166**(2): 765-771.
174. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004 Aug; **21**(2): 137-148.
175. Groh V, Li YQ, Cioca D, Hunder NN, Wang W, Riddell SR, *et al.* Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 May; **102**(18): 6461-6466.
176. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 2012 Apr; **12**(4): 239-252.
177. Abbas AK, Lichtman, A.H. & Pillai, S. Cellular and molecular immunology 6th edition. Saunders Elsevier, Philadelphia; 2010.
178. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011 Feb; **11**(2): 119-130.
179. Yang G, Xu Y, Chen X, Hu G. IFITM1 plays an essential role in the antiproliferative action of interferon-gamma. *Oncogene* 2007 Jan; **26**(4): 594-603.
180. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev* 2008 Apr; **222**: 129-144.
181. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008 Jan; **8**(1): 22-33.
182. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006 Nov; **6**(11): 836-848.
183. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002 Nov; **3**(11): 991-998.

REFERENCES

184. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 235-271.
185. Shaked Y, McAllister S, Fainaru O, Almog N. Tumor dormancy and the angiogenic switch: possible implications of bone marrow- derived cells. *Curr Pharm Des* 2014; **20**(30): 4920-4933.
186. Piras F, Colombari R, Minerba L, Murtas D, Floris C, Maxia C, *et al.* The predictive value of CD8, CD4, CD68, and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* 2005 Sep; **104**(6): 1246-1254.
187. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996 Apr; **77**(7): 1303-1310.
188. Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2001 May; **61**(10): 3932-3936.
189. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003 Jan; **348**(3): 203-213.
190. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, *et al.* CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998 Aug; **58**(16): 3491-3494.
191. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 2004 Jan; **4**: 1.
192. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, *et al.* Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005 Dec; **353**(25): 2654-2666.
193. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006 Sep; **313**(5795): 1960-1964.
194. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 2006; **90**: 51-81.
195. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002 Nov; **3**(11): 999-1005.
196. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005 Apr; **54**(4): 307-314.
197. Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, *et al.* Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 2002 Oct; **188**: 97-113.
198. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; **24**: 99-146.
199. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996 Mar; **271**(5256): 1734-1736.
200. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 531-562.

REFERENCES

201. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005 Apr; **5**(4): 263-274.
202. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 267-296.
203. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008 May; **9**(5): 503-510.
204. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, *et al.* Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000 Feb; **191**(4): 661-668.
205. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, *et al.* Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 2011 Aug; **71**(16): 5412-5422.
206. Remark R, Alifano M, Cremer I, Lupo A, Dieu-Nosjean MC, Riquet M, *et al.* Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin Cancer Res* 2013 Aug; **19**(15): 4079-4091.
207. Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Ménard C, Roux S, Lyonnet L, *et al.* Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* 2011 Jun; **17**(6): 700-707.
208. Burke S, Lakshmikanth T, Colucci F, Carbone E. New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment. *Trends Immunol* 2010 Sep; **31**(9): 339-345.
209. Sconocchia G, Arriga R, Tornillo L, Terracciano L, Ferrone S, Spagnoli GC. Melanoma cells inhibit NK cell functions. *Cancer Res* 2012 Oct; **72**(20): 5428-5429; author reply 5430.
210. Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, *et al.* Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Dec; **106**(49): 20847-20852.
211. Halama N, Braun M, Kahlert C, Spille A, Quack C, Rahbari N, *et al.* Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines. *Clin Cancer Res* 2011 Feb; **17**(4): 678-689.
212. Mamessier E, Sylvain A, Thibult ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, *et al.* Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest* 2011 Sep; **121**(9): 3609-3622.
213. Balsamo M, Vermi W, Parodi M, Pietra G, Manzini C, Queirolo P, *et al.* Melanoma cells become resistant to NK-cell-mediated killing when exposed to NK-cell numbers compatible with NK-cell infiltration in the tumor. *Eur J Immunol* 2012 Jul; **42**(7): 1833-1842.
214. Elboim M, Gazit R, Gur C, Ghadially H, Betser-Cohen G, Mandelboim O. Tumor immunoediting by NKp46. *J Immunol* 2010 May; **184**(10): 5637-5644.
215. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, *et al.* Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Apr; **100**(7): 4120-4125.
216. Marcenaro E, Della Chiesa M, Bellora F, Parolini S, Millo R, Moretta L, *et al.* IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* 2005 Apr; **174**(7): 3992-3998.

REFERENCES

217. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol* 2014 Jun; **44**(6): 1582-1592.
218. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 2012 Apr; **12**(4): 265-277.
219. Conrad C, Gregorio J, Wang YH, Ito T, Meller S, Hanabuchi S, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res* 2012 Oct; **72**(20): 5240-5249.
220. Idoyaga J, Fiorese C, Zbytnuik L, Lubkin A, Miller J, Malissen B, *et al.* Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest* 2013 Feb; **123**(2): 844-854.
221. Cao FM, Zhang XH, Yan X, Wang JL, Wang XL, Zhang ZG, *et al.* [Prognostic significances of natural killer cells and dendritic cells infiltrations in esophageal squamous cell carcinoma]. *Ai Zheng* 2005 Feb; **24**(2): 232-236.
222. Zhao R, Feng H, Wang X, Hu D, Zhu T. [Study on the relationship between the dendritic cell infiltration in cancer tissues and prognosis in patients with lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2002 Apr; **5**(2): 112-114.
223. Chang KC, Huang GC, Jones D, Lin YH. Distribution patterns of dendritic cells and T cells in diffuse large B-cell lymphomas correlate with prognoses. *Clin Cancer Res* 2007 Nov; **13**(22 Pt 1): 6666-6672.
224. Furihata M, Ohtsuki Y, Sonobe H, Araki K, Ogata T, Toki T, *et al.* Prognostic significance of simultaneous infiltration of HLA-DR-positive dendritic cells and tumor infiltrating lymphocytes into human esophageal carcinoma. *Tohoku J Exp Med* 1993 Mar; **169**(3): 187-195.
225. Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T, *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 2003 Mar; **104**(1): 92-97.
226. Ladányi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Mohos A, *et al.* Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother* 2007 Sep; **56**(9): 1459-1469.
227. Sandel MH, Dadabayev AR, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res* 2005 Apr; **11**(7): 2576-2582.
228. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Donskov F, Høyer M, Sjoegren P, *et al.* Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 2012 May; **118**(9): 2476-2485.
229. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, *et al.* Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004 Nov; **10**(22): 7466-7474.
230. Ma CX, Jia TC, Li XR, Zhand ZF, Yiao CB. Langerhans cells in nasopharyngeal carcinoma in relation to prognosis. *In Vivo* 1995 May-Jun; **9**(3): 225-229.
231. Sautès-Fridman C, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Fisson S, Fridman WH, Cremer I, *et al.* Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev* 2011 Mar; **30**(1): 13-25.

REFERENCES

232. Ishigami S, Ueno S, Matsumoto M, Okumura H, Arigami T, Uchikado Y, *et al.* Prognostic value of CD208-positive cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010 Mar; **59**(3): 389-395.
233. Senovilla L, Aranda F, Galluzzi L, Kroemer G. Impact of myeloid cells on the efficacy of anticancer chemotherapy. *Curr Opin Immunol* 2014 Oct; **30**: 24-31.
234. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, *et al.* Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000 May; **6**(5): 1755-1766.
235. Hoffmann TK, Müller-Berghaus J, Ferris RL, Johnson JT, Storkus WJ, Whiteside TL. Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002 Jun; **8**(6): 1787-1793.
236. Pinzon-Charry A, Ho CS, Laherty R, Maxwell T, Walker D, Gardiner RA, *et al.* A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. *Neoplasia* 2005 Dec; **7**(12): 1112-1122.
237. Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998 Mar; **4**(3): 585-593.
238. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997 Nov; **73**(3): 309-316.
239. Nestle FO, Burg G, Föh J, Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 1997 Feb; **150**(2): 641-651.
240. Chauv P, Favre N, Martin M, Martin F. Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats. *Int J Cancer* 1997 Aug; **72**(4): 619-624.
241. Ishida T, Oyama T, Carbone DP, Gaborilovich DI. Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors. *J Immunol* 1998 Nov; **161**(9): 4842-4851.
242. Kichler-Lakomy C, Budinsky AC, Wolfram R, Hellan M, Wiltschke C, Brodowicz T, *et al.* Deficiencies in phenotype expression and function of dendritic cells from patients with early breast cancer. *Eur J Med Res* 2006 Jan; **11**(1): 7-12.
243. Gaborilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997 Mar; **3**(3): 483-490.
244. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004 Dec; **5**(12): 1219-1226.
245. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, *et al.* Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001 Dec; **7**(12): 1339-1346.
246. Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, *et al.* Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 2004 Jul; **114**(2): 280-290.
247. Gaborilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009 Mar; **9**(3): 162-174.

REFERENCES

248. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2008 Oct; **118**(10): 3367-3377.
249. Mauti LA, Le Bitoux MA, Baumer K, Stehle JC, Golshayan D, Provero P, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells are implicated in regulating permissiveness for tumor metastasis during mouse gestation. *J Clin Invest* 2011 Jul; **121**(7): 2794-2807.
250. Jiang J, Guo W, Liang X. Phenotypes, accumulation, and functions of myeloid-derived suppressor cells and associated treatment strategies in cancer patients. *Hum Immunol* 2014 Nov; **75**(11): 1128-1137.
251. Zhang B, Wang Z, Wu L, Zhang M, Li W, Ding J, *et al.* Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. *PLoS One* 2013; **8**(2): e57114.
252. Schilling B, Sucker A, Griewank K, Zhao F, Weide B, Görgens A, *et al.* Vemurafenib reverses immunosuppression by myeloid derived suppressor cells. *Int J Cancer* 2013 Oct; **133**(7): 1653-1663.
253. Wang L, Chang EW, Wong SC, Ong SM, Chong DQ, Ling KL. Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J Immunol* 2013 Jan; **190**(2): 794-804.
254. Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, Gorbounov M, Albesiano E, Fu J, *et al.* STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J Clin Invest* 2013 Apr; **123**(4): 1580-1589.
255. Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, Gamrekelashvili J, Zhao F, Wedemeyer H, *et al.* Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* 2009 Sep; **50**(3): 799-807.
256. Rudolph BM, Loquai C, Gerwe A, Bacher N, Steinbrink K, Grabbe S, *et al.* Increased frequencies of CD11b(+) CD33(+) CD14(+) HLA-DR(low) myeloid-derived suppressor cells are an early event in melanoma patients. *Exp Dermatol* 2014 Mar; **23**(3): 202-204.
257. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev* 2008 Apr; **222**: 162-179.
258. Mundy-Bosse BL, Young GS, Bauer T, Binkley E, Bloomston M, Bill MA, *et al.* Distinct myeloid suppressor cell subsets correlate with plasma IL-6 and IL-10 and reduced interferon-alpha signaling in CD4⁺ T cells from patients with GI malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 2011 Sep; **60**(9): 1269-1279.
259. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Krüger C, Manns MP, *et al.* A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 2008 Jul; **135**(1): 234-243.
260. Porembka MR, Mitchem JB, Belt BA, Hsieh CS, Lee HM, Herndon J, *et al.* Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 2012 Sep; **61**(9): 1373-1385.
261. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Jan; **58**(1): 49-59.

REFERENCES

262. Tadmor T, Fell R, Polliack A, Attias D. Absolute monocytosis at diagnosis correlates with survival in diffuse large B-cell lymphoma-possible link with monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Hematol Oncol* 2013 Jun; **31**(2): 65-71.
263. Montero AJ, Diaz-Montero CM, Deutsch YE, Hurley J, Koniaris LG, Rumboldt T, *et al.* Phase 2 study of neoadjuvant treatment with NOV-002 in combination with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel in patients with HER-2 negative clinical stage II-IIIc breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012 Feb; **132**(1): 215-223.
264. Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, *et al.* Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺/CD33⁺ myeloid-derived suppressor cells and CD8⁺ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010 Jan; **136**(1): 35-45.
265. Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* 2011 Oct; **60**(10): 1419-1430.
266. Gowda M, Godder K, Kmiecik M, Worschech A, Ascierto ML, Wang E, *et al.* Distinct signatures of the immune responses in low risk versus high risk neuroblastoma. *J Transl Med* 2011; **9**: 170.
267. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ. Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2013 Sep; **62**(9): 1439-1451.
268. Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 1995 Jan; **1**(1): 95-103.
269. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, *et al.* Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol* 2007 Jun; **25**(18): 2546-2553.
270. Trellakis S, Bruderek K, Hütte J, Elian M, Hoffmann TK, Lang S, *et al.* Granulocytic myeloid-derived suppressor cells are cryosensitive and their frequency does not correlate with serum concentrations of colony-stimulating factors in head and neck cancer. *Innate Immun* 2013 Jun; **19**(3): 328-336.
271. Young MR, Petruzzelli GJ, Kolesiak K, Achille N, Lathers DM, Gabrilovich DI. Human squamous cell carcinomas of the head and neck chemoattract immune suppressive CD34(+) progenitor cells. *Hum Immunol* 2001 Apr; **62**(4): 332-341.
272. Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, *et al.* Increase in CD14+HLA-DR -/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol Immunother* 2013 Aug; **62**(8): 1421-1430.
273. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8⁺ T cell activation by CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001 Aug; **167**(3): 1137-1140.
274. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, *et al.* Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key

REFERENCES

- function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999 May; **162**(9): 5317-5326.
275. Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, Marrack P. CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Jun; **99**(13): 8832-8837.
276. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999 Jul; **59**(13): 3128-3133.
277. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999 Nov; **163**(10): 5211-5218.
278. Golgher D, Jones E, Powrie F, Elliott T, Gallimore A. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol* 2002 Nov; **32**(11): 3267-3275.
279. Javia LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother* 2003 Jan-Feb; **26**(1): 85-93.
280. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, *et al.* Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002 Sep; **169**(5): 2756-2761.
281. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, *et al.* Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001 Jun; **61**(12): 4766-4772.
282. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003 Feb; **9**(2): 606-612.
283. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003 Sep; **98**(5): 1089-1099.
284. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, *et al.* Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 2006 Dec; **24**(34): 5373-5380.
285. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Lee AH, Ellis IO, *et al.* An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011 May; **127**(1): 99-108.
286. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, *et al.* Localisation pattern of Foxp3+ regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer* 2008 Jan; **98**(1): 148-153.
287. Heimberger AB, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C, Yang DS, Sun W, Qiao W, *et al.* Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. *Clin Cancer Res* 2008 Aug; **14**(16): 5166-5172.
288. Jacobs JF, Idema AJ, Bol KF, Grotenhuis JA, de Vries IJ, Wesseling P, *et al.* Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J Neuroimmunol* 2010 Aug; **225**(1-2): 195-199.

REFERENCES

289. Ladányi A, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejos Z, *et al.* FOXP3+ cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 2010 Sep; **16**(3): 303-309.
290. Wansom D, Light E, Thomas D, Worden F, Prince M, Urba S, *et al.* Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16--associated oropharyngeal cancer. *Laryngoscope* 2012 Jan; **122**(1): 121-127.
291. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, *et al.* High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006 Nov; **108**(9): 2957-2964.
292. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2008 Feb; **93**(2): 193-200.
293. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, *et al.* Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009 Jan; **27**(2): 186-192.
294. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009 Oct; **21**(10): 1105-1111.
295. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009 Oct; **114**(16): 3367-3375.
296. Palmer S, Hanson CA, Zent CS, Porrata LF, Laplant B, Geyer SM, *et al.* Prognostic importance of T and NK-cells in a consecutive series of newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2008 May; **141**(5): 607-614.
297. Riches JC, Gribben JG. Understanding the immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia: potential clinical implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013 Apr; **27**(2): 207-235.
298. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, *et al.* T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013 Feb; **121**(9): 1612-1621.
299. Motta M, Rassenti L, Shelvin BJ, Lerner S, Kipps TJ, Keating MJ, *et al.* Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005 Oct; **19**(10): 1788-1793.
300. McClanahan F1 HB, Miller S3, Clear AJ3, Lichter P2, Gribben JG3, Seiffert M2. PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia.; 2015.
301. MacFarlane M, Harper N, Snowden RT, Dyer MJ, Barnett GA, Pringle JH, *et al.* Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* 2002 Oct; **21**(44): 6809-6818.
302. Görgün G, Holderried TA, Zahrieh D, Neuberg D, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J Clin Invest* 2005 Jul; **115**(7): 1797-1805.
303. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgün G, Le Dieu R, Blum W, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 2008 Jul; **118**(7): 2427-2437.

REFERENCES

304. Ramsay AG, Evans R, Kiaii S, Svensson L, Hogg N, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce defective LFA-1-directed T-cell motility by altering Rho GTPase signaling that is reversible with lenalidomide. *Blood* 2013 Apr; **121**(14): 2704-2714.
305. Aue G, Njuguna N, Tian X, Soto S, Hughes T, Vire B, *et al.* Lenalidomide-induced upregulation of CD80 on tumor cells correlates with T-cell activation, the rapid onset of a cytokine release syndrome and leukemic cell clearance in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2009 Sep; **94**(9): 1266-1273.
306. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999 Sep; **106**(4): 995-1004.
307. Zucchetto A, Tripodo C, Benedetti D, Deaglio S, Gaidano G, Del Poeta G, *et al.* Monocytes/macrophages but not T lymphocytes are the major targets of the CCL3/CCL4 chemokines produced by CD38(+)/CD49d(+) chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2010 Jul; **150**(1): 111-113.
308. Mainou-Fowler T, Dignum HM, Proctor SJ, Summerfield GP. The prognostic value of CD38 expression and its quantification in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymphoma* 2004 Mar; **45**(3): 455-462.
309. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 2014 Feb; **24**: 71-81.
310. Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Huergo-Zapico L, Lopez-Soto A, Fernández-Guizán A, Acebes-Huerta A, *et al.* Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2010 Oct; **51**(10): 1829-1836.
311. Coscia M, Vitale C, Peola S, Foglietta M, Rigoni M, Griggio V, *et al.* Dysfunctional V γ 9V δ 2 T cells are negative prognosticators and markers of dysregulated mevalonate pathway activity in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2012 Oct; **120**(16): 3271-3279.
312. Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, *et al.* Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 2005 Sep; **106**(6): 2018-2025.
313. Giannopoulos K, Schmitt M, Kowal M, Wlasiuk P, Bojarska-Junak A, Chen J, *et al.* Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep* 2008 Sep; **20**(3): 677-682.
314. Giannopoulos K, Schmitt M, Wlasiuk P, Chen J, Bojarska-Junak A, Kowal M, *et al.* The high frequency of T regulatory cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia is diminished through treatment with thalidomide. *Leukemia* 2008 Jan; **22**(1): 222-224.
315. Deutsch V, Perry C, Polliack A. Expansion of regulatory T cells in B chronic lymphocytic leukemia: enhanced 'brakes' on host immunity. *Leuk Lymphoma* 2009 May; **50**(5): 687-688.
316. Jak M, Mous R, Remmerswaal EB, Spijker R, Jaspers A, Yagüe A, *et al.* Enhanced formation and survival of CD4+ CD25hi Foxp3+ T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2009 May; **50**(5): 788-801.
317. D'Arena G, Laurenti L, Minervini MM, Deaglio S, Bonello L, De Martino L, *et al.* Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res* 2011 Mar; **35**(3): 363-368.

REFERENCES

318. Weiss L, Melchardt T, Egle A, Grabmer C, Greil R, Tinhofer I. Regulatory T cells predict the time to initial treatment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2011 May; **117**(10): 2163-2169.
319. D'Arena G, D'Auria F, Simeon V, Laurenti L, Deaglio S, Mansueto G, *et al.* A shorter time to the first treatment may be predicted by the absolute number of regulatory T-cells in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2012 Jun; **87**(6): 628-631.
320. Kay NE, Zarling JM. Impaired natural killer activity in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with a deficiency of azurophilic cytoplasmic granules in putative NK cells. *Blood* 1984 Feb; **63**(2): 305-309.
321. Kimby E, Mellstedt H, Nilsson B, Björkholm M, Holm G. Differences in blood T and NK cell populations between chronic lymphocytic leukemia of B cell type (B-CLL) and monoclonal B-lymphocytosis of undetermined significance (B-MLUS). *Leukemia* 1989 Jul; **3**(7): 501-504.
322. Kay NE, Zarling J. Restoration of impaired natural killer cell activity of B-chronic lymphocytic leukemia patients by recombinant interleukin-2. *Am J Hematol* 1987 Feb; **24**(2): 161-167.
323. Burton JD, Weitz CH, Kay NE. Malignant chronic lymphocytic leukemia B cells elaborate soluble factors that down-regulate T cell and NK function. *Am J Hematol* 1989 Feb; **30**(2): 61-67.
324. Katrinakis G, Kyriakou D, Papadaki H, Kalokyri I, Markidou F, Eliopoulos GD. Defective natural killer cell activity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is associated with impaired release of natural killer cytotoxic factor(s) but not of tumour necrosis factor-alpha. *Acta Haematol* 1996; **96**(1): 16-23.
325. Maki G, Hayes GM, Naji A, Tyler T, Carosella ED, Rouas-Freiss N, *et al.* NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G. *Leukemia* 2008 May; **22**(5): 998-1006.
326. Buechele C, Baessler T, Schmiedel BJ, Schumacher CE, Grosse-Hovest L, Rittig K, *et al.* 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Immunol* 2012 Mar; **42**(3): 737-748.
327. Reiners KS, Topolar D, Henke A, Simhadri VR, Kessler J, Sauer M, *et al.* Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood* 2013 May; **121**(18): 3658-3665.
328. Veuillen C, Aurrant-Schleinitz T, Castellano R, Rey J, Mallet F, Orlanducci F, *et al.* Primary B-CLL resistance to NK cell cytotoxicity can be overcome in vitro and in vivo by priming NK cells and monoclonal antibody therapy. *J Clin Immunol* 2012 Jun; **32**(3): 632-646.
329. Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez-García E, Payer AR, *et al.* Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease. *PLoS One* 2014; **9**(10): e108326.
330. Xing D, Ramsay AG, Gribben JG, Decker WK, Burks JK, Munsell M, *et al.* Cord blood natural killer cells exhibit impaired lytic immunological synapse formation that is reversed with IL-2 ex vivo expansion. *J Immunother* 2010 Sep; **33**(7): 684-696.
331. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996 Sep; **184**(3): 1101-1109.

REFERENCES

332. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999 Dec 1; **94**(11): 3658-3667.
333. 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. *Br J Haematol* 1996 Jan; **92**(1): 97-103.
334. 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 Nov; **114**(20): 4441-4450.
335. Sivina M, Hartmann E, Vasyutina E, Boucas JM, Breuer A, Keating MJ, *et al.* Stromal cells modulate TCL1 expression, interacting AP-1 components and TCL1-targeting micro-RNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012 Aug; **26**(8): 1812-1820.
336. 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 Apr; **6**(10): 7632-7643.
337. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, *et al.* Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008 Jan; **111**(2): 865-873.
338. Marquez ME, Hernández-Uzcátegui O, Cornejo A, Vargas P, Da Costa O. Bone marrow stromal mesenchymal cells induce down regulation of CD20 expression on B-CLL: implications for rituximab resistance in CLL. *Br J Haematol* 2015 Jan.
339. Lutzny G, Kocher T, Schmidt-Supprian M, Rudelius M, Klein-Hitpass L, Finch AJ, *et al.* Protein kinase c- β -dependent activation of NF- κ B in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell* 2013 Jan; **23**(1): 77-92.
340. Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, Ding W, Mukhopadhyay D, Kay NE. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood* 2010 Mar; **115**(9): 1755-1764.
341. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* Feb; **24**: 71-81.
342. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta* 2015 Jul.
343. Heinig K, Gätjen M, Grau M, Stache V, Anagnostopoulos I, Gerlach K, *et al.* Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer Discov* 2014 Dec; **4**(12): 1448-1465.
344. Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, Zapata JM, Karras JG, Tsukada N, *et al.* Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* 2002 Sep; **100**(5): 1795-1801.
345. Granziero L, Circosta P, Scielzo C, Frisaldi E, Stella S, Geuna M, *et al.* CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes. *Blood* 2003 Mar; **101**(5): 1962-1969.

REFERENCES

346. Badoux X, Bueso-Ramos C, Harris D, Li P, Liu Z, Burger J, *et al.* Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and bone marrow endothelial cells: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hum Pathol* 2011 Dec; **42**(12): 1989-2000.
347. Cols M, Barra CM, He B, Puga I, Xu W, Chiu A, *et al.* Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J Immunol* 2012 Jun; **188**(12): 6071-6083.
348. Hamilton E, Pearce L, Morgan L, Robinson S, Ware V, Brennan P, *et al.* Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2012 Sep; **158**(5): 589-599.
349. Maffei R, Fiorcari S, Bulgarelli J, Martinelli S, Castelli I, Deaglio S, *et al.* Physical contact with endothelial cells through β 1- and β 2- integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells. *Haematologica* 2012 Jun; **97**(6): 952-960.
350. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Martinelli S, Castelli I, Valenti V, *et al.* Endothelin-1 promotes survival and chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia B cells through ETA receptor. *PLoS One* 2014; **9**(6): e98818.
351. Sangaletti S, Tripodo C, Vitali C, Portararo P, Guarnotta C, Casalini P, *et al.* Defective stromal remodeling and neutrophil extracellular traps in lymphoid tissues favor the transition from autoimmunity to lymphoma. *Cancer Discov* 2014 Jan; **4**(1): 110-129.
352. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005 Dec; **5**(12): 953-964.
353. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 2014; **6**(3): 1670-1690.
354. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002 Nov; **23**(11): 549-555.
355. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* 2012; **2012**: 948098.
356. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012 Mar; **122**(3): 787-795.
357. Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Polosukhin VV, Han W, Ausborn JA, McLoed AG, *et al.* A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis. *J Immunol* 2011 Dec; **187**(11): 5703-5711.
358. Gordon S, Mantovani A. Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. *Eur J Immunol* 2011 Sep; **41**(9): 2470-2472.
359. Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013 Jul; **33**(7): 1478-1483.
360. Alahari SV, Dong S, Alahari SK. Are Macrophages in Tumors Good Targets for Novel Therapeutic Approaches? *Mol Cells* 2015 Feb; **38**(2): 95-104.
361. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992 Jul; **13**(7): 265-270.

REFERENCES

362. Kodelja V, Müller C, Politz O, Hakij N, Orfanos CE, Goerdts S. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *J Immunol* 1998 Feb; **160**(3): 1411-1418.
363. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999 Jun; **20**(6): 254-257.
364. Mizutani K, Sud S, McGregor NA, Martinovski G, Rice BT, Craig MJ, *et al.* The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia* 2009 Nov; **11**(11): 1235-1242.
365. Bonecchi R, Facchetti F, Dusi S, Luini W, Lissandrini D, Simmelink M, *et al.* Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J Immunol* 2000 Apr; **164**(7): 3862-3869.
366. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001 Mar; **193**(6): 727-740.
367. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004 Jul; **4**(7): 540-550.
368. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009 Nov; **86**(5): 1065-1073.
369. Chiodoni C, Colombo MP, Sangaletti S. Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2010 Jun; **29**(2): 295-307.
370. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004 Oct; **104**(8): 2224-2234.
371. Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, Barroso R, Sánchez-Mateos P, Puig-Kroger A, *et al.* CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J Immunol* 2014 Apr; **192**(8): 3858-3867.
372. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 2000 Mar; **404**(6776): 407-411.
373. Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, Welters MJ, *et al.* M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol* 2011 Aug; **187**(3): 1157-1165.
374. Avila-Moreno F, Lopez-Gonzalez JS, Galindo-Rodriguez G, Prado-Garcia H, Bajana S, Sanchez-Torres C. Lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines use different mediators to induce comparable phenotypic and functional changes in human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006 May; **55**(5): 598-611.
375. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 2007 Dec; **110**(13): 4319-4330.
376. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 2011 Nov; **11**(11): 750-761.
377. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 2006 Feb; **79**(2): 285-293.

REFERENCES

378. Herfs M, Herman L, Hubert P, Minner F, Arafa M, Roncarati P, *et al.* High expression of PGE2 enzymatic pathways in cervical (pre)neoplastic lesions and functional consequences for antigen-presenting cells. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Apr; **58**(4): 603-614.
379. Dalwadi H, Krysan K, Heuze-Vourc'h N, Dohadwala M, Elashoff D, Sharma S, *et al.* Cyclooxygenase-2-dependent activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-6 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005 Nov; **11**(21): 7674-7682.
380. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2007 Jan; **81**(1): 15-27.
381. Banerjee S, Lin CF, Skinner KA, Schiffhauer LM, Peacock J, Hicks DG, *et al.* Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res* 2011 Jan; **71**(2): 318-327.
382. Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med* 2011; **9**: 216.
383. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010 Oct; **11**(10): 889-896.
384. Eiró N, Pidal I, Fernandez-Garcia B, Junquera S, Lamelas ML, del Casar JM, *et al.* Impact of CD68/(CD3+CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. *PLoS One* 2012; **7**(12): e52796.
385. Faber TJ, Japink D, Leers MP, Sosef MN, von Meyenfeldt MF, Nap M. Activated macrophages containing tumor marker in colon carcinoma: immunohistochemical proof of a concept. *Tumour Biol* 2012 Apr; **33**(2): 435-441.
386. Kurahara H, Shinchu H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, *et al.* Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* 2011 May; **167**(2): e211-219.
387. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Müller A, *et al.* Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 2008 May; **67**(5): 453-463.
388. Kurahara H, Shinchu H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, *et al.* Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* May 15; **167**(2): e211-219.
389. Lan C, Huang X, Lin S, Huang H, Cai Q, Wan T, *et al.* Expression of M2-polarized macrophages is associated with poor prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Technol Cancer Res Treat* Jun; **12**(3): 259-267.
390. Medrek C, Ponten F, Jirstrom K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*; **12**: 306.
391. Cook J, Hagemann T. Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2013 Aug; **13**(4): 595-601.
392. Law SK, Micklem KJ, Shaw JM, Zhang XP, Dong Y, Willis AC, *et al.* A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol* 1993 Sep; **23**(9): 2320-2325.

REFERENCES

393. Van den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, Van den Berg TK, Fluitsma DM, Dijkstra CD, *et al.* Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol* 1999 Nov; **66**(5): 858-866.
394. Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 2007 Mar; **191**(1): 48-53.
395. Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, *et al.* Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 2003 Sep; **55**(3): 551-571.
396. Fabriek BO, Polfliet MM, Vloet RP, van der Schors RC, Ligtenberg AJ, Weaver LK, *et al.* The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood* 2007 Jun 15; **109**(12): 5223-5229.
397. Zwadlo G, Voegeli R, Schulze Osthoff K, Sorg C. A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp Cell Biol* 1987; **55**(6): 295-304.
398. Schaer DJ, Boretti FS, Hongegger A, Poehler D, Linnscheid P, Staeger H, *et al.* Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Immunogenetics* 2001 Mar; **53**(2): 170-177.
399. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, *et al.* Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000 Apr; **6**(4): 422-428.
400. Polfliet MM, Fabriek BO, Daniels WP, Dijkstra CD, van den Berg TK. The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology* 2006; **211**(6-8): 419-425.
401. Fabriek BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, *et al.* The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 2009 Jan 22; **113**(4): 887-892.
402. Droste A, Sorg C, Hogger P. Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Mar 5; **256**(1): 110-113.
403. Matsushita N, Kashiwagi M, Wait R, Nagayoshi R, Nakamura M, Matsuda T, *et al.* Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3. *Clin Exp Immunol* 2002 Oct; **130**(1): 156-161.
404. Baeten D, Moller HJ, Delanghe J, Veys EM, Moestrup SK, De Keyser F. Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum* 2004 May; **50**(5): 1611-1623.
405. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 1998 Mar; **187**(5): 813-818.
406. Kelly GL, Strasser A. The essential role of evasion from cell death in cancer. *Adv Cancer Res* 2011; **111**: 39-96.

REFERENCES

407. Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Apr; **100**(9): 5336-5341.
408. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, *et al.* PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med* 2014 May; **211**(5): 781-790.
409. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 1998 Sep; **64**(3): 275-290.
410. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, *et al.* B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 2006 Apr; **203**(4): 871-881.
411. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol* 2013; **4**: 190.
412. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004 Sep; **10**(9): 942-949.
413. Liu J, Zhang N, Li Q, Zhang W, Ke F, Leng Q, *et al.* Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. *PLoS One* 2011; **6**(4): e19495.
414. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, *et al.* Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res* 2010 Oct; **70**(19): 7465-7475.
415. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014 Jul; **41**(1): 49-61.
416. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008 Aug; **8**(8): 618-631.
417. Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, Ueda S, Kimura YN, Hamano S, *et al.* Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest* 2005 Nov; **115**(11): 2979-2991.
418. Etoh T, Shibuta K, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiogenin expression in human colorectal cancer: the role of focal macrophage infiltration. *Clin Cancer Res* 2000 Sep; **6**(9): 3545-3551.
419. Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, Koyama H, Kitazawa M, Takeoka M, *et al.* Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res* 2010 Sep; **70**(18): 7073-7083.
420. Chen P, Huang Y, Bong R, Ding Y, Song N, Wang X, *et al.* Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. *Clin Cancer Res* 2011 Dec; **17**(23): 7230-7239.
421. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol* 2000 Oct; **192**(2): 150-158.
422. Laoui D, Van Overmeire E, Di Conza G, Aldeni C, Keirsse J, Morias Y, *et al.* Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res* 2014 Jan; **74**(1): 24-30.

REFERENCES

423. Guruvayoorappan C. Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? *Integr Cancer Ther* 2008 Jun; **7**(2): 90-95.
424. Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, *et al.* Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol* 2003 Oct; **163**(4): 1233-1243.
425. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, *et al.* HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008 Mar; **13**(3): 206-220.
426. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER, *et al.* Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 2007 Mar; **67**(6): 2649-2656.
427. Mazzieri R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Raghetti A, Berti A, *et al.* Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell* 2011 Apr; **19**(4): 512-526.
428. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006 Jan; **124**(2): 263-266.
429. Rohan TE, Xue X, Lin HM, D'Alfonso TM, Ginter PS, Oktay MH, *et al.* Tumor microenvironment of metastasis and risk of distant metastasis of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014 Aug; **106**(8).
430. Sangaletti S, Di Carlo E, Gariboldi S, Miotti S, Cappetti B, Parenza M, *et al.* Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res* 2008 Nov; **68**(21): 9050-9059.
431. Bonde AK, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer* 2012; **12**: 35.
432. Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van den Bossche J, Schouppe E, Mommer C, *et al.* Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol* 2011; **55**(7-9): 861-867.
433. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013 Nov; **19**(11): 1423-1437.
434. Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, Lossos IS, Anderson MW, Morais JC, *et al.* Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2012 Mar; **23**(3): 736-742.
435. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, *et al.* Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010 Mar; **362**(10): 875-885.
436. Wada N, Zaki MA, Hori Y, Hashimoto K, Tsukaguchi M, Tatsumi Y, *et al.* Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology* Jan; **60**(2): 313-319.
437. Marchesi F, Cirillo M, Bianchi A, Gately M, Olimpieri OM, Cerchiara E, *et al.* High density of CD68+/CD163+ tumour-associated macrophages (M2-TAM) at diagnosis is significantly correlated to unfavorable prognostic factors and to poor clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2014 Apr.

REFERENCES

438. Kridel R, Xerri L, Gelas-Dore B, Tan K, Feugier P, Vawda A, *et al.* The Prognostic Impact of CD163-Positive Macrophages in Follicular Lymphoma: A Study from the BC Cancer Agency and the Lymphoma Study Association. *Clin Cancer Res* 2015 Aug; **21**(15): 3428-3435.
439. Clear AJ, Lee AM, Calaminici M, Ramsay AG, Morris KJ, Hallam S, *et al.* Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. *Blood* 2010 Jun; **115**(24): 5053-5056.
440. Jones K, Vari F, Keane C, Crooks P, Nourse JP, Seymour LA, *et al.* Serum CD163 and TARC as disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 2013 Feb; **19**(3): 731-742.
441. Kinouchi M, Miura K, Mizoi T, Ishida K, Fujibuchi W, Sasaki H, *et al.* Infiltration of CD40-positive tumor-associated macrophages indicates a favorable prognosis in colorectal cancer patients. *Hepato gastroenterology* 2013 2013 Jan-Feb; **60**(121): 83-88.
442. Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY. A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res* 2010 Sep; **16**(18): 4583-4594.
443. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Liguori M, *et al.* Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* 2013 Feb; **23**(2): 249-262.
444. Paulus P, Stanley ER, Schäfer R, Abraham D, Aharinejad S. Colony-stimulating factor-1 antibody reverses chemoresistance in human MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2006 Apr; **66**(8): 4349-4356.
445. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* 2011 Jun; **1**(1): 54-67.
446. Shree T, Olson OC, Elie BT, Kester JC, Garfall AL, Simpson K, *et al.* Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev* 2011 Dec; **25**(23): 2465-2479.
447. Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, Masutomi K, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, *et al.* Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Jul; **108**(30): 12425-12430.
448. Milas L, Wike J, Hunter N, Volpe J, Basic I. Macrophage content of murine sarcomas and carcinomas: associations with tumor growth parameters and tumor radiocurability. *Cancer Res* 1987 Feb; **47**(4): 1069-1075.
449. Xu J, Escamilla J, Mok S, David J, Priceman S, West B, *et al.* CSF1R signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer. *Cancer Res* 2013 May; **73**(9): 2782-2794.
450. Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest* 2010 Mar; **120**(3): 694-705.
451. Ahn GO, Tseng D, Liao CH, Dorie MJ, Czechowicz A, Brown JM. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 May; **107**(18): 8363-8368.
452. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013 Jan; **229**(2): 176-185.

REFERENCES

453. Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AH, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer* 2006 Aug; **95**(3): 272-281.
454. Priceman SJ, Sung JL, Shaposhnik Z, Burton JB, Torres-Collado AX, Moughon DL, *et al.* Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood* 2010 Feb; **115**(7): 1461-1471.
455. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000 Apr; **6**(4): 443-446.
456. Park S, Jiang Z, Mortenson ED, Deng L, Radkevich-Brown O, Yang X, *et al.* The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell* 2010 Aug; **18**(2): 160-170.
457. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, *et al.* Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 2010 Sep; **142**(5): 699-713.
458. Minard-Colin V, Xiu Y, Poe JC, Horikawa M, Magro CM, Hamaguchi Y, *et al.* Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV. *Blood* 2008 Aug; **112**(4): 1205-1213.
459. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Nyman H, Eerola LM, Leppä S. A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clin Cancer Res* 2007 Oct; **13**(19): 5784-5789.
460. Andreu P, Johansson M, Affara NI, Pucci F, Tan T, Junankar S, *et al.* Fcγ activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell* 2010 Feb; **17**(2): 121-134.
461. Pander J, Heusinkveld M, van der Straaten T, Jordanova ES, Baak-Pablo R, Gelderblom H, *et al.* Activation of tumor-promoting type 2 macrophages by EGFR-targeting antibody cetuximab. *Clin Cancer Res* 2011 Sep; **17**(17): 5668-5673.
462. Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* 1989 Mar; **71**(3): 343-350.
463. McConkey DJ, Aguilar-Santelises M, Hartzell P, Eriksson I, Mellstedt H, Orrenius S, *et al.* Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 1991 Feb; **146**(3): 1072-1076.
464. Munk Pedersen I, Reed J. Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma* 2004 Dec; **45**(12): 2365-2372.
465. Ysebaert L, Fournié JJ. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011 Jul; **52**(7): 1404-1406.
466. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Feb; **99**(3): 1030-1037.

REFERENCES

467. Audrito V, Serra S, Brusa D, Mazzola F, Arruga F, Vaisitti T, *et al.* Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2015 Jan; **125**(1): 111-123.
468. Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, Rauen J, Habe S, Busch H, *et al.* Nurse-like cells show deregulated expression of genes involved in immunocompetence. *Br J Haematol* Aug; **154**(3): 349-356.
469. Fiorcari S, Martinelli S, Bulgarelli J, Audrito V, Zucchini P, Colaci E, *et al.* Lenalidomide interferes with tumor-promoting properties of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2015 Feb; **100**(2): 253-262.
470. Giannoni P, Pietra G, Travaini G, Quarto R, Shyti G, Benelli R, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica* 2014 Jun; **99**(6): 1078-1087.
471. Filip AA, Ciseł B, Koczkodaj D, Wąsik-Szczepanek E, Piersiak T, Dmoszyńska A. Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages? *Blood Cells Mol Dis* 2013 Apr; **50**(4): 263-270.
472. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, *et al.* Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* 2005 Aug; **106**(3): 1012-1020.
473. Coscia M, Pantaleoni F, Riganti C, Vitale C, Rigoni M, Peola S, *et al.* IGHV unmutated CLL B cells are more prone to spontaneous apoptosis and subject to environmental prosurvival signals than mutated CLL B cells. *Leukemia* 2011 May; **25**(5): 828-837.
474. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Bertoncelli L, Martinelli S, Guarnotta C, *et al.* The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica* 2013 Jul; **98**(7): 1115-1123.
475. Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, Barth TF, Rauen J, Habermann A, *et al.* Non-malignant B cells and chronic lymphocytic leukemia cells induce a pro-survival phenotype in CD14+ cells from peripheral blood. *Leukemia* 2011 Apr; **25**(4): 722-726.
476. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994 Feb; **14**(2): 1431-1437.
477. Chang YH, Chang DM, Lin KC, Shin SJ, Lee YJ. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes Metab Res Rev* 2011 Sep; **27**(6): 515-527.
478. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, *et al.* The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 2002 Oct; **3**(10): 995-1001.
479. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentinis B, Catalanotti F, Giazzon M, *et al.* HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* 2004 Aug; **5**(8): 825-830.
480. Mazumdar R, Evans P, Culpin R, Bailey J, Allsup D. The automated monocyte count is independently predictive of overall survival from diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia and of survival following first-line chemotherapy. *Leuk Res* 2013 Jun; **37**(6): 614-618.

REFERENCES

481. Herishanu Y, Kay S, Sarid N, Kohan P, Braunstein R, Rotman R, *et al.* Absolute monocyte count trichotomizes chronic lymphocytic leukemia into high risk patients with immune dysregulation, disease progression and poor survival. *Leuk Res* 2013 Oct; **37**(10): 1222-1228.
482. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Mar; **91**(6): 2305-2309.
483. Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999 Apr; **10**(4): 463-471.
484. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, *et al.* CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007 Dec 1; **110**(12): 4012-4021.
485. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, *et al.* ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2006 May 1; **107**(9): 3584-3592.
486. Borge M, Remes Lenicov F, Nannini PR, de los Ríos Alicandú MM, Podaza E, Ceballos A, *et al.* The expression of sphingosine-1 phosphate receptor-1 in chronic lymphocytic leukemia cells is impaired by tumor microenvironmental signals and enhanced by piceatannol and R406. *J Immunol* 2014 Sep; **193**(6): 3165-3174.
487. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2012; **30**: 69-94.
488. Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther* 2007 Jul; **115**(1): 84-105.
489. Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007 Nov 1; **110**(9): 3316-3325.
490. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Eklund EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 1998 Feb; **391**(6669): 799-803.
491. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, *et al.* A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 2000 Jul; **406**(6793): 309-314.
492. Ferretti E, Bertolotto M, Deaglio S, Tripodo C, Ribatti D, Audrito V, *et al.* A novel role of the CX3CR1/CX3CL1 system in the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and tumor microenvironment. *Leukemia* 2011 Aug; **25**(8): 1268-1277.
493. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 231-264.
494. Croci DO, Morande PE, Dergan-Dylon S, Borge M, Toscano MA, Stupirski JC, *et al.* Nurse-like cells control the activity of chronic lymphocytic leukemia B cells via galectin-1. *Leukemia* 2013 Jun; **27**(6): 1413-1416.
495. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Bürkle A, Wierda WG, Keating MJ, *et al.* High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009 Mar; **113**(13): 3050-3058.

REFERENCES

496. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 1993 Apr; **260**(5106): 355-358.
497. Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 1993 Jun; **177**(6): 1821-1826.
498. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, Bonello L, Horenstein AL, Tamagnone L, *et al.* CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005 Apr; **105**(8): 3042-3050.
499. Tonino SH, Spijker R, Luijckx DM, van Oers MH, Kater AP. No convincing evidence for a role of CD31-CD38 interactions in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008 Aug 1; **112**(3): 840-843.
500. Giannoni P, Pietra G, Travaini G, Quarto R, Shyti G, Benelli R, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica* Jun; **99**(6): 1078-1087.
501. Borge M, Nannini PR, Morande PE, Jancic C, Bistmans A, Bezares RF, *et al.* CXCL12 is a costimulator for CD4+ T cell activation and proliferation in chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Immunol Immunother* 2013 Jan; **62**(1): 113-124.
502. Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ, *et al.* TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* 2006 Feb; **20**(2): 280-285.
503. Pekarsky Y, Zanesi N, Aqeilan RI, Croce CM. Animal models for chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Biochem* 2007 Apr; **100**(5): 1109-1118.
504. Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune responses to microbes. *Scand J Infect Dis* 2003; **35**(9): 573-576.
505. Talos F, Mena P, Fingerle-Rowson G, Moll U, Petrenko O. MIF loss impairs Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ* 2005 Oct; **12**(10): 1319-1328.
506. Sapozhnikov A, Pewzner-Jung Y, Kalchenko V, Krauthgamer R, Shachar I, Jung S. Perivascular clusters of dendritic cells provide critical survival signals to B cells in bone marrow niches. *Nat Immunol* 2008 Apr; **9**(4): 388-395.
507. Reinart N, Nguyen PH, Boucas J, Rosen N, Kvasnicka HM, Heukamp L, *et al.* Delayed development of chronic lymphocytic leukemia in the absence of macrophage migration inhibitory factor. *Blood* 2013 Jan; **121**(5): 812-821.
508. Dallery-Prudhomme E, Roumier C, Denis C, Preudhomme C, Kerckaert JP, Galiegue-Zouitina S. Genomic structure and assignment of the RhoH/TTF small GTPase gene (ARHH) to 4p13 by in situ hybridization. *Genomics* 1997 Jul; **43**(1): 89-94.
509. Preudhomme C, Roumier C, Hildebrand MP, Dallery-Prudhomme E, Lantoine D, Lai JL, *et al.* Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene* 2000 Apr; **19**(16): 2023-2032.
510. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Küppers R, *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001 Jul; **412**(6844): 341-346.

REFERENCES

511. Hiraga J, Katsumi A, Iwasaki T, Abe A, Kiyoi H, Matsushita T, *et al.* Prognostic analysis of aberrant somatic hypermutation of RhoH gene in diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia* 2007 Aug; **21**(8): 1846-1847.
512. Troeger A, Johnson AJ, Wood J, Blum WG, Andritsos LA, Byrd JC, *et al.* RhoH is critical for cell-microenvironment interactions in chronic lymphocytic leukemia in mice and humans. *Blood* 2012 May; **119**(20): 4708-4718.
513. Jia L, Clear A, Liu FT, Matthews J, Uddin N, McCarthy A, *et al.* Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014 Mar; **123**(11): 1709-1719.
514. Sivina M, Hartmann E, Kipps TJ, Rassenti L, Krupnik D, Lerner S, *et al.* CCL3 (MIP-1 α) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Feb; **117**(5): 1662-1669.
515. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Burkle A, Wierda WG, Keating MJ, *et al.* High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009 Mar 26; **113**(13): 3050-3058.
516. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, *et al.* CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 2009 May; **69**(9): 4001-4009.
517. Palacios F, Moreno P, Morande P, Abreu C, Correa A, Porro V, *et al.* High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* 2010 Jun; **115**(22): 4488-4496.
518. Hamed H, Zaki S. Role of CCL3 protein (monocyte inflammatory protein-1 alpha) in lymphoid malignancy. *Egypt J Immunol* 2007; **14**(1): 63-72.
519. Martinez-Lostao L, Briones J, Martinez-Gallo M, Forne I, Sierra J, Rodriguez-Sanchez JL, *et al.* Fludarabine-induced apoptosis in CD19+/CD5+B-CLL cells is a direct and nurse-like-cell independent effect. *Leuk Lymphoma* 2004 Nov; **45**(11): 2307-2314.
520. Filip AA, Ciseł B, Wąsik-Szczepanek E. Guilty bystanders: nurse-like cells as a model of microenvironmental support for leukemic lymphocytes. *Clin Exp Med* 2013 Dec.
521. ten Hacken E, Burger JA. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia--focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res* 2014 Feb; **20**(3): 548-556.
522. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, *et al.* The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* Sep 29; **118**(13): 3603-3612.
523. Ramsay AG, Gribben JG. Immune dysfunction in chronic lymphocytic leukemia T cells and lenalidomide as an immunomodulatory drug. *Haematologica* 2009 Sep; **94**(9): 1198-1202.
524. Burger M, Hartmann T, Krome M, Rawluk J, Tamamura H, Fujii N, *et al.* Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005 Sep 1; **106**(5): 1824-1830.
525. Stamatopoulos B, Meuleman N, De Bruyn C, Pieters K, Mineur P, Le Roy C, *et al.* AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal

REFERENCES

- stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments. *Haematologica* 2012 Apr; **97**(4): 608-615.
526. Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, Rauen J, Häbe S, Busch H, *et al.* Nurse-like cells show deregulated expression of genes involved in immunocompetence. *Br J Haematol* 2011 Aug; **154**(3): 349-356.
527. Sander B, de Jong D, Rosenwald A, Xie W, Balagué O, Calaminici M, *et al.* The reliability of immunohistochemical analysis of the tumor microenvironment in follicular lymphoma: a validation study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Haematologica* 2014 Apr; **99**(4): 715-725.

Auteur: Frédéric BOISSARD

Directeur de Thèse : Dr Mary Poupot et Dr Loïc Ysebaert

Titre : Etude des interactions entre « nurse-like » cells et cellules leucémiques de leucémie lymphoïde chronique : nouveaux rationnels pour de nouveaux traitements.

Résumé:

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est l'hémopathie maligne la plus fréquente des pays occidentaux. Elle se caractérise par une accumulation de cellules leucémiques dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires. Malgré les nouvelles thérapies, la LLC reste incurable. Dans la LLC, comme dans tout cancer, le microenvironnement tumoral, un milieu complexe contenant des cellules immunitaires pouvant être pro-tumorales, prend une part croissante aussi bien dans la physiopathologie que le pronostic. La recherche de nouvelles thérapies ciblant les interactions des cellules leucémiques avec ce microenvironnement représente aujourd'hui une piste prometteuse pour traiter cette pathologie.

Les « nurse-like » cells (NLC) semblaient être les macrophages associés aux tumeurs (TAM) de la LLC. Ces cellules, retrouvées dans les ganglions lymphatiques de patients, favorisent *in vitro* la survie des cellules leucémiques. Elles partagent avec les TAM de nombreuses caractéristiques telles que des capacités immunosuppressives, un profil transcriptomique proche et une implication dans la résistance aux traitements. Nous l'avons confirmé par une analyse fonctionnelle et phénotypique. Nos travaux indiquent clairement que les NLC sont les TAM de la LLC avec une forte expression de CD68 et de CD163 et qu'elles favorisent la survie des cellules leucémiques.

Suite à ce travail, nous avons déterminé l'impact pronostique des NLC dans la LLC, en émettant l'hypothèse que, comme dans d'autres cancers, une forte infiltration par les TAM pouvait être de mauvais pronostic. Nous avons alors montré que le taux de NLC présentes au sein du ganglion lymphatique chez le patient est corrélé à la progression de la LLC. Les NLC relarguent également un facteur soluble le CD163 soluble (sCD163) dans le sang des patients, dont le taux est corrélé à des marqueurs de mauvais pronostic dans la LLC tels que le statut IgHV non muté, le caryotype complexe et les mutations de *TP53*. Enfin, le taux de sCD163 est un marqueur pronostique indépendant dans la LLC : un fort taux étant associé à un raccourcissement du temps avant retraitement, de la survie sans progression et de la survie globale des patients.

Ensuite nous avons étudié l'impact d'une thérapie innovante, l'ibrutinib, un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant spécifiquement la Bruton Tyrosine Kinase, sur ces NLC. *In vitro*, les monocytes se différencient toujours en NLC et leur phénotype n'est pas modifié. De plus, ces cellules sont toujours capables de protéger les cellules leucémiques de l'apoptose. Finalement, nous avons mis en évidence qu'elles pouvaient participer à la chimiorésistance, en protégeant *in vitro* les cellules leucémiques de l'ibrutinib mais pas du dasatinib, de l'idélalisib, du vénétoclax, de la bendamustine et du rituximab.

L'ensemble de nos résultats indique que cibler les NLC est une piste prometteuse dans le traitement de la LLC. Les interactions cellulaires entre NLC et cellules leucémiques pourraient représenter une cible thérapeutique intéressante. Nous avons montré qu'*in vitro* le contact entre NLC et cellules leucémiques est nécessaire à la survie de ces dernières. Suite à une étude transcriptomique, nous avons mis en évidence plusieurs couples moléculaires potentiellement impliqués dans ces interactions. Seul le couple LFA3/CD2 s'est révélé être nécessaire dans ce contact *via* un mécanisme dépendant d'Akt et son blocage inhibe totalement les effets pro-survie des NLC sur les cellules leucémiques.

En conclusion, les NLC *via* des interactions dépendantes du couple LFA-3/CD2 protègent les cellules leucémiques de l'apoptose *in vitro*. De plus, elles participent à la chimiorésistance en protégeant aussi les cellules leucémiques de l'ibrutinib. Elles relarguent également du sCD163, dosable dans le sérum, un facteur pronostique indépendant de la LLC. La recherche de nouvelles thérapies plus spécifiques, ciblant les NLC constitue donc une piste thérapeutique intéressante dans la LLC.

Mots clés: « Nurse-like » cells, leucémie lymphoïde chronique, LFA-3, ibrutinib, CD163 soluble, macrophage associé aux tumeurs

Discipline: Cancérologie

Laboratoire d'accueil: CRCT U1037, équipe 9 « Immunociblage thérapeutiques des tumeurs à cellules B