



HAL
open science

Apport d'une approche protéomique dans l'étude des mécanismes d'activation de néoplasies lymphoïdes B

Aurore Perrot

► To cite this version:

Aurore Perrot. Apport d'une approche protéomique dans l'étude des mécanismes d'activation de néoplasies lymphoïdes B. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. ⟨NNT: 2015LORR0349⟩. ⟨tel-01474099⟩

HAL Id: tel-01474099

<https://theses.hal.science/tel-01474099v1>

Submitted on 22 Feb 2017

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.



HAL Authorization



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par Aurore PERROT

**Apport d'une approche protéomique dans
l'étude des mécanismes d'activation de
néoplasies lymphoïdes B**

1^{er} décembre 2015

Membres du jury

Rapporteurs

Loïc YSEBAERT

Médecin chercheur, Université de Toulouse III

Olivier TOURNIHLAC

Professeur des Universités, Université d'Auvergne

Examineurs

Marie Christine BENE

Professeur des Universités, Université de Nantes

Pierre FEUGIER

Professeur des Universités, Université de Lorraine

Rémi HOULGATTE

Directeur de Recherche, Université de Lorraine

Catherine THIEBLEMONT

Professeur des Universités, Université Paris 7

Invité

Siamak BAHRAM

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

UMR Inserm 954, Nutrition Génétique Exposition aux Risques Environnementaux

It always seems impossible until it is done

Nelson Mandela

Je remercie infiniment Mme Le Pr Marie-Christine Béné pour son encadrement et son soutien bienveillant tout au long des multiples étapes administratives et scientifiques de ce parcours. Je voudrais lui témoigner ma profonde gratitude pour m'avoir aidée à traverser les différents obstacles.

Je remercie Le Dr Laurent Vallat pour m'avoir confié ces études, et encore plus Le Pr Siamak Bahram pour avoir permis leurs finalisations jusqu'à acceptation des publications.

Je souhaite également remercier Mr Le Pr Pierre Feugier pour le soutien depuis le début de cette aventure en 2008, et peut-être encore plus pour les encouragements et les aides pour y mettre fin, notamment pour la (les) constitution(s) du jury, les détails administratifs, mais aussi les conseils pour l'amélioration du manuscrit.

Je remercie Mr Rémi Houlgatte pour avoir pris le relai de la direction de cette thèse, ainsi que Mme Le Pr Catherine Thieblemont pour avoir accepté de juger ce travail et s'être rendue disponible à cette date impossible.

Je tiens à remercier vivement Le Dr Loïc Ysebaert et Le Pr Olivier Tournilhac pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse ; pour leur disponibilité, leur expertise, leurs critiques constructives, leurs encouragements.

Je remercie les autres responsables scientifiques et directeurs d'unités qui m'ont accueillie chaleureusement pendant les différentes années de ce travail, Les Pr Véronique Leblond, Hélène Merle-Béral, Frédéric Davi, Patrice Debré à La Pitié-Salpêtrière, Le Pr Raoul Herbrecht à Strasbourg, Les Pr Gilbert Faure et Jean-Louis Guéant à Nancy.

Je remercie tous les médecins, chercheurs et étudiants de ces unités pour les interactions scientifiques et amicales, Cédric Pionneau, Frédéric Jacob, Cynthia Frapsauce, Julien Bouley, Wassila Carpentier, Abiba Doukani ; Elsa Nourisson, Cindy Barnig, Alice Meyer, Raphael Carapito, Cécile Macquin, Véronique Rolli, Raphael Dupont, Irina Kotova, Aurore Morlon, Philippe Georgel, Mirjana Radosavljevic ; Mélanie Durand, Nader Hadife, Tala Hamade, Marc Muller, Min Chen, Sébastien Hergalant, Julien Broséus, Gaili Chen, et une pensée particulière pour Le Pr Ali Dalloul.

Je salue certains soutiens et certaines rencontres pendant les périodes difficiles. Je suis profondément reconnaissante envers Messieurs Les Pr Marc Braun, Thomas Lecompte, Jean-Yves Blay notamment : merci d'avoir cru à la finalisation de ce travail plus que moi, et de m'avoir montré qu'on pouvait aussi aimer le chemin.

J'ai enfin une pensée pour mes collègues, compagnons de route - parfois de galère - au quotidien.

Je remercie La Fondation pour la Recherche Médicale pour le soutien matériel pendant les deux années de mobilité alsacienne.

Je dédie cette thèse à mes proches, ma famille, mes amis ; mes raisons d'être.

Ac : Anticorps	DNA-PKcs : <i>DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit</i>
ABC : <i>Activated B-Cell</i>	DTT : <i>DiThioThreitol</i>
ACN : ACétoNitrile	E2D : <i>Electrophorèse BiDimensionnelle</i>
ADCC : <i>Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity</i>	EBF1 : <i>Early B-cell Factor 1</i>
ADN : <i>Acide DésoxyriboNucléique (DNA)</i>	eIF : <i>eukaryotic Initiation Factor</i>
AID : <i>Activation-Induced cytidine Deaminase</i>	EBV : <i>Epstein-Barr Virus</i>
ALK : <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>	ERIC : <i>European Research Initiative on CLL</i>
AMM : <i>Autorisation de Mise sur le Marché</i>	ESI : <i>ElectroSpray Ionization</i>
ANOVA : <i>ANalysis Of VAriance</i>	FAB : <i>French American British</i>
APS : <i>Ammonium PerSulfate</i>	FC : <i>Fludarabine-Cyclophosphamide</i>
APRIL : <i>A Proliferation-Inducing Ligand</i>	FCR : <i>Fludarabine-Cyclophosphamide-Rituximab</i>
ATM : <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	FDR : <i>False Discovery Rate</i>
ATU : <i>Autorisation Temporaire d'Utilisation</i>	FITC : <i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>
BAFF : <i>B-cell Activating Factor</i>	FISH : <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
BBP : <i>Bleu de BromoPhénol</i>	FLT3 : <i>Fms-Like Tyrosine kinase 3</i>
BCL2 : <i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>	GC : <i>Germinal Center</i>
BCL6 : <i>B-Cell Lymphoma 6</i>	HCCA : <i>α-Cyano-4-HydroxyCinnamic Acid</i>
BCR : <i>B-Cell Receptor</i>	HCLS1 (ou HS1) : <i>Hematopoietic cell-specific LYN substrate 1</i>
BMI1 : <i>B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1</i>	HHV8 : <i>Human Herpes Virus 8</i>
BR : <i>Bendamustine-Rituximab</i>	HPLC : <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
BSA : <i>Bovin Serum Albumin</i>	HR : <i>Hazard Ratio</i>
BTK : <i>Bruton's Tyrosine Kinase</i>	HRP : <i>HorseRadish Peroxidase</i>
CALLA : <i>Common Acute Lymphoblastic leukemia/lymphoma Antigen</i>	HSP : <i>Heat Shock Protein</i>
CART19 : <i>Chimeric Antigen Receptor anti-CD19</i>	IEF : <i>IsoElectroFocalisation</i>
CCL : <i>Chemokine CC motif Ligand</i>	Ig : <i>Immunoglobuline</i>
CCR : <i>Chemokine CC motif Receptor</i>	IGVH : <i>ImmunoGlobulin Variable Heavy (gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes des Ig)</i>
CD : <i>Cluster de Différenciation</i>	ILSG : <i>International Lymphoma Study Group</i>
CdK : <i>Cyclin Dependent Kinase</i>	IP3 : <i>Inositol TriPhosphate</i>
CDR : <i>Complementary Determining Region</i>	IPG : <i>Immobilized PH Gradient</i>
CGH : <i>Comparative Genomic Hybridization</i>	IPI : <i>International Prognostic Index</i>
CHAPS : <i>(3-CHolamidopropyl) dimethyl Ammonio] - 1- PropaneSulfonate</i>	IRAK : <i>IL-1 Receptor Activated Kinase</i>
CIRCS : <i>Cumulative Illness Rating Scale</i>	ITAM : <i>Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif</i>
CMF : <i>Cytométrie en flux</i>	IWCLL : <i>International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia</i>
CMH : <i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>	LAL : <i>Leucémie Aiguë Lymphoblastique</i>
CSR : <i>Class Swith Recombination</i>	LBDGC : <i>Lymphome B Diffus à Grandes Cellules</i>
Cy : <i>Cyanine</i>	LBM : <i>Lymphocytose B Monoclonale</i>
DIGE : <i>Differential In Gel Electrophoresis</i>	LCM : <i>Lymphome à Cellules du Manteau</i>
DLEU : <i>Deleted in LEUkemia</i>	
DMF : <i>Di-Méthyl Formamide</i>	

LC-MS-MS : <i>Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>	RSS : <i>Recombination Signal Sequence</i>
LF : Lymphome Folliculaire	S : <i>Stimulated (cells)</i>
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique	SB 3-10 : <i>Sulfobetain 3-10</i>
LNH : Lymphome Non Hodgkinien	SDF1 : <i>Stromal cell-Derived Factor 1</i>
LPL : <i>LymphoPlasmocytic Lymphoma</i>	SDS-PAGE : <i>Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis</i>
LR : Léналidomide-Rituximab	SLC : <i>Surrogate Light Chain</i>
LSP1 : <i>Lymphocyte-Specific Protein 1</i>	SVF : <i>Sérum de Veau Foetal</i>
LZM : Lymphome de la Zone Marginale	TBS / TBS-T : <i>Tris Buffered Saline / TBS-Tween</i>
M : <i>Mutated (genes)</i>	TCA : <i>TriChloroacetic Acid</i>
MALDI-TOF : <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight</i>	TDL : <i>Temps de Doublement Lymphocytaire</i>
MALT : <i>Mucosae-Associated Lymphoid Tissue</i>	Tdt : <i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase</i>
MDR : <i>Minimal Deleted Region</i>	Tec : <i>Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma</i>
MEC-1 : <i>Mitosis Entry Checkpoint 1</i>	TEMED : <i>TEtraMethylEthyleneDiamine</i>
MM : Myélome Multiple	TFA : <i>TriFluoroacetic Acid</i>
MS : <i>Mass Spectrometry</i>	TIR : <i>Toll Interleukin-1 Receptor</i>
MUM1 : <i>MUltiple Myeloma oncogene 1</i>	TLR : <i>Toll-like Receptor</i>
MYD88 : <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>	TP53 : <i>Tumor Protein P53</i>
MW : Maladie de Waldenström	TPA : <i>12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
ND : non disponible (donnée)	UM : <i>UnMutated (genes)</i>
NES : <i>Nuclear Export Sequence</i>	US : <i>UnStimulated (cells)</i>
NFkB : <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>	VDJ : <i>Variable Diversity and Junction</i>
NGS : <i>Next Generation Sequencing</i>	VEGF : <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
NHEJ : <i>Non Homogenous End-Joining</i>	VLA-4 : <i>Very Late Antigen-4</i>
NLC : <i>Nurse-Like Cells</i>	WB : <i>Western-Blot</i>
NZB : <i>New Zealand Black</i>	XRCC6 : <i>X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 6</i>
ORF : <i>Open Reading Frame</i>	ZAP-70 : <i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>
OMS : <i>Organisation Mondiale de la Santé</i>	
PAX5 : <i>PAired boX protein 5</i>	
PBS : <i>Phosphate Buffered Saline</i>	
PCR : <i>Polymerase Chain Reaction</i>	
PDCD4 : <i>Programmed Cell Death Protein 4</i>	
PFS : <i>Progression-Free-Survival</i>	
pI : <i>point Isoélectrique</i>	
PI3K : <i>PhosphoInositide-3-Kinase</i>	
PKC : <i>Protein Kinase C</i>	
PMF : <i>Peptide Mass Fingerprinting</i>	
RC : <i>Réponse Complète</i>	
REAL : <i>Revised European American Lymphoma</i>	
RMH : <i>Royal Marsden Hospital</i>	
RPMI : <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>	

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	9
I. Néoplasies lymphoïdes B	10
<i>A. Physiopathologie générale des néoplasies lymphoïdes B matures</i>	<i>12</i>
1. Ontogénèse normale des lymphocytes B	12
2. Origine des cellules B tumorales	18
3. Signalisation B normale et pathologique	22
4. Apoptose et prolifération	26
5. Rôle du micro-environnement	28
6. Modèles animaux	31
<i>B. La leucémie lymphoïde chronique</i>	<i>33</i>
1. Epidémiologie	33
2. Aspects cliniques	33
3. Diagnostic	35
4. Cytogénétique et données moléculaires	36
5. Facteurs pronostiques	42
6. Moyens thérapeutiques	45
7. Stratégies actuelles de traitement	51
<i>C. La maladie de Waldenström</i>	<i>53</i>
1. Epidémiologie	53
2. Aspects cliniques	54
3. Diagnostic	54
4. Cytogénétique et données moléculaires	56
5. Un diagnostic différentiel particulier : le LZM splénique	58
6. Facteurs pronostiques	59
7. Stratégies thérapeutiques	60
II. Stratégies générales en protéomique	61
<i>A. Les techniques d'identification : l'apport de la spectrométrie de masse</i>	<i>62</i>
<i>B. Les techniques séparatives</i>	<i>64</i>
<i>C. Les progrès de la technologie E2D-MS</i>	<i>65</i>
III. Génomique et protéomique des néoplasies lymphoïdes B	68
<i>A. Génomique et protéomique de la LLC</i>	<i>68</i>
<i>B. Génomique et protéomique de la MW</i>	<i>71</i>
OBJECTIFS DU TRAVAIL	72
MATERIELS ET METHODES	75

I. Matériels	76
<i>A. Sélection et prélèvements des cellules des patients</i>	<i>76</i>
<i>B. Réactifs utilisés</i>	<i>76</i>
II. Méthodes	78
<i>A. Préparations cellulaires</i>	<i>78</i>
1. Isolement des cellules tumorales B	78
2. Stimulation du BCR des lymphocytes B de LLC	78
3. Test fonctionnel d'apoptose	79
<i>B. Préparation des extraits protéiques</i>	<i>80</i>
1. Extraction des protéines en vue de l'utilisation en E2D-DIGE	80
2. Dosage protéique	80
3. Purification des extraits protéiques destinés à la DIGE par précipitation	80
4. Contrôle qualité : migration sur petit gel SDS-PAGE	81
<i>C. Electrophorèse bidimensionnelle</i>	<i>82</i>
1. Constitution du standard interne	82
2. Marquage par les cyanines et réhydratation des strips	82
3. Isoélectrofocalisation (1ère dimension)	82
4. Migration SDS-PAGE (2ème dimension)	83
5. Acquisition et analyse des images	83
<i>D. Spectrométrie de masse</i>	<i>84</i>
1. Prélèvement des spots d'intérêt	84
2. Digestion tryptique	84
3. Détermination des spectres de masse par MALDI-TOF et LC-MS/MS	84
4. Identification polypeptidique	84
<i>E. Analyses de validation</i>	<i>85</i>
1. Western-Blot	85
2. Analyse de l'expression de XRCC6 par PCR quantitative	85
RESULTATS	86
I. Chapitre 1 : Apport de la protéomique à l'étude de la leucémie lymphoïde chronique	87
<i>A. Faisabilité d'une étude protéomique par E2D-DIGE dans le contexte de la LLC</i>	<i>87</i>
1. Caractéristiques des patients étudiés	87
2. Analyse protéomique par E2D-DIGE	88
<i>B. Existence d'une signature protéomique des LLC agressives à l'état basal</i>	<i>90</i>
1. Analyse en composantes principales	90
2. Analyses statistiques	90
<i>C. Modifications du protéome après stimulation du BCR</i>	<i>92</i>
<i>D. Modifications post-traductionnelles après stimulation du BCR</i>	<i>99</i>
<i>E. Validations par Western-Blot</i>	<i>102</i>
<i>E. Description d'un sous-type intermédiaire de LLC</i>	<i>104</i>

II. Chapitre 2 : Apport de la protéomique à l'étude de la macroglobulinémie de Waldenström	106
<i>A. Mise en évidence d'une signature protéomique spécifique de la maladie de Waldenström</i>	<i>107</i>
<i>B. Existence d'une sous-expression de Ku70/XRCC6 dans la maladie de Waldenström</i>	<i>109</i>
DISCUSSION - PERSPECTIVES	112
I. Apport d'une technologie de type E2D-DIGE dans les hémopathies lymphoïdes B	113
II. Perspectives	117
<i>A. Expression et régulation de PDCD4 dans la LLC</i>	<i>117</i>
<i>B. Rôle des molécules du cytosquelette dans la LLC et la MW</i>	<i>119</i>
<i>C. Mécanismes de la sous-expression de XRCC6 / Ku70 dans la MW</i>	<i>119</i>
REFERENCES	121
ANNEXES	144
Annexe 1 : Premier article : A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia	145
Annexe 2 : Second article : A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia	164
Annexe 3 : Projet d'étude de Ku70 dans la maladie de Waldenström	173

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Ontogénèse B et expression séquentielle des antigènes de différenciation ⁷	12
Figure 2 : Synthèse schématique générale de la différenciation lymphocytaire B ¹³	15
Figure 3 : Schéma simplifié des processus de modification des gènes des Ig : recombinaison V(D)J, hypermutation somatique et <i>switch</i> isotypique ¹⁵	16
Figure 4 : Mécanismes moléculaires des réarrangements géniques du BCR : cassures, recombinaisons et réparations de l'ADN ¹⁶	17
Figure 5 : Représentation schématique des précurseurs des cellules B néoplasiques ¹⁵	18
Figure 6 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses sur l'origine cellulaire de la LLC ²²	20
Figure 7 : Schéma de la signalisation du BCR dans les cellules B ³⁷	23
Figure 8 : Altérations moléculaires récurrentes et voies de signalisation activées dans la MW ⁵²	24
Figure 9 : Interactions moléculaires entre la cellule de LLC et son microenvironnement ⁸⁶	28
Figure 10 : Probabilité de survie depuis le diagnostic selon le groupe cytogénétique ¹³⁰	38
Figure 11 : Voies biologiques -autres que celle du BCR- dérégulées dans la LLC suite à des anomalies moléculaires	41
Figure 11 : Intermédiaires de signalisation de la voie du BCR et inhibiteurs utilisés en clinique à ce jour ²⁰⁸	47
Figure 12 : Représentation schématique de différents spectromètres de masse : MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, ESI-TOF	63
Figure 13 : Principales étapes de la technique d'E2D-MS	64
Figure 14 : Les différentes étapes nécessaires à l'identification de protéines issues d'un échantillon par technologie E2D-MS	65
Figure 15 : Principe de la technologie E2D-DIGE	66
Figure 16 : Evaluation de la réponse à la stimulation du BCR par test fonctionnel d'apoptose.	79
Figure 17 : Exemple de contrôle de qualité des extraits protéiques pour un patient.	81
Figure 18 : Image représentative de l'ensemble des spots polypeptidiques obtenus par migration 2D	89
Figure 19 : Analyse en composantes principales du protéome de LLC à l'état basal	90
Figure 20 : Analyse en composantes principales du protéome de LLC avant et après stimulation du BCR	92
Figure 21 : Classification hiérarchique des échantillons issus de LLC de profil indolent	93
Figure 22 : Classification hiérarchique des échantillons issus de LLC de profil agressif :	94
Figure 23 : Diminution de l'expression de la protéine <i>UV excision repair protein RAD23 homolog B</i> après stimulation du BCR de cellules de LLC de profil agressif	98

Figure 24 : Profil évocateur de phosphorylation de la <i>Lymphocyte-specific protein 1</i> après stimulation du BCR des cellules de LLC de profil agressif _____	101
Figure 25 : Validation des différences d'expression des protéines <i>UV excision repair protein RAD23 homolog B</i> et <i>Programmed death cell protein 4</i> par Western-Blot _____	102
Figure 26 : Diminution de l'expression de RAD23B après stimulation du BCR de LLC de profil agressif et intermédiaire _____	103
Figure 27 : Analyse descriptive des profils d'expression des échantillons M3 d'une LLC de sous-type intermédiaire _____	105
Figure 28 : Analyse en composantes principales du protéome de MW en comparaison avec des LZM et des LLC _____	107
Figure 29 : Profil protéomique E2D-DIGE de Ku70 dans les MW en comparaison avec des LZM et des LLC _____	110
Figure 30 : Diminution de l'expression de la protéine Ku70 dans les MW par rapport aux LZM et aux LLC _____	111
Figure 31 : Diminution de l'expression de l'ARN de <i>XRCC6</i> dans les MW par rapport à d'autres hémopathies lymphoïdes B _____	111
Figure 32 : Expression transcriptionnelle de <i>PDCD4</i> relative à celle de la β -actine en dehors de toute stimulation	118
Figure 33 : Données préliminaires d'expression protéique de <i>PDCD4</i> phosphorylée sur S457 après stimulation _____	118

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification OMS des néoplasies lymphoïdes à cellules B matures (* = Entités provisoires) ⁴	11
Tableau 2 : Score RMH (<i>Royal Marsden Hospital</i>) dit de Matutes / Moreau ^{110,126}	35
Tableau 3 : Classification pronostique de Rai ¹⁶⁴	42
Tableau 4 : Classification pronostique de Binet ¹⁶⁵	42
Tableau 5 : Synthèse des principaux facteurs pronostiques clinico-biologiques dans la LLC	44
Tableau 6 : Critères d'évolutivité d'une LLC constituant une indication thérapeutique ¹²⁰	51
Tableau 7 : Critères diagnostiques d'une MGUS et d'une MW ²³³	55
Tableau 8 : Score prédictif d'évolution d'une MGUS vers une MW permettant de distinguer 3 groupes : faible risque (0-2), risque intermédiaire (3-5), haut risque (6-9) ²⁴³	56
Tableau 9 : Score pronostique international de la MW (IPSS)	59
Tableau 10 : Liste des réactifs utilisés.	77
Tableau 11 : Caractéristiques des patients atteints de LLC	87
Tableau 12 : Spots polypeptidiques différenciellement exprimés entre les LLC indolentes et agressives en dehors de toute stimulation	91
Tableau 13 : Spots polypeptidiques différenciellement exprimés après stimulation des LLC indolentes	95
Tableau 14 : Spots polypeptidiques différenciellement exprimés après stimulation des LLC agressives	97
Tableau 15 : Profil d'expression, dans des cellules de LLC à gènes <i>IGVH</i> non mutés, de protéines identifiées sous plusieurs isoformes et variations d'expression après stimulation du BCR	99
Tableau 16 : Caractéristiques des échantillons inclus dans l'étude protéomique MW	106
Tableau 17 : Spots polypeptidiques différenciellement exprimés entre les échantillons de MW, LZM et LLC	108

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Néoplasies lymphoïdes B

Si depuis la plus haute antiquité, le sang et son rapport à la vie ont attiré l'attention des hommes et des médecins, ce n'est qu'à partir du XVIII^e siècle que sont réalisées les premières observations microscopiques des cellules sanguines (par Anton van Leeuwenhoek pour les globules rouges en 1674 et par Joseph Lieutaud pour les globules blancs en 1749). La première description d'un lymphocyte revient à William Hewson en 1774 lors de la publication de ses travaux sur le système lymphatique¹. Le terme de leucémie (ou leucémie ou leucocythémie) fait son entrée dans le langage médical français en 1856 après les premiers cas décrits simultanément et indépendamment par le français Alfred Donné, l'écossais John Bennett et l'allemand Rudolph Virchow. Paul Ehrlich distingue les "leucémies lymphatiques" des leucémies myélogènes en 1898 alors que Wilhem Epstein avait déjà décrit en 1889 des cas d'évolution aiguë différents des leucémies chroniques. Concernant les lymphomes, si la première description par Thomas Hodgkin remonte à 1832 et si le terme de lymphosarcome revient à Rudolph Virchow en 1863, il faut attendre 1956 pour que soit proposée par Henri Rappaport la première réelle classification des lymphomes non hodgkiniens (LNH) initialement centrée sur le lymphome folliculaire (LF)². Un tournant est amorcé dans les années 1960-1970 grâce au développement des connaissances du système immunitaire, avec la description des lignées lymphocytaires B, T, NK et de leurs stades de différenciation, et, dans les années 1980, à l'explosion des connaissances des molécules de surface grâce à l'essor des anticorps (Ac) monoclonaux. L'intégration de ces données conduit à la publication en 1974 par Karl Lennert de la classification de Kiel qui devient rapidement la référence en Europe. D'autres classifications voient le jour, notamment aux Etats-Unis, mais il faut patienter jusqu'aux années 1990 pour que se crée un groupe de travail international (*International Lymphoma Study Group* ILSG), permettant d'aboutir aux classifications modernes, et en premier lieu la classification REAL (*Revised European American Lymphoma*).

Les néoplasies malignes du tissu lymphoïde se développent à partir d'éléments cellulaires constituant le tissu lymphoïde normal. L'essor des techniques immunohistochimiques, le développement des Ac monoclonaux, de la cytogénétique et de la biologie moléculaire ont abouti à de profonds remaniements dans la conception histogénétique et la classification de ces tumeurs. La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)^{3,4}, faisant suite à la classification REAL⁵ établie en 1994, qui a elle-même succédé à la classification FAB (*French American British*)⁶ datant de 1989, est largement fondée sur l'analyse phénotypique et moléculaire découlant en partie de travaux sur la différenciation des cellules B et T normales. La mise en évidence d'anomalies cytogénétiques récurrentes a permis de mieux classer certaines entités qui autrefois appartenaient à des groupes hétérogènes de tumeurs.

Le tableau 1 présente la plus récente classification OMS des néoplasies lymphoïdes B à cellules matures.

Néoplasies lymphoïdes à cellules B matures
Leucémie lymphoïde chronique / Lymphome lymphocytaire
Leucémie prolymphocytaire B
Lymphome splénique B de la zone marginale
Leucémie à tricholeucocytes
Lymphomes / leucémies spléniques B inclassables* <i>Lymphome splénique diffus de la pulpe rouge à petites cellules*</i> <i>Variante de la leucémie à tricholeucocytes*</i>
Lymphome lymphoplasmocytaire <i>Macroglobulinémie de Waldenström</i>
Maladie des chaînes lourdes <i>Maladie des chaînes lourdes α</i> <i>Maladie des chaînes lourdes γ</i> <i>Maladie des chaînes lourdes μ</i>
Myélome multiple
Plasmocytome osseux solitaire
Plasmocytome extra-osseux
Lymphome de la zone marginale extra-ganglionnaire de type MALT
Lymphome de la zone marginale ganglionnaire <i>Lymphome de la zone marginale ganglionnaire pédiatrique*</i>
Lymphome folliculaire <i>Lymphome folliculaire pédiatrique*</i>
Lymphome centro-folliculaire cutané primitif
Lymphome à cellules du manteau
Lymphome diffus à grandes cellules B LBDGC riche en cellules T / histiocytes LBDGC primitif du système nerveux central LBDGC primitif cutané localisé aux membres inférieurs (<i>leg-type</i>) LBDGC lié à l'EBV des sujets âgés*
LBDGC associé à une inflammation chronique
Granulomatose lymphomatoïde
Lymphome primitif du médiastin à grandes cellules B
Lymphome intra-vasculaire à grandes cellules B
Lymphome à grandes cellules ALK+
Lymphome plasmoblastique
Lymphome à grandes cellules survenant sur une maladie de Castelman multicentrique associée à HHV8
Lymphome primitif des séreuses
Lymphome de Burkitt
Lymphome B inclassable, avec caractéristiques intermédiaires entre un LBDGC et un lymphome de Burkitt
Lymphome B inclassable, avec caractéristiques intermédiaires entre un LBDGC et un lymphome de Hodgkin

Tableau 1 : Classification OMS des néoplasies lymphoïdes à cellules B matures (* = Entités provisoires)⁴

Nous nous intéresserons dans ce travail plus particulièrement à la leucémie lymphoïde chronique (LLC), à la maladie de Waldenström (MW) et au lymphome de la zone marginale (LZM) dans sa forme splénique, dont les définitions sont détaillées dans les chapitres I.B et I.C.

A. Physiopathologie générale des néoplasies lymphoïdes B matures

1. Ontogénèse normale des lymphocytes B

L'ontogénèse des lymphocytes B comporte deux étapes principales :

- une **phase de différenciation et de maturation** des lymphocytes B, indépendante de la présence d'un antigène, qui se déroule dans la moelle osseuse, générant des lymphocytes B immatures exprimant une immunoglobuline (Ig) de surface capable de reconnaître un antigène, grâce au réarrangement génique VDJ (*Variable Diversity and Junction*).

- une **phase d'activation et de différenciation finale**, dépendante d'antigènes du soi et du non-soi, qui a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, aboutissant après activation antigénique à la formation de plasmocytes producteurs d'Ig et de cellules mémoires spécifiques d'un antigène.

La maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse se fait à partir d'une cellule souche hématopoïétique, et se traduit par l'expression séquentielle de molécules de surface appelées antigènes de différenciation et identifiées depuis l'avènement des Ac monoclonaux. Elles sont ainsi le plus souvent désignées par le cluster de différenciation (CD), groupe d'Ac monoclonaux similaires ayant conduit à leur découverte. D'autres mécanismes moléculaires complexes consistant en des réarrangements géniques conduisant à la synthèse d'un récepteur à l'antigène (*B-cell receptor BCR*) accompagnent ces modifications immunophénotypiques, ainsi que l'activation ou la répression de nombreux gènes dont les principaux sont *PAX-5* et *RAG*. Ces remaniements chromosomiques peuvent ultérieurement favoriser l'apparition de translocations impliquées dans la lymphomagenèse.

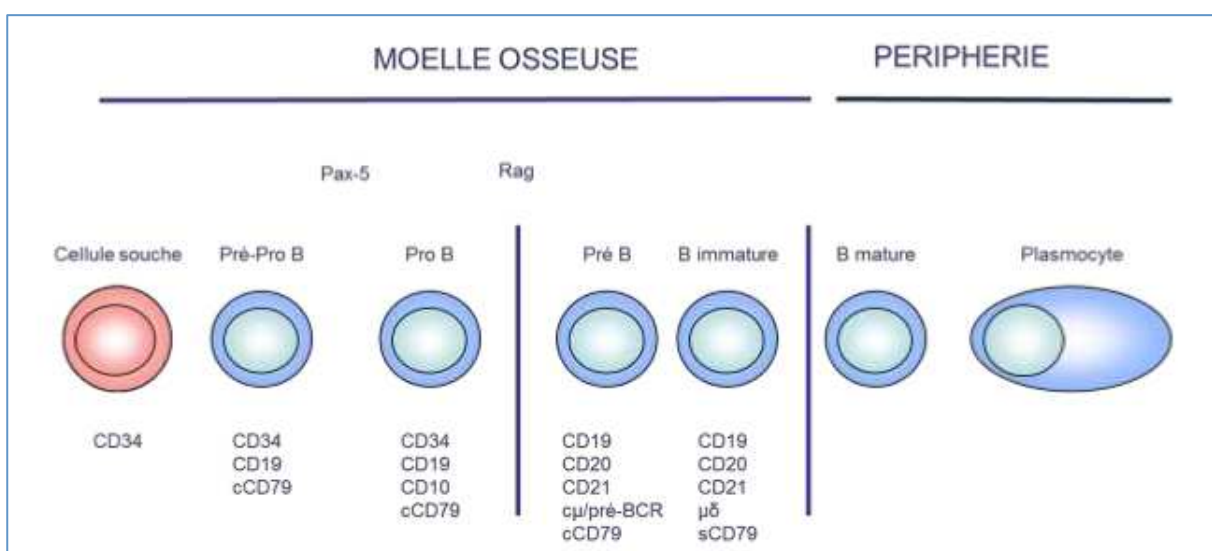


Figure 1 : Ontogénèse B et expression séquentielle des antigènes de différenciation⁷

- *Stades évolutifs des lymphocytes B*

On distingue différents stades cellulaires en fonction du réarrangement des gènes et de l'apparition des antigènes de différenciation :

- les **cellules souches pluripotentes** : elles possèdent des capacités d'auto-renouvellement grâce à un contact avec les ostéoblastes des travées osseuses délimitant la niche hématopoïétique⁸ ; leur entrée en différenciation est permise par la perte de ce contact et l'expression de *c-Kit*

- les **cellules progénitrices multipotentes** : l'expression de *FLT3* se traduit par la perte des capacités d'auto-renouvellement, et des mécanismes épigénétiques (acétylation ou méthylation des histones notamment) permettent à ces cellules d'exprimer faiblement des gènes normalement associés à des progéniteurs plus avancés dans la différenciation ; l'orientation vers la lignée lymphoïde est sous le contrôle des protéines BMI-1 et PRC-1 et une expression faible de la protéine PU-1 régule l'intervention des facteurs de transcription pour orienter la différenciation lymphoïde⁹ ; sur le plan phénotypique, c'est le stade de l'expression intra-cytoplasmique de CD79a¹⁰

- les **cellules progénitrices multipotentes "marquées lymphoïdes" ou progéniteurs lymphoïdes (précoce et commun)** : acquérant l'expression des enzymes Rag1 et Rag2 impliquées dans les réarrangements géniques des Ig, ces cellules subissent la première phase du réarrangement génique concernant les segments D et J de la chaîne lourde H (*Heavy*) ; c'est à ce stade qu'est perdue la possibilité de différenciation vers la lignée NK puis T, avec parallèlement l'expression de CD19¹¹

- les **cellules pro-B** : en plus de l'acquisition de CD10 ou CALLA (*Common Acute Lymphoblastic leukemia/lymphoma Antigen*) et de CD38, ces cellules sont concernées par le réarrangement V-DJ de la chaîne lourde sur un des deux chromosomes 14, suivi de la synthèse de la chaîne lourde complète μ si ce réarrangement est productif ; les chaînes légères ne sont pas réarrangées à ce stade, mais l'expression d'une pseudo-chaîne légère (*surrogate light chain SLC*) formée des molécules VpreB et $\lambda 5$ permet le passage au stade suivant caractérisé par cette expression du pré-BCR¹² ; ceci nécessite l'expression des facteurs de transcription *EBF-1*, *Pax 5* puis *Aiolos* (membre de la famille *Ikaros*)

- les **cellules pré-B** : définies par l'apparition de CD24, ces cellules sont surtout caractérisées par la présence de chaînes μ intracytoplasmiques et l'expression à la surface du pré-BCR (formé d'une seule chaîne μ et d'une SLC) qui conduit à une phase de prolifération et de division cellulaire associée aux phénomènes d'exclusion allélique (consistant à l'inactivation de Rag1 et Rag2 dès qu'un réarrangement est productif, permettant l'obtention d'un seul type de chaîne légère et un seul type de chaîne lourde) et de sélection positive (génération d'un signal de survie si le réarrangement est productif) qui autorise la cellule à poursuivre sa maturation par le réarrangement V-J de la chaîne légère κ , puis de la chaîne légère λ si le réarrangement κ n'est pas productif

- les **lymphocytes B immatures** : après réarrangement productif de la chaîne légère, ces cellules expriment l'IgM correspondant à un BCR complet, nécessaire à la survie cellulaire à ce stade ; s'en suit une deuxième sélection, dite sélection négative, qui permet d'éliminer les cellules exprimant un BCR

auto-réactif, grâce à la présence, au niveau de la moelle osseuse, de cellules stromales exprimant des peptides du soi via des molécules du CMH ; dans le même temps, la transcription des gènes est étendue jusqu'au segment C δ , ce qui permet, par épissage alternatif, la co-expression IgM / IgD à la surface de la cellule

- les **lymphocytes B matures naïfs** : caractérisées par cette co-expression d'une IgM et d'une IgD de même spécificité antigénique, ces cellules constituent le stade ultime de développement dans la moelle osseuse et migrent vers les organes lymphoïdes périphériques que sont les ganglions, la rate, et le système MALT, au niveau desquels ils peuvent rencontrer l'antigène

- les **centroblastes** : une fois que les lymphocytes B ont rencontré l'antigène -déclenchant un premier signal d'activation-, les lymphocytes T CD4+ peuvent fournir un second signal activateur conduisant à une prolifération. Les centroblastes peuvent ensuite se différencier en cellules productrices d'anticorps et migrer dans la médullaire du ganglion et la pulpe rouge de la rate sous forme de plasmocytes à gènes *IGVH* non mutés et à récepteur de faible affinité (maturation indépendante du centre germinatif ou *Germinal Center* GC), ou peuvent rejoindre un follicule et former un GC. Là, ils prolifèrent rapidement grâce à l'environnement fourni par les cellules folliculaires dendritiques et c'est lors de cette prolifération qu'ont lieu les hypermutations somatiques des régions variables des deux chaînes d'Ig

- les **centrocytes** : lorsque cette phase de prolifération intense et d'hypermutations dans le centre germinatif se termine, les centroblastes deviennent des centrocytes. Ces derniers doivent recevoir des signaux de survie pour contrebalancer l'expression de protéines pro-apoptotiques telles Fas, Bax. Les cellules pour lesquelles les hypermutations somatiques ont conduit à un BCR d'affinité élevée reçoivent préférentiellement ces signaux de survie, permettant de reprendre un processus de prolifération/hypermutation somatique, de quitter le GC pour se différencier en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes à gènes *IGVH* mutés et à récepteur de forte affinité, ou de s'orienter vers la commutation de classe (*switch* isotypique) via une présentation de l'antigène aux cellules T CD4+. Les phénomènes d'hypermutation somatique et de commutation de classe permettent de diversifier le répertoire antigénique

- les **lymphocytes B mémoires** issus de la réponse T dépendante dans le GC sont IgM+ (ou IgA+ ou IgG+) IgD- et CD27+ ; l'expression du CD27 est très forte dans les **plasmocytes**.

A noter que la caractérisation phénotypique permet également de mettre en évidence d'autres populations de lymphocytes B circulants : les cellules IgM^{low} IgD^{high} CD27- sont des cellules naïves ; les lymphocytes IgM^{high} IgD^{low} CD27+ ont probablement une origine extra-folliculaire (car présents dans les syndromes génétiques hyper-IgM) et les cellules IgM+ IgD+ CD27+ sont la contrepartie circulante des cellules B de la zone marginale de la rate (et l'équivalent fonctionnel des cellules B1 de la souris ?).

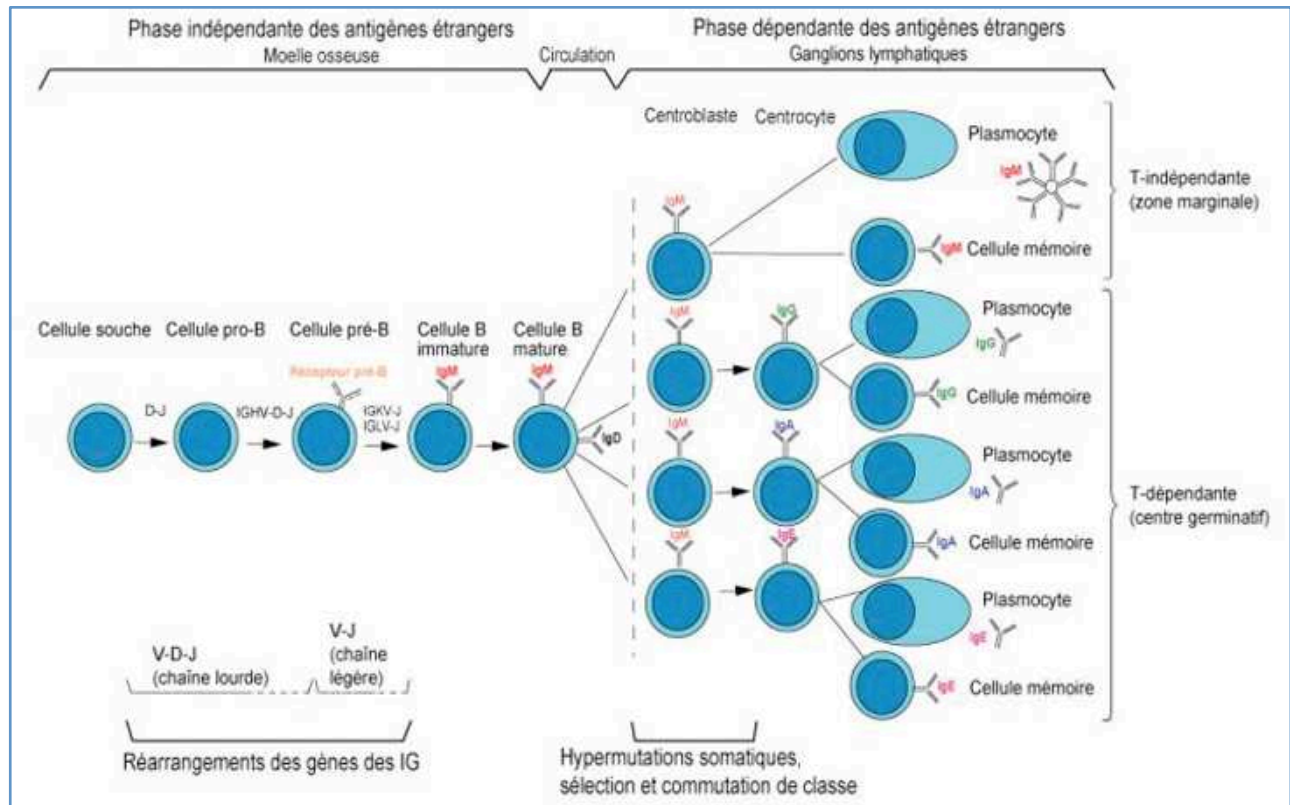


Figure 2 : Synthèse schématique générale de la différenciation lymphocytaire B¹³

- *Mécanismes moléculaires de la lymphopoïèse B*

La différenciation des précurseurs hématopoïétiques en cellules B matures commence par des réarrangements des gènes des Ig, d'abord dans le locus des chaînes lourdes des Ig (*IGH*) localisé en 14q32.33, puis dans le locus des chaînes légères kappa (*IGK*) localisé en 2p11.2 et, si nécessaire, dans le locus des chaînes légères lambda (*IGL*) en 22q11.2 :

- **au niveau du locus *IGH*** : réarrangement d'un gène D_H (27 gènes possibles) avec un gène J_H (23 gènes) puis réarrangement d'un gène V_H (123 à 129 gènes) avec le D-J préalablement réarrangé
- **au niveau du locus *IGK*** : réarrangement d'un gène V_K (31 à 35 gènes) avec un gène J_K (5 gènes)
- puis si besoin **au niveau du locus *IGL*** : réarrangement d'un gène V_L (29 à 33 gènes) avec un gène J_L (4 à 5 gènes).

Cette recombinaison V(D)J est initiée par une enzyme de type recombinase, Rag (Rag1 et Rag2) : exprimée fortement uniquement aux stades précoces de la lymphopoïèse, Rag reconnaît des séquences spécifiques (*Recombination Signal Sequence* RSS) situées de chaque côté des segments des gènes V, D ou J. Un complexe moléculaire, comportant Rag1 et Rag2 notamment, se fixe sur une séquence RSS au niveau d'une zone contenant les segments J, zone appelée centre de recombinaison, puis repère une autre séquence RSS et un clivage des 2 brins d'ADN permet le rapprochement des gènes suivi d'une jonction. Ces jonctions sont approximatives, pouvant comporter des délétions mais aussi des ajouts aléatoires de nucléotides par l'enzyme TdT (*terminal déoxynucléotidyltransférase*).

Ces réarrangements séquentiels génèrent une diversité combinatoire considérable de réarrangements V-D-J (associations aléatoires des différents gènes V, D et J), à laquelle s'ajoute la diversité jonctionnelle mentionnée ci-dessus qui modifie les cadres de lecture (*Open Reading Frame ORF*) (Figure 3).

Cette recombinaison est régulée par divers mécanismes mais il a été démontré plus récemment qu'elle était permise notamment par des régulations épigénétiques : déméthylation locale suivie d'une acétylation des histones permettant à Rag d'accéder au locus, interaction avec l'allèle non réarrangé relocalisé dans l'hétérochromatine permettant l'exclusion allélique¹⁴.

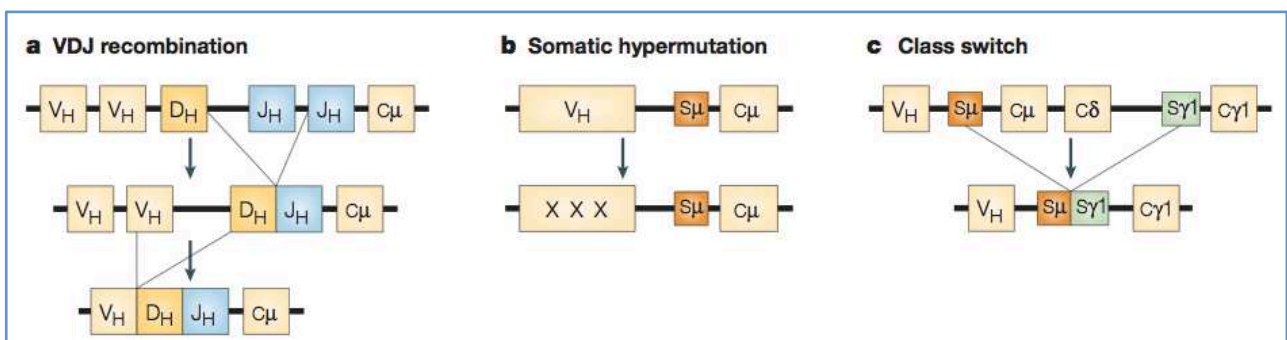


Figure 3 : Schéma simplifié des processus de modification des gènes des Ig : recombinaison V(D)J, hypermutation somatique et *switch* isotypique¹⁵

À la suite de l'activation du BCR par liaison à un antigène au niveau des centres germinatifs (GC) des follicules secondaires des organes lymphoïdes périphériques, un signal activera des mécanismes qui augmentent encore la diversité et surtout l'affinité des Ig.

L'**hypermutation somatique** est un processus enclenché dans le GC par lequel des mutations ponctuelles, des délétions ou des duplications sont introduites dans les régions variables des chaînes lourdes et légères du BCR suite à l'activation par liaison à un antigène et grâce à l'aide des lymphocytes T. Ces mutations se font à un taux de 1/1000 paires de bases par division cellulaire, et peuvent être silencieuses, neutres, délétères ou positives. Les mutations délétères sont responsables d'une diminution de l'affinité du BCR pour l'antigène et une nouvelle sélection négative entraîne la mort de ces cellules. Les bases C dans les motifs WRCY (W = A ou T, R = G ou A et Y = T ou C) sont préférentiellement mutées et d'autres motifs comme WRCH ou DGYW ont également été proposés. Ces séquences sont fortement représentées dans les régions CDR (*Complementary Determining Regions*) des Ig qui présentent donc un taux élevé de mutations somatiques.

La **commutation de classe** ("*switch* isotypique" ou *Class Switch Recombination* CSR) correspond à un réarrangement irréversible de l'ADN, par excision des séquences d'ADN situées entre le gène J et les exons codant pour la chaîne lourde voulue, en conservant l'expression de la même spécificité anticorps. Ceci est possible par la présence de séquences caractéristiques appelées régions S (pour régions *Switch*) en amont de chaque gène, entraînant le rapprochement des séquences codantes pour

l'IgM et le nouvel isotype, puis l'excision de toutes les séquences d'ADN situées entre ces deux régions *Switch* par une enzyme de type cytidine désaminase, AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*). L'interaction avec les lymphocytes T via le couple CD40 / CD40 ligand est indispensable à la réalisation de cette étape ainsi que les signaux cytokiniques fournis par les lymphocytes T-helper.

Qu'il s'agisse des processus de recombinaison V(D)J, d'hypermutation somatique ou de commutation de classe, les mécanismes moléculaires sont complexes et font intervenir des cassures de l'ADN, mais aussi des enzymes capables d'enlever un groupement amine à des cytidines créant ainsi des mutations (AID), ou des enzymes pouvant recombiner l'ADN (RAG), ainsi que des complexes de réparation, notamment le système de réparation non homologue NHEJ (*Non Homologous End Joining*) qui est un complexe composé des molécules DNA-PKcs, Ku70, Ku80, Artemis, XRCC4 et DNA ligase IV (Figure 4)¹⁶.

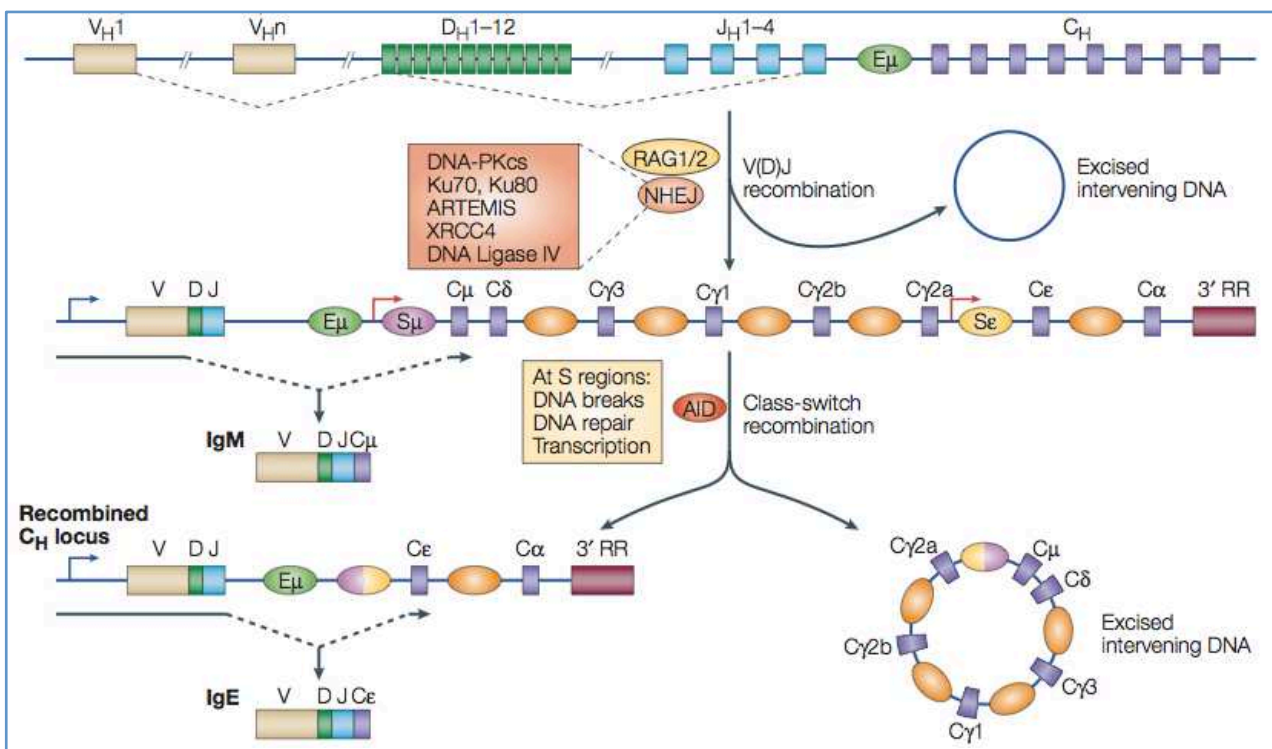


Figure 4 : Mécanismes moléculaires des réarrangements géniques du BCR : cassures, recombinaisons et réparations de l'ADN¹⁶

2. Origine des cellules B tumorales

La plupart des néoplasies lymphoïdes B dérive de cellules B du GC ou de cellules ayant transité par le GC, indiquant son rôle dans la pathogénie. Le processus d'hypermutation somatique, notamment, contribue à la lymphomagénèse en favorisant les translocations chromosomiques entre le locus des Ig et un proto-oncogène.

L'origine de la cellule tumorale des différents types de néoplasies lymphoïdes B peut être supposée grâce aux caractéristiques de structure du BCR et au profil d'expression des marqueurs de différenciation lymphocytaire, ce qui permet de distinguer schématiquement (Figure 5) :

- les **néoplasies pré-GC** : la plupart des lymphomes à cellules du manteau
- les **néoplasies GC** : LF, lymphome de Burkitt, lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) de type GC, lymphome de Hodgkin
- les **néoplasies post-GC** : lymphome de la zone marginale (LZM), lymphome lymphoplasmocytaire, LLC, LBDGC de type ABC (*Activated B Cell*), myélome multiple (MM).

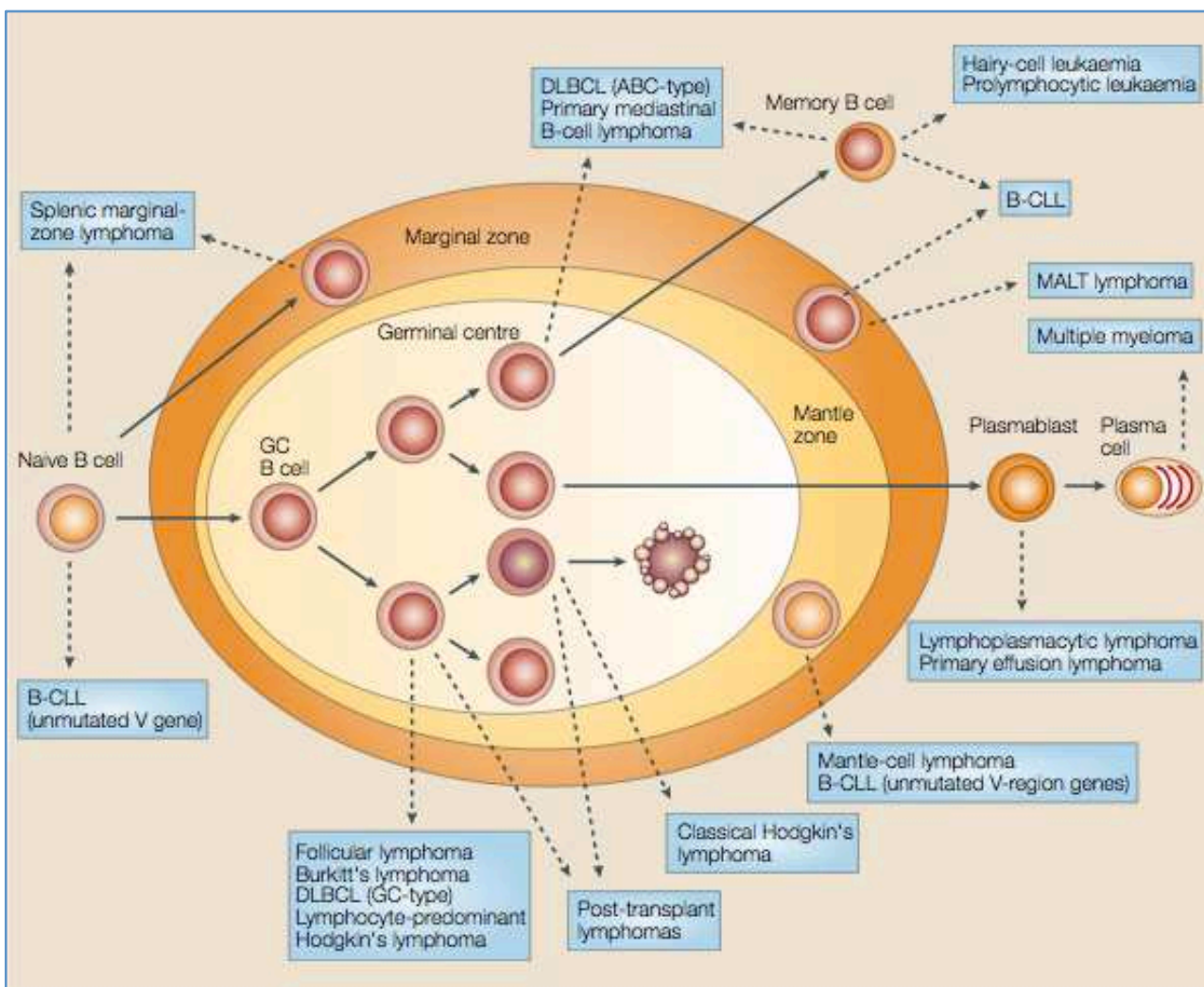


Figure 5 : Représentation schématique des précurseurs des cellules B néoplasiques¹⁵

- *Origine de la cellule tumorale de la LLC*

La contrepartie physiologique des cellules de la LLC reste à l'heure actuelle controversée, les premières hypothèses retenant un équivalent de cellule B1 humaine, un lymphocyte B de la zone marginale ou une cellule B transitionnelle.

Cette première hypothèse repose sur l'expression constante de CD5 sur la cellule de LLC, faisant rechercher comme cellule originelle une cellule CD5+. Les cellules B1 ont été décrites chez la souris comme une minorité de lymphocytes B spléniques CD5+ sécrétant spontanément des IgM non mutées auto-réactives et ont été finalement montrées comme se localisant principalement dans les cavités péritonéales et pleurales. Ces cellules B1 peuvent effectuer un *switch* de classe, sécrétant alors de façon prédominante des IgA, et ont une capacité à produire de l'IL-10 anti-inflammatoire¹⁷. Chez l'homme, il a été mis en évidence des cellules produisant des IgM polyréactives (non localisées à la cavité péritonéale) et des cellules B CD5+ produisant des IgA polyréactives ainsi que des lymphocytes B CD5+ dans le sang placentaire en proportions importantes, ce qui laisse penser qu'il existe bien un équivalent des cellules B1 chez l'homme, même si elles sont moins bien caractérisées. Les cellules humaines normales CD5+ sont composées essentiellement des cellules transitionnelles émergeant de la moelle osseuse et des cellules de la zone du manteau des centres germinatifs. Ce sont des cellules naïves, n'ayant pas transité par le GC, ce qui permet difficilement d'expliquer la moitié des LLC porteuses de mutations sur les gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes des Ig (gènes *IGVH*).

L'apport des profils d'expression génique repose sur la mise en évidence du fait que la LLC est une maladie homogène, avec peu de différences d'expression entre les formes mutées et non mutées^{18,19}, et que la cellule de LLC paraît plus proche d'une cellule mémoire, avec un phénotype membranaire activé, que d'une cellule CD5+ normale¹⁹. Ces résultats ont conforté l'hypothèse selon laquelle la cellule de LLC dériverait d'une cellule B de la zone marginale de phénotype typiquement IgM^{high}, IgD^{low}, CD23^{low}, CD5-. Dans ce cas, l'activation de ces cellules entraînerait l'expression de CD5, CD23 et éventuellement CD38 comme cela a été montré *in vitro*.

Deux modèles ont alors été avancés par Chiorazzi et Ferrarini²⁰ :

- dans le premier, les cellules de LLC *IGVH* non mutées proviendraient des cellules de la zone marginale, répondant à des antigènes T-indépendants, alors que les cellules *IGVH* mutées dériveraient de cellules B conventionnelles ayant transité par le GC

- dans le second modèle, les deux types de cellules dériveraient de cellules de la zone marginale stimulées par des antigènes T-indépendants et ayant acquis ou non des mutations somatiques.

Si les progrès récents dans les connaissances n'ont pas permis de trancher formellement sur l'origine précise, de la cellule de LLC, les concepts de compartiment prolifératif, de cellule souche leucémique, de raccourcissement des télomères et de BCR stéréotypique, notamment, permettent de conforter les hypothèses existantes ou d'en alimenter de nouvelles²¹.

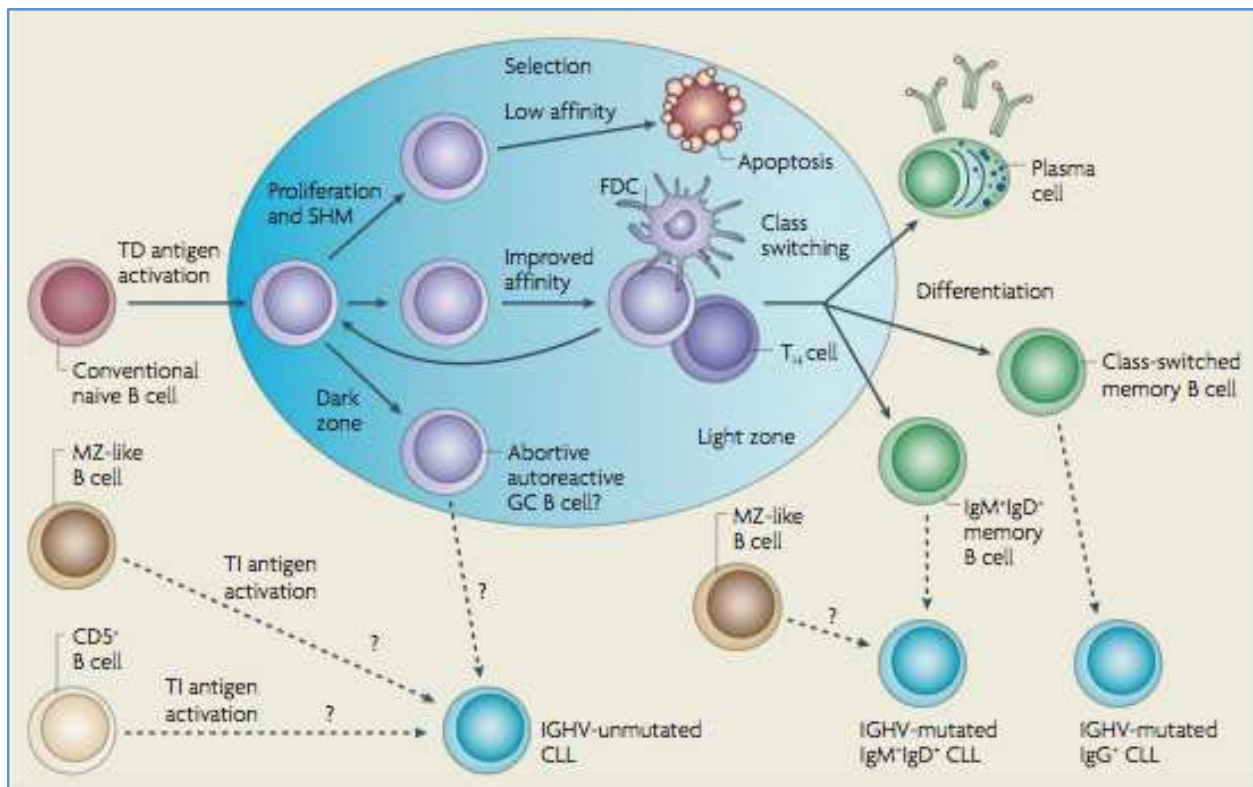


Figure 6 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses sur l'origine cellulaire de la LLC²²

Si l'implication des cellules souches hématopoïétiques dans la pathogénie de la LLC avait déjà été suggérée depuis 2011²³, des données importantes ont été fournies plus récemment par les travaux de Frederik Damm et Olivier Bernard, qui ont mis en évidence la présence de mutations acquises dans des progéniteurs hématopoïétiques multipotents de patients porteurs de LLC²⁴. L'existence de mutations de gènes impliqués dans la pathogénie de la LLC tels *NOTCH1*, *XPO1*, *SF3B1* dans des populations cellulaires immatures ou myéloïdes (isolées par tri CD34+ ou CD14+) suggère une origine tumorale précoce au stade des précurseurs multipotents, avec une différenciation B anormale sous l'effet d'une dérégulation de la signalisation du BCR. Ces nouvelles données ne sont pas totalement incompatibles avec les théories précédentes, les modalités de la différenciation B anormale pouvant différer selon les sous-types (*IGHV* mutés ou non mutés) de LLC.

- *Origine de la cellule tumorale de la maladie de Waldenström (MW)*

Moins de travaux ont été consacrés au sujet de l'origine cellulaire de la MW qui reste débattu, mais il semble admis que la cellule originelle de la MW est une cellule mémoire IgM+ et/ou IgM+/IgD+ ayant arrêté son processus de développement après passage dans le GC et qui présenterait un déficit dans le processus de "switch" isotypique²⁵. Le phénotype CD5-, CD10-, CD23-, CD19+, CD20+, CD75-, CD79+, CD27+, CD138-, Pax5+, Bcl2+, Bcl6-, Mum- est en faveur d'une origine post-GC et les translocations impliquant le locus *IGH* sont extrêmement rares dans la MW²⁶. Deux études ont rapporté un séquençage complet du gène *IGH* réarrangé dans la MW, mettant en évidence des mutations (avec moins de 98 % d'homologie avec la séquence germinale) dans 91 % des cas, et un

biais d'utilisation du répertoire avec sur-représentation des gènes de la famille IGHV3 et du gène IGHJ4^{27,28}. Une étude récente décrit également une utilisation préférentielle à 35 % du gène IGHV3-23²⁹. La recherche d'évènements transcriptionnels de commutation isotypique est négative (présence de transcrits μ ou $\mu+\delta$ et absence de transcrits α , γ ou ϵ), à la différence des rares MM de type IgM³⁰. L'ensemble des études confirme l'absence de phénomène d'hypermutation somatique et de variation intraclonale dans la MW. Néanmoins, l'origine cellulaire établie sur le fait que le statut *IGVH* soit pratiquement toujours muté et témoigne d'un contact antigénique dans le contexte de la MW est controversée : les découvertes récentes du lien entre la signalisation MYD88 et les cellules B mémoires IgM+ IgD+ "effectrices naturelles" suggèrent que la cellule tumorale de la MW pourrait aussi dériver d'une autre sous-population particulière de lymphocytes B indépendante du GC³¹.

- *Origine de la cellule tumorale du LZM splénique*

L'origine de la cellule tumorale du LZM splénique semble être un lymphocyte B mémoire de la zone marginale et par définition, post-GC, comme le suggère la mise en évidence de mutations somatiques des gènes *IGVH*³². Il a cependant aussi été constaté qu'il existait au sein de ces LNH une hétérogénéité de profil mutationnel, un tiers des patients présentant un profil non muté^{33,34} et que la fréquence des mutations d'oncogènes tels *BCL6*, *PAX5*, *PIM1*, était faible. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle la cellule originelle du LZM pourrait également ne pas être passée par le GC.

3. Signalisation B normale et pathologique

- *Signalisation normale*

Le BCR mature est composé de deux unités fonctionnelles : d'une part l'Ig de surface avec deux chaînes lourdes et deux chaînes légères formant une molécule divalente capable de reconnaître l'antigène, et d'autre part l'unité de signalisation qui est un double hétérodimère constitué des co-récepteurs CD79a et CD79b situés de part et d'autre de l'Ig de surface. Le site de fixation de l'antigène est constitué des parties variables amino-terminales des chaînes lourdes VH et légères VL de l'Ig. Les prolongements intra-cytoplasmiques des co-récepteurs CD79a et CD79b contiennent des motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif*) présentant deux résidus tyrosine initiant la signalisation et participant à l'apprêtement de l'antigène. Le BCR peut s'organiser en structures oligomériques à la surface cellulaire lors de la reconnaissance d'un antigène, ce qui rend l'activation du lymphocyte B plus efficace (phénomène de *cross-linking*)³⁵.

La signalisation du BCR est initiée par un contact antigénique, entraînant l'agrégation des récepteurs dans les radeaux lipidiques et leur internalisation par endocytose. L'activation par phosphorylation des résidus tyrosine des ITAM conduit au recrutement et à l'activation des protéines tyrosine kinases de la famille Src puis Syk et Btk, ainsi que des phosphatases régulatrices SHP1, SHP2, CD45, SHIP et des protéines adaptatrices comme BLNK³⁶. L'initiation de cette signalisation aboutit à l'activation de trois grandes voies de signalisation (Figure 7) :

- la **voie NFAT/NFκB** qui implique les protéines Syk, Vav et PLCγ2, les protéines IP3 (inositol triphosphate) et le flux calcique activant le facteur transcriptionnel NFAT ; parallèlement, DAG et PKC activent le facteur de transcription NFκB

- la **voie PI3K/AKT** inhibe par phosphorylation le facteur pro-apoptotique Bad de la famille BCL2, favorisant ainsi la survie, et inhibe également la kinase GSK3 inhibant elle-même le cycle cellulaire (inhibition de cycline D et de Myc) et régulant plusieurs facteurs de transcription dont NFAT et NFκB

- la **voie MAPK/JNK** se différencie vers la voie Ras/Raf induisant le facteur de transcription Erk1/2 (qui régule notamment BCL6) et vers la voie MEKK activant les facteurs de transcription p38MAPK et JNK1/2 ; la voie MAPK/JNK est également une voie favorisant la survie cellulaire.

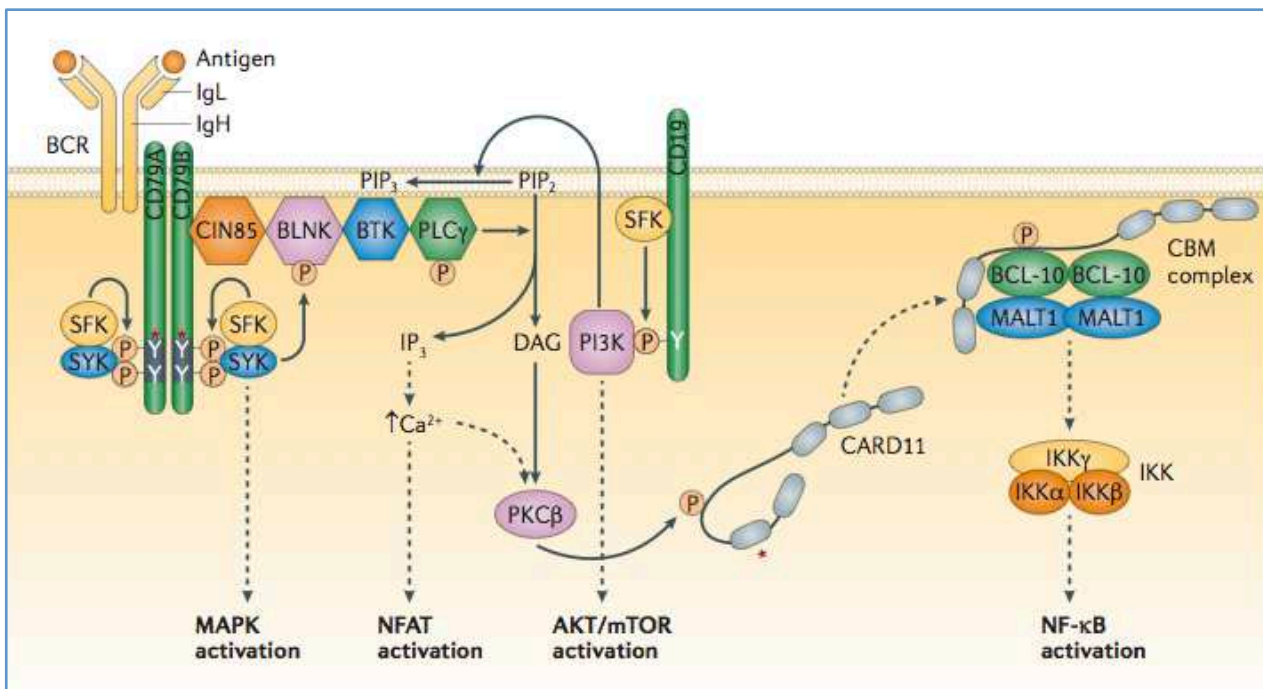


Figure 7 : Schéma de la signalisation du BCR dans les cellules B³⁷

- *Signalisation pathologique*

Dans la LLC, le BCR présente des particularités de structure : sa densité à la surface des lymphocytes B est diminuée par rapport à des lymphocytes B normaux ou à des cellules d'autres néoplasies lymphoïdes B³⁸, ce qui est un critère diagnostique. La sous-expression corrélée du co-récepteur CD79b³⁹ s'explique par l'existence de mutations et de formes tronquées, et des anomalies de l'internalisation des radeaux lipidiques ont été décrites, avec une nette diminution dans les LLC de type *IGVH* mutés⁴⁰. L'existence d'un biais de répertoire, avec l'utilisation d'un répertoire restreint à quelques dizaines de VH seulement (notamment V1-69 dans les LLC *IGVH* non mutés et V4-34 et V3-21 dans les LLC *IGVH* mutés), et la mise en évidence dans 20 % des cas de LLC de stéréotypes dans des régions normalement hypervariables (CDR3) ont confirmé le rôle central du BCR dans la physiopathologie de la LLC.

Si la signalisation après activation du BCR est plutôt diminuée de façon générale dans la LLC, possiblement en partie en raison des caractéristiques particulières du BCR et de l'expression de CD5, il existe une augmentation de l'activation constitutive de tyrosine kinases comme Lyn, Syk ou Btk⁴¹. Il existe une différence importante de signalisation entre les formes agressives et les formes indolentes de LLC, mesurée par des variations des flux calciques et des niveaux de phosphorylation de plusieurs tyrosine kinases dont Syk^{42,43}. Cette différence est principalement corrélée au statut muté ou non des gènes *IGVH*, à l'expression de la protéine ZAP-70, kinase normalement associée au récepteur T (TCR *T-cell receptor*), et à celle de CD38^{44,45}. Cette capacité de signalisation du BCR est un facteur pronostique à la fois en termes de survie sans progression et de survie globale^{46,47} et la possibilité d'inhibition pharmacologique de cette voie du BCR ouvre des perspectives thérapeutiques très intéressantes.

Dans la maladie de Waldenström, plusieurs études ont initialement montré une activation de la voie Akt/mTOR avec une augmentation de l'expression des protéines de la voie PI3K⁴⁸. Cette activation confère à la cellule un avantage de prolifération, en la maintenant dans le cycle cellulaire et en inhibant l'apoptose. Il a également été montré une diminution d'expression de PTEN qui régule négativement cette voie⁴⁹. Plus récemment, des études de séquençage à haut débit ont permis de mettre en évidence une mutation unique L265P du gène *MYD88* dans près de 90 % des cas de MW^{50,51}, ainsi que d'autres anomalies moléculaires, permettant de mieux expliquer l'activation constitutive de NFκB (Figure 8).

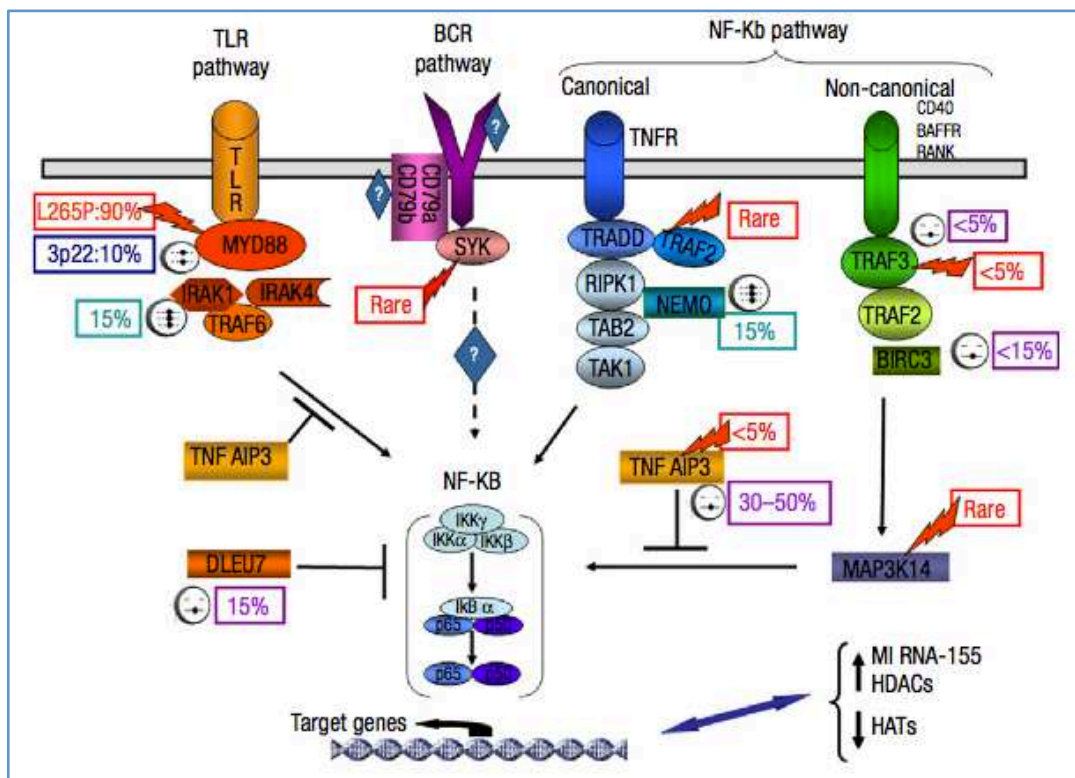


Figure 8 : Altérations moléculaires récurrentes et voies de signalisation activées dans la MW⁵²

Les LZM spléniques peuvent être associés dans certains cas à une stimulation antigénique chronique d'origine endogène ou exogène en lien avec le BCR. Une des situations les mieux décrites jusqu'à présent est représentée par l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC). Un lien précis a été établi entre le VHC et le LZM splénique (+/- à lymphocytes villosus)^{53,54}, via une interaction entre la glycoprotéine virale E2 et CD81, entraînant une activation de la signalisation du BCR. Cela est confirmé par l'existence de modèles murins où sont observés des LZM après stimulation chronique par le VHC associée à des mutations de FAS et p53⁵⁵. La meilleure preuve du rôle de cette stimulation dans le LZM lié au VHC est la régression de la lymphoprolifération après traitement antiviral^{56,57}.

- *Stimulation expérimentale du BCR*

Si la stimulation *in vitro* du BCR d'un LB normal induit communément une prolifération cellulaire⁵⁸, les réactions cellulaires observées après "*cross-linking*" du BCR de cellules B de LLC sont extrêmement variées selon les conditions expérimentales et selon le type de LLC étudiée.

Après activation par des anticorps spécifiques d'isotype, il a initialement été démontré une augmentation globale de la phosphorylation des tyrosines, qui constitue un marqueur du déclenchement d'une signalisation intracellulaire. La réponse à cette stimulation était fortement liée au statut mutationnel *IGVH* et à l'expression de CD38⁴⁵ (réponse augmentée dans des cellules *IGVH* non mutés et CD38+). Une étude du profil d'expression génique a mis en évidence que la liaison du BCR par un anticorps anti-IgM entraîne la transcription de gènes impliqués dans des voies de régulation du cycle cellulaire, de réorganisation du cytosquelette et de prolifération ; cependant, ces modifications n'ont été observées que dans les cellules de LLC *IGVH* non mutés⁵⁹. Cette activation du BCR conduit à une augmentation de la signalisation à travers la kinase ZAP-70. L'introduction de ZAP-70 dans des cellules de LLC qui ne l'exprimaient pas auparavant permet d'augmenter la signalisation en aval du BCR, suggérant un rôle direct de ZAP-70 dans cette signalisation⁴⁴. Parallèlement, une étude italienne s'est intéressée aux cellules B de LLC qui ne répondent pas à l'activation du BCR (typiquement des LLC à *IGVH* mutés) et a montré dans ces cellules une signature moléculaire correspondant à une anergie⁶⁰. Ainsi, on distingue schématiquement des LLC *IGVH* non mutés souvent ZAP-70+ et CD38+ dont la liaison du BCR induit l'activation et une réponse proliférative, et des LLC *IGVH* mutés plus volontiers ZAP-70- et CD38-, dans lesquelles la signalisation du BCR favorise plutôt l'anergie et la résistance à l'apoptose.

Si l'ensemble des études s'accorde sur le fait que toutes (ou quasi toutes) les cellules de LLC non répondeuses à l'activation du BCR sont des cellules à *IGVH* mutés, il a été démontré que les cellules répondeuses constituaient une population plus hétérogène : la plupart sont *IGVH* non mutés mais une proportion non négligeable (environ un tiers) correspond à des cellules à *IGVH* mutés associées à une évolution clinique défavorable⁶¹. Le statut mutationnel *IGVH* ne peut donc être considéré comme le seul responsable de l'évolutivité des LLC.

Les expériences d'activation *in vitro* conduisent à des réponses différentes selon les conditions expérimentales : choix du ligand (anti-IgM soluble, anti-IgM immobilisé, renforcement de la liaison par un système avidine/biotine), dose du ligand, durée de stimulation... Pour des cellules répondeuses, une stimulation prolongée par des anticorps immobilisés induit une prolifération et une augmentation de la survie, alors que l'utilisation courte d'anticorps solubles de type anti- μ F(ab')₂ entraîne une apoptose de ces mêmes cellules⁶¹⁻⁶⁴.

4. Apoptose et prolifération

La résistance intrinsèque à l'apoptose des cellules de LLC est généralement admise comme étant à l'origine de la thèse accumulative de la maladie. Elle reste un phénomène complexe à étudier du fait de l'engagement spontané des cellules vers l'apoptose *in vitro*, soulignant le rôle majeur du microenvironnement tumoral. Néanmoins, les cellules de LLC présentent un réel profil moléculaire de cellules résistantes à l'apoptose comme l'attestent la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 et la sous-expression de protéines pro-apoptotiques telles Bax et Bcl-xs ou la survivine⁶⁵.

Cette résistance à l'apoptose est expliquée par de multiples mécanismes, impliquant tout d'abord la voie extrinsèque : faible expression par les cellules de LLC du récepteur Fas, pouvant activer les récepteurs de mort⁶⁶ ; diminution de l'apoptose induite par TRAIL⁶⁷.

Concernant la voie intrinsèque, la surexpression de Bcl-2 ne semble pas liée à une anomalie génique mais à une dérégulation transcriptionnelle, avec une fréquente déméthylation du gène *BCL-2* et perte d'action des microARN mir15-a et miR16-1, ciblant le gène *BCL-2*, situés dans la région 13q14, et par conséquent fréquemment sous-exprimés dans la LLC^{68,69}. Cette perte d'inhibition par ARN interférence explique aussi la surexpression de Tcl-1, oncogène activateur de la voie PI3K, due à la diminution des miR-29b et miR181b dans les LLC agressives⁷⁰. Le défaut d'apoptose s'explique enfin par l'augmentation des signaux de survie, et notamment la signalisation du BCR est un des premiers inhibiteurs de l'apoptose en activant les voies PI3K/AKT, MAPK et NFkB.

Il était depuis de nombreuses années communément admis que les cellules de LLC étaient des lymphocytes quiescents et que l'accumulation de cellules à faible potentiel prolifératif était liée à un défaut d'apoptose : tout d'abord parce que l'examen microscopique de ces cellules révèle une chromatine nucléaire condensée, traduisant une activité métabolique minimale, avec absence de nucléole et rapport cytoplasmique élevé, mais aussi parce que ces cellules présentent de façon unanime un blocage de leur cycle cellulaire en phase G0 - G1.

Des travaux récents tendent à proposer un nouveau modèle où la prolifération apparaît comme un mécanisme essentiel de la leucémogénèse. Premièrement, les cellules de LLC expriment un certain nombre d'antigènes d'activation tels que CD23, et, souvent CD25, CD69 ou CD71⁷¹, ce qui a conduit à la proposition d'une hypothèse proliférative, initialement sans démonstration formelle. Un premier argument est venu de l'analyse de la taille des télomères de cellules de LLC, dont il a été montré qu'ils étaient plus courts que ceux des cellules B normales, traduisant une histoire proliférative plus intense⁷², et s'accompagnant d'une augmentation de l'activité télomérase, en particulier dans les cellules *IGVH* non mutées. Mais ce sont les travaux du groupe de Chiorazzi qui ont en 2005 définitivement clôturé l'ère de l'ancienne vision accumulative pour introduire la vision de maladie dynamique dotée d'un potentiel prolifératif : par incorporation d'eau lourde (²H₂O) dans l'ADN des cellules tumorales *in vivo*, ils ont mis en évidence la dynamique quotidienne de génération et de mort

des cellules leucémiques⁷³. La quantité de cellules leucémiques produites chaque jour représente 0,1 % à 1,76 % de la population tumorale totale et surpasse les taux rencontrés dans la génération de cellules B normales. La pertinence physiopathologique de ces résultats repose sur la corrélation entre un taux de génération de cellules leucémiques supérieur à 0,35 % et la présence d'une maladie progressive. Parallèlement est observée une mort cellulaire qui concerne jusqu'à 2 % de la population tumorale. Il existe donc un équilibre dynamique permanent entre prolifération et apoptose. De plus, il a été observé chez tous les patients étudiés que les cellules prolifératives faisaient partie de la fraction de cellules CD38+, alors que les cellules CD38- mouraient plus vite, conduisant à un nouveau modèle physiopathologique dans lequel CD38 est un marqueur des cellules prolifératives suite à une stimulation qui se perd progressivement accroissant la sensibilité cellulaire à l'apoptose. D'autres arguments encore plus récents renforcent la thèse proliférative : de l'étude de modèles murins de LLC délétées au niveau de la région 13q14, codant notamment pour les microARN miR15a et miR16-1, a été déduit le fait que ces miR contrôlaient la prolifération cellulaire B au niveau de la transition G1/S du cycle cellulaire, établissant ainsi le rôle moteur de la prolifération dans les mécanismes de leucémogénèse⁷⁴.

L'ensemble de ces données indique que la prolifération concerne préférentiellement une population privilégiée qui établit une niche intégrant des signaux microenvironnementaux multiples au niveau de structures particulières appelées centres de prolifération. La présence de ces centres de prolifération caractéristiques de la LLC au niveau des ganglions et dans une moindre mesure dans la moelle osseuse a été décrite depuis les années 1990⁷⁵. Ces foyers forment des structures nodulaires et contiennent des agrégats de cellules tumorales de grande taille, de phénotype pseudo-blastique, prolifératives (Ki67+), CD38+ et surexprimant de nombreuses protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, survivine, Mcl-1)^{22,76}. Ils contiennent également des cellules non tumorales, notamment des lymphocytes T CD4+ exprimant CD40L et pouvant interagir avec les cellules leucémiques via CD40/CD40L et grâce à des chimiokines telles que CCL17 et CCL22⁷⁷. A noter que les expériences d'étude de la cinétique de prolifération ont été renouvelées dans un contexte de traitement de patients par un inhibiteur de Btk, l'ibrutinib : il a été démontré, sur 30 patients inclus, l'absence de prolifération sous ibrutinib chez 28 patients avec par ailleurs la mise en évidence de la sortie des cellules depuis les sites de prolifération vers le sang⁷⁸.

5. Rôle du micro-environnement

L'apparente contradiction entre la survie prolongée des cellules de LLC *in vivo* et leur apoptose rapide *in vitro*, a conduit rapidement à considérer le rôle important du microenvironnement dans cette pathologie. Différents types de cellules du microenvironnement contribuent à la survie prolongée *in vivo* des cellules tumorales, dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes secondaires (Figure 9), les principales étant :

- les **lymphocytes T CD4+**, recrutés par les cellules du compartiment prolifératif de LLC via les molécules CCL22 et CCL27, permettant aux cellules leucémiques nichées dans les centres de prolifération de recevoir des signaux de survie par l'interaction CD40/CD40 ligand et grâce à l'IL-4⁷⁹ ; la stimulation chronique par CD40 induit une forte expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, et une faible expression de Noxa dans les ganglions, alors que ce profil apoptotique est inversé dans les cellules B du sang⁸⁰

- les **cellules stromales médullaires** (*Bone Marrow Stromal Cells* BMSC), d'origine mésenchymateuse, créent de véritables niches nourricières et protectrices contre les agents cytotoxiques et interagissent avec les cellules de LLC principalement via l'axe CXCR4 - CXCL12 ; l'ajout de ces cellules *in vitro* permet d'inhiber l'apoptose spontanée des cellules B de LLC^{81,82}

- les **cellules "nurse-like"** (*Nurse-Like Cells* NLC), dérivant des monocytes *in vitro*⁸³, sont des cellules de grande taille, adhérentes, d'aspect fibroblastique, et de phénotype stromal (expression de vimentine et STRO-1), plutôt présentes dans la rate et dans les ganglions ; exprimant les molécules CXCL12, CXCL13, CD31, BAFF, APRIL, elles jouent un rôle protecteur contre l'apoptose spontanée et chimio-induite par un mécanisme dépendant de SDF-1 ou de BAFF/APRIL^{84,85} ; leur forte expression de CD68 les rapproche des macrophages associés aux lymphomes.

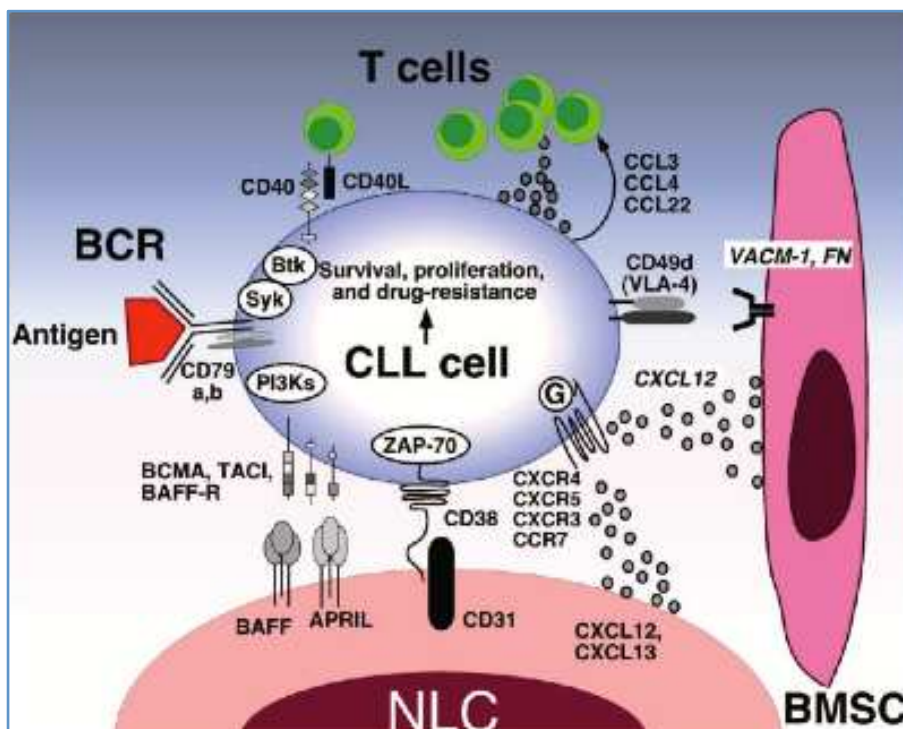


Figure 9 : Interactions moléculaires entre la cellule de LLC et son microenvironnement⁸⁶

On peut également citer d'autres cellules, telles que les **cellules folliculaires dendritiques** qui interagissent avec les cellules de LLC via la molécule CD44, induisant l'expression de Mcl-1⁸⁷, ou d'autres cellules stromales comme les **fibroblastes réticulaires ganglionnaires**.

Les échanges entre les différentes cellules reposent principalement sur l'**axe CXCR4 (CD184) - CXCL12 (SDF-1)** : la molécule CXCR4, fortement exprimée sur les cellules de LLC, permet, via l'interaction avec son ligand, la chimiotaxie et la migration des cellules à travers l'endothélium vasculaire en vue d'une entrée dans la moelle osseuse et d'une sortie des ganglions. Il a été montré que la stimulation du BCR induit une diminution de CXCR4 conduisant à une accumulation des cellules dans les centres de prolifération ganglionnaires⁸⁸. Le plerixafor est un antagoniste de CXCR4 qui pourrait agir dans la LLC en faisant sortir les cellules des ganglions et de la moelle osseuse. De façon encore plus intéressante, les inhibiteurs de la signalisation du BCR (ibrutinib, inhibiteurs de PI3k) ont la capacité de chasser les cellules des ganglions vers le sang, en partie à travers leur action sur CXCR4.

D'autres axes sont essentiels dans le *homing* et la migration des cellules : l'**axe CXCR5 (CD185) - CXCL13**, second axe permettant le *homing* des lymphocytes mais aussi leur localisation dans les follicules lymphoïdes, et l'**axe CCR7 - CCL19/CCL21**, impliqué dans la migration préférentielle des cellules vers les ganglions ; la pertinence de cet axe repose sur la corrélation entre le syndrome tumoral ganglionnaire et à la fois l'expression et la fonctionnalité du récepteur CCR7⁸⁹. D'autres molécules sont importantes pour la communication entre cellules de LLC et microenvironnement, et notamment les **chémokines CCL3, CCL4 et CCL22**, les **molécules d'adhésion** comme l'intégrine VLA-4 (CD49d/CD29), récepteur de la fibronectine et de VCAM1/CD106, les **TLR (Toll-like receptor)** notamment TLR7 et TLR9 qui sont exprimés et fonctionnels dans la LLC⁹⁰.

Par ailleurs, le concept d'évasion immune via le couple PD-1/PD-L1 est également décrit dans la LLC. Les cellules de LLC surexpriment le ligand PDL-1⁹¹, permettant d'épuiser les lymphocytes T cytotoxiques et de diminuer la réponse anti-tumorale. Il a été plus récemment démontré que cette surexpression de PD-L1 est en partie induite par le relargage par les cellules de LLC de microARN (notamment miR21 et miR29) qui activent TLR7 au niveau des macrophages, entraînant notamment la synthèse d'IL-6 (qui soutient la prolifération des cellules tumorales) et la surexpression de PD-L1 sur les cellules de LLC mais aussi sur les lymphocytes B normaux⁹². Le blocage de l'interaction PD-1/PD-L1 dans des modèles animaux permet de restaurer l'immunité anti-tumorale⁹³ et constitue par conséquent une voie thérapeutique potentielle comme dans d'autres cancers.

Une augmentation de la densité mastocytaire a été décrite depuis plusieurs années dans la MW, constituant d'ailleurs un outil diagnostique. Le rôle favorisant des mastocytes sur la croissance tumorale a été bien démontré dans le lymphome de Hodgkin⁹⁴. Dans le contexte de la MW, une étude a mis en évidence que les mastocytes parsemés au sein des infiltrats tumoraux ou disposés en couronne à leur pourtour expriment constitutivement CD40L, permettant ainsi de favoriser la croissance tumorale via l'interaction CD40-CD40L⁹⁵. Le rôle de CD30L a aussi été évoqué, même si les cellules tumorales n'expriment que rarement cette molécule⁹⁶.

Le rôle de l'IL-6 dans la MW est connu depuis les années 1990. Cette cytokine favorise, *via* l'activation de la voie JAK/STAT, la sécrétion d'IgM⁹⁷, mais il a été plus récemment montré que l'IL-6 était sécrétée par des cellules endothéliales stimulées par le VEGF, lui-même produit par les cellules tumorales. L'angiogénèse paraît moins importante dans la MW que dans le MM, avec une augmentation nette de la densité microvasculaire médullaire dans seulement 30 % des cas⁹⁸. Néanmoins, le VEGF a un rôle dans la prolifération de la cellule de MW et sa protection contre l'apoptose par un mécanisme autocrine puisque les cellules tumorales expriment deux récepteurs du VEGF (KDR et Flt1)⁹⁹. Plus récemment, il a été montré que l'IL-6 était également produite par les cellules stromales sous l'influence de la cytokine CCL5¹⁰⁰.

Enfin, le mécanisme de dysfonction immunitaire par surexpression de PD-1 et de ses ligands a aussi été décrit très récemment dans la maladie de Waldenström¹⁰¹.

6. Modèles animaux

Longtemps imputée à l'absence de cellule originelle définie, la difficulté à obtenir un modèle pertinent de xénogreffe de LLC souligne la complexité de la leucémogénèse et l'importance du microenvironnement immunitaire dans cette pathologie. Le premier modèle convaincant de xénogreffe a été publié en 2007 : l'efficacité de la greffe effectuée dans des souris NOD/SCID s'avère être dépendante du stade d'évolution de la maladie. Cependant, ces cellules présentent une invasion préférentielle de la rate et de la cavité du péritoine, l'infiltration des sites habituels de la LLC (moelle osseuse, sang périphérique et ganglions) étant relativement rare.

Les souris NZB (*New Zealand Black*), exemptes de toute modification transgénique et initialement utilisées comme des modèles d'auto-immunité spontanée, présentent également un développement tardif de LLC. Favorisant la thèse de l'auto-immunité initiatrice de LLC, ce modèle présente dans un premier temps une prolifération de lymphocytes B (B1) produisant des auto-anticorps dirigés contre l'ADN et des protéines érythrocytaires. Lorsque les souris atteignent un âge de 9 à 12 mois, cette prolifération progresse ensuite vers une maladie ressemblant à un syndrome de Richter¹⁰². Récemment, il a été mis en évidence que l'atteinte de ces souris était liée à une mutation ponctuelle dans le locus du gène codant pour miR-16-1, la ré-expression de miR-16-1 permettant de diminuer la prolifération tumorale¹⁰³.

Le modèle transgénique E μ -TCL1 (*T-cell Leukemia 1*) a longtemps été le modèle murin de référence de la LLC. Il repose sur la surexpression de TCL1 (régulateur de la voie oncogénique PI3K/AKT dont l'expression est de mauvais pronostic dans la LLC) dans la lignée B sous la dépendance de la région régulatrice *enhancer* des Ig. Ces souris présentent, de façon âge-dépendante, une expansion et une infiltration progressive de lymphocytes B CD5+IgM+ au niveau du péritoine, puis de la rate et de la moelle osseuse, pour finir avec une maladie symptomatique et agressive caractérisée par la présence d'adénopathies et d'une hépatosplénomégalie à l'âge de 20 mois. La pertinence du modèle réside dans l'analogie qu'il présente avec les LLC de mauvais pronostic concernant la nature de l'Ig de surface (non-mutée et stéréotypée)¹⁰⁴.

De nouveaux modèles murins ont été récemment développés, basés sur l'anomalie chromosomique la plus fréquente dans la LLC, la del(13q), en définissant la région minimale délétée (*Minimal Deleted Region* MDR) où ont été identifiés les gènes codant pour les microARN miR-15-a et miR-16-1. Ces modèles murins MDR^{-/-} et miR-15a/16-1^{-/-} regroupent tous les phénotypes associés à la LLC (lymphocytose monoclonale, LPL, LLC, BCR stéréotypique, syndrome de Richter), avec une plus grande incidence pour les souris MDR^{-/-}⁷⁴.

Enfin, il a été décrit récemment un nouveau modèle murin, les souris IRF4^{-/-} Vh11, qui développent spontanément et de façon précoce des tableaux typiques de LLC. Ceci souligne le rôle important d'IRF4 dans la physiopathogénie de la LLC¹⁰⁵.

Le manque de modèles précliniques a longtemps été également un frein aux progrès dans la compréhension, de la biologie de la MW. Des modèles de xénogreffe ont été publiés dans les années 1990 et 2000^{106,107}. L'intérêt d'un nouveau modèle animal (de type souris NOD/SCID) tel que présenté en 2009 réside dans la possibilité de recréer le microenvironnement tumoral de la MW¹⁰⁸.

Récemment, une nouvelle lignée cellulaire de MW (RPCI-WM1) a également été décrite, caractérisée notamment par la sécrétion d'une IgM humaine de monotypie kappa, la présence d'une délétion 6q21 et une mutation L265P de *MYD88*. Ceci devrait faciliter une meilleure compréhension de la biologie de la MW¹⁰⁹.

Dans le LZM splénique, l'absence de lignées cellulaires et de modèles animaux rend très difficiles les études expérimentales concernant l'origine cellulaire et les mécanismes d'oncogénèse.

B. La leucémie lymphoïde chronique

La LLC est un syndrome lymphoprolifératif chronique défini par l'accumulation, dans le sang et la moelle osseuse, d'une population de lymphocytes matures, d'immunophénotype B caractéristique (CD5 positif, CD23 positif, FMC7 négatif, expression faible des Ig de surface avec monotypie kappa ou lambda, CD22/CD79b négatif ou faible), correspondant à un score diagnostique dit de Matutes de 4 ou 5¹¹⁰.

1. Epidémiologie

La LLC est l'hémopathie de l'adulte la plus couramment rencontrée dans les pays occidentaux, avec une incidence de 2,87 pour 100 000 individus. Elle représente 1 % des cancers et 12,5 % des hémopathies en Europe, sans variation selon les pays d'après l'étude du groupe Haemacare qui a analysé 48 registres issus de 20 pays européens différents¹¹¹.

La LLC est plus rare dans les pays asiatiques, avec par exemple à Taïwan en 2005 une incidence de 0,47 pour 100 000 habitants chez l'homme et 0,24 pour 100 000 habitants chez la femme¹¹². Cette incidence est en augmentation régulière dans les pays asiatiques, alors qu'elle est stable chez les américains caucasiens : elle est chez l'homme de 1,7 pour 100 000 habitants chez les asiatiques américains nés en dehors des États-Unis, *versus* 2,4 pour 100 000 habitants chez les asiatiques nés aux États-Unis et 7,9 pour 100 000 habitants dans la population blanche non hispanique. Chez la femme, ces proportions sont respectivement de 1,0, 1,2 et 4,2¹¹³.

La LLC est une maladie où il existe une forte prédisposition familiale et plusieurs études ont montré que les apparentés du premier degré des patients porteurs d'une LLC ont un risque relatif estimé entre 7,7 et 8,5 de développer une LLC^{114,115}, mais également un sur-risque de développer une autre hémopathie lymphoïde (LNH indolent, MW, leucémie à tricholeucocytes..). Une étude suédoise récente, basée d'une part sur les données du "Registre Multi-Génération" et d'autre part sur celles du Registre Suédois du Cancer, objective un risque augmenté d'environ 7,7 fois chez les apparentés du premier degré, et un risque plus élevé chez les fils en comparaison aux filles lorsque la mère est atteinte d'une LLC (risque relatif de plus de 23)¹¹⁵.

2. Aspects cliniques

Le diagnostic de LLC est porté dans 3/4 des cas chez un patient asymptomatique devant une hyperlymphocytose constatée fortuitement sur un hémogramme.

Lorsque des signes cliniques sont présents, il s'agit le plus souvent d'une polyadénopathie superficielle bilatérale et symétrique, et/ou d'une splénomégalie.

Plus rarement, le diagnostic peut être fait à l'occasion d'une complication, infectieuse ou auto-immune.

Les complications infectieuses représentent la cause principale de morbidité et de mortalité de la LLC, et sont liées à l'immunodépression à la fois cellulaire et humorale inhérente à la pathologie. Le déficit immunitaire humoral peut être corrigé par un traitement substitutif par Ig polyvalentes, indiqué en cas d'infections graves et récurrentes et/ou d'hypogammaglobulinémie < 4 g/L. Le déficit immunitaire cellulaire, aggravé par les thérapeutiques, peut justifier de prophylaxies anti-infectieuses de type cotrimoxazole et valaciclovir. Malgré la diminution d'efficacité des vaccinations, il est recommandé de les réaliser et notamment les vaccinations anti-grippale, anti-pneumococcique et anti-*Haemophilus influenzae* B. Les vaccins vivants (fièvre jaune, zona) sont en revanche contre-indiqués.

La prévalence des cytopénies auto-immunes dans la LLC est estimée entre 5 et 10 % dans plusieurs études récentes¹¹⁶⁻¹¹⁸. Plusieurs facteurs pronostiques péjoratifs sont significativement retrouvés chez les patients présentant des cytopénies auto-immunes : temps de doublement des lymphocytes court, β 2-microglobuline élevée, expression élevée de CD38 et de ZAP-70, cytogénétique défavorable, gènes *IGVH* non mutés^{117,119}. Ces cytopénies peuvent se présenter sous la forme d'une anémie hémolytique auto-immune, d'une thrombopénie auto-immune ou plus rarement d'une érythroblastopénie auto-immune ou d'un syndrome d'Evans. La prise en charge thérapeutique n'était jusqu'à récemment pas consensuelle avec des schémas de traitement allant d'une simple corticothérapie à la mise en route d'une immuno-chimiothérapie. Les recommandations de l'IWCLL (*International Workshop of Chronic Lymphocytic Leukemia*) distinguent désormais la prise en charge des cytopénies auto-immunes simples de celle des cytopénies complexes, c'est-à-dire associées à une poussée évolutive de la LLC, justifiant ainsi un traitement cytotoxique¹²⁰.

Il a également été rapporté de plus rares cas d'auto-immunité extra-hématologique tels des pemphigus paranéoplasiques, des angioœdèmes acquis par déficit en C1 inhibiteur, des glomérulonéphrites ou des neuropathies anti-MAG. Des troubles de l'hémostase de type hémophilie acquise ou syndrome de Willebrand acquis d'origine auto-immune ont également été décrits.

L'évolution de la LLC est extrêmement variable, mais une des évolutions les plus péjoratives est la transformation en lymphome agressif ou syndrome de Richter qui survient dans 5 à 10 % des cas¹²¹. Suspecté devant une altération de l'état général, une fièvre non infectieuse et la majoration rapide et asymétrique d'un syndrome tumoral, le diagnostic est histologique, objectivant un lymphome B diffus à grandes cellules ou plus rarement un lymphome de Hodgkin. Si les mécanismes pathogéniques de cette transformation restent peu clairs, des facteurs de risque ont été identifiés, tels un statut *IGVH* non muté, l'utilisation du répertoire V4-39, l'absence de del13q14, une expression de CD38 > 30 %, l'existence d'anomalies de p53 ou de c-Myc^{122,123}. Le pronostic de cette transformation est péjoratif, surtout si le syndrome de Richter est issu du même clone que la LLC préexistante¹²⁴.

3. Diagnostic

• *Diagnostic positif*

Le diagnostic de LLC, qui doit être évoqué devant toute lymphocytose persistante de l'adulte, repose sur l'aspect cytologique et l'immunophénotypage des lymphocytes circulants. Il est affirmé devant des critères cytologiques et immunophénotypiques tels que définis par l'IWCLL (*International Workshop on Chronic Lymphoid Leukemia*)¹²⁰ :

- **lymphocytose B supérieure à 5 G/L** évoluant depuis plus de 3 mois
- **aspect cytologique typique** : cellules lymphoïdes de petite taille avec noyau régulier, à chromatine mottée, sans nucléole visible, à cytoplasme homogène et rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Y sont souvent associées des ombres de Gümprrecht (*smudge cells*), correspondant à des cellules altérées présentant une rupture de la membrane nucléaire lors de la réalisation du frottis sanguin¹²⁵

- **score RMH (Royal Marsden Hospital) ou de Matutes à 4 ou 5**^{110,126} (Tableau 2)

Antigène	Cotation : 1 point	Cotation : 0 point
CD5	+	-
CD23	+	-
Expression Ig de surface monotypique	Expression faible	Expression forte
FMC7	-	+
CD79b / CD22	Expression faible	Expression forte

Tableau 2 : Score RMH (Royal Marsden Hospital) dit de Matutes / Moreau^{110,126}

L'analyse histologique médullaire est inutile au diagnostic, sauf en cas de difficulté diagnostique ou lorsqu'une évaluation complète de la maladie est requise comme dans les essais thérapeutiques. L'infiltration tumorale peut être nodulaire, interstitielle, mixte (nodulaire et interstitielle à renforcements focaux) ou diffuse, mais elle n'est jamais paratrabéculaire, contrairement à ce qui est observé dans les LNH. La biopsie ganglionnaire est également inutile, sauf en cas de diagnostic difficile ou s'il existe une suspicion de transformation en syndrome de Richter.

• *Diagnostic différentiel*

Les critères diagnostiques ont été récemment modifiés pour dégager une forme à faible lymphocytose, appelée **lymphocytose B monoclonale (LBM)**, et définie par une lymphocytose B < 5 G/L, en l'absence d'adénopathie, de splénomégalie et de signe clinique d'évolutivité¹²⁷. Le type LLC (CD5+, CD23+) est la forme la plus fréquente, alors que les LBM de type LLC atypique (CD5+, CD23-) ou

non LLC (CD5-) sont plus rares. Cette LBM, qui concerne 3,5 % de la population générale, peut précéder la survenue d'une LLC, comme l'a montré une étude d'une cohorte de 150 000 sujets âgés entre 55 et 74 ans, où 129 ont développé une LLC. Parmi les 45 patients pour lesquels des cellules lymphoïdes sanguines étaient disponibles avant la survenue de la LLC, un clone de type LLC a été identifié en cytométrie en flux chez 42/45 sujets et une monoclonalité en RQ-PCR chez 43/45 patients¹²⁸. Le risque de progression vers une LLC est évalué à 1 % par an chez les patients porteurs d'une LBM, dont la survie est toutefois identique à celle de la population générale¹²⁹.

Les autres diagnostics différentiels sont constitués par les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B non LLC.

4. Cytogénétique et données moléculaires

Du fait de la faible activité proliférative des cellules de LLC et de la difficulté d'obtenir des mitoses analysables pour la réalisation d'un caryotype, des anomalies chromosomiques ne sont détectées en cytogénétique conventionnelle que chez 40 à 55 % des patients^{130,131}. Le développement de la FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), notamment interphasique, a permis de mettre en évidence en fait des anomalies chez plus de 80 % des patients^{130,132}. Plus récemment, le développement d'agents mitogènes puissants comme le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) additionné d'IL-2 ou d'oligodinucléotides (DSP30) activant TLR-9, a permis la génération de métaphases dans les cellules de plus de 98 % de patients de LLC et la réalisation de caryotypes a conduit à la détection d'anomalies cytogénétiques chez 83 % d'entre eux. La cytogénétique conventionnelle et la FISH semblent donc actuellement complémentaires et ont profondément modifié la signification pronostique des classifications cliniques.

- *Délétion du bras long du chromosome 13 (del 13q14)*

Anomalie cytogénétique la plus fréquente, souvent cryptique, elle est détectée dans 13 à 27 % des cas par cytogénétique conventionnelle, et dans environ 55 % des cas par FISH^{130,131,133}. Cette anomalie, non spécifique de la LLC puisque également rencontrée dans le MM et le LNH à cellules du manteau par exemple, est de bon pronostic lorsqu'elle est isolée : elle est corrélée à une survie globale de 133 mois, supérieure à celle des patients avec FISH normale - de 111 mois - (Figure 10)¹³⁰.

Il a été mis en évidence une région minimale délétée de 29 kb qui comporte le locus du gène *DLEU* (*Deleted in LEUkemia*) ainsi qu'un groupe de 2 miRNAs (miR15-a et miR16-1) ciblant Bcl-2 et qui ont été montrés sous-exprimés dans 70 % des cas de LLC⁶⁸. La délétion 13q14 est actuellement considérée comme un évènement précoce dans la transformation leucémique et son absence prédispose à une transformation en syndrome de Richter¹³⁴.

- *Délétion du bras long du chromosome 11 (del 11q22.23)*

Mise en évidence chez 12 à 20 % des patients, elle aboutit à la délétion du gène suppresseur de tumeur ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) qui a un rôle fondamental dans la réparation des cassures d'ADN notamment après exposition aux radiations ionisantes. Il s'agit de la seconde anomalie en termes de fréquence et elle peut survenir au cours de l'évolution de la LLC¹³⁵. La délétion est de taille hétérogène, avec une région minimale délétée d'environ 1,5 Mb en 11q22. Elle est associée à un âge plus jeune des patients, à une atteinte ganglionnaire importante, à la nécessité d'initier un traitement plus précocement ainsi qu'à des survies sans progression et globale médianes inférieures à celles des patients avec FISH normale (79 *versus* 111 mois pour la survie globale, Figure 10)^{130,133,136}.

- *Trisomie 12*

La trisomie 12 est une anomalie fréquemment rencontrée dans la LLC (13 à 20 % des patients)^{130,133,137}. Sa présence en mosaïque à côté de mitoses normales dans des clones minoritaires fait penser qu'il s'agit d'un événement secondaire. Elle est très souvent associée à des atypies cytologiques, ainsi qu'à un profil immunophénotypique particulier de LLC atypique avec un score de Matutes inférieur à 4 (forte intensité d'expression de FMC7 et des Ig de surface)^{138,139}. Son pronostic est controversé, défini comme intermédiaire dans la plupart des études, avec une survie médiane de 114 mois, *versus* 111 mois en cas de FISH normale dans l'étude princeps (Figure 10)¹³⁰.

- *Délétion du bras court du chromosome 17 (del 17p13)*

La délétion 17p13, responsable de la perte du gène suppresseur de tumeur *TP53*, est détectée par FISH chez environ 5 à 10 % des patients au diagnostic. Sa fréquence augmente au cours de l'évolution de la maladie, jusqu'à 25 % en situation de rechute et environ 30 % en cas de LLC réfractaire. Rarement isolée, elle est plus souvent associée à d'autres anomalies, voire à un caryotype complexe. C'est l'anomalie chromosomique de plus mauvais pronostic, avec une survie médiane de 32 mois (Figure 10)^{130,133} et elle est associée à une résistance à la chimiothérapie conventionnelle (analogues des purines et agents alkylants)¹⁴⁰. Le dysfonctionnement de la protéine p53, qui joue un rôle majeur dans la réponse aux dommages de l'ADN, l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire, est un des facteurs de la chimiorésistance.

L'analyse fonctionnelle de la voie p53 (permise notamment par une technique de CMF¹⁴¹) est devenu un enjeu majeur dans la LLC. En effet, la délétion 17p est associée à une ou plusieurs mutations inactivatrices de *TP53* sur l'autre allèle, non détectées par la FISH, dans un grand nombre de cas (76 % des patients de l'étude anglaise CLL4¹⁴²). La présence de mutations de *TP53*, observée chez 7,6 % de l'ensemble des patients, même en l'absence de del17p, est également associée à un mauvais pronostic : diminution de la réponse globale (27 % *vs* 83 % en l'absence de mutations), diminution de la survie sans progression à 5 ans (5 % *vs* 17 %) et de la survie globale à 5 ans (20 % *vs*

59 %) ¹⁴². Un groupe européen rattaché à l'ERIC (*European Research Initiative on CLL*) évalue les différents tests analysant la fonctionnalité de p53 en vue d'une future utilisation en routine ¹⁴³.

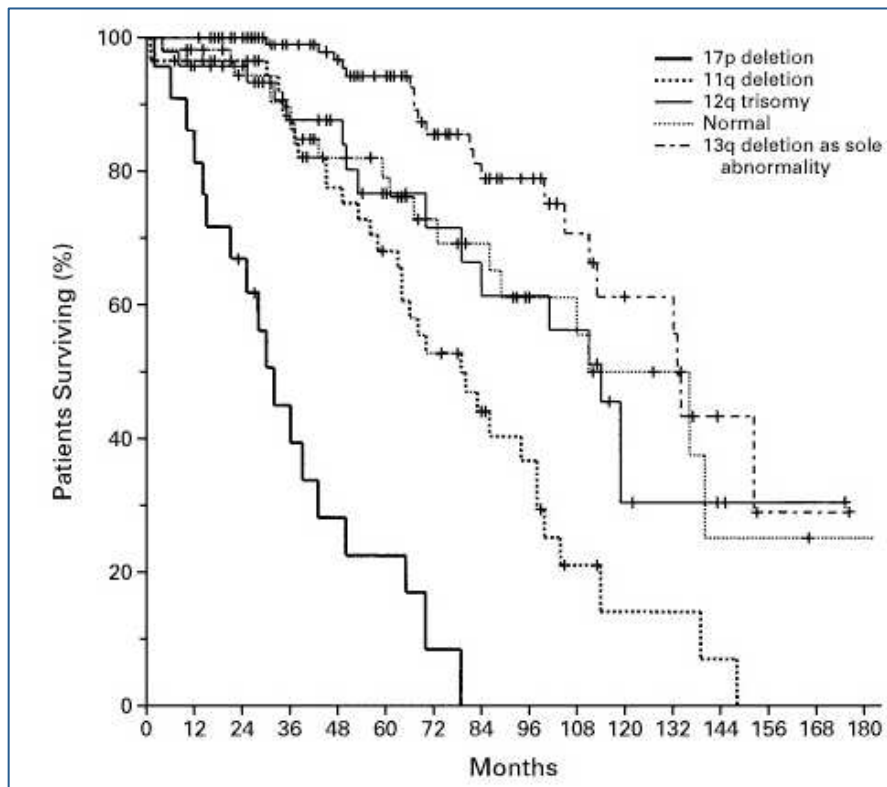


Figure 10 : Probabilité de survie depuis le diagnostic selon le groupe cytogénétique ¹³⁰
(FISH normale = absence de délétions 6q21, 11q22.23, 13q14, 17p13 ; absence de trisomies 3q26, 8q24, 12q13 ; absence de translocation impliquant la bande 14q32)

A noter que si l'association d'une del17p et d'une del11q ("*double hit*") est rare (1 % dans une étude récente ayant concerné 2184 patients), elle est associée à un pronostic particulièrement péjoratif, avec une survie médiane de 1,9 ans *versus* 3,1 ans chez les patients avec del17p, 4,8 ans chez les patients avec del11q et 9,3 ans chez les patients n'ayant ni del17p ni del11q ¹⁴⁴.

- *Autres anomalies chromosomiques*

Une **délétion du bras long du chromosome 6** del(6q21) est mise en évidence chez environ 5 % des patients. Elle est corrélée à une hyperlymphocytose importante, une morphologie atypique et un pronostic intermédiaire ^{130,133,145}.

Des **translocations impliquant un réarrangement du gène IGVH** situé en 14q32 ont été mises en évidence dans 4 à 7 % des LLC, leur conférant un mauvais pronostic ^{130,146}. Ces translocations concernent deux partenaires récurrents, le gène *BCL2* dans la t(14;18)(q32;q21) et le gène *CCND1* dans la t(11;14), respectivement identiques à celles retrouvées dans le LF et le LCM. Les autres partenaires décrits sont *BCL11A*, *CCND3* et *CDK6* ¹⁴⁶.

Assez fréquemment observée, la survenue d'une **évolution clonale** semble être plus fréquente chez les patients avec *IGVH* non muté et constitue un facteur péjoratif ¹⁴⁷.

- *Anomalies moléculaires*

La voie p53, dont nous venons de citer l'importance dans la chimio-sensibilité des cellules de LLC, peut donc également être altérée par l'existence de **mutations du gène TP53**. Ces mutations sont identifiées dans 2,2 % des cas au diagnostic (mutations habituellement faux sens et à l'état hétérozygote, souvent situées dans les sites CpG), 11,2 % des cas de LLC progressive et dans 21,3 % des LLC chimio-résistantes (mutations non sens, facilement à l'état homozygote et microdélétions)¹⁴⁸. La présence de ces mutations est associée à une réponse anormale obtenue après irradiation. Si la présence d'une anomalie fonctionnelle de p53, corrélée à une évolution clinique péjorative, est généralement associée à des mutations de *TP53*, dans de plus rares cas (environ 11 % des anomalies fonctionnelles de p53), il existe un dysfonctionnement de p53 indépendant de *TP53*¹⁴⁸.

Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit NGS (*Next-Generation Sequencing*) ont permis de mettre en évidence d'autres mutations récurrentes chez des patients avec une LLC, et c'est en 2011 que deux équipes ont décrit pour la première fois des mutations de *NOTCH1*, *MYD88*, *XPO1*, *KLHL6*, *ATM*, *SF3B1*, *ZMYM3*, *MAPK1*, *FBXW7*, *DDX3X*^{149,150}.

L'activation constitutive de la voie de signalisation de *NOTCH1*, impliquée dans la résistance à l'apoptose et l'augmentation de la survie cellulaire¹⁵¹, était connue dans la LLC préalablement à la mise en évidence des **mutations de NOTCH1**, identifiées chez 11 à 12 %^{149,152,153} des patients. Contrairement aux mutations observées dans la LAL-T, les mutations de *NOTCH1* survenant au cours de la LLC affectent très fréquemment, voire exclusivement, l'exon 34 localisé en 9q34.3, générant prématurément un codon stop et conduisant à une protéine présentant une délétion du domaine C-terminal qui contient une séquence PEST. La fréquence des mutations de *NOTCH1* est plus importante dans les LLC avec un profil *IGHV* non muté (20,4 %) par rapport aux patients avec un profil muté (7 %)¹⁴⁹ sauf en cas d'utilisation d'IGHV4-39, et également en cas de trisomie 12 (41,9 %)¹⁵⁴, certaines données suggérant que l'apparition de ces mutations est associée à une progression de la maladie¹⁵⁵. A noter que ces mutations sont associées à des mutations de *FBXW7* (régulateur négatif de *NOTCH1*), elles mêmes associées à la présence d'une trisomie 12. Les patients présentant une mutation de *NOTCH1* ont aussi plus fréquemment d'autres facteurs de mauvais pronostic : augmentation des LDH et de la β 2-microglobuline, forte expression de CD38 et de ZAP-70¹⁵³. Les mutations de *NOTCH1* sont associées à une évolution clinique péjorative, avec diminution de la survie globale (OS médiane dans 2 cohortes estimée entre 3,5 et 8,5 années en cas de mutation de *NOTCH1* versus 13,9 à 16,2 années en l'absence de mutation¹⁵², OS à 10 ans diminuée à 35 % versus 64 % en l'absence de mutation dans une autre étude¹⁵³), à une diminution du délai de progression et enfin à une augmentation importante du risque de syndrome de Richter (23 à 31 % versus 1,3 à 6 % en l'absence de mutation^{149,153}), surtout si ce dernier dérive du même clone que la LLC (*hazard ratio* (HR) de 5,8 [2,78-12,12]), et encore plus si les cellules utilisent IGHV4-39¹⁵⁶.

Une autre anomalie récurrente est la **mutation du gène *MYD88*** (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), décrite dans la LLC à une fréquence globale de 2,9 % (0,8 % en cas de profil *IGVH* non muté, et 5,6 % en cas de profil *IGVH* muté)¹⁴⁹. Les patients avec *MYD88* muté sont plutôt des patients jeunes avec un stade clinique plus avancé, et souvent une délétion 13q, mais aucune différence n'est démontrée en termes de survie globale ou survie sans progression. A noter l'absence de mise en évidence de mutation conjointe de *NOTCH1* et *MYD88*¹⁵³.

Des **mutations du gène *XPO1***, codant pour l'exportine-1, ont été détectées chez 2,4 % des patients, plus fréquemment en cas de profil *IGVH* non muté (4,6 %) qu'en cas de profil muté (< 1 %)¹⁴⁹. Dans la plupart des cas, il existe aussi des mutations de *NOTCH1*, laissant suggérer une synergie des 2 événements dans l'évolution de la LLC.

Les mécanismes d'épissage et de maturation des ARN sont également concernés par des anomalies moléculaires dans la LLC. Le **gène *SF3B1*** (*Splicing factor 3b, subunit 1*), localisé en 2q23.1, et codant pour U2 snRNP (*U2 small nuclear ribonucleoprotein*) qui appartient au spliceosome (complexe ARN-protéine impliqué dans la maturation des ARN) est muté dans 15 % des LLC¹⁵⁰. Les mutations de *SF3B1* ont un impact pronostique péjoratif dans la LLC, avec une fréquence plus importante dans les LLC réfractaires¹⁵⁷. Elles ne sont en revanche pas associées aux anomalies de *TP53*. Elles sont associées de façon indépendante à une réduction de la survie sans progression et de la survie globale¹⁵⁸.

Plusieurs autres voies moléculaires que celle du BCR sont par conséquent activées dans la LLC, notamment par ces différentes mutations, comme l'illustre la figure 11. A noter que la voie *NOTCH1* est activée dans un grand nombre de cas, y compris en l'absence de mutation de *NOTCH1*¹⁵⁹.

Les **microARN**, ou miRNA (petits ARN non codants d'une vingtaine de nucléotides réprimant l'expression d'autres gènes en se fixant sur leur ARN codants) jouent également un rôle important dans la LLC. Des délétions de miRNA 15 ou 16 sont présentes dans 15 % des LLC⁶⁸ et il a été montré qu'elles étaient associées aux délétions 13q. Ces miRNA inhibent l'expression de *BLC2*, mais aussi celle de la cycline D1 et de *MCL1*¹⁶⁰. Par ailleurs, la diminution des miR-29b et miR181b dans les LLC agressives est associée à la surexpression de TCL-1, oncogène activateur de la voie PI3K⁷⁰. D'autres miR ont été décrits comme ayant un rôle dans l'agressivité des LLC : une forte expression de miR-21 a été décrite comme associée à une diminution de survie des patients porteurs d'une LLC avec del(17p)¹⁶¹ ; les miR-132 et miR-155 ont également fait l'objet d'études récentes dans la LLC^{162,163}.

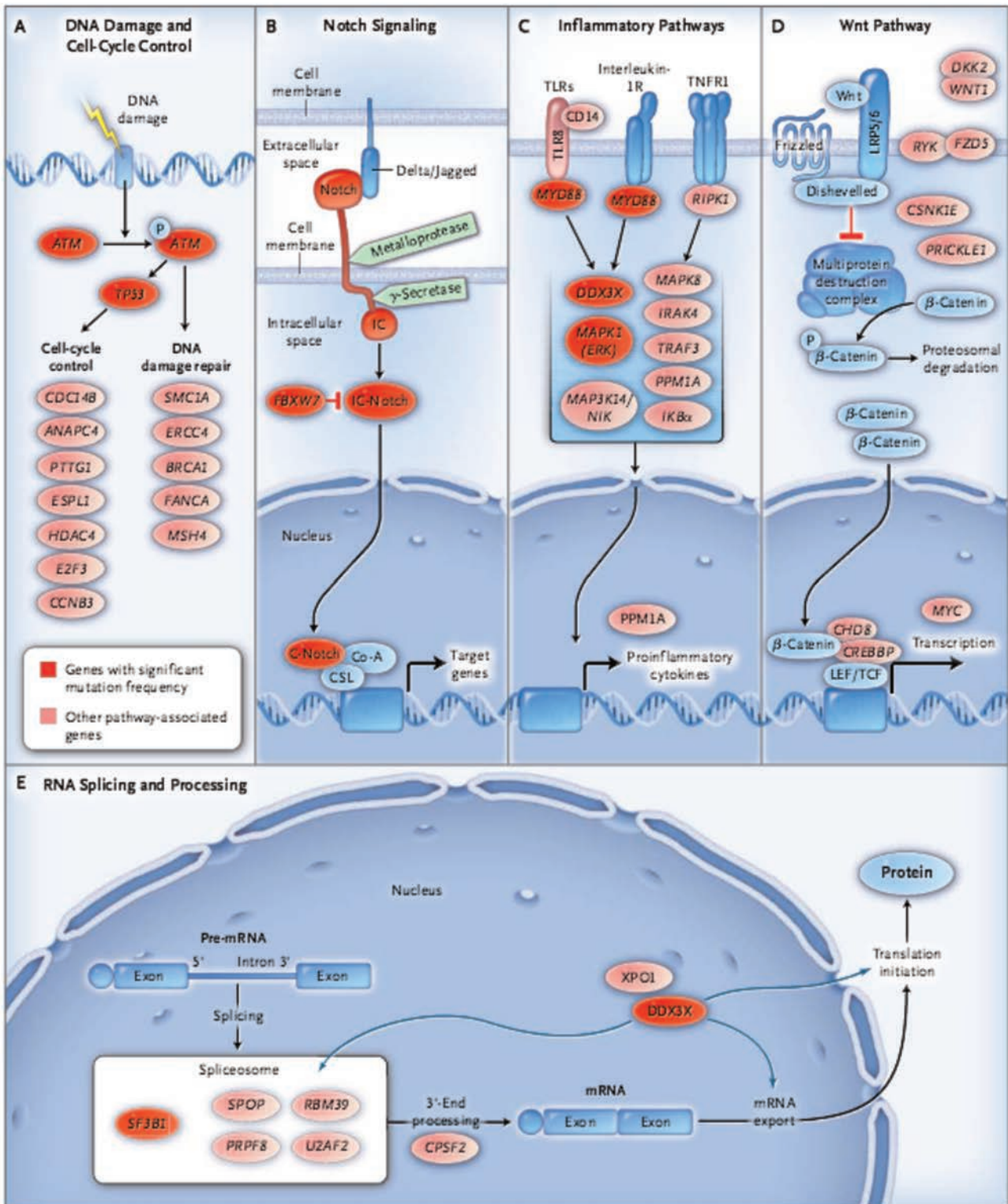


Figure 11 : Voies biologiques -autres que celle du BCR- dérégulées dans la LLC suite à des anomalies moléculaires (A: réparation de l'ADN et contrôle du cycle cellulaire ; B: voie de signalisation NOTCH ; C: voies de l'inflammation ; D: voie de signalisation Wnt ; E: épissage et maturation des ARN)

5. Facteurs pronostiques

- *Paramètres anatomo-cliniques*

Les premières classifications pronostiques ont été proposées par Rai en 1975¹⁶⁴ et Binet en 1981¹⁶⁵. Elles reposent sur les données de l'examen clinique (présence d'adénopathies, d'une hépatomégalie ou d'une splénomégalie) et de l'hémogramme (hyperlymphocytose, anémie, thrombopénie). Elles restent encore d'actualité dans la pratique quotidienne et les essais cliniques, et sont détaillées dans les tableaux 3 et 4. Les médianes de survie des patients de pronostic intermédiaire ou défavorable décrites dans ces classifications en 1975 et 1981 ont été nettement améliorées depuis l'avènement de l'immunochimiothérapie.

Stades	Critères	Médiane de survie (Mois)
0	Lymphocytose monoclonale isolée (sang périphérique et moelle osseuse)	> 150
I	Stade 0 et adénopathies (cervicales, axillaires ou inguinales à l'examen clinique)	101
II	Stade 0 ou I et splénomégalie et/ou hépatomégalie (à la palpation abdominale)	71
III	Stade 0 et Hb < 110 g/L (ou Ht < 33 %)	19
IV	Stade 0 et plaquettes < 100 G/L	19

Tableau 3 : Classification pronostique de Rai¹⁶⁴

Stades	Aires lymphoïdes*	Hb et plaquettes	Médiane de survie (Mois)
A	< 3	Hb ≥ 100 g/L et plaquettes ≥ 100 G/L	Comparable à celle d'une population saine d'âge correspondant
B	≥ 3		84
C	Indifférent	Hb < 100 g/L ou plaquettes < 100 G/L	24

Tableau 4 : Classification pronostique de Binet¹⁶⁵

(* adénopathies cervicales, axillaires, inguinales, hépatomégalie ou splénomégalie palpables à l'examen clinique)

- *Facteurs pronostiques issus de l'hémogramme et du frottis sanguin*

Si pour beaucoup, l'importance de la lymphocytose au diagnostic n'a pas de valeur pronostique, une étude récente a objectivé qu'une lymphocytose supérieure à 13 G/L au diagnostic chez des patients porteurs d'une LLC de stade A était un facteur péjoratif indépendant en terme de survie sans progression¹⁶⁶.

Par ailleurs, un **temps de doublement des lymphocytes** (TDL) inférieur à 12 mois a depuis longtemps été rapporté comme péjoratif dans des études rétrospectives^{167,168}, et reste un paramètre discriminant dans les stades A.

Une **morphologie sanguine atypique**, définie par plus de 10 % de prolymphocytes ou un taux supérieur à 5 G/L, ou par plus de 15 % de cellules à noyau clivé ou d'aspect lymphoplasmocytaire, a également été montrée comme un critère de mauvais pronostic^{169,170}.

Les **ombres de Gümprrecht** (ou *smudge cells*), décrites dès 1896, sont définies par des cellules lymphoïdes "cassées" *ex vivo* avec un cytoplasme non intact et une membrane nucléaire interrompue, dont la formation est inversement corrélée à l'expression de vimentine, protéine du cytosquelette essentielle pour la rigidité et l'intégrité du lymphocyte. Le pourcentage moyen de ces ombres sur le frottis sanguin a été évalué entre 21 et 28 % et il a été montré par deux études récentes qu'un pourcentage inférieur à 20 ou 30 % des lymphocytes sanguins était un facteur indépendant associé à une réduction de la survie^{171,172}.

L'importance du **taux de monocytes** au diagnostic a également décrit comme un facteur pronostique indépendant : un chiffre de monocytes supérieur à 0,910 G/L est associé à une diminution de la survie globale¹⁷³.

- *Facteurs pronostiques liés au patient*

Le **score CIRS** (*Cumulative Illness Rating Scale*) est un score de comorbidités évaluant 14 appareils et initialement développé en oncogériatrie¹⁷⁴. Un score supérieur à 6 est classiquement reconnu comme de mauvais pronostic, et une étude espagnole récente mettait en évidence un impact pronostique de ce score de comorbidités avec un *cut-off* à 4¹⁷⁵.

L'existence d'une **insuffisance rénale** est un facteur de mauvais pronostic dans la LLC^{176,177}, avec un seuil de clairance de créatinine entre 45 et 80 mL/min selon les études.

- *Facteurs moléculaires*

De nombreuses anomalies cytogénétiques et moléculaires ont été décrites influençant le pronostic des patients (Chapitre I.B.4). Une synthèse est proposée dans le tableau 5.

- *Facteurs pronostiques de la réponse au traitement*

L'obtention d'une réponse complète et d'une maladie résiduelle (MRD) négative influence l'évolution, en termes de survie sans progression et de survie globale, comme le démontre une étude allemande en analysant la MRD évaluée par cytométrie en flux¹⁷⁸. Une étude italienne comparant des techniques de CMF et de PCR quantitative met en évidence une concordance entre les deux techniques dans environ 80 % des cas, et une confirmation de l'impact sur la survie¹⁷⁹.

Facteurs pronostiques	Favorables	Défavorables
Stades cliniques (Rai / Binet) ^{164,165}	0-II / A	III-IV / B-C
Infiltration de la moelle osseuse	Infiltration interstitielle ou nodulaire	Infiltration diffuse
Temps de doublement de la lymphocytose ^{167,168}	≥ 12 mois	< 12 mois
Expression de CD38 ^{180 181}	Faible (< 7 %)	Forte (> 30 %)
Expression cytoplasmique de ZAP-70 ^{182 183 184}	Faible	Forte
Cytogénétique conventionnelle ou FISH ¹³⁰	Délétion 13q isolée Caryotype normal	Délétion (11q), délétion (17p) Caryotype complexe
Mutations		TP53, ATM, NOTCH1, SF3B1
Gènes IGVH ^{180 185}	Mutés	Non mutés
Expression de CD23 soluble ^{186 187}	Faible	Forte
Taux de β2-microglobuline ¹⁸⁸	Bas (< 1,7 mg/L)	Elevé (> 3,5 mg/L)
Taux sérique de TK ¹⁸⁸	Bas (< 7,1 UI/L)	Elevé (> 10 UI/L)

Tableau 5 : Synthèse des principaux facteurs pronostiques clinico-biologiques dans la LLC

- *Scores pronostiques*

De nombreux scores pronostiques combinant l'effet de plusieurs facteurs décrits ci-dessus ont fait l'objet de publications dans la littérature. Nous en retiendrons 3 :

- un **score pronostique spécifique des stades A** de Binet¹⁶⁶ défini par Rémi Letestu et le groupe français qui combine la thymidine kinase sérique, la lymphocytose, la β2-microglobuline et l'expression du CD38 pour différencier deux groupes de risque dont la PFS est significativement différente (pas de progression à 7 ans si 0 ou 1 facteur, versus PFS médiane de 20 mois si au moins 2 facteurs)

- un **score pronostique clinico-biologique, dit score de Pflug**, établi par le groupe allemand et la Mayo Clinic sur la base de trois essais thérapeutiques randomisés (CLL1, CLL4, CLL8) et utilisant la combinaison de 8 variables indépendantes de poids différents (l'âge > 60 ans, le sexe masculin, l'ECOG > 0, la présence d'une del(17p), d'une del(11q), le statut IGVH non muté, la β2-microglobuline et la thymidine kinase sérique)¹⁸⁹. Les quatre groupes de risque présentent des différences significatives en termes de survie globale à 5 ans (de 19 à 95 %) et de survie sans progression

- un **score pronostique international (IPI)** récemment présenté, basé sur une méta-analyse de 3472 patients, combinant l'âge, le stade clinique, la présence d'une délétion 17p et/ou d'une mutation de TP53, le statut mutationnel IGVH et la β2-microglobuline¹⁹⁰.

6. Moyens thérapeutiques

- *Chimiothérapies classiques : alkylants et analogues des purines*

Le **chlorambucil** est un alkylant utilisé depuis les années 1950 et reste actuellement un des traitements utilisés en première intention chez les sujets très âgés et/ou fragiles. Plusieurs schémas d'administration, continu ou séquentiel, existent sans étude comparative permettant de conclure à la supériorité de l'un d'entre eux. Les taux de réponse globale en monothérapie sont de l'ordre de 40 à 70 % selon les études^{191,192}, avec un taux de réponse complète de seulement 4 %¹⁹².

La **fludarabine** est un analogue des purines qui a démontré, dans une étude randomisée incluant 193 patients de plus de 65 ans, sa supériorité en monothérapie par rapport au chlorambucil¹⁹². L'ajout de cyclophosphamide (association FC) est plus efficace que la monothérapie par fludarabine en termes de taux de réponse et de durée de réponse^{193,194}.

La **bendamustine** est une drogue découverte en 1963 en Allemagne de l'Est, mais dont le développement attendra la chute du mur de Berlin. Son activité, qui combine les mécanismes des alkylants et des analogues des purines, a été démontrée supérieure au chlorambucil en monothérapie, avec un taux de réponses complètes de l'ordre de 30 %¹⁹⁵.

- *Anticorps monoclonaux*

Le premier anticorps monoclonal anti-CD20, le **rituximab**, a bouleversé le traitement des LLC comme d'autres hémopathies lymphoïdes B.

Chez les sujets les plus jeunes, la **combinaison FCR** est démontrée clairement supérieure à la combinaison FC avec augmentation des taux de réponses, de la survie sans progression et, pour la première fois dans le domaine de la LLC, de la survie globale¹⁹⁶. L'existence d'une toxicité hématologique et de complications infectieuses a fait envisager des schémas à dose diminuée dits FCR-Lite¹⁹⁷.

Chez les sujets plus âgés et/ou fragiles ("*unfit*"), l'association **rituximab-chlorambucil** est supérieure à la monothérapie par chlorambucil¹⁹⁸.

L'introduction de nouveaux anticorps monoclonaux ciblant CD20 dans l'arsenal thérapeutique de la LLC représente une alternative intéressante :

- l'**obinutuzumab** (GA101) est un anticorps monoclonal anti-CD20 humanisé de type II, qui s'est montré dans les études précliniques plus efficace que les anticorps monoclonaux de type I. Le GA101 a été évalué en combinaison avec le chlorambucil chez des patients *unfit* en première ligne dans l'étude CLL11, en comparaison avec chlorambucil et rituximab-chlorambucil¹⁹⁸. Les résultats mettent en évidence une supériorité de l'association GA101-chlorambucil avec des taux de RC de plus de 20 % (*versus* 7 % dans le bras rituximab-chlorambucil)

- l'**ofatumumab** est un anticorps anti-CD20 de type IgG1 kappa qui se lie à un épitope de la molécule CD20 différent de celui reconnu par le rituximab avec une affinité meilleure. Sa demi-vie est de 180 minutes, rendant l'activation des mécanismes de cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC) plus efficace¹⁹⁹. Une étude internationale de phase II, évaluant l'efficacité de l'ofatumumab chez 206 patients, dont 95 étaient réfractaires à la fludarabine et à l'alemtuzumab et 111 étaient réfractaires à la fludarabine et présentant un volumineux syndrome tumoral ("*bulky*"), rapporte un taux de réponse global prometteur de 47 % que les patients aient déjà reçu ou non du rituximab (43 % pour les patients ayant déjà reçu du rituximab, 53 % pour le groupe naïf)²⁰⁰.

En dehors des anti-CD20, divers médicaments ont été développés contre d'autres molécules de surface présentes sur la cellule de LLC :

- le **lumiliximab** est un anticorps chimérique dirigé contre la molécule membranaire CD23 qui a été évalué en association avec du FCR, avec un taux de réponse globale de 71 % chez des patients avec une LLC réfractaire/en rechute, sans augmenter la toxicité du FCR²⁰¹

- l'**épratuzumab**, un anticorps humanisé de type IgG1 dirigé contre la molécule membranaire CD22, évalué en association au rituximab dans divers LNH indolents en rechute, constitue une thérapie potentiellement intéressante (taux de réponse de 57 % dans des LNH lymphocytiques)²⁰²

- l'**apolizumab** est un anticorps humanisé dirigé contre la chaîne β de la molécule HLA-DR dont le développement a été arrêté à l'issue d'une phase I-II ayant conduit à une efficacité médiocre (1 réponse partielle sur 22 patients), accompagnée d'une toxicité importante²⁰³

- le **lucatumumab** (HCD122) est un anticorps monoclonal d'isotype IgG1 anti-CD40, inhibant l'interaction CD40-CD40 ligand et entraînant une apoptose par mécanisme d'ADCC. Il a été évalué en phase I chez 26 patients avec une LLC en rechute/réfractaire à la fludarabine, permettant de retenir la dose de 3 mg/kg. La réponse est néanmoins très modérée en monothérapie, justifiant plutôt une stratégie d'évaluation en association avec d'autres molécules²⁰⁴

- l'**IMGN539** est un anticorps humanisé IgG1 anti-CD37 (tétraspanine présente sur les lymphocytes B qui active la voie PI3K) associé à un conjugué toxique, le DM1 ou maytansinoid, dont les résultats en phase précoce sont prometteurs²⁰⁵

Une autre stratégie originale repose en l'utilisation de **cellules T autologues manipulées génétiquement appelées CART19** (pour *anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T cells*). Les lymphocytes T CART19 sont des cellules T autologues manipulées génétiquement *in vitro* pour être transfectées avec un lentivirus exprimant un récepteur chimérique de troisième génération associant la chaîne zéta du complexe TCR-CD3, un domaine CD137, et les domaines variables des chaînes lourdes et légères d'un anticorps anti-CD19, ciblant ainsi les cellules tumorales exprimant le CD19. L'utilisation chez un patient porteur d'une LLC en rechute réfractaire avec del(17p) de ces cellules CART19 a permis une RC à 6 mois, avec constatation d'une activation immune (libération de cytokines inflammatoires dans les surnageants des aspirations médullaires) concomitamment au syndrome de lyse tumorale²⁰⁶. Cette efficacité a été confirmée après évaluation de 9 patients, avec obtention de 4 RC et 4 RP²⁰⁷.

- *Autres thérapies ciblées*

Comme décrit précédemment, une fois activé par l'antigène, le BCR recrute des kinases, en particulier Syk et Lyn qui phosphorylent les motifs cytoplasmiques ITAM, activant notamment Btk et la PI3K. Btk et Syk phosphorylent PLC γ 2 qui à son tour met en jeu la voie des protéines kinases C (PKC) et du calcium, aboutissant à l'activation de facteurs de transcription nécessaire à la prolifération (NF κ B et NFAT). La voie PI3k, mise en jeu parallèlement, permet de maintenir l'activation du BCR. Cibler ces différents partenaires a de façon évidente un intérêt en thérapeutique⁴¹.

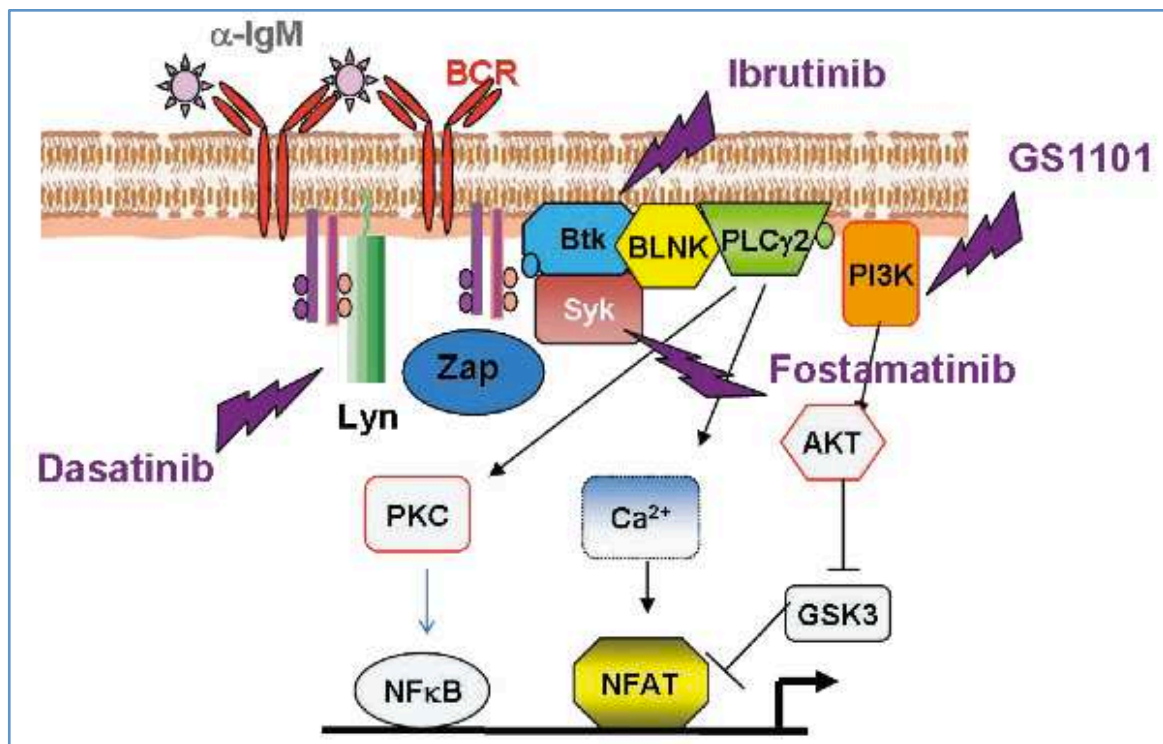


Figure 11 : Intermédiaires de signalisation de la voie du BCR et inhibiteurs utilisés en clinique à ce jour²⁰⁸

- *Cibler la Bruton Tyrosine Kinase (Btk)*

Btk est une tyrosine kinase cytoplasmique de la famille Tec (*Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma*) qui est essentielle à la voie de signalisation du BCR. Des mutations avec perte de fonction de Btk sont responsables d'un déficit immunitaire primitif, l'hypogammaglobulinémie / agammaglobulinémie liée au chromosome X ou maladie de Bruton²⁰⁹. L'ibrutinib (PCI-32765) est une petite molécule disponible *per os* se liant de façon covalente à la cystéine 481 de la Btk, l'inhibant ainsi de façon irréversible. Une étude de phase Ib-II menée chez 116 patients porteurs d'une LLC en rechute ou réfractaire (à 420 ou 840 mg/j) a montré, avec un suivi médian de 16 mois, un taux de réponse globale entre 50 et 71 % (sans différence entre les 2 posologies, et y compris en présence d'une del (17p)). Une lymphocytose apparaît à J7, concomitante d'une réduction du syndrome tumoral et d'une amélioration des cytopénies, atteint son maximum à 4 semaines puis disparaît chez la majorité des patients. Le traitement est très bien toléré, avec peu d'effets de grade 3-

4 (neutropénie (15 %), diarrhée, asthénie, fièvre). Une phase III randomisée ayant inclus 391 patients démontre la supériorité de l'ibrutinib sur l'ofatumumab en situation de rechute²¹⁰, permettant l'approbation de cette molécule en 2014 en rechute, et en première ligne pour les patients avec anomalie de *TP53*. Des études de phase II en association avec le rituximab et avec l'ofatumumab ont conduit à des résultats intéressants en termes d'efficacité et de tolérance^{211,212}, et les premiers résultats d'une étude d'association à l'immunochimiothérapie BR (bendamustine-rituximab) en rechute, l'étude HELIOS, sont très prometteurs.

- *Cibler la Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)*

La voie PI3K est au cœur de la signalisation du BCR et elle est aussi déclenchée par l'activation des récepteurs tyrosine kinase et des récepteurs de certaines cytokines. Il existe plusieurs isoformes de la PI3K, et notamment les domaines catalytiques 110 α , 110 β et 110 δ associés aux unités régulatrices p85, p50 et p55, l'isoforme δ de la sous unité catalytique p110 étant la forme prédominante dans les leucocytes. Cette activation de la PI3-K permet la transformation du phosphatidylinositol (3-4) biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PIP3), aboutissant ainsi à l'activation de la voie AKT.

L'idélalisib ou GS-11011 ou CAL-101, est un inhibiteur spécifique de p110 δ disponible par voie orale. Il induit l'apoptose, par un mécanisme caspase-dépendant, des cellules de LLC de façon variable d'un échantillon à un autre mais de façon sélective. La drogue inhibe les mécanismes de survie par blocage entre autre des effets protecteurs des cellules du microenvironnement et entraîne également une redistribution des cellules tumorales des ganglions vers le sang, avec réduction de taille des ganglions et présence d'une lymphocytose pendant les premières semaines de traitement. La rétention et le *homing* des cellules tumorales dans les ganglions sont dépendantes de CXCL12 et CXCL13, chémokines secrétées par les cellules du microenvironnement, qui attirent les lymphocytes tumoraux exprimant les récepteurs CXCR4 et CXCR5. Cette drogue permet également *in vitro* de diminuer la migration des cellules tumorales vers les cellules stromales médullaires, de diminuer la production de chémokines et cytokines (CCL2, CCL3, IL-6, sCD40L, CCL22, CCL17, TNF- α) en co-culture avec les cellules "nurse-like" et de sensibiliser les cellules de LLC aux drogues cytotoxiques telles la fludarabine, la bendamustine ou la dexaméthasone²¹³. Une étude de phase I évaluant l'idélalisib chez 54 patients met en évidence un taux de réponse globale de 72 % avec un profil de tolérance correcte²¹⁴. C'est en association avec le rituximab et versus placebo que l'idélalisib a été évalué en phase III en situation de rechute chez 220 patients²¹⁵. La PFS médiane n'est pas atteinte dans le bras idélalisib, alors qu'elle est de 5,5 mois dans le groupe rituximab-placebo et la survie globale est également significativement augmentée dans le bras rituximab-idélalisib. Ces données ont conduit à l'approbation de l'idélalisib en 2014, en association au rituximab dans les LLC en rechute ou avec anomalie de *TP53*. Des études de phase III sont actuellement en cours dans les LLC non antérieurement traitées.

- *Cibler l'apoptose et Bcl-2*

Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique surexprimée notamment dans la LLC²¹⁶. Plusieurs inhibiteurs ont été développés, le premier étant l'ABT-263 ou navitoclax, molécule inhibant BCL-XL, BCL2 et BCL-w (protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2 et impliquées dans le maintien du clone tumoral de la LLC), induisant l'apoptose. Une étude de phase I dans la LLC en rechute avait montré chez 29 patients une efficacité sur la lymphocytose mais en raison d'une thrombopénie limitante, son développement n'a pas été poursuivi²¹⁷. La génération d'un inhibiteur plus sélectif, l'ABT-199 ou venetoclax, permet d'épargner la lignée plaquettaire, et l'apparition de syndromes de lyse tumorale après une seule prise par voie orale en fait une thérapie très prometteuse en termes d'efficacité²¹⁸. Les résultats de la phase I sont encourageants, avec 23 % de réponse complète en situation de rechute.

- *Cibler la Spleen Tyrosine Kinase (SYK)*

L'inhibition de SYK permet non seulement l'arrêt de la prolifération et de l'apoptose mais diminue aussi la migration cellulaire et la sécrétion de CCL3 et CCL4 par les cellules tumorales. Le fostamatinib (R718) est un inhibiteur de SYK utilisé *per os* sous la forme d'une prodrogue transformée en un composé actif. Il a été utilisé à la dose de 200 mg deux fois par jour avec une bonne tolérance en dehors d'une neutropénie, d'une thrombopénie et d'une diarrhée. Les premiers essais ont montré une chasse des lymphocytes ganglionnaires et médullaires dans le sang. Le développement de ce médicament a été poursuivi en rhumatologie mais pas dans la LLC. Des inhibiteurs de SYK de seconde génération sont en cours de développement, en particulier le PRT318 et le P505-15²¹⁹.

- *Cibler la sérine thréonine kinase mTOR*

La sérine/thréonine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) est impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et de la prolifération en agissant sur des protéines clés comme p27, RB, la cycline D1, cMyc ou STAT3. En se liant à mTOR, la rapamycine entraîne un arrêt ou un retard de la progression des cellules en phase S. L'évérolimus (RAD001) est un analogue de la rapamycine qui a été étudié dans la LLC en rechute ou réfractaire, avec une efficacité modeste (18 % de réponse partielle)²²⁰ mais il a été observé des réductions tumorales ganglionnaires et un phénomène de *flare*, faisant envisager une complémentarité avec d'autres drogues. Des inhibiteurs de mTOR de seconde génération sont en cours d'étude, en particulier le temsirolimus ou le déforolimus.

- *Cibler le microenvironnement*

Le lénalidomide est un immunomodulateur dont le mécanisme d'action précis reste obscur, même si on connaît ses effets anti-TNF, anti-angiogéniques et d'activation sur les cellules T et NK. Au début de son utilisation dans la LLC à des doses "habituelles" dans le contexte du MM ou des

myélodysplasies, une toxicité importante (syndromes de lyse tumorale avec insuffisance rénale, "tumor flare") a fait considérer la nécessité d'une escalade de dose²²¹.

Après des résultats très encourageants en situation de rechute, avec un taux de réponse globale à 47 %²²², plusieurs études de phase II ont été menées en première ligne en monothérapie, en débutant le lénalidomide à une posologie de 2,5 mg à 5 mg par jour, avec une escalade de dose progressive. La première série de 25 patients rapporte une durée médiane de traitement de 21 mois et un taux de réponse globale de 72 %, avec un délai médian de réponse de 7,7 mois^{223,224}. La seconde étude a concerné 60 patients âgés de 66 à 83 ans et rapporte 58 % de bons répondeurs définis par une réponse durable de plus de 36 mois, soulignant l'importance de prolonger le traitement, associée à une bonne tolérance dans cette population²²⁵.

Le lénalidomide a également été évalué dans la LLC en association avec d'une part le rituximab et d'autre part l'alemtuzumab. La combinaison lénalidomide-rituximab (LR) utilisée chez 59 patients de 42 à 82 ans présentant une LLC en rechute ou réfractaire a permis l'obtention d'une réponse globale de 66 % obtenue après 3 cycles en médiane (avec 12 % de RC obtenues plus tardivement après 12 cycles). La réponse n'est pas significativement différente, évaluée à 53 % dans le sous-groupe de patients avec del(17p), en comparaison aux patients sans del(17p). Les effets secondaires sont essentiellement hématologiques avec une neutropénie de grade 3-4 observée au moins une fois chez 73 % des patients²²⁶. L'association lénalidomide-alemtuzumab a été évaluée en situation de rechute ou de LLC réfractaire en phase I avec une bonne tolérance²²⁷, puis en phase II par l'analyse de 36 patients avec un suivi médian de 24 mois. Le taux de réponse était de 68 % dont 24 % de RC (55 % de RP chez les patients avec del(17p)) et la durée médiane de réponse de 22 mois. Les effets secondaires étaient essentiellement hématologiques (47 % de neutropénie de grade 3-4), associés à un phénomène de *flare* dans 24 % des cas²²⁸.

Parallèlement à son efficacité anti-tumorale, le lénalidomide présente l'intérêt de ne pas aggraver le déficit immunitaire, en raison de sa capacité à restaurer la synapse immunologique entre lymphocytes T et cellules de LLC, permettant une reconstitution partielle de l'immunité cellulaire²²⁹.

7. Stratégies actuelles de traitement

- *Critères d'instauration d'un traitement*

Traitement des formes évolutives

Les recommandations de traitement en France se sont longtemps essentiellement basées sur la seule classification de Binet et seuls les patients

En 2008 ont été publiées des recommandations internationales de prise en charge de la LLC¹²⁰, et les indications thérapeutiques ont intégré la notion de maladie évolutive tout en conservant les classifications anatomo-cliniques. Les patients nécessitant un traitement sont désormais les patients de stade A évolutif, de stade B progressif et de stade C (à l'exception de situations où les cytopénies sont modérées et stables). Les critères d'évolutivité sont présentés dans le tableau 6.

Critères d'évolutivité d'une LLC
Atteinte médullaire progressive avec développement ou aggravation d'une anémie et/ou d'une thrombopénie
Splénomégalie massive (de plus de 6 cm de débord costal ou d'aggravation progressive ou symptomatique)
Volumineuses adénopathies (de plus de 10 cm de grand axe, ou d'augmentation de taille progressive ou symptomatiques)
Lymphocytose progressive avec augmentation de plus de 50 % sur une période de 2 mois ou temps de doublement lymphocytaire de moins de 6 mois (le TDL ne doit pas être le seul critère si la lymphocytose est inférieure à 30 G/L)
Anémie et/ou thrombopénie auto-immune répondant de façon insuffisante aux corticoïdes ou aux autres traitements habituels
Présence de signes généraux (un ou plusieurs des symptômes suivants) <i>Perte de poids ≥ 10 % non volontaire dans les 6 mois précédents</i> <i>Asthénie significative (PS ≥ 2, incapacité à travailler ou à réaliser les activités habituelles)</i> <i>Fièvre ≥ 38° C depuis 2 semaines sans signe d'infection</i> <i>Sueurs nocturnes depuis plus d'un mois sans signe d'infection</i>

Tableau 6 : Critères d'évolutivité d'une LLC constituant une indication thérapeutique¹²⁰

Quid du traitement précoce des patients de stade A ?

L'expérience française de deux études randomisées (LLC-80 et LLC-85) ayant inclus 1535 patients de stade A dont la moitié ont été traités par Chlorambucil (en schéma quotidien ou en administration séquentielle associée à une corticothérapie) avait conclu en 1998 à l'absence de bénéfice en terme de survie globale d'un traitement précoce par rapport à un traitement différé au moment de la progression²³⁰.

Depuis, de nouveaux facteurs pronostiques biologiques ont permis de mieux définir les patients à risque de progression : des facteurs de prolifération (TDL, thymidine kinase sérique) et des caractéristiques de la cellule tumorale (statut des gènes *IGVH*, cytogénétique..). L'étude franco-allemande CLL7 dont les résultats ont été présentés à l'ASH en 2013²³¹ a isolé, sur 4 facteurs

pronostiques, 25 % de patients de stade A défavorable. Ces patients de haut risque ont bénéficié, après randomisation, soit d'une thérapeutique préemptive de type Fludarabine-Cyclophosphamide-Rituximab, soit d'une surveillance rapprochée. La survie sans événement est plus courte dans le bras surveillance.

L'arrivée de nouveaux médicaments au profil de tolérance intéressant rouvre le débat du traitement des stades A défavorables.

- *Traitement de première ligne en l'absence de del17p*

Le traitement de référence à l'heure actuelle reste une immunochimiothérapie associant Rituximab - Fludarabine - Cyclophosphamide (FCR). Une étude allemande de phase III (CLL10) confirme la supériorité du FCR à l'association Rituximab - Bendamustine en termes de RC, PFS et taux de MRD indétectable, même si cette dernière est moins toxique et peut donc constituer une alternative chez les sujets âgés un peu fragiles.

- *Traitement de première ligne si présence d'une del17p*

Avant l'obtention en 2014 de l'AMM en première ligne dans cette indication de l'Ibrutinib d'une part et de l'Idélalisib en association au Rituximab d'autre part, le traitement de référence était un anticorps monoclonal anti-CD52, le Mabcampath, disponible en ATU. L'efficacité et la bonne tolérance de l'ibrutinib et de l'idélalisib dans cette situation posent la question de la réalisation systématique d'une allogreffe de cellules souches périphériques une fois une réponse obtenue.

- *Traitement des rechutes*

Il est discuté au cas par cas, en fonction de l'âge et de l'état général du patient, et de la durée de la réponse au traitement de première ligne. En cas de réponse prolongée d'au moins 2 ans, la reprise de la même association est possible. Une immunochimiothérapie à base d'anticorps monoclonal anti-CD20 et de Bendamustine est classiquement utilisée en l'absence d'anomalie de *TP53*, mais tend à être supplantée par l'utilisation des inhibiteurs de signalisation du BCR et notamment actuellement hors essai clinique de l'Ibrutinib et de l'Idélalisib.

C. La maladie de Waldenström

La MW a été décrite en 1944 par Jan Waldenström qui rapportait les cas de deux patients présentant une épistaxis, une anémie, des adénopathies, une fibropénie et une hypergammaglobulinémie²³².

La MW est considérée comme un lymphome lymphoplasmocytaire (LPL) dans la classification OMS⁴ (en sachant que la plupart des LPL sont des MW) et se caractérise par une infiltration médullaire faite de cellules lymphoïdes avec une inflexion plasmocytaire associée à la production d'une Ig monoclonale sérique de type IgM²³³.

1. Epidémiologie

La MW est une maladie rare qui représente 2 % des hémopathies malignes et 6 % des néoplasies lymphoïdes à cellules B matures. Elle survient à un âge médian de 63 ans, avec une prédominance masculine. Rare dans les pays asiatiques (avec une incidence dix fois moindre au Japon) et en Afrique, son incidence a été estimée à 3,4 / 1 000 000 habitants chez l'homme et 1,7 chez la femme dans une étude américaine²³⁴. Cette incidence augmente avec l'âge, passant à 36,4 chez l'homme et 16,4 chez la femme après 75 ans²³⁵.

L'existence de formes familiales est connue depuis de nombreuses années²³⁶ et concerne environ 20 % des patients. Une étude américaine de 257 patients a mis en évidence, dans 18,7 % des cas, la présence chez les apparentés au premier degré d'une MW (5 % des cas), d'un LNH (3,5 %), d'un MM (3,1 %), d'une LLC (2,7 %) ou d'une MGUS (1,9 %)²³⁷. Plus récemment en Suède, l'analyse de 2144 patients porteurs d'une MW ou d'un LPL, a mis en évidence, chez les apparentés au premier degré, un sur-risque de développer une MW (x 20), une LLC (x 3,4), un LNH (x 3) ou une MGUS (x 5)²³⁸. La prévalence d'une IgM monoclonale, estimée entre 0,25 et 0,64 % dans la population générale, atteint entre 3,2 et 6,3 % dans les familles de patients avec une MW²³⁹. Il a également été rapporté la présence d'autres manifestations dysimmunitaires dans les familles de patients : hypogammaglobulinémie, hypergammaglobulinémie polyclonale, présence d'auto-anticorps notamment anti-thyroïdiens²⁴⁰.

Si l'étiologie reste inconnue, le plus grand risque de développer une MW est lié à l'existence d'une MGUS²⁴¹, avec un risque 46 fois supérieur, surtout s'il existe une del(6q). Une IgM monoclonale peut néanmoins être observée dans de nombreux SLP de type B et notamment la LLC ou le LZM. Une étude italienne portant sur 458 sujets a montré que devant une MGUS de type IgM asymptomatique ou une MGUS de type IgM symptomatique, la probabilité cumulative de développer une hémopathie (principalement une MW dans 91 % des cas) était respectivement de 8 et 29 %²⁴². Les critères distinguant MGUS et MW asymptomatiques et symptomatiques ont été précisés lors du deuxième workshop international sur la MW²³³.

2. Aspects cliniques

La présentation clinique de la MW est hétérogène et environ 30 % des patients présentent une forme indolente asymptomatique.

Les symptômes peuvent être premièrement **liés à l'infiltration tumorale** qui est systématiquement médullaire et fréquemment responsable de cytopénies, mais il peut s'y associer des adénopathies dans 10 à 20 % des cas, une hépatomégalie dans 20 % et une splénomégalie dans 15 % des cas ou plus rarement des infiltrats ou nodules pulmonaires ou épanchements pleuraux, des infiltrats du tube digestif, des atteintes oculaires, des infiltrats rénaux et des lésions ostéolytiques.

Les signes cliniques peuvent également être **liés à l'immunoglobuline monoclonale** uniquement. D'une part, **ses propriétés physico-chimiques** peuvent induire la fixation de molécules d'eau sur les résidus carbohydrates et un ralentissement de la circulation dans les microvaisseaux. Il en résulte une diminution de la déformabilité des globules rouges et leur empilement, responsables du syndrome d'hyperviscosité avec céphalées, épistaxis, hémorragies gastro-intestinales, troubles visuels. Il existe parfois une cryoglobuline de type I pouvant occasionner un syndrome de Raynaud. D'autre part, l'IgM peut avoir une **activité auto-immune** et être responsable d'anémie hémolytique auto-immune, de neuropathie périphérique de tableau variable en fonction de l'activité anticorps, de glomérulonéphrite ou de maladie des agglutinines froides due à une activité anticorps dirigée contre des IgG polyclonales avec activité facteur rhumatoïde donnant alors une cryoglobuline de type II. Certaines IgM de MW ont une activité dirigée contre des facteurs de la coagulation conduisant notamment à une hémophilie acquise ou un syndrome de Willebrand acquis. Enfin la **capacité de l'IgM à se déposer dans différents tissus** peut conduire au développement de neuropathies ou d'amylose.

Une incidence augmentée de seconds cancers est également à signaler, possiblement favorisée par les traitements utilisés dans cette pathologie.

3. Diagnostic

• *Diagnostic positif*

Les critères diagnostiques définis lors du deuxième workshop international sur la MW à Athènes en 2002²³³ sont les suivants :

- présence d'une IgM monoclonale sérique (quelle que soit sa concentration)
- présence d'une infiltration médullaire par des petits lymphocytes avec inflexion plasmocytaire et infiltration souvent diffuse à la biopsie médullaire

- immunophénotype des cellules tumorales : IgM+, CD5-/+, CD10-, CD19+, CD20+, CD22+, CD23-, CD25+, CD27+, FMC7+, CD103-, conduisant à un score de Matutes de 0 ou 1

Le taux de l'IgM monoclonale, qui doit être mesuré par électrophorèse (et non par le dosage pondéral par néphélométrie en raison d'un manque de sensibilité) n'entre pas dans les critères diagnostiques mais il est supérieur à 30 g/L chez un tiers des patients. La présence d'une cryoglobulinémie ou d'agglutinines froides pouvant modifier la quantification de l'IgM, il est important de les rechercher au diagnostic.

Le niveau d'infiltration médullaire est variable, décrit de 20 à 100 % des cellules médullaires, au sein desquelles il est fréquent d'observer des mastocytes qui favorisent la croissance tumorale⁹⁵.

• *Formes cliniques*

Il existe un continuum physiopathologique entre une IgM monoclonale asymptomatique et une MW symptomatique et le premier diagnostic différentiel d'une MW est donc représenté par une MGUS de type IgM. La définition précise des critères diagnostiques en 2002 à Athènes²³³ permet d'établir plus aisément le diagnostic différentiel.

Critères	MGUS de type IgM asymptomatique	MGUS de type IgM symptomatique	MW asymptomatique	MW symptomatique
IgM sérique	+	+	+	+
Infiltration médullaire	-	-	+	+
Symptômes liés à l'infiltration tumorale	-	-	-	+
Symptômes liés à l'IgM	-	+	-	+

Tableau 7 : Critères diagnostiques d'une MGUS et d'une MW²³³

Si la probabilité d'évolution d'une MGUS de type IgM vers une MW varie de 8 à 29 % selon s'il existe ou non des symptômes liés à l'IgM²⁴², les facteurs de risque de progression sont un taux élevé du composant monoclonal, le taux d'hémoglobine et le sexe masculin. Un score prédictif a été proposé pour évaluer le risque²⁴³. Trois groupes sont distingués selon ce score, avec une survie sans progression à 5 ans de 95 % pour le groupe de faible risque, 90 % pour le risque intermédiaire et seulement 50 % pour les MGUS de haut risque.

Critères	Score			
	0	1	2	3
IgM sérique (g/L)	< 7	7 ≤ IgM ≤ 13,9	14 ≤ IgM ≤ 20,9	≥ 21
Hb (g/dL)	≥ 15	13 < Hb < 14,9	11 ≤ Hb ≤ 12,9	< 11
Sexe	Féminin	/	/	Masculin

Tableau 8 : Score prédictif d'évolution d'une MGUS vers une MW permettant de distinguer 3 groupes : faible risque (0-2), risque intermédiaire (3-5), haut risque (6-9)²⁴³

• *Diagnostic différentiel*

L'association d'une IgM monoclonale et d'une infiltration lymphocytaire B médullaire n'est pas forcément synonyme de MW :

- une LLC peut comporter une IgM monoclonale, mais l'immunophénotypage permet de discriminer les deux entités (score de Matutes > 3 pour une LLC)

- un MM de type IgM est possible, même si ceci est très rare (< 0,2 % des gammopathies de type IgM)²⁴⁴, et son diagnostic repose sur une infiltration médullaire par des plasmocytes, CD20- et CD138+, avec fréquemment une translocation t(11;14)(q13;q32)^{245,246}, et éventuellement des lésions osseuses ostéolytiques

- un LNH, y compris de type LZM ganglionnaire, est facilement distingué par l'analyse histologique et un LZM de type MALT est généralement extra-ganglionnaire sans atteinte médullaire

- un LZM splénique, en revanche, peut être plus difficile à distinguer d'une MW²⁴⁷

La recherche de la mutation L265P de *MYD88* permet désormais d'envisager plus facilement la distinction entre MW, MM de type IgM²⁴⁸ et LLC avec IgM monoclonale, mais sa positivité dans la plupart des MGUS et certains LZM spléniques doit conduire à interpréter sa présence avec prudence²⁴⁹. Le diagnostic différentiel doit donc reposer sur un faisceau d'arguments morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires.

4. Cytogénétique et données moléculaires

Les analyses en cytogénétique conventionnelle permettent d'objectiver des anomalies chromosomiques dans à peine 30 % des cas de MW, en raison du faible indice mitotique de cette pathologie. L'utilisation dans les milieux de culture d'un oligonucléotide CpG associé à l'IL-2²⁵⁰ a amélioré l'informativité de la technique, un caryotype clonal étant obtenu près de 50 % des cas. Le caryotype est complexe dans environ 30 % des cas, l'analyse en CGH-array met en évidence un

nombre médian d'anomalies de nombre de 7. Les translocations sont présentes dans un tiers des cas, impliquant très rarement le locus des Ig.

L'anomalie la plus fréquente est la **délétion du bras long du chromosome 6**, de 31 à 54 % selon les études. Même si l'incidence de cette anomalie est plus élevée que dans les autres hémopathies lymphoïdes B, elle n'est pas spécifique (puisque'elle est mise en évidence dans 6 % des cas de LLC, dans 21 % des LNH de type MALT, et dans certains cas de MM)^{130,251,252}. Il existe 4 zones minimales de délétion sur les régions 6q16, 6q21 et 6q23-24.3 et 6q25-26. Les 2 principales régions contiennent un gène suppresseur de tumeur, *BLIMP-1* ou *PRDM1* en 6q21 et *A20* ou *TNFAIP3* en 6q23, qui pourraient être impliqués dans la physiopathologie^{253,254}. *BLIMP1* est un suppresseur de la prolifération cellulaire et un régulateur négatif de *PAX5*. L'inactivation de *A20* entraîne une activation constitutive de la voie NF-κB. La délétion 6q est associée à des facteurs pronostiques défavorables (caryotype complexe, hypoalbuminémie, β2-microglobuline élevée) mais il n'a pas été mis en évidence d'impact sur la survie²⁵⁵. Les études de CGH-array ont démontré que dans 17 % des cas, il existe un gain du 6p qui survient systématiquement après la perte en 6q, comme un évènement secondaire²⁵³.

Une **trisomie 4** est constatée dans 10 à 20 % des cas et semble être l'anomalie récurrente la plus spécifique car elle n'est notamment pas décrite dans les LZM. Cette trisomie est associée à un taux élevé d'IgM, de CRP et de β2 microglobuline. Elle jouerait un rôle dans la susceptibilité intrafamiliale de la MW, un déséquilibre de liaison ayant été décrit dans la région 4q33-q34²⁵⁶.

D'autres anomalies, classiquement décrites dans les LZM, les LLC ou les MM, peuvent également se rencontrer : trisomie 3, trisomie 18, délétion 7q ; délétion 11q22 impliquant *ATM* dans 8 % des cas, trisomie 12 dans 3 % des cas, délétion 17p impliquant *TP53* dans 5 à 10 % des cas ; délétion 13q14²⁵³. Dans ce dernier cas, la région minimale de délétion est comparable à celle des LLC et des LZM spléniques mais différente de celle du MM ; elle contient 2 micro-ARN, miR-15a et miR-16-1, qui régulent négativement *BCL-2*⁶⁹.

Un réarrangement VDJ pour la chaîne lourde des Ig est détecté dans 90 % des cas de MW dans 5 séries comprenant 7 à 52 cas. Les gènes *IGVH* sont le plus souvent mutés avec des taux généralement supérieurs à 5 %²⁵⁷, mais il a été mis en évidence 4 % de MW à gènes *IGVH* non mutés^{258,259}, avec surreprésentation de la famille *IGHV3* et notamment *IGHV3-23*. Bien que la région *switch* de l'IgH soit fonctionnelle, les cellules sont de type IgM et n'ont pas subi la commutation isotypique^{25,260}.

C'est l'équipe de Steven Treon qui a décrit en premier, en 2012, grâce à une étude de séquençage d'exome, une mutation récurrente dans cette maladie, la **mutation L265P du gène MYD88**⁵⁰. MYD88 est une protéine adaptatrice qui intervient en amont de la voie de signalisation de NF-κB, capable de coupler les protéines à motif TIR (*Toll-Interleukin-1 Receptor*), comme les TLR, à toute une variété de voies de signalisation cellulaire comme les voies NF-κB, IP38-MAPkinase ou de l'IFN de type I²⁶¹. Sollicitée dès la fixation d'un ligand sur un TLR, MYD88 assure la phosphorylation et l'activation des IRAK, protéines suivantes dans la cascade de signalisation pour activer *in fine* NF-κB. Les mutations de

MYD88 sont activatrices conférant un avantage de prolifération par activation continue des protéines IRAK. La protéine comporte 3 domaines mais les mutations sont localisées dans le domaine TIR uniquement. La mutation L265P est prédominante en termes de fréquence et concerne un acide aminé particulièrement conservé dans l'évolution, situé dans un feuillet bêta du noyau hydrophobique du domaine TIR, région importante pour la fixation aux protéines²⁶². Présente dans 29 % des LBDGC de type ABC, 9 % des lymphomes du MALT, 13 % des LZM spléniques, elle n'est donc pas spécifique de la MW mais permet dans un grand nombre de cas de réaliser un diagnostic différentiel²⁶³.

5. Un diagnostic différentiel particulier : le LZM splénique

Le LZM splénique est un lymphome B à petites cellules décrit dès 1992, individualisé en 1994 comme entité provisoire dans la classification REAL⁵ avant d'être définitivement admis dans les classifications OMS⁴. Des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension de la physiopathologie des LZM de type MALT, modèle de transformation déclenchée par une stimulation antigénique chronique, mais les LZM spléniques restent de description incomplète, sans marqueur spécifique identifié et d'étude difficile en l'absence de lignée cellulaire ou de modèle animal. Ce lymphome pose régulièrement la question du diagnostic différentiel avec d'autres lymphomes B à petites cellules et avec la MW dans les formes à forte inflexion plasmocytaire.

Il s'agit d'un lymphome peu fréquent (moins de 1 % de l'ensemble des lymphomes), survenant à un âge médian de 59 à 69 ans, sans prédominance de sexe^{264,265}. Une association au virus de l'hépatite C a été décrite essentiellement en Italie du Nord. La présentation clinique se fait fréquemment devant une splénomégalie isolée, et un envahissement sanguin souvent modéré. Des cytopénies (anémie, thrombopénie), liées à l'hypersplénisme et/ou l'envahissement médullaire, souvent modérées, ou plus rarement des complications auto-immunes peuvent être révélatrices. Un composant monoclonal sérique de type IgM le plus souvent est présent dans plus d'un tiers des cas.

Le diagnostic peut être évoqué devant l'aspect cytologique des lymphocytes circulants qui sont des cellules lymphoïdes à noyau irrégulier encoché et chromatine dense peu mottée, comportant de fines villosités. Il peut exister des cellules lympho-plasmocytoïdes. Le diagnostic doit être confirmé par la réalisation d'une biospsie ostéo-médullaire.

En histologie, l'infiltration médullaire est généralement modérée, interstitielle et/ou nodulaire. L'immunohistochimie met en évidence un marquage CD20 et Bcl2, mais c'est la négativité des marquages Cycline-D1, CD10 et Bcl6 qui aide au diagnostic différentiel. Les cellules expriment parfois CD5 et/ou CD43 mais sont classiquement CD23 négatives²⁶⁶. L'immunophénotypage par CMF met en évidence une population B monotypique exprimant le plus souvent IgM+ ou IgM+/IgD+, parfois IgG+ ou IgD+, avec une positivité pour CD20, CD22, CD24, CD27, FMC7, CD79b fort, et une expression absente ou faible de CD11c, CD23, CD103, CD25, CD5, CD76, concluant à un score de Matutes entre 0

et 2. L'histologie splénique, lorsqu'elle est disponible, est caractéristique avec infiltration de la pulpe blanche qui présente une zone marginale élargie et envahissement nodulaire de la pulpe rouge. Une architecture diffuse doit faire évoquer un lymphome de la pulpe rouge splénique.

Le LZM splénique présente un profil cytogénétique et moléculaire particulier²⁶⁷, avec des anomalies moléculaires récurrentes. Des anomalies clonales sont décrites dans 70 à 80 % des cas, les anomalies les plus fréquentes étant les délétions 7q, 6q et 8p et les trisomies 3, 12, 18 -complètes ou partielles²⁶⁸. La délétion (8p) est fréquemment associée à une délétion de *TP53*, la combinaison des deux étant de mauvais pronostic²⁶⁹.

Des études de profil d'expression génique et de séquençage haut débit ont mis en évidence en 2012 des mutations récurrentes de *NOTCH2* dans le LZM splénique^{270,271}, impliquées dans la pathogénie et la progression lymphomateuse, et par ailleurs associées à un mauvais pronostic. La mise en évidence de cette mutation peut désormais participer au diagnostic différentiel.

6. Facteurs pronostiques

La médiane de survie varie de 5 à 10 ans selon les études. Les principaux facteurs pronostiques mis en évidence sont l'âge (seuil entre 60 et 70 ans), la diminution du taux de l'Hb et l'augmentation de celui de la β 2-microglobuline (chez 50 % des patients). Plusieurs études ont établi des scores pronostiques prédisant la survie globale, incluant des paramètres tels l'âge, l'anémie, le nombre de cytopénies, l'albuminémie, le taux d'IgM, le taux de β 2-microglobuline²⁷². Le score pronostique international IPSS (*International Prognostic Score System*) publié par Pierre Morel *et al*²⁷³, est présenté dans le tableau 9. Ce score n'intègre pas les données de la cytogénétiques ni le dosage des chaînes légères libres sériques, qui a démontré un impact pronostique sur la survie sans traitement²⁷⁴.

	Faible risque	Risque intermédiaire	Haut risque
Age > 65 ans	-	+	> 2 facteurs
Hb < 11,5 g/dL	≤ 1 facteur	2 facteurs	
Plaquettes < 100 G/L			
β 2m > 3 mg/L			
IgM > 70 g/L			
% de patients	27 %	38 %	35 %
Survie à 5 ans	87 %	68 %	36 %

Tableau 9 : Score pronostique international de la MW (IPSS)

7. Stratégies thérapeutiques

Seuls les patients MW symptomatiques relèvent d'un traitement anti-tumoral. Le traitement de première ligne peut utiliser des agents alkylants (chloraminophène, cyclophosphamide), des analogues nucléosidiques ou dérivés (fludarabine, bendamustine), des inhibiteurs du protéasome (bortezomib) ou des anticorps monoclonaux (rituximab), seul ou en combinaison^{275,276}.

La découverte de la mutation récurrente L252P de *MYD88* activant la voie NF-κB à travers BTK, a conduit à envisager des thérapeutiques ciblées. L'ibrutinib a par conséquent logiquement été évalué dans cette pathologie, avec d'abord d'excellents résultats en rechute, en l'absence de mutation activatrice de *CXCR4*²⁷⁷. Cette drogue vient d'être approuvée par les autorités dans le traitement de la MW.

II. Stratégies générales en protéomique

Une protéine est une macromolécule, formée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés, qui résulte de la traduction d'un ARN messager lui-même issu de la transcription de l'ADN. La synthèse d'une protéine résulte donc directement de l'information génétique fournie par l'organisme. La structure d'une protéine influe sur sa fonction, qui peut concerner des phénomènes biologiques tels que la catalyse, le transport, la communication, la signalisation ou encore la reconnaissance. D'autre part, l'état physiologique des cellules et des tissus conditionne le type de protéines exprimées, leur abondance, leur état de modification post-transcriptionnelle.

Le terme "protéome" a été introduit pour la première fois en 1994 lors d'une conférence en Italie par Marc Wilkins²⁷⁸ et définit l'ensemble des protéines présentes dans un milieu biologique, à un instant donné, et dans un environnement donné. La taille estimée du protéome, de l'ordre de 300 000 protéines, est plus importante que celle du génome, en raison des variations de la maturation des ARNm et des modifications post-traductionnelles des protéines (phosphorylations, glycosylations, amidations, ubiquitylations). Le protéome est de nature dynamique à la différence du génome qui reste constant dans les cellules d'un organisme à l'exception des lymphocytes. Le protéome varie suivant le type cellulaire, l'activité cellulaire ou le microenvironnement.

Il est désormais reconnu que le terme "protéomique", dont la définition a été longuement discutée, correspond à "l'étude de l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule incluant leurs isoformes, les modifications qu'elles peuvent subir, leurs interactions avec d'autres protéines, leur description structurale et les complexes qu'elles peuvent former ; donc de ce fait tout ce qui est post-génomique"²⁷⁹.

L'étude du protéome, tant au niveau quantitatif que qualitatif, est complémentaire de celle du transcriptome. Il s'agit en effet d'approches concernant des entités moléculaires, les protéines et les ARNm, certes liées dans le fonctionnement cellulaire, mais possédant des propriétés physico-chimiques totalement différentes, des durées de vie non corrélées et jouant des rôles physiologiques tout à fait distincts²⁸⁰. L'analyse protéomique permet une description dynamique de la régulation de l'expression génique grâce à l'étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles. Les protéines peuvent être considérées comme des effecteurs fonctionnels des gènes. En effet, si le séquençage du génome humain est aujourd'hui achevé, sa connaissance ne permet pas d'accéder à la complexité du fonctionnement cellulaire. Un même génome conduit à l'expression de plusieurs protéomes en fonction des étapes du cycle cellulaire, de l'état physiopathologique de la cellule, de sa localisation ou des conditions environnementales, et les protéines peuvent faire l'objet de modifications qui ne sont pas identifiables à partir de la seule séquence de leur gène.

L'analyse protéomique, au carrefour de la biologie et de la chimie, repose sur un ensemble de méthodologies : des techniques séparatives (électrophorèse, chromatographie), des techniques d'identification reposant sur la spectrométrie de masse ou l'immunologie et des outils bio-informatiques incluant bases de données et logiciels de traitement.

A. Les techniques d'identification : l'apport de la spectrométrie de masse

En biologie, la première information requise pour l'étude des protéines est la connaissance de la séquence primaire (enchaînement d'acides aminés). Depuis les années 1950, la méthode de choix pour accéder à cette information était le séquençage par dégradation d'Edman²⁸¹. Cette méthode, qui reposait sur l'identification des acides aminés coupés chimiquement de façon séquentielle à partir de l'acide aminé N-terminal de la protéine, nécessitait de disposer de la protéine purifiée en quantité non négligeable. La spectrométrie de masse a progressivement supplanté depuis les années 1990 la dégradation d'Edman et constitue désormais la méthode de choix pour la caractérisation des biomolécules²⁸².

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse basée sur la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse / charge (m/z). Un spectromètre de masse est constitué de plusieurs parties :

- une source d'ionisation, qui permet de volatiliser et d'ioniser les molécules (génération d'ions en phase gazeuse)
- un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse / charge (m/z)
- un détecteur qui convertit un courant ionique en courant électrique.

Le succès de la spectrométrie de masse en biologie repose sur la mise au point par John Fenn et Koichi Tanaka notamment, devenus prix Nobel de chimie en 2002, de nouvelles techniques d'ionisation douce, l'ionisation Electrospray (ESI)²⁸³ et le MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)²⁸⁴, qui ont rendu possible le transfert de molécules intactes en phase gazeuse.

La technique d'ionisation MALDI consiste à irradier, sous vide (aux alentours de 10^{-7} mbar), avec un faisceau laser pulsé, un dépôt cristallin contenant un mélange de matrice organique et d'échantillon à analyser. Le faisceau laser excite la matrice qui se dissocie, se sublime et entraîne l'analyte dans un plasma d'expansion, au niveau duquel se produit l'ionisation des molécules par transfert de protons. Les ions ainsi produits (généralement mono-chargés, générant des spectres de masse relativement simples) sont accélérés par une différence de potentiel jusqu'à l'analyseur choisi. Cette technique a l'avantage d'être relativement tolérante aux sels, contrairement à la source Electrospray.

Le mode d'ionisation électrospray permet de générer des ions en phase gazeuse à pression atmosphérique et sous l'effet d'un fort champ électrique obtenu en appliquant une différence de potentiel d'environ 5 000 V entre un capillaire et une contre-électrode. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, formant des gouttelettes hautement chargées.

Un analyseur sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Les analyseurs à haute résolution permettent de mesurer la masse exacte et peuvent être de type secteur magnétique couplé à un secteur électrique, de type temps de vol (*Time of Flight*, TOF) ou de résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier. Les analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) : un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions et un second analyseur sépare les ions fragments.

Le détecteur transforme les ions en en signal électrique : plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

Le système TOF est souvent combiné avec une source MALDI parce qu'il est extrêmement bien adapté pour analyser les ions générés par l'impulsion du faisceau laser. Le temps nécessaire à chaque ion pour atteindre le détecteur est mesuré.

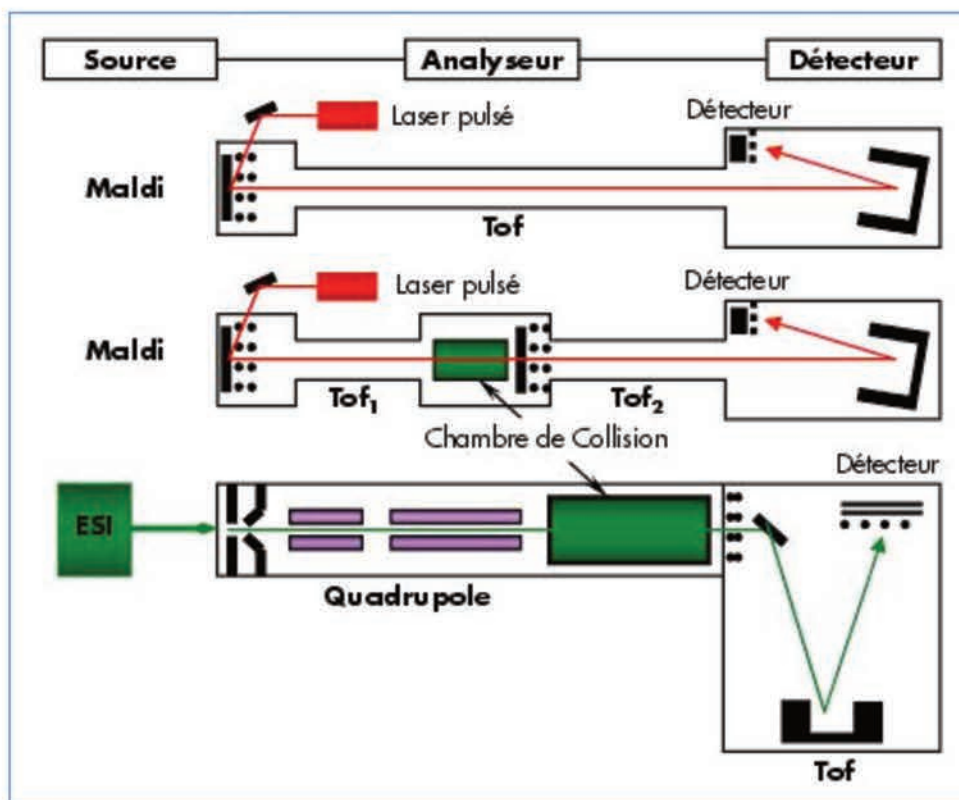


Figure 12 : Représentation schématique de différents spectromètres de masse : MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, ESI-TOF

B. Les techniques séparatives

Deux techniques principales permettent de séparer les protéines d'un échantillon donné.

La chromatographie bidimensionnelle résulte du couplage de deux séparations chromatographiques de nature différente dans le but de séparer des mélanges complexes : une chromatofocalisation est tout d'abord réalisée, permettant une élution progressive des protéines selon leur pHi ; puis les protéines récupérées de la première dimension sont injectées dans la colonne pour subir une chromatographie HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) en phase inverse, où l'élution se fait en fonction de l'hydrophobicité.

La technique d'électrophorèse bidimensionnelle (E2D) a été développée par O'Farell en 1975²⁸⁵. Elle consiste en deux séparations protéiques successives sur gel de polyacrylamide : la première est une **isoélectrofocalisation** (IEF) en conditions dénaturantes, réalisée sur une bandelette d'acrylamide (strip), sur laquelle les protéines se focalisent selon leur point isoélectrique ($pI = pH$ pour lequel la charge de la protéine est nulle) ; la seconde migration est une **SDS-PAGE classique** où les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire.

Le fait d'associer IEF et SDS-PAGE permet de travailler avec deux critères de séparation différents et de combiner l'importante résolution de ces deux systèmes (Figure 13).

Le principe de la séparation IEF, qui se fait sur un plan horizontal, est le suivant : sous l'effet d'un champ électrique, les protéines migrent dans une strip, où est immobilisé un gradient de pH ; lorsque le pH pour lequel leur charge devient nulle (pI) est atteint, elles s'immobilisent.

Après cette première migration, est réalisée une équilibration des strips, étape qui conduit à ioniser les protéines par complexation avec le SDS (ce qui leur confère une charge négative permettant la seconde migration), de réaliser une réduction par du DTT et une alkylation des groupements thiols pour éviter une réoxydation des protéines et minimiser les traces verticales sur les gels.

La seconde migration est une SDS-PAGE classique : les protéines sont séparées, selon le plan vertical, selon la masse moléculaire au sein d'un gel de polyacrylamide à 10 %. La séparation est fondée sur le ralentissement des polypeptides par la maille de la matrice de polyacrylamide (migration d'autant plus rapide que la masse moléculaire est faible).

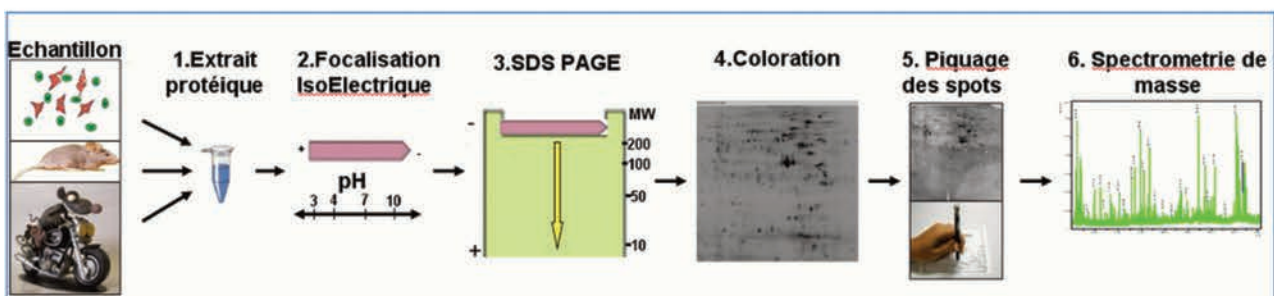


Figure 13 : Principales étapes de la technique d'E2D-MS

C. Les progrès de la technologie E2D-MS

La technologie E2D-MS (électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse) est à ce jour une des techniques les plus résolutive permettant la séparation et l'analyse simultanée de plusieurs centaines de protéines à partir d'un échantillon biologique, même si elle est assez mal adaptée à la séparation des protéines de haut poids moléculaire, des petits peptides, des protéines hydrophobes ou basiques (gênant notamment l'étude des protéines membranaires²⁸⁶). Les différentes étapes de cette technologie sont illustrées dans la figure 14.

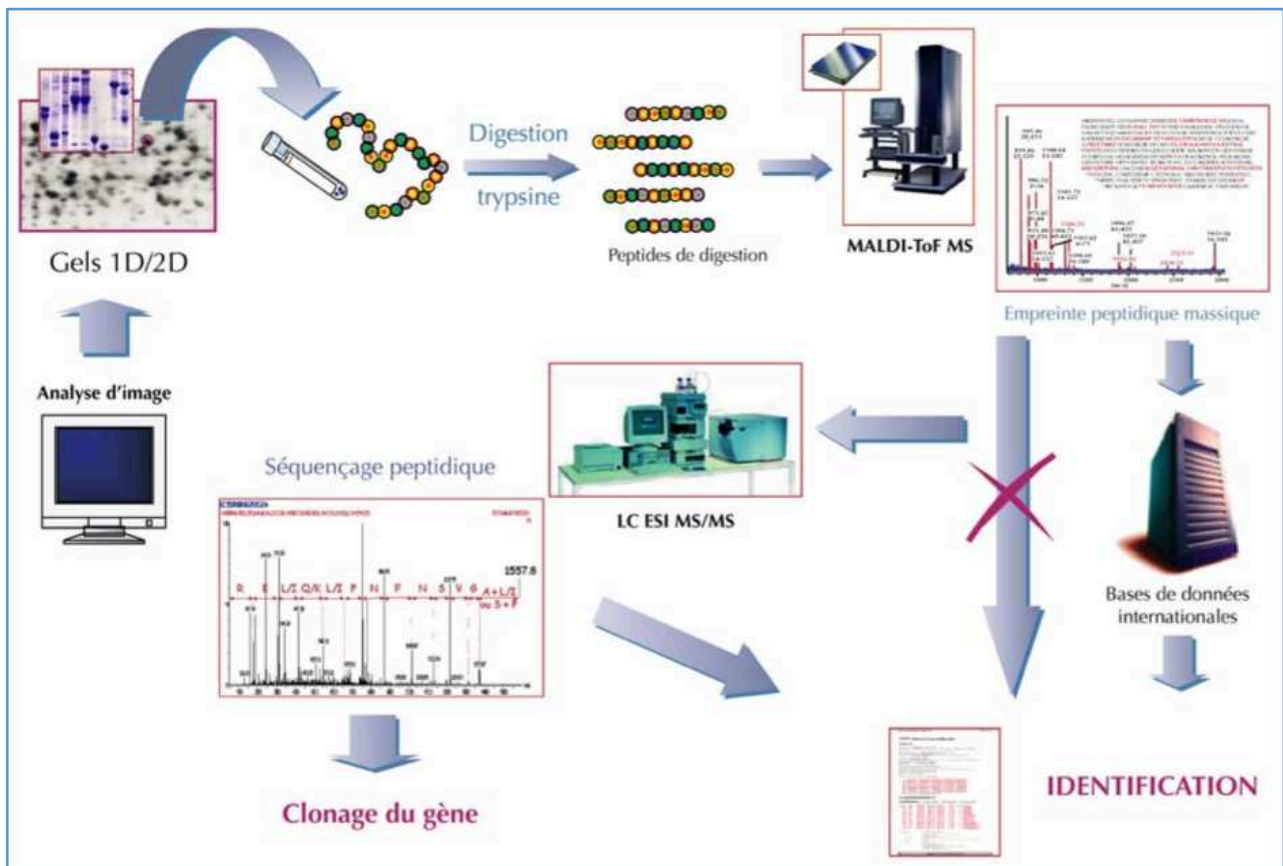


Figure 14 : Les différentes étapes nécessaires à l'identification de protéines issues d'un échantillon par technologie E2D-MS

Les méthodes de coloration classiques (par exemple, bleu de coomassie, nitrate d'argent...) permettant de révéler les protéines sur gel sont peu linéaires et ne permettent pas d'atteindre une quantification fiable – même relative – des protéines fractionnées. En revanche, les techniques de coloration en fluorescence qui présentent trois ordres de grandeur de linéarité du signal, peuvent être utilisées en quantification.

La technologie E2D-DIGE, développée par la société GE Healthcare, est basée sur le marquage des protéines d'échantillons à comparer, par des cyanines fluorescentes spécifiques (CyDyes -2, -3 and -5)²⁸⁷ préalablement à leur fractionnement (Figure 15).

Les échantillons à comparer sont ensuite mélangés en quantités égales et co-séparés sur un seul et unique gel d'électrophorèse bidimensionnelle haute résolution. Ce gel est ensuite analysé sur un scanner moléculaire (Typhoon 9410) grâce au logiciel DeCyder™ dans le but d'identifier et de quantifier l'expression des protéines différentiellement exprimées entre les échantillons d'intérêt. Les protéines peuvent être directement identifiées par spectrométrie de masse à partir du gel fluorescent ou à partir d'un gel similaire coloré par une technique conventionnelle²⁸⁸.

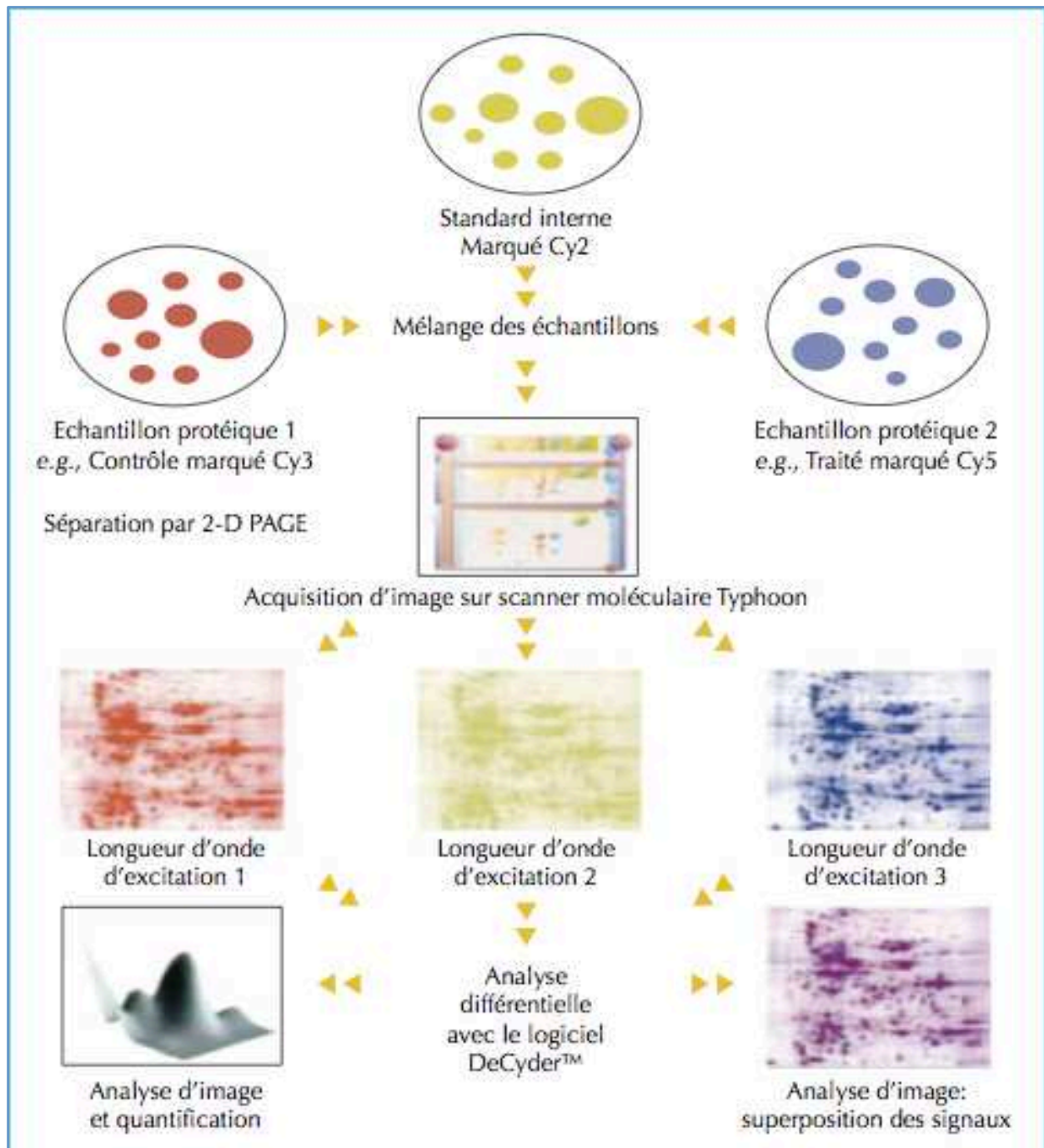


Figure 15 : Principe de la technologie E2D-DIGE

L'intérêt de l'E2D-DIGE par rapport à l'E2D classique réside d'une part en l'utilisation de ces cyanines fluorescentes pour marquer les extraits protéiques et d'autre part en l'utilisation d'un standard interne ("pool") permettant une normalisation des images.

- Le marquage des extraits protéiques par des cyanines fluorescentes permet premièrement de faire co-migrer sur un même gel deux échantillons à comparer, et diminuer ainsi la variabilité expérimentale liée à des différences de migration. Mais le principal intérêt de ces cyanines réside en un marquage quantitatif, la quantité de fluorescence émise étant proportionnelle à la quantité de protéine marquée. Ceci permet de réaliser des études comparatives quantitatives et non plus semi-quantitatives comme avec la coloration argentique.

- Le standard interne est un extrait protéique constitué du mélange à parts égales des échantillons protéiques de toutes les conditions étudiées. Chaque gel contient ce "pool" marqué par la cyanine 2. La comparaison entre plusieurs gels est plus aisée et la variabilité expérimentale à l'intérieur d'un même gel et surtout entre les gels diminue, puisque l'image cyanine 2 sert de référence et permet un alignement entre deux gels qui n'auraient pas migré exactement de la même façon.

III. Génomique et protéomique des néoplasies lymphoïdes B

A. Génomique et protéomique de la LLC

- *Génomique de la LLC*

L'histoire de l'étude de la génomique de la LLC débute en 2001 par la publication concomitante des résultats de deux équipes : celle de Louis Staudt¹⁹ et celle de Riccardo Dalla-Favera¹⁸. Ces études de profil d'expression génique objectivent un profil homogène des échantillons de LLC, quel que soit leur statut mutationnel, suggérant l'existence d'un précurseur cellulaire commun^{18,19}. Ces analyses révèlent également que ce profil d'expression est proche de celui de cellules B ayant expérimenté l'antigène, ce qui inclut les cellules B mémoires classiques et les cellules B de la zone marginale, qui peuvent être somatiquement mutées ou non. Un nombre assez restreint de gènes permet de différencier les deux sous-types de LLC à gènes *IGVH* mutés ou non mutés. Ces gènes sont impliqués dans l'activation cellulaire B, via la voie du BCR, et sont sur-exprimés dans les LLC à gènes *IGVH* non mutés. Ces résultats ont renforcé l'hypothèse de l'importance de l'activation du BCR dans la physiopathogénie de la LLC.

Une étude transcriptomique dynamique de la réponse à la stimulation du BCR a été réalisée sur des cellules de LLC et sur des cellules B normales⁶⁴. Les résultats mettent en évidence une expression génique commune aux cellules B normales et aux cellules de LLC aux temps précoces après stimulation du BCR. En revanche, les temps tardifs permettent de visualiser l'existence d'un programme génique spécifique des cellules à gènes *IGVH* non mutés. Les gènes différentiellement modulés sont impliqués dans la régulation de la prolifération et de la mort cellulaire : surexpression de *MYC* et *NFkB1* aux temps tardifs, expressions différentielles de *DUSP1* (impliqué dans la régulation du cycle cellulaire), de *RAN* (membre de la famille de Ras) et de *YWHAQ* (membre de la famille 14-3-3).

- *Protéomique de la LLC*

La première étude protéomique de cellules de LLC a été publiée en 1976 et consistait en un marquage de glycoprotéines de surface de lymphocytes B et T normaux, ainsi que de cellules de LLC, suivi d'une séparation par électrophorèse unidimensionnelle et visualisation par autoradiographie²⁸⁹. Les résultats mettaient en évidence des profils différents d'une part entre les lymphocytes B et T normaux et d'autre part entre les lymphocytes B sains et les cellules de LLC.

En 1983 et 1984 étaient réalisées les deux premières études protéomiques en E2D sur des mini-gels avec révélation respectivement par coloration au bleu de Coomassie²⁹⁰ et par autoradiographie²⁹¹. La première de ces deux études a comparé des profils protéiques de lymphocytes normaux, de lignées et de différentes leucémies, objectivant des cartes protéiques très proches entre des cellules de LLC et de leucémie à tricholeucocytes. La seconde étude a analysé l'expression protéique de cellules de 20 patients porteurs d'une LLC, mettant en évidence la présence dans les extraits membranaires de protéines telles la β 2-microglobuline, une IgM de surface, des molécules HLA.

En 1990, une équipe britannique a observé, grâce à une technique de chromatographie en phase liquide, une variation de protéines de surface (notamment CD45 et CD21) permettant de différencier deux profils protéiques de LLC²⁹². En 1993, une analyse par E2D de profils de protéines marquées au ¹⁴C issues de 10 patients porteurs d'une LLC démontrait une corrélation entre le niveau d'expression de certaines protéines et le stade de la maladie²⁹³.

Après les progrès réalisés dans l'établissement de facteurs pronostiques durant la dernière décennie, les études protéomiques se sont attachées à comparer différents groupes de patients en fonction de facteurs pronostiques définis. Cette approche, à la recherche de biomarqueurs de l'agressivité d'une maladie, est actuellement complétée par une analyse fonctionnelle, afin d'explorer les interactions protéines-protéines et les réseaux de signalisation cellulaire gouvernant le phénotype des cellules leucémiques.

Une étude du protéome de cellules de LLC a été menée en Autriche en 2001, utilisant une approche d'E2D avec révélation par coloration argentique²⁹⁴. La corrélation entre les caractéristiques cytogénétiques de 24 patients séparés en trois groupes (délétion (11q), délétion (13q) et délétion (17p)) et leurs profils protéiques a mis en évidence 36 spots polypeptidiques différenciellement exprimés, dont 25 permettaient de distinguer les trois groupes. Les protéines ensuite identifiées par spectrométrie de masse correspondaient à des enzymes impliquées dans les mécanismes d'oxydoréduction (glutathion S-transférase, protéine disulfite isomérase, thiorédoxine peroxydase) ainsi qu'HSP27, une protéine de choc thermique.

En 2003 ont été rapportés les résultats d'une étude réalisée au Royaume-Uni par E2D, utilisant des gels de 18 cm avec un gradient de pI de 4 à 7, sur les cellules de 12 patients porteurs d'une LLC, séparés en 2 groupes : 6 patients avec IGVH non mutés (UM) et 6 patients avec IGVH mutés (M)²⁹⁵. Trois protéines sont observées surexprimées chez les patients IGVH M par rapport aux IGVH UM : il s'agit de protéines intervenant dans l'organisation du cytosquelette, telles la sous-unité β de la protéine liant l'actine F ou le précurseur de la protéine fixant la laminine, ainsi qu'une protéine ubiquitaire intervenant dans la régulation de la prolifération, de l'apoptose et de la régulation

transcriptionnelle, la protéine 14-3-3 β . D'autre part, la nucléophosmine NPM1 (phosphoprotéine nucléolaire dont une des fonctions est de réguler la transcription) est identifiée sous plusieurs formes suite à des modifications post-traductionnelles dans les cellules des patients IGVH M, alors qu'elle n'est pas détectée dans les cellules IGVH UM.

Enfin, l'équipe italienne de Paolo Ghia et Federico Caligaris-Capio a étudié en E2D les profils protéiques de cellules d'une population de 18 patients porteurs de LLC avec statuts IGVH et CD38 concordants (avec élargissement secondairement de la cohorte à 40 patients). Ils ont mis en évidence une augmentation de la forme phosphorylée de la protéine HCLS1 ou HS1 dans les formes les plus agressives de LLC²⁹⁶, entraînant un renforcement de la signalisation en aval du BCR.

B. Génomique et protéomique de la MW

Les analyses de profils d'expression génique ont mis en évidence une signature moléculaire qui caractérise la MW par rapport à la LLC et au MM, le profil d'expression étant plus proche de celui de la LLC que celui du MM²⁹⁷. Il existe dans les échantillons de MW une hyperexpression de l'IL-6 et de sa voie de signalisation. Une autre étude transcriptomique a comparé des lymphocytes B et des plasmocytes issus d'échantillons de MW à des lymphocytes B et plasmocytes normaux²⁹⁸. Parmi les gènes différentiellement exprimés, on note des gènes impliqués dans la différenciation B et l'oncogénèse. En plus de la confirmation d'une hyperexpression de l'IL-6, une hyperexpression de gènes de la différenciation B (*PAX5*, *SYK*) est mise en évidence. D'autres gènes en revanche sont sous-exprimés dans la MW, tels *IRF4*, *BACH2* et *BLIMP1*.

L'équipe d'Irène Ghobrial a publié en 2007 une étude protéomique utilisant une technique de puces à protéines comparant des cellules de MW et des cellules médullaires normales²⁹⁹. Les protéines les plus surexprimées sont des familles Ras, Rho ainsi que des *cycline-dependent kinases*, des régulateurs de l'apoptose, et des histone déacétylases. Par ailleurs, le niveau d'expression de la protéine HSP90 différencie les formes asymptomatiques des formes symptomatiques.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'apport potentiel d'une approche protéomique utilisant une technologie d'électrophorèse bidimensionnelle de type DIGE pour étudier les mécanismes d'activation de néoplasies lymphoïdes B, et en particulier de la LLC et de la MW.

L'E2D-DIGE a déjà été utilisée pour étudier le protéome de cellules B, mais uniquement sur des lignées cellulaires. Une équipe japonaise a publié en 2006 les résultats d'une analyse de profils protéiques par E2D-DIGE de 42 lignées cellulaires différentes issues d'hémopathies lymphoïdes³⁰⁰. Au sein des 19 lignées cellulaires B étudiées, 5 protéines ont été identifiées permettant une distinction avec les néoplasies de cellules T (γ -enolase, chaîne α 4 de la tropomyosine, vimentine, facteur initiant la traduction eIF6, galectine-1) et 7 protéines pouvant séparer les hémopathies B et NK, notamment la L-plastine, la vimentine, la galectine-1. En 2007, une étude australienne s'est intéressée aux protéines cytosoliques différenciellement exprimées dans des lignées de leucémies et lymphomes, et notamment la lignée de LLC B kappa MEC-1³⁰¹. Une étude en 2D-DIGE utilisant des strips de 17 cm et un gradient de pI entre 3 et 10, a permis de mettre en évidence 6 protéines dont les variations d'expression sont spécifiques de cette lignée, dont la γ -enolase, la stathmine, la transgeline 2 et la tubuline. Puisque la technologie DIGE permet des comparaisons quantitatives multiples et des études cinétiques, il a naturellement été envisagé d'étudier le protéome après stimulation cellulaire. Une équipe finlandaise a analysé en 2006 le protéome de lignées B Ramos à 8 points de cinétique sur 5 jours après stimulation du BCR, comparativement au protéome de cellules non stimulées³⁰². La mise en évidence de 100 spots polypeptidiques différenciellement exprimés après stimulation a conduit à l'identification en spectrométrie de masse de 48 protéines dont les principales fonctions concernent le réarrangement du cytosquelette et la signalisation intra-cellulaire en aval du BCR.

La première partie de ce travail est une analyse protéomique de la réponse à la stimulation du BCR de cellules de LLC de profil indolent (à gènes *IGVH* mutés) ou agressif (à gènes *IGVH* non mutés). Nous nous sommes intéressés aux différences d'expression en dehors de toute stimulation entre les 2 sous-types de LLC, ainsi qu'aux variations d'expression après stimulation pour chaque sous-type. Certaines protéines différenciellement exprimées ont pu être étudiées de façon plus approfondie.

La seconde partie de ce rapport présente une étude du profil protéomique de cellules de MW, en comparaison à d'autres hémopathies lymphoïdes B telles le LZM et la LLC. La mise en évidence de protéines d'expression différentielle dans la MW a conduit à débiter des analyses spécifiques dans l'objectif de comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces différences d'expression.

Ces deux études ont été réalisées dans deux unités de recherche différentes :

- la première phase de chaque étude (analyse en E2D-DIGE, identifications protéiques et analyse bioinformatique) a eu lieu en 2008-2009 dans l'unité U543 du Pr Patrice Debré à la Pitié-Salpêtrière, et plus particulièrement sur la plateforme P3S (Protéomique, Post-génomique de la Pitié-Salpêtrière) dont la partie protéomique est dirigée par Cédric Pionneau

- la seconde phase de validation sur d'autres cohortes de patients, comportant les analyses par Western-Blot et PCR quantitative, a été réalisée dans l'unité de recherche du Pr Seiamak Bahram au CHU de Strasbourg en 2010-2011.

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

A. Sélection et prélèvements des cellules des patients

Cette étude a été réalisée sur des cellules primaires. Les patients, suivis dans le service d'Hématologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière pour la première partie du travail (analyse protéomique utilisant la technologie E2D-DIGE) et dans les services d'Hématologie des CHU de Nancy et Strasbourg pour la seconde partie (validations des niveaux d'expression de certaines protéines), ont été inclus après recueil de leur consentement éclairé signé. La sélection s'est faite sur des critères cliniques (LLC de stade A initial de Binet, MW/LZM ou LCM non précédemment traités) et biologiques : analyses cytogénétiques et autres facteurs pronostiques permettant de distinguer le groupe des LLC dites UM (association de gènes *IGVH* non mutés, ZAP-70 positif, CD38 positif, TDL court) de celui des LLC dites M (gènes *IGVH* mutés, ZAP-70 négatif, CD38 négatif, TDL important).

Dix-neuf patients ont été retenus pour la première étude concernant la LLC. Vingt-six patients ont été inclus dans la seconde étude concernant la MW (10 patients porteurs d'une MW, 4 d'un LZM, 10 d'une LLC et 2 d'un LCM).

B. Réactifs utilisés

Tous les réactifs utilisés sont listés dans le tableau 10.

Cinétique cellulaire	Préparation des extraits protéiques
- Milieu de séparation des lymphocytes, densité 1,077, Eurobio®	- Urée PlusOne, GE Healthcare®
- RosettesSep® (Human B Cell Enrichment cocktail), StemCell Technologies Inc, The Cell Experts™	- Thiourée Ettan™ Sample Preparation Kits and Reagents, GE Healthcare®
- Trypan Blue Solution, Fluka®	- CHAPS PlusOne, GE Healthcare®
- RPMI 1640, Gibco®	- Tris : Trizma base / Trizma hydrochloride, Trizma®
- SVF pur (décomplémenté et filtré)	- Isopropanol : 2-Propanol, Sigma®
- Tampon PBS de Dubelcco Eurobio®	- Isobutanol : 2-Méthyl-1-Propanol, Sigma Aldrich® Triton X-100 PlusOne, GE Healthcare®
- CD19 PerCP-Cy5.5*, BD Biosciences®	- SB 3-10 : 3-(Decyldimethyl-ammonio)propanesulfonate inner salt, Sigma®
- CD5 APC*, BD Biosciences®	- DTT PlusOne, GE Healthcare®
- MultiMix™ Dual-Color Reagent anti-human kappa light chains /FITC anti-human lambda light chains/RPE, Dako®	- IPG buffer pH 3-10 / pH 4-7 for Immobiline® DryStrip, GE Healthcare®
- Goat F(ab') ₂ anti-human IgM-BIOT, SouthernBiotech®	- Kit Perfect-Focus, G-Biosciences®
- Avidin from egg white, Sigma®	- Kit FASTsilver™, G-Biosciences®
- ApoAlert Annexin V-FITC Apoptosis Kit, BD Biosciences®	- Bradford : BIO-RAD PROTEIN ASSAY (Dye Reagent Concentrate), Bio-Rad®

Marquage DIGE et IEF

- DMF : N,N, Dimethylformamide anhydrous, Aldrich®
- Cy : Amersham™ 5 nmol CyDye DIGE Fluor (minimal Dye) Labelling Kit, GE Healthcare®
- Strips : Immobiline™ DryStrip pH 4-7 24 cm, GE Healthcare®
- Huile minérale : DryStrip Cover Fluid PlusOne, Amersham Biosciences®
- Iodoacetamide Ettan™ Sample Preparation Kits and Reagents, GE Healthcare®
- Agarose PROTEAN® Plus Overlay Agarose, BioRad
- BBP : Bromophenol Blue, Amersham Biosciences®
- Glycerol PlusOne 87%, Amersham Biosciences®

2^{ème} dimension et spectrométrie de masse

- Acrylamide 30 % solution, Sigma®
- TEMED PlusOne, Amersham Biosciences®
- APS Ammonium Persulfate PlusOne, Amersham Biosciences®
- SDS Sodium DodecylSulfate, usb®
- Glycine for electrophoresis, Sigma®
- Ethanol absolute, Sigma Aldrich®
- Acide acétique, Fluka®
- SYPRO® Ruby Protein Gel Stain, Molecular Probes™, Invitrogen®
- TFA : TriFluoroacetic acid, SDS®
- ACN : Acetonitrile, Riedel-de-Haën®

Western-Blot

- Membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra, Amersham Biosciences®
- Anticorps primaire anti-PDCD4, Sigma-Aldrich®
- Anticorps primaire anti-RAD23B, Santa Cruz Biotechnology®
- Anticorps primaire anti-Ku (p70) clone N3H10, Kamiya Biomedical®
- Anticorps primaire anti-Actin, Sigma-Aldrich®
- Anticorps secondaire HRP-conjugué IgG anti-souris ou IgG anti-lapin, Bio-Rad®
- Inhibiteur de Protéase Complete 1X, Roche Diagnostics®
- Super Signal West Pico Substrate, Pierce Biotechnology®

PCR quantitative

- RNeasy mini kit, Qiagen®
- DNase, Qiagen®
- Improm II reverse transcriptase, Promega®
- Random hexadeoxynucleotide primers, Promega®
- 1X Taqman Universal Master Mix, Applied Biosystems®
- 1X Taqman Gene Expression Assays, Applied Biosystems®

Tableau 10 : Liste des réactifs utilisés.

II. Méthodes

A. Préparations cellulaires

1. Isolement des cellules tumorales B

L'isolement des cellules tumorales de LLC a été réalisé à partir d'un prélèvement de sang total : les cellules B leucémiques sont isolées par sélection négative par Rosettes Sep[®] et centrifugation en gradient de densité sur un milieu de séparation des lymphocytes (Ficoll), selon la technique classique.

Les cellules B issues de la moelle ou du sang de patients avec une MW, un LZM ou un LCM ont été isolées par tri cellulaire grâce à un trieur de cellules (BD FACS Aria II[™]) en utilisant des anticorps anti-CD19, anti-kappa ou anti-lambda selon les caractéristiques immunophénotypiques du clone.

Un contrôle de la pureté de la sélection est réalisé par immunophénotypage : marquage par anticorps anti-CD19, anti-CD5 et anti-Kappa ou anti-Lambda, incubation avec respectivement 10, 5 et 3 μ L (pour $0,5 \cdot 10^6$ cellules) d'anticorps pendant 20 min à 4° C à l'abri de la lumière, puis lavage, en parallèle avec des contrôles isotypiques. L'acquisition est faite sur un cytomètre en flux (BD FACS Canto[™], BD Biosciences[®]) et l'analyse des données est réalisée à l'aide du logiciel BD FACS Diva[™]. Les prélèvements ont été inclus dans l'étude lorsque la pureté était supérieure à 95 %.

2. Stimulation du BCR des lymphocytes B de LLC

Les cellules sont lavées puis remises en suspension à une concentration de 10 millions de cellules/mL dans du RPMI sans SVF et la viabilité est contrôlée par coloration au bleu Trypan. Les cellules sont placées en incubation pendant 3 h à l'étuve à 37° C en atmosphère humide à 5 % de CO₂, afin de les préparer à la stimulation, selon un protocole communément établi par la littérature.

La stimulation des lymphocytes B de LLC est réalisée selon le protocole mis au point pour l'étude du transcriptome⁶⁴ adapté des travaux de l'équipe de Chen⁴⁴. L'échantillon est séparé en deux, une moitié servant de contrôle non stimulé (US). La seconde moitié est soumise à une stimulation par des fragments d'anticorps F(ab')₂ anti-IgM biotinylés, en présence d'avidine, sur la glace pendant 5 minutes, puis à 37° C pendant 15 minutes. L'intensité et la durée de la stimulation avaient été déterminées après une étude pilote évaluant la réponse apoptotique par cytométrie en flux, la phosphorylation des tyrosine kinases et la prolifération cellulaire⁶⁴. Après stimulation, les cellules sont lavées puis remises en suspension dans un milieu de culture RPMI supplémenté avec 10 % de SVF (milieu R10) et incubées à 37° C, en atmosphère humide à 5 % de CO₂. L'étude du transcriptome a été réalisée à 1h, 1h30, 3h30 et 6h30 de la stimulation (T0)⁶⁴. Le choix de la durée de stimulation pour l'étude protéique (temps 1h, 2, 4h et 7h) s'est basé à la fois sur des données empiriques du temps nécessaire à une synthèse protéique d'une part et de la demi-vie

des protéines d'autre part ainsi que sur une validation de l'expression des protéines d'intérêt par technique de Western-Blot à différents temps⁶⁴.

A chaque temps de cinétique, les prélèvements correspondants sont sortis de l'incubateur, les culots cellulaires sont réalisés par une centrifugation à 1250 g/min pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont lavées à deux reprises dans du PBS (5 min à 1500 t/min), puis transférées dans des tubes Eppendorf pour centrifugation à 12 500 g/min pendant 5 min à température ambiante afin d'obtenir des culots secs qui sont plongés dans l'azote liquide et conservés congelés à -80° C.

Ainsi, pour chaque patient, ont été obtenus 8 échantillons, soit 4 stimulés et 4 non stimulés, nommés US1, S1, US2, S2, US4, S4, US7, S7.

3. Test fonctionnel d'apoptose

Un test fonctionnel mesurant l'apoptose est réalisé 6 h après la stimulation après marquage par annexine V et iodure de propidium. L'apoptose est évaluée en cytométrie en flux par l'augmentation du marquage membranaire par l'annexine V entre des cellules stimulées et non stimulées au temps T 6 h. Une réponse apoptotique significative (définie par un marquage d'au moins 20 % des cellules) est considérée comme un critère de réponse à la stimulation du BCR et permet de distinguer des patients répondeurs et non répondeurs, comme l'illustre la figure 16.

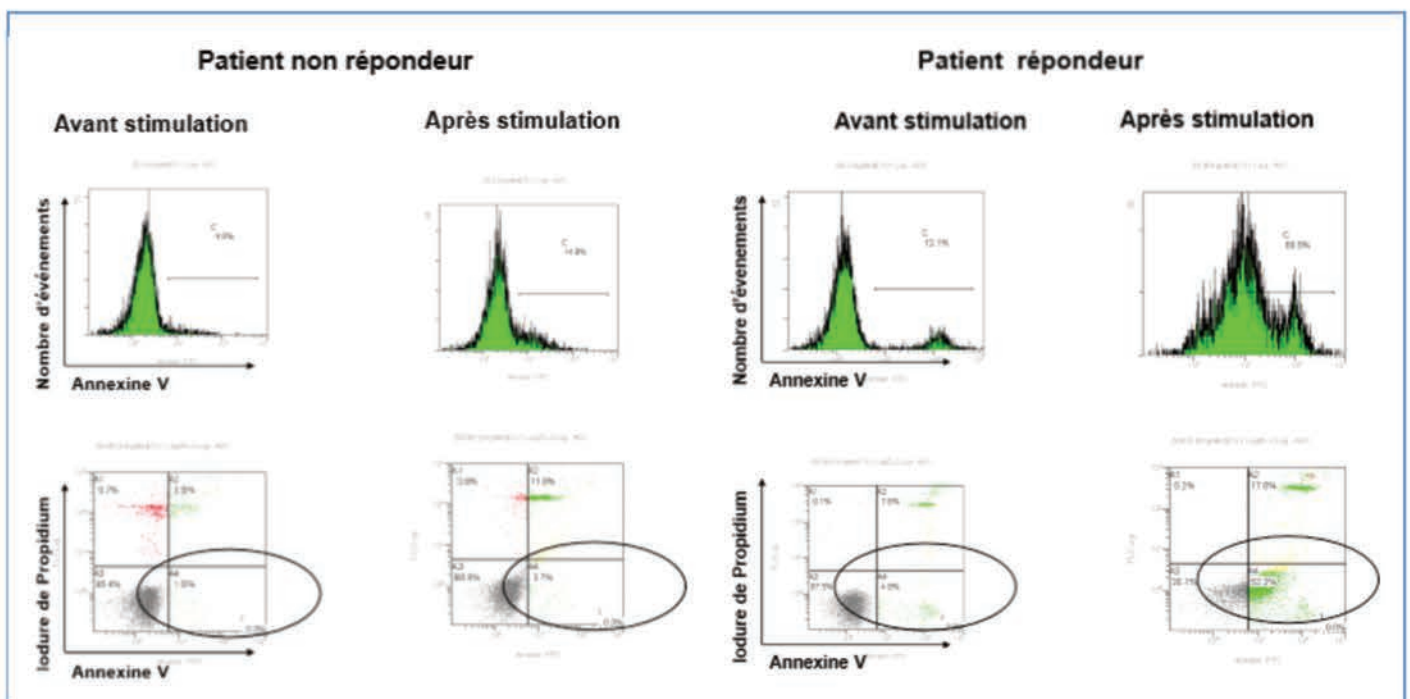


Figure 16 : Evaluation de la réponse à la stimulation du BCR par test fonctionnel d'apoptose.

B. Préparation des extraits protéiques

1. Extraction des protéines en vue de l'utilisation en E2D-DIGE

L'extraction protéique est réalisée avec un tampon d'extraction, spécifique de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle, adapté à la technologie DIGE, composé d'Urée 7 M, de Thiourée 2 M, de CHAPS 1 %, de Tris 30 mM, d'Isopropanol 10 %, d'Isobutanol 10 %, de Triton X100 0,5 %, de SB 3-10 0,5%, de DTT 65 mM, d'IPG buffer 3-10 0,5 % et de Spermine 30 mM.

Sur les culots secs encore congelés sont ajoutés 200 µL du tampon d'extraction ci-dessus. L'ensemble est bien homogénéisé et placé en agitation sur roue à température ambiante pendant 30 min, avec vortex régulier (toutes les 5 minutes). Après centrifugation à 16 000 g/min pendant 30 minutes à température ambiante, le surnageant (extrait protéique) est récupéré pour être dosé et précipité.

2. Dosage protéique

Le dosage est réalisé en plaque à 96 puits³⁰³, avec la méthode colorimétrique de Bradford qui repose sur la quantification du bleu de Coomassie avec les protéines, en comparaison avec différentes concentrations d'une protéine standard (*Bovine Serum Albumine* BSA) : à 10 µL de la gamme de BSA et de chaque échantillon, préalablement dilués au 1/10ème, sont ajoutés 200 µL de réactif de Bradford dilué au 1/5ème. L'ensemble est déposé sur une plaque 96 puits pour une lecture à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre Fusion™ (Packard®).

Un premier dosage est réalisé après l'extraction, afin de prévoir quel volume de tampon sera utilisé après la précipitation, afin de concentrer les extraits protéiques et d'obtenir des concentrations similaires entre les échantillons. Le second dosage, après précipitation, informe de la quantité totale de protéines recueillies.

3. Purification des extraits protéiques destinés à la DIGE par précipitation

Une précipitation des protéines, réalisée à l'aide du kit Perfect-Focus™, permet de concentrer les échantillons et d'éliminer des substances pouvant interférer, d'une part avec le marquage par les cyanines (DTT, ampholytes) et d'autre part avec la 1ère dimension d'isoélectrofocalisation. En effet, les sels, les détergents ioniques, les lipides, les polysaccharides chargés, les acides nucléiques et les phénols peuvent modifier la charge nette des protéines.

Cette précipitation, de type TCA (acide trichloracétique-acétone), est réalisée dans la glace selon le protocole du fabricant. Après précipitation, le culot protéique est repris dans un volume de tampon prédéfini selon le dosage protéique avant précipitation. Ce tampon est IEF compatible, composé d'urée 7 M, de Thiourée 2 M, de CHAPS 1 %, d'Isopropanol 10 %, d'Isobutanol 10 %, de SB 3-10 0,5 %, de DTT 40 mM et d'IPG Buffer 4-7 0,5 %. Les extraits protéiques prêts à être utilisés sont conservés congelés à -80° C.

4. Contrôle qualité : migration sur petit gel SDS-PAGE

Un contrôle de qualité est réalisé pour d'une part contrôler la qualité de l'extraction (nombre de bandes et profils protéiques) et d'autre part l'exactitude du dosage (homogénéité des dépôts). Trois μg de chaque échantillon sont déposés dans chaque puits pour migration sur un petit gel à 10 % d'acrylamide (Acrylamide 10 % T 2,6, SDS 0,1 %, Tris 375 mM, TEMED 0,06 %, APS 0,05 %) et de stacking (4 % d'acrylamide) à 20 mA pendant 2 h. La révélation des bandes est réalisée par coloration argentique à l'aide du kit FAST Silver™.

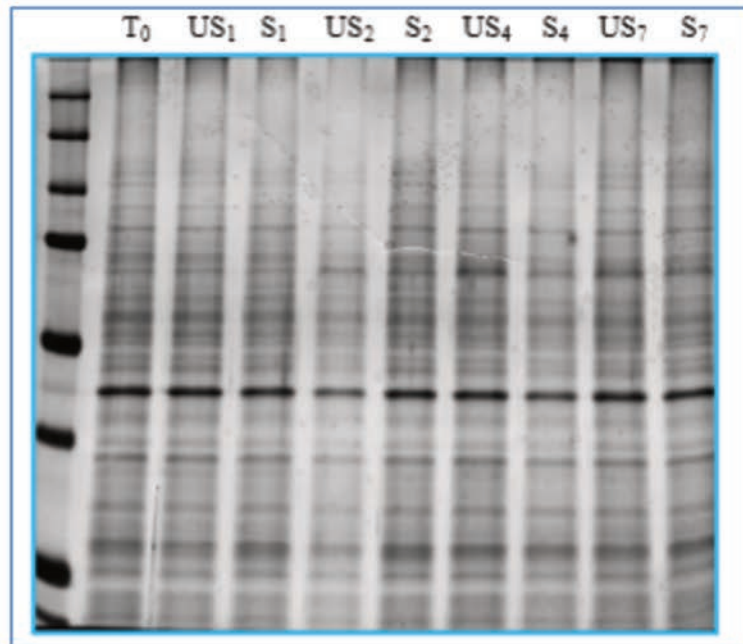


Figure 17 : Exemple de contrôle de qualité des extraits protéiques pour un patient.

C. Electrophorèse bidimensionnelle

1. Constitution du standard interne

Classiquement, le standard interne est constitué de l'ensemble des échantillons étudiés en quantités égales. Dans notre étude, il a été décidé de préparer un pool (pour 24 gels) avec 32 extraits protéiques soit les 8 temps (US1, S1, US2, S2, US4, S4, US7, S7) de 4 patients, 2 agressifs et 2 indolents. En effet, l'utilisation des 48 extraits protéiques provenant des 6 patients aurait l'inconvénient de diluer de façon majeure des protéines faiblement exprimées. Or ces protéines minoritaires, qui peuvent être modulées seulement à un ou deux temps de la cinétique de stimulation font partie de celles que nous souhaitons analyser.

2. Marquage par les cyanines et réhydratation des strips

Les extraits protéiques sont marqués par les cyanines, à pH basique (pH = 8,5). On utilise pour chaque extrait 50 µg de protéines. Le marquage est réalisé selon le principe du *minimal labelling*, de telle sorte que seulement 2 à 3 % des résidus lysines des protéines soient marqués, par fixation covalente via une liaison amide. Un gel comporte la co-migration de 2 extraits d'un même patient à un même temps (S et US), ainsi que celle du standard toujours marqué par la Cy2. Concernant les extraits de cellules UM et M, c'est-à-dire stimulées ou non, une planification du marquage est assurée par une technique de *dye switch* (limitation d'un biais lié à une éventuelle variation de fluorescence entre les cyanines) : les Cy 3 et 5 sont utilisées pour la moitié de chaque type d'extrait. Le marquage s'effectue sur la glace, à l'abri de la lumière, par ajout de 1 µL de cyanine, préalablement diluée dans du Diméthylformamide (DMF), à une concentration de 400 pmol/µL pour 50 µg de protéines. La réaction est stoppée au bout de 33 minutes par l'ajout d'une solution de lysine 10 mM. Les 3 extraits prévus pour co-migrer sur un même gel (l'un marqué par une Cy3, l'autre par une Cy5, ainsi que le pool) sont ensuite réunis et mélangés à une solution de réhydratation (Urée 7 M, Thiourée 2 M, CHAPS 1 %, Isopropanol 10 %, Isobutanol 10 %, SB 3-10 0,5 %, DTT 40 mM, IPG Buffer 4-7 0,5 %) pour un volume final de 450 µL afin de réhydrater une strip de 24 cm avec un gradient de pH 4-7. La strip, une fois réhydratée, doit avoir une épaisseur régulière de 0,5 mm et faire immédiatement l'objet de la 1ère dimension IEF.

3. Isoélectrofocalisation (1ère dimension)

Après réhydratation nocturne pendant 16 heures, les strips sont transférées sur la platine en céramique de l'Etan IPGphor II® (GE Healthcare®), des mèches humidifiées avec 150 µL d'eau milliQ assurant la conductivité et l'ensemble est recouvert d'huile minérale pour éviter le dessèchement. La 1ère dimension est réalisée à 20° C, en 4 étapes : 1er palier à 200 V pendant 1h30, 2ème palier à 500 V pendant 1h, gradient jusqu'à 10 000 V pendant 3h30 puis dernier palier à 10 000 V pendant 6h30 (focalisation

finale des protéines), pour un total de 85000 kWh. Les strips sont équilibrées pendant 15 minutes dans une solution réductrice de DTT (Urée 6M, Tris 50 mM, Glycérol 30 %, SDS 3 %, DTT 1 % soit 65 mM), puis pendant 20 minutes dans une solution d'alkylation d'iodoacétamide (Urée 6M, Tris 50 mM, Glycérol 30 %, SDS 3 %, Iodoacétamide 2,5 % soit 135 mM). Dans la 2ème solution, l'ajout de bleu de bromophénol permet de marquer le front de migration.

4. Migration SDS-PAGE (2ème dimension)

Après préparation et polymérisation des gels, 4 strips correspondant à 8 prélèvements d'un même patient (US1, S1, US2, S2, US4, S4, US7, S7) sont mises en contact avec la partie supérieure de 4 gels (l'interface étant réalisée par une solution d'agarose à 0,5 %), ensuite placés dans la même cuve pour une migration simultanée (afin d'obtenir la meilleure reproductibilité possible). Après mise en place d'un système de refroidissement maintenant la température à 20° C, la migration débute doucement (25 V pendant 1 h) pour faciliter l'entrée des protéines dans le gel, puis est augmentée à 150 V, 12 mA/gel et puis 1 W/gel jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas de la plaque (soit environ 15 h).

5. Acquisition et analyse des images

L'acquisition des images est réalisée par numérisation directe des gels bidimensionnels, sans nécessité de les démouler, grâce à un scanner à fluorescence (Ettan DIGE Imager®). Les temps d'exposition de chaque cyanine sont adaptés pour obtenir des intensités de fluorescence moyennes similaires entre les 3 cyanines et entre les différents gels. L'analyse utilise deux logiciels spécialisés (Decyder® et Samespot®). L'étude comparative des profils électrophorétiques aboutit à la visualisation de spots polypeptidiques différenciellement exprimés.

Plusieurs niveaux d'analyse ont été réalisés : non supervisée par analyse en composantes principales (ACP) et supervisée par comparaison de deux groupes. Cette dernière a comporté une analyse à l'état basal des extraits protéiques non stimulés US et une analyse des conséquences fonctionnelles de la stimulation évaluant la variation de la différence S-US entre les patients indolents et les patients agressifs.

L'ACP est une méthode mathématique d'analyse des données qui consiste à rechercher les directions spatiales représentant au mieux les corrélations entre des variables aléatoires. Si l'ACP est majoritairement utilisée pour visualiser des données, elle permet aussi de classer ces données en groupes (clusters) corrélés. L'analyse supervisée a été réalisée par ANOVA (ANalysis Of Variance) qui permet d'étudier des différences de moyennes entre différents groupes. Le degré de significativité choisi est de 5 % ($p < 0,05$). Les tests statistiques se sont basés sur la valeur des q-values et l'utilisation d'une méthode de correction permet de corriger ou de limiter le risque de faux positifs (diminution du FDR *False Discovery Rate*).

D. Spectrométrie de masse

1. Prélèvement des spots d'intérêt

Après repérage des protéines d'intérêt, les gels, démoulés et fixés dans une solution d'Ethanol 30 %, Acide acétique 10 %, juste après la numérisation, sont colorés au Sypro Ruby®. Les spots sont prélevés manuellement grâce à un repérage par rayonnement UV.

2. Digestion trypsique

Les spots prélevés sont lavés 2 fois dans une solution de bicarbonate d'ammonium à 25mM et d'éthanol 50 %, puis déshydratés avec 100 µL d'acétonitrile (ACN). La digestion trypsique est réalisée par ajout d'une solution de trypsine (bicarbonate d'ammonium 50 mM, ACN 10 %, trypsine 20 ng/µL) sur les spots séchés. Après incubation d'une heure sur glace, permettant une réhydratation des spots sans autolyse de la trypsine, les spots sont placés dans un tampon à 37° C toute la nuit. Après évaporation des solvants à l'aide d'un Speed-Vac®, les peptides (digest) sont repris dans une solution de resolubilisation TFA 0,1 % et ACN 50 % avant d'être analysés en MS.

3. Détermination des spectres de masse par MALDI-TOF et LC-MS/MS

Les peptides en solution acide sont mélangés à une solution de matrice HCCA (ACN 50 %, TFA 0,1 %, HCCA à saturation) directement sur une surface métallique (méthode de dépôt en goutte séchée). Après séchage, la matrice et les peptides forment une structure cristalline. Les dépôts sont passés en MALDI-TOF puis pour certains en LC-MSMS pour générer des spectres de masse qui sont ensuite analysés pour identification.

4. Identification polypeptidique

L'approche utilisée pour identifier les protéines en MS est celle du *Peptide Mass Fingerprinting* PMF. Le principe est de comparer les spectres de masse obtenus à des spectres de masse théoriques mis au point *in silico* par la simulation de l'action de l'enzyme sur une banque de protéines. Selon des algorithmes évaluant la similarité des spectres, en fonction par exemple du nombre de pics communs, des scores de similarité sont calculés, permettant un classement des protéines candidates.

E. Analyses de validation

1. Western-Blot

Les analyses d'expression protéique par Western-Blot ont été réalisées selon des procédures standards, en utilisant des anticorps primaires anti-PDCD4, anti-RAD23, anti-Ku70 et anti-actine. Les extraits protéiques ont été préparés par ajout sur des culots cellulaires congelés d'un tampon de lyse contenant 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,1%, NP 40, 10 % glycérol, 0,5 mM EDTA et un inhibiteur de protéase Complete 1X. Après centrifugation à 4 °C pendant 30 minutes à 16 000 g et dosage protéique, 50 µg de protéines sont mélangés à du tampon Laemmli 1 X et chauffés pendant 5 minutes. Après migration sur un gel SDS-PAGE à 10%, sont réalisés un transfert sur membrane de nitrocellulose puis un blocage des sites de fixation non spécifiques dans du T-TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Tween-20) avec 5 % de lait. Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires, sur la nuit à 4°C pour les anti-PDCD4 et anti-RAD23B et pendant 3 heures à température ambiante pour l'anti-Ku70. Après lavage dans du T-TBS, les membranes sont mises en présence de l'anticorps secondaire (anti-souris ou anti-lapin) conjugué à l'HRP. Les blots sont révélés par chimiluminescence grâce à au kit Super Signal Pico et l'acquisition des images est réalisée par un scanner Chemi-Start utilisant le logiciel Bio-1D Advanced version 12.10 (Vilber®).

2. Analyse de l'expression de *XRCC6* par PCR quantitative

L'analyse de l'expression du gène *XRCC6* codant pour la protéine Ku70 a été réalisée par PCR quantitative en temps réel. Cette seconde validation a été réalisée pour 14 patients (5 MW, 2 LZM, 2 LCM et 5 LLC). L'ARN a été extrait en utilisant le mini-kit RNeasy de Qiagen. De l'ADN complémentaire a été obtenu par transcription inverse selon des procédures standards utilisant une reverse transcriptase Improm II. L'expression du gène *XRCC6* a été mesurée, en duplicate, comparativement à l'expression du gène de référence *GUSB* (β -D-glucuronidase), par technique Taqman sur un LightCycler 480®. Cette expression relative de *XRCC6* a été calculée en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta C(T)}_{304}$.

RESULTATS

I. Chapitre 1 : Apport de la protéomique à l'étude de la leucémie lymphoïde chronique

A. Faisabilité d'une étude protéomique par E2D-DIGE dans le contexte de la LLC

1. Caractéristiques des patients étudiés

Les caractéristiques des patients dont les cellules ont été utilisées dans cette étude sont résumées dans le tableau 11.

Patient	Age	Sexe	Stade Binet	Stade Rai	Matutes	IGVH	ZAP70	Cytogénétique	CD38	TDL (an)	Réponse au BCR
UM1	89	H	A	0	5	100 %	+	del11q	+	> 1	Oui (25 %)
UM2	68	H	A	0	5	100 %	+	t(6;11;14)	+	> 1	Oui (60 %)
UM3	67	F	A	III	5	100 %	+	del13q/del17p	+	> 1	Oui (43 %)
M1	64	H	A	0	5	94,7 %	-	normale	-	< 1	Non (12 %)
M2	76	H	A	0	4	97,4 %	-	ND	-	< 1	Non (2 %)
M3	65	H	A	0	5	90,2 %	-	del13q	-	< 1	Oui (46 %)
UM4	50	H	B	I	5	100 %	+	normale	+	< 1	ND
UM5	61	F	A	0	5	100 %	ND	normale	-	< 1	ND
UM6	49	F	A	0	5	99,3 %	ND	normale	+	> 1	ND
UM7	74	H	B	II	5	99,6 %	ND	-17	+	> 1	Oui (58 %)
UM8	52	H	A	0	4	100 %	ND	del13q/del11q	ND	> 1	Oui (23 %)
UM9	69	H	A	0	4	99,6 %	ND	normale	+	> 1	Oui (23 %)
UM10	73	H	A	0	4	100 %	ND	+12	+	> 1	Oui (25 %)
UM11	54	H	A	I	3	98,5 %	ND	normale	-	> 1	Oui (21 %)
M4	70	H	A	0	4	94,5 %	ND	del13q	-	> 1	Non (3 %)
M5	71	H	A	0	5	95,4 %	ND	del13q	ND	> 1	ND
M6	53	F	A	0	5	95,6 %	ND	del13q	-	> 1	Oui (23 %)
M7	52	H	A	0	4	86,9 %	ND	del17p/del6q	ND	< 1	Non (6 %)
M8	72	F	A	I	5	93,2 %	ND	del13q/del18q/del22q	+	> 1	Oui (20 %)

Tableau 11 : Caractéristiques des patients atteints de LLC
(TDL = temps de doublement lymphocytaire ; ND = non disponible)

Cette cohorte comporte principalement des patients de sexe masculin, d'âge médian de 67 ans, porteurs d'une LLC non préalablement traitée, de score Matutes 4 ou 5 (à l'exclusion d'un patient dont la relecture du phénotypage permettait de conclure à un score de Matutes à 3), et de stade A pour 17 des 19 patients.

Les cellules des 6 premiers patients (UM1, UM2, UM3, M1, M2, M3) ont été utilisées pour l'analyse en électrophorèse 2D-DIGE. Les autres ont permis la réalisation des analyses de validation par techniques de Western-Blot.

Sur les 19 patients étudiés, 11 étaient porteurs d'une LLC considérée agressive, c'est-à-dire avec gènes *IGVH* non mutés (statut défini par un pourcentage d'homologie aux séquences germinales de plus de 98 %), souvent concordant avec une expression positive de ZAP-70 et de CD38. Le temps de doublement lymphocytaire reflète l'agressivité évolutive clinique de ces LLC.

L'analyse fonctionnelle de la réponse à la stimulation du BCR a été réalisée comme précédemment indiqué par mesure de l'apoptose par technique de cytométrie en flux : une réponse était considérée significative si au moins 20 % des cellules présentaient, 6 heures après la stimulation, un marquage par l'annexine V. Les 11 patients considérés répondeurs (sur les 15 analysés) sont principalement des patients porteurs d'une LLC agressive avec gènes *IGVH* non mutés. Toutes les cellules à gènes *IGVH* non mutés sont répondeuses (8/8) ainsi qu'environ un tiers (3/7) des cellules avec gènes *IGVH* mutés.

2. Analyse protéomique par E2D-DIGE

Après isolement des cellules tumorales et contrôle de la pureté de l'échantillon par cytométrie en flux, les cellules des 6 patients (UM1, UM2, UM3, M1, M2, M3) ont été soumises à une stimulation du BCR par utilisation d'un anticorps anti-IgM (Fab'2) biotinylé, associé à de l'avidine pendant 20 minutes, puis lavées et mises en culture pendant 1, 2, 4 ou 7 heures, avant l'extraction protéique. Ceci a permis d'obtenir au total 48 échantillons protéiques soit 8 échantillons par patient (4 contrôles non stimulés et 4 échantillons stimulés récupérés à 1 heure, 2 heures, 4 heures et 7 heures post-stimulation).

Une analyse protéomique a été réalisée par E2D-DIGE pour ces 48 échantillons, correspondant à 24 gels puisque le marquage par les cyanines permet de faire co-migrer 2 échantillons protéiques (ainsi que le standard interne) sur un même gel. L'utilisation de la technologie d'E2D-DIGE pour l'étude des syndromes lymphoprolifératifs a nécessité des adaptations techniques. En effet, le tampon d'extraction spécifique de la technique DIGE ne peut contenir ni agent réducteur de type DTT ni de tampon IPG (*Immobilized pH Gradient*) -utile car empêchant la carbamylation des protéines par l'urée-, tous deux incompatibles au marquage par les cyanines. La présence d'une quantité importante d'acides nucléiques dans les cellules de LLC a nécessité l'ajout de spermine dans le tampon d'extraction. Le recours à une étape de précipitation a permis d'éliminer ces substances gênantes au marquage par les cyanines.

Après migration des extraits dans les 2 dimensions, et acquisition des niveaux de fluorescence par scanner des 24 gels de 24 cm à trois longueurs d'onde différentes (spécifiques de chaque cyanine), 48 images protéomiques à analyser ont été obtenues ainsi que 24 images du standard interne. L'une d'entre elles est présentée dans la figure 18.

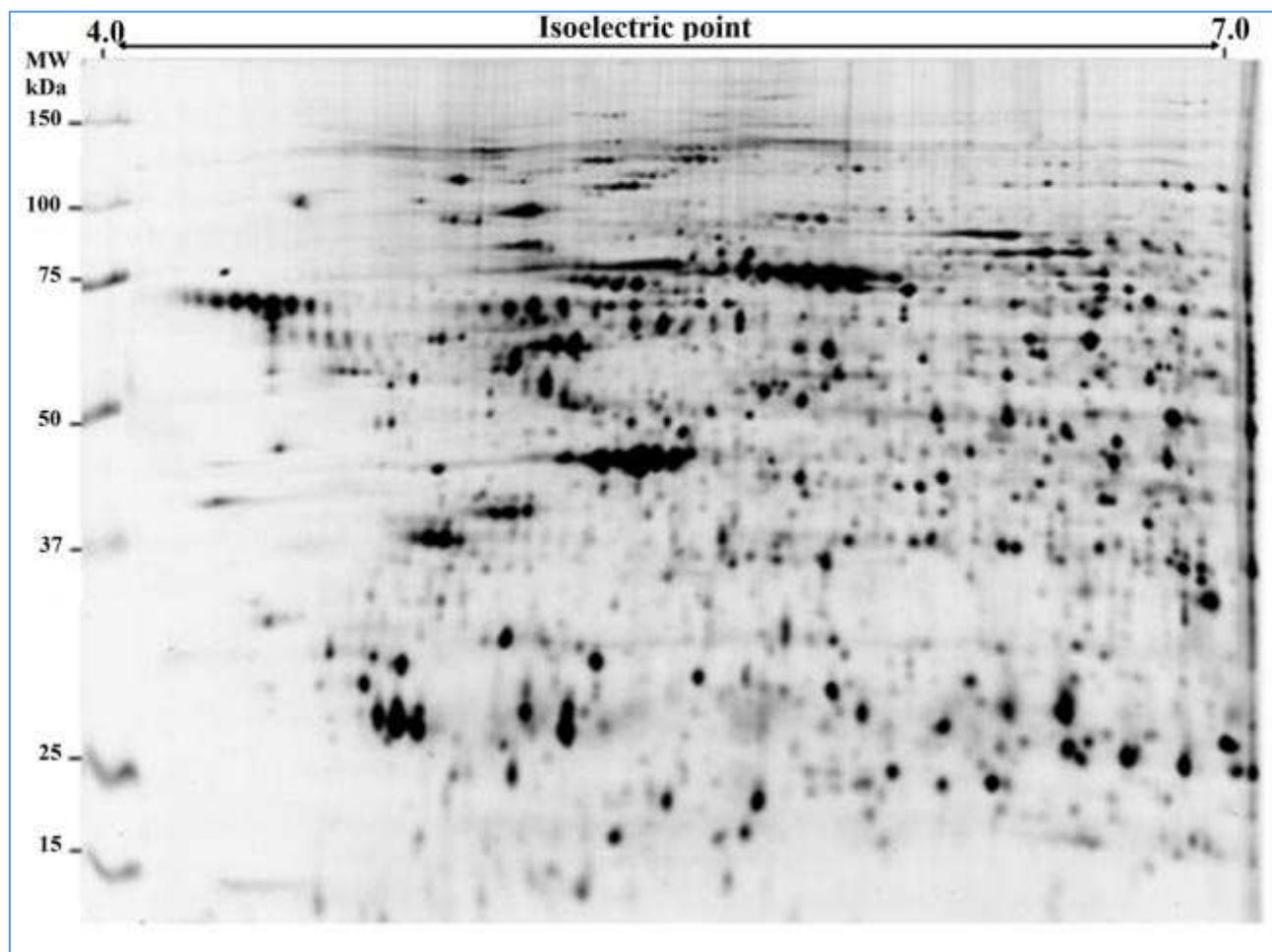


Figure 18 : Image représentative de l'ensemble des spots polypeptidiques obtenus par migration 2D

L'analyse comparative des 48 profils a été réalisée grâce au logiciel Decyder® après des étapes de normalisation des profils de migration en utilisant les 24 images de profils protéomiques identiques du standard interne.

B. Existence d'une signature protéomique des LLC agressives à l'état basal

1. Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales de l'image globale du protéome des 24 échantillons non stimulés (à l'état basal) regroupés par temps de stimulation, est présentée dans la figure 19.

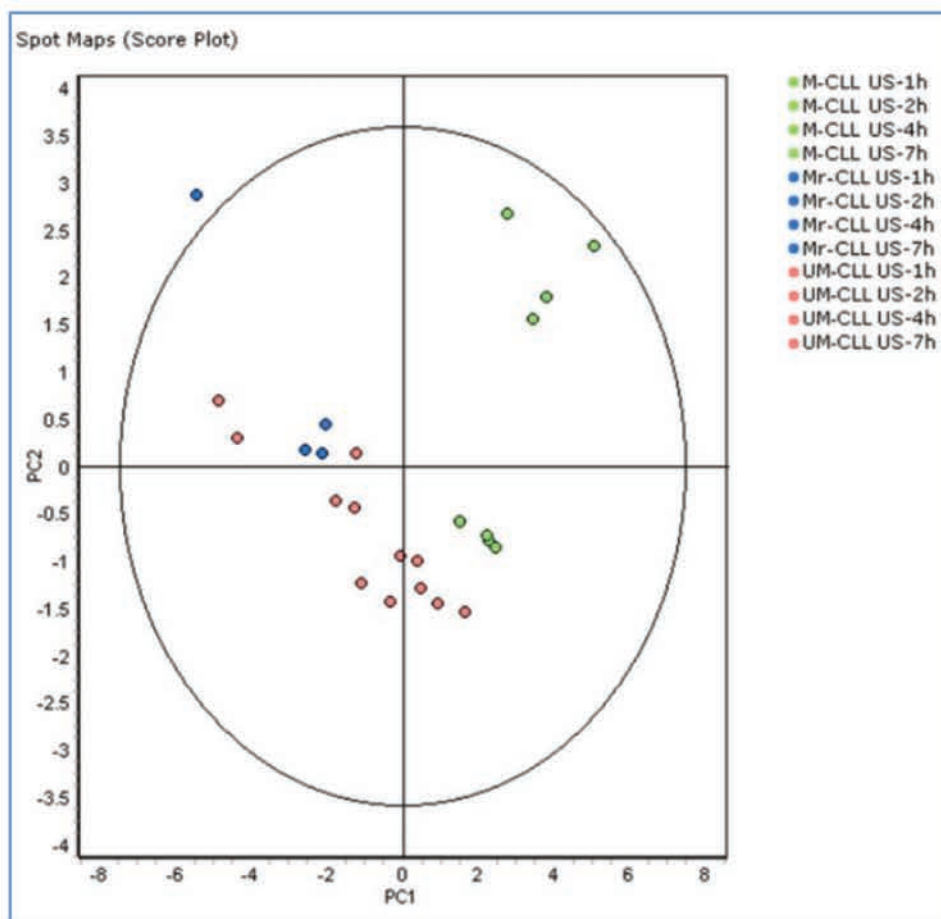


Figure 19 : Analyse en composantes principales du protéome de LLC à l'état basal

Cette analyse permet de séparer, selon l'axe principal PC1, les échantillons issus des LLC de profil indolent (en vert) ou agressif (en bleu et rouge). Les échantillons bleus correspondent au patient porteur d'une LLC à gènes *IGVH* mutés mais présentant *in vitro* une réponse apoptotique à la stimulation du BCR (patient M3 dénommé "M répondeur") ; ces échantillons sont regroupés avec ceux issus de LLC de profil agressif.

2. Analyses statistiques

Les tests statistiques comparant les niveaux d'expression protéique entre les échantillons non stimulés des cellules à gènes *IGVH* non mutés et des cellules à gènes mutés, mettent en évidence 26 spots polypeptidiques dont le niveau d'expression varie de plus de 1,4, de façon significative ($p < 0,05$).

Après application de la correction statistique pour éliminer de potentiels faux positifs (FDR), 6 spots polypeptidiques différentiellement exprimés ont été retenus, correspondant à 4 protéines différentes (Tableau 12). Ces protéines sont impliquées essentiellement dans des mécanismes de communication cellulaire et transduction du signal (*Haematopoietic lineage cell-specific protein* et *c-AMP-dependent protein kinase type 1- α regulatory subunit*), de régulation du métabolisme des acides nucléiques (*DNA-directed RNA polymerase I, II, III subunit*) et du métabolisme énergétique (*S-formylglutathione hydrolase*).

Numéro Uniprot	Niveau d'expression	Protéine	Gène	T-test	Couverture de séquence	Nombre de peptides	Fonctions
P14317	-6,2	Haematopoietic lineage cell-specific protein	<i>HCLS1</i>	< 0,0006	11 %	5	Communication cellulaire, transduction du signal
P19388	1,8	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	<i>POLR2E</i>	< 0,005	42 %	9	Régulation du métabolisme des acides nucléiques
P10644	1,7	cAMP-dependent protein kinase type I- α -regulatory subunit	<i>PRKAR1A</i>	< 0,009	32 %	10	Communication cellulaire, transduction du signal
P10768	2,2	S-formylglutathione hydrolase	<i>ESD</i>	< 0,009	6 %	2	Activité hydrolase, métabolisme énergétique
P10768	2,8	S-formylglutathione hydrolase	<i>ESD</i>	< 0,005	24 %	5	Activité hydrolase, métabolisme énergétique
P14317	2,1	Haematopoietic lineage cell-specific protein	<i>HCLS1</i>	< 0,03	19 %	7	Communication cellulaire, transduction du signal

Tableau 12 : Spots polypeptidiques différentiellement exprimés entre les LLC indolentes et agressives en dehors de toute stimulation

La présence de 2 spots correspondant à la même protéine (*Haematopoietic lineage cell-specific protein* et *S-formylglutathione hydrolase*), reflète l'existence de modifications post-traductionnelles générant des différences de points isoélectriques conduisant à plusieurs isoformes. Pour certaines protéines comme la *S-formylglutathione hydrolase*, les variations d'expression concordent pour les deux isoformes, en l'occurrence dans cet exemple l'expression des deux isoformes est augmentée dans les échantillons issus de LLC de profil agressif, à gènes *IGVH* non mutés. Pour la protéine *Haematopoietic lineage cell-specific protein* en revanche, l'expression d'une isoforme acide (spot #436 avec un pI à 4,87, cf Annexe 1) est augmentée, avec un ratio à plus de 2, dans les échantillons de LLC de profil agressif (à gènes *IGVH* non mutés) alors que l'isoforme basique (spot #434 avec un pI à 4,92, cf Annexe 1) a une expression diminuée de plus de 6 fois dans ces même échantillons de LLC de profil agressif. Ceci suggère une différence de statut de phosphorylation de cette protéine entre les 2 sous-types de LLC (augmentation de la phosphorylation dans les échantillons de LLC de profil agressif), en dehors de toute stimulation cellulaire.

C. Modifications du protéome après stimulation du BCR

Pour étudier les effets de la stimulation du BCR dans les 2 sous-types de LLC, une analyse en composantes principales de l'image globale du protéome a été réalisée pour les 48 échantillons non stimulés et stimulés regroupés par type de LLC et par temps de cinétique après stimulation ; cette analyse est présentée dans la figure 20.

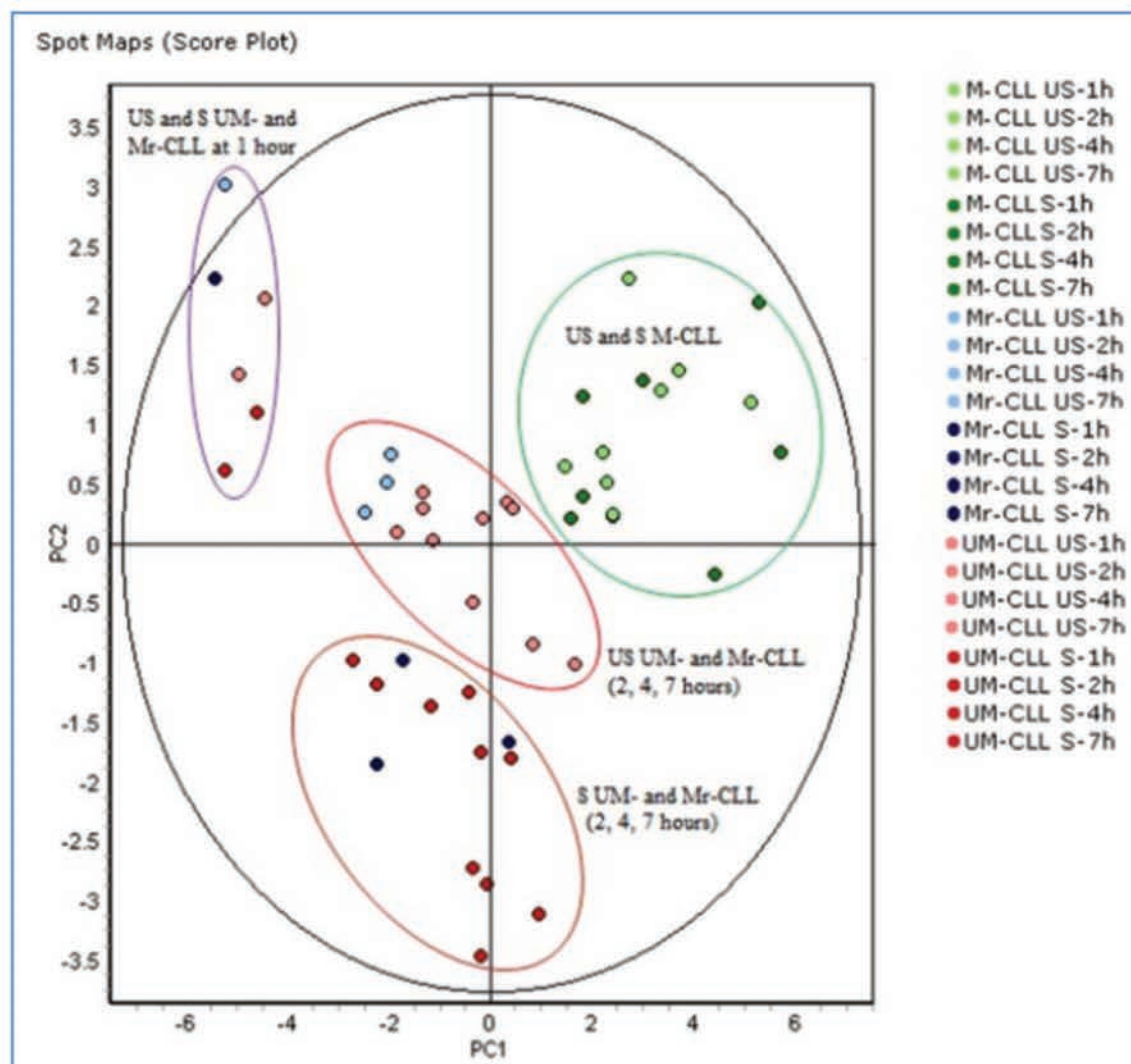


Figure 20 : Analyse en composantes principales du protéome de LLC avant et après stimulation du BCR

Cette figure met en évidence une séparation des échantillons en 4 groupes :

- le premier groupe comporte les échantillons non stimulés et stimulés des LLC de profil indolent (à gènes *IGVH* mutés, M-CLL, -en dehors du patient M3 dit répondeur-), suggérant une similitude importante entre les statuts non stimulés et stimulés

- le second groupe est constitué des échantillons non stimulés et stimulés des LLC de profil agressif au temps 1 heure après stimulation ; il semble par conséquent que la variation du protéome soit minimale au temps précoce de 1 heure dans notre modèle de stimulation, ou qu'il existe un facteur technique confondant concernant ces échantillons

- le troisième groupe comprend les échantillons non stimulés issus des patients avec une LLC de profil agressif (à gènes *IGVH* non mutés) et du patient porteur d'une LLC à gènes *IGVH* mutés mais répondant à la stimulation du BCR en terme de réponse apoptotique, aux temps 2 heures, 4 heures et 7 heures

- le dernier groupe se compose des échantillons stimulés issus des mêmes patients que le troisième groupe, aux temps identiques 2 heures, 4 heures et 7 heures.

Il peut être conclu que cette analyse permet de séparer les échantillons non stimulés et stimulés uniquement pour les LLC de profil agressif et pour le patient particulier M3. Une autre représentation possible de cette analyse multivariée est présentée dans les figures 20 (pour les échantillons issus de LLC de profil indolent sauf patient M3) et 21 (pour les échantillons issus de LLC de profil agressif) sous forme d'une classification hiérarchique en 2 dimensions (Figures 21 et 22).

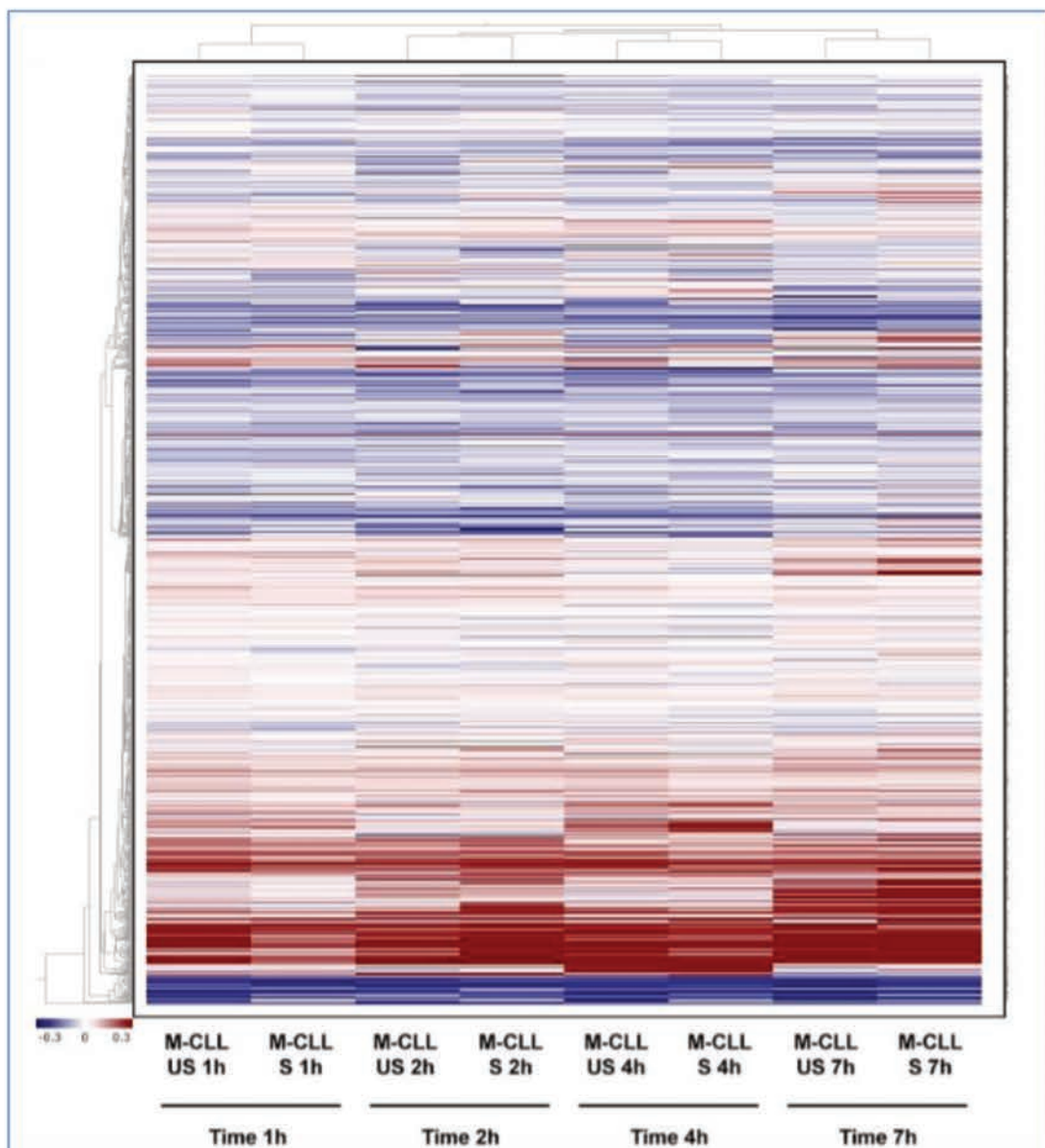


Figure 21 : Classification hiérarchique des échantillons issus de LLC de profil indolent (sauf patient M3 répondeur) : clustering selon le temps après stimulation

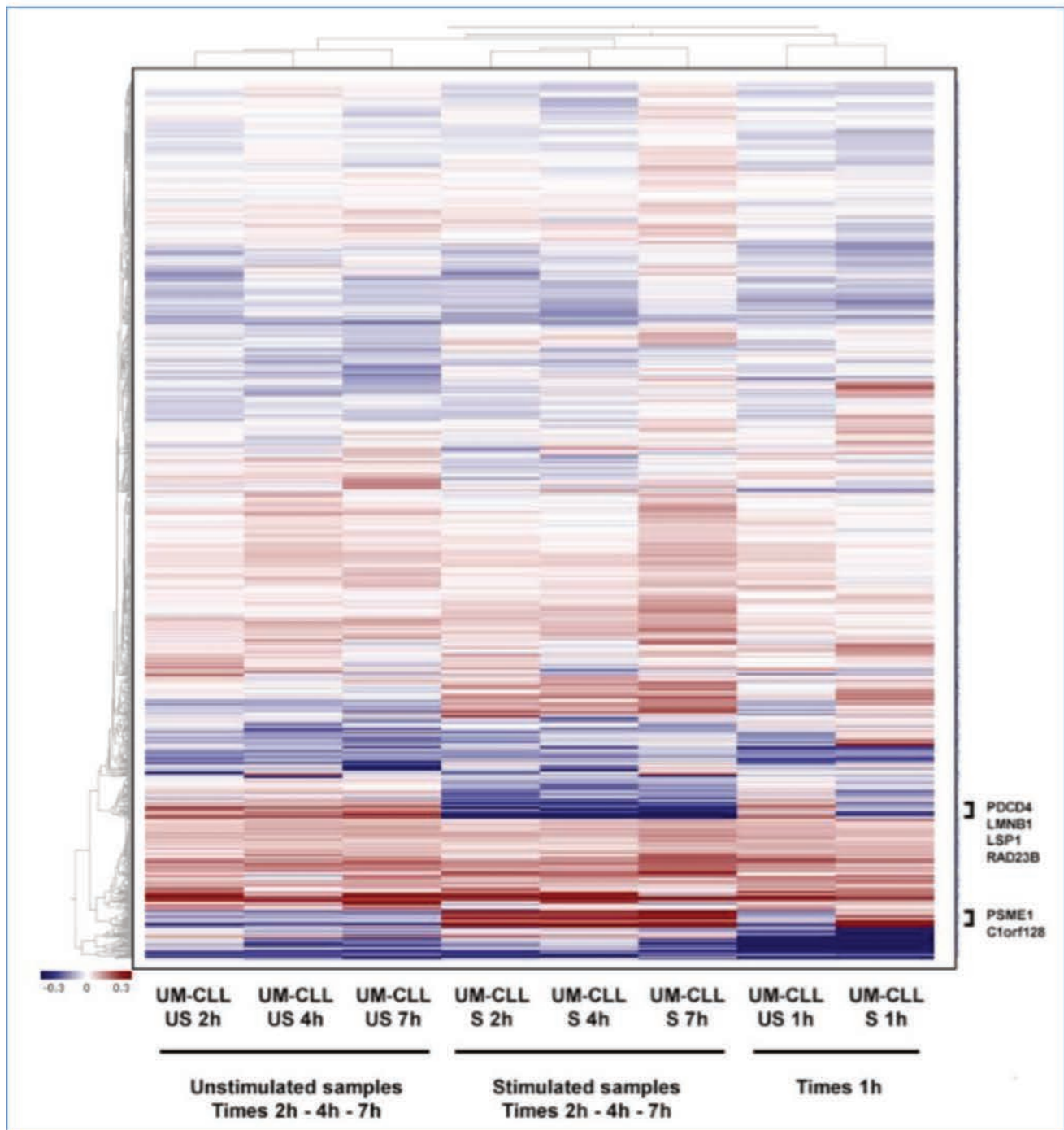


Figure 22 : Classification hiérarchique des échantillons issus de LLC de profil agressif : *clustering* selon le caractère stimulé ou non stimulé pour les temps 2h, 4h et 7h

Les classifications hiérarchiques regroupent les échantillons issus de LLC de profil indolent selon le temps de stimulation (Figure 21) alors que les échantillons issus de LLC de profil agressif sont séparés selon le statut stimulé ou non, en dehors des échantillons au temps précoce de 1 heure (Figure 22). Ceci suggère que la stimulation du BCR a un effet sur le protéome des cellules de LLC de profil agressif, à gènes *IGVH* non mutés, mais n'influence pas de façon significative celui des cellules de LLC de profil indolent.

Les niveaux d'expression des spots polypeptidiques des échantillons non stimulés et échantillons stimulés ont été comparés dans les deux sous-types de LLC. Les échantillons du patient M3 ont été exclus des analyses statistiques pour le groupe de LLC de profil indolent puisque l'image globale du protéome était dans ce cas différente de celle des échantillons des 2 autres LLC à gènes *IGVH* mutés. Les 16 autres échantillons constituent un groupe homogène et ont pu être analysés.

Le tableau 13 présente les protéines ayant des différences d'expression après stimulation de cellules de LLC de profil indolent. Après mesure correctrice sur les 25 spots polypeptidiques concernés par des p-values < 0,05, 6 spots ont été retenus comme ayant une expression significativement différente entre les échantillons non stimulés et stimulés. Ces spots correspondent à 6 protéines dont une n'a pas de fonction connue. Parmi les 5 autres, 4 ont une activité catalytique ou de protéase et sont impliquées dans le métabolisme énergétique et protéique (la *Enoyl CoA hydratase mitochondrial*, la *NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3*, la *Proteasome activator complex subunit 1* et la *Catechol-O-methyltransferase*). La dernière, la *Ran-specific GTPase-activating protein*, a un rôle dans la transduction du signal et les communications intercellulaires.

Numéro Uniprot	Niveau d'expression	Protéine	Gène	T-test	Couverture de séquence	Nombre de peptides	Fonctions
P30084	1,6	Enoyl CoA hydratase, mitochondrial	<i>ECHS1</i>	< 0,002	36 %	9	Activité catalytique, métabolisme énergétique
O75489	1,6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3	<i>NDUFS3</i>	< 0,002	45 %	12	Activité catalytique, métabolisme énergétique
P43487	1,6	Ran-specific GTPase-activating protein	<i>RANBP1</i>	< 0,004	14 %	5	Communication cellulaire, transduction du signal
Q06323	1,9	Proteasome activator complex subunit 1	<i>PSME1</i>	< 0,002	50 %	12	Activité protéase, métabolisme protéique
Q9GZP4	2,7	UPF0424 protein C1orf128	<i>C1orf128</i>	< 0,002	23 %	3	Inconnue
P21964	2,7	Catechol O-methyltransferase	<i>COMT</i>	< 0,002	19 %	3	Métabolisme énergétique

Tableau 13 : Spots polypeptidiques différentiellement exprimés après stimulation des LLC indolentes

Si seulement 6 protéines ont une expression augmentée après stimulation de cellules de LLC de profil indolent, la même analyse réalisée sur les échantillons issus de LLC de profil agressif a mis en évidence une variation d'expression pour 25 spots polypeptidiques (Tableau 14). Pour 13 protéines, on constate une augmentation d'expression après stimulation et pour 12 autres, la stimulation du BCR s'accompagne d'une diminution d'expression.

Numéro Uniprot	Niveau d'expression	Protéine	Gène	T-test	Couverture de séquence	Nombre de peptides	Fonctions
P54727	- 4,2	UV excision repair protein RAD23 homolog B	<i>RAD23B</i>	< 0,0002	30 %	10	Métabolisme des acides nucléiques, réparation de l'ADN
Q03252	- 2,8	Lamin-B2	<i>LMNB2</i>	<0,00005	39 %	26	Molécule structurale, croissance cellulaire
Q53EL6	- 2,5	Programmed cell death protein 4	<i>PDCD4</i>	< 0,04	28 %	11	Apoptose
P36507	- 1,8	Dual-specificity MAP kinase kinase 2	<i>MAP2K2</i>	< 0,002	20 %	7	Activité kinase, communication cellulaire, transduction du signal
Q14005	- 1,7	Pro-IL 16	<i>IL16</i>	< 0,007	5 %	4	Activité cytokine, réponse immunitaire
P07910	- 1,7	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	<i>HNRNPC</i>	< 0,002	23 %	13	Régulation du métabolisme des acides nucléiques, liaison de l'ARN
P28331	- 1,6	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75-kDa subunit	<i>NDUFS1</i>	< 0,05	35 %	17	Activité oxydoréductase, métabolisme énergétique
Q9NYB0	- 1,5	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	<i>TERF2IP</i>	< 0,03	31 %	9	Communication cellulaire, transduction du signal
P37837	- 1,5	Transaldolase	<i>TALDO1</i>	< 0,05	21 %	8	Activité transférase, métabolisme énergétique
Q9Y5X3	-1,4	Sorting nexin-5	<i>SNX5</i>	< 0,006	45 %	14	Transporteur
Q9Y5X1	- 1,4	Sorting nexin-9	<i>SNX9</i>	< 0,05	20 %	9	Communication cellulaire, transduction du signal
P42331	- 1,4	Rho-GTPase-activating protein 25	<i>ARHGAP25</i>	< 0,03	16 %	10	Activité activatrice de GTPase
P14317	1,4	Hematopoietic lineage cell-specific protein	<i>HCLS1</i>	< 0,01	4 %	2	Communication cellulaire, transduction du signal
P52566	1,4	Rho-GDP-dissociation inhibitor 2	<i>ARHGDI2</i>	< 0,01	47 %	7	Communication cellulaire, transduction du signal
P13796	1,5	Plastin-2	<i>LCP1</i>	< 0,02	14 %	9	Communication cellulaire, transduction du signal, liaison calcique
P08670	1,5	Vimentin	<i>VIM</i>	< 0,05	36 %	14	Cytosquelette, croissance cellulaire
Q6IBC3	1,6	Cathepsin H	<i>CTSH</i>	< 0,04	12 %	6	Activité peptidase, métabolisme protéique
P11310	1,6	Medium-chain specific acyl-coA dehydrogenase, mitochondrial	<i>ACADM</i>	< 0,002	26 %	10	Activité catalytique, métabolisme énergétique
P20700	2	Lamin-B1	<i>LMNB1</i>	< 0,03	25 %	14	Molécule structurale, croissance cellulaire

O75489	2,1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3	<i>NDUFS3</i>	< 0,03	45 %	12	Activité catalytique, métabolisme énergétique
P33241	2,1	Lymphocyte-specific protein 1	<i>LSP1</i>	< 0,007	18 %	4	Communication cellulaire, transduction du signal, liaison calcique
Q06323	2,2	Proteasome activator complex subunit 1	<i>PSME1</i>	< 0,01	50 %	12	Métabolisme protéique, Activité protéase liée à l'ubiquitine
P61978	1,9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	<i>HNRNPK</i>	< 0,0002	32 %	11	Régulation du métabolisme des acides nucléiques
P21964	3,4	Catechol O-methyltransferase	<i>COMT</i>	< 0,004	19 %	3	Métabolisme énergétique
Q13409	4,1	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	<i>DYNC1I2</i>	< 0,02	9 %	5	Activité motrice, croissance cellulaire

Tableau 14 : Spots polypeptidiques différentiellement exprimés après stimulation des LLC agressives

Les protéines dont l'expression est modifiée après la stimulation du BCR interviennent principalement dans les mécanismes de communication cellulaire, de transduction du signal, de prolifération, de métabolisme énergétique, de métabolisme des acides nucléiques, de réparation de l'ADN ou de l'apoptose.

Parmi les protéines dont l'expression augmente après stimulation, deux ont été trouvées modifiées de la même façon dans les cellules de LLC de profil indolent (Tableau 13) : il s'agit de la *NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3* et la *Proteasome activator complex subunit 1*, codées respectivement par les gènes *NDUFS3* et *PSME1*.

Les profils d'expression des protéines les plus différentielles ont été étudiés de façon plus approfondie. La protéine dont l'expression est la plus modifiée après stimulation du BCR est l'*UV excision repair protein RAD23 homolog B*, codée par le gène *RAD23B*. Elle est impliquée dans la réparation de l'ADN et l'adressage de substrats au protéasome notamment. Son profil d'expression, caractéristique des cellules de LLC de profil agressif (à gènes *IGVH* non mutés), est détaillé dans la figure 23. La représentation en 3 dimensions tout comme l'image du gel 2D illustrent la nette diminution d'expression protéique de *RAD23B* après stimulation du BCR.

On peut noter également que l'expression d'une isoforme basique de l'*Haematopoietic lineage cell-specific protein*, codée par *HCLS1* est diminuée après stimulation du BCR des cellules de LLC de profil agressif. Nous avons précédemment suggéré, d'après les analyses des échantillons non stimulés (Tableau 12) qu'il existait une augmentation de la phosphorylation à l'état basal ; la diminution de cette isoforme basique peut refléter une augmentation de la phosphorylation déclenchée par la stimulation du BCR.

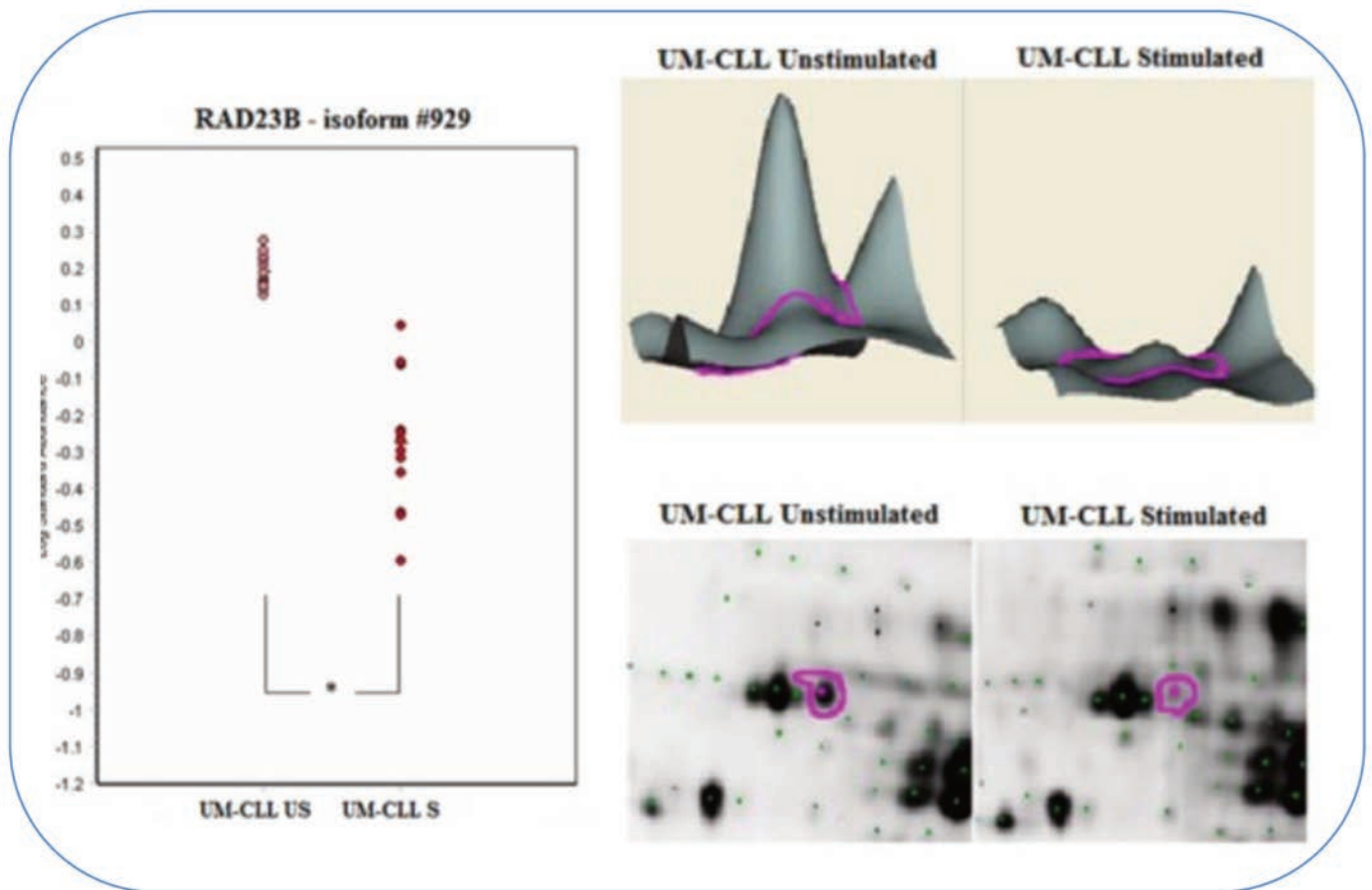


Figure 23 : Diminution de l'expression de la protéine *UV excision repair protein RAD23 homolog B* après stimulation du BCR de cellules de LLC de profil agressif

D. Modifications post-traductionnelles après stimulation du BCR

L'identification de plusieurs isoformes d'une même protéine est classique en E2D et permet d'étudier les modifications post-traductionnelles et particulièrement les niveaux de phosphorylation d'une molécule. En effet, l'ajout d'un ou plusieurs groupements phosphate chargé(s) négativement diminue le point isoélectrique de la protéine sans affecter significativement sa masse moléculaire, ce qui influe sur la migration horizontale.

Pour chaque protéine identifiée sous plusieurs isoformes, les détails de l'expression protéique ont été étudiés, dans les cellules de LLC de profil agressif, ainsi que les variations de chaque isoforme après stimulation du BCR (Tableau 15).

Gène	Protéine	Nombre de spots identifiés	Expression à l'état basal dans les LLC UM	Variation de l'expression après stimulation du BCR dans les LLC UM	Hypothèses biologiques
<i>LMNB1</i>	Lamin-B1	6	/	4 isoformes acides ↑ 2 isoformes basiques ↓	Phosphorylation après stimulation
<i>LMNB2</i>	Lamin-B2	2	/	2 isoformes ↓	Diminution après stimulation
<i>LCP1</i>	Plastin-2	3	/	1 isoforme acide ↑ 2 isoformes basiques ↓	Phosphorylation après stimulation
<i>VIM</i>	Vimentin	5	/	3 isoformes acides ↑ 2 isoformes basiques ↓	Phosphorylation après stimulation
<i>HCLS1</i>	Hematopoietic lineage cell-specific protein	4	1 isoforme basique ↓	1 isoforme acide ↑ 2 isoformes non modifiées 1 isoforme basique ↓	Phosphorylation à l'état basal et après stimulation
<i>LSP1</i>	Lymphocyte-specific protein 1	6	/	2 isoformes acides ↑ 4 isoformes basiques ↓	Phosphorylation après stimulation
<i>DYNC1I2</i>	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	3	/	2 isoformes acides ↑ 1 isoforme basique ↓	Phosphorylation après stimulation
<i>HNRNPK</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	9	1 isoforme ↑ 1 isoforme ↓	5 isoformes ↑ 4 isoformes ↓	Phosphorylation après stimulation
<i>HNRNPC</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2	4	/	1 isoforme ↓ 3 isoformes non modifiées	/
<i>ESD</i>	S-formylglutathione hydrolase	2	2 isoformes ↑	/	Augmentation à l'état basal
<i>TALDO1</i>	Transaldolase	4	/	3 isoformes ↓ 1 isoforme non modifiée	Diminution après stimulation
<i>HSPD1</i>	60-kDa heat shock protein; mitochondrial	4	1 isoforme ↑	1 isoforme ↑ 2 isoformes non modifiées 4 isoformes ↓	/
<i>PDCD4</i>	Programmed death cell protein 4	3	1 isoforme ↓	3 isoformes ↓	Diminution à l'état basal et après stimulation
<i>PSME1</i>	Proteasome activator complex subunit 1	3	/	2 isoformes ↑ 1 isoforme non modifiée	Augmentation après stimulation

Tableau 15 : Profil d'expression, dans des cellules de LLC à gènes *IGVH* non mutés, de protéines identifiées sous plusieurs isoformes et variations d'expression après stimulation du BCR

Pour 3 des 14 protéines identifiées sous plusieurs isoformes, ces dernières varient parallèlement. Ainsi, les 2 isoformes de la *S-formylglutathione hydrolase* sont augmentées à l'état basal dans les cellules de LLC de profil agressif par rapport à celles de profil indolent. A l'inverse, les 2 isoformes de la *Lamin-B2* ainsi que les 3 isoformes de la *Programmed death cell protein 4* diminuent après stimulation du BCR dans les cellules de LLC à gènes *IGVH* non mutés. A noter que l'une de ces 3 isoformes de la protéine PDCD4 était déjà significativement diminuée à l'état basal.

Parallèlement, pour 7 de ces 14 protéines, les isoformes varient de façon opposée : les isoformes les plus acides augmentent tandis que les isoformes les plus basiques diminuent, ce qui évoque une modification post-traductionnelle de type phosphorylation. Ces protéines faisant très probablement l'objet d'une phosphorylation après stimulation du BCR sont des molécules du cytosquelette (la *Lamin-B1*, la *Plastin-2*, la *Vimentin*, la *Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2*), des molécules tardives dans la voie de signalisation du BCR (*Hematopoietic lineage cell-specific protein 1*, *Lymphocyte-specific protein 1*) et une ribonucléoprotéine (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*).

A titre d'exemple, le profil d'expression des 6 isoformes de la protéine *Lymphocyte-specific protein 1* est présenté dans la figure 24 : l'expression des 2 isoformes les plus acides (#1032 et #1036) augmente après stimulation du BCR des cellules de LLC à *IGVH* non mutés, alors que celle des 4 isoformes les plus basiques (#1038, #1040, #1043, #1041) diminue après stimulation.

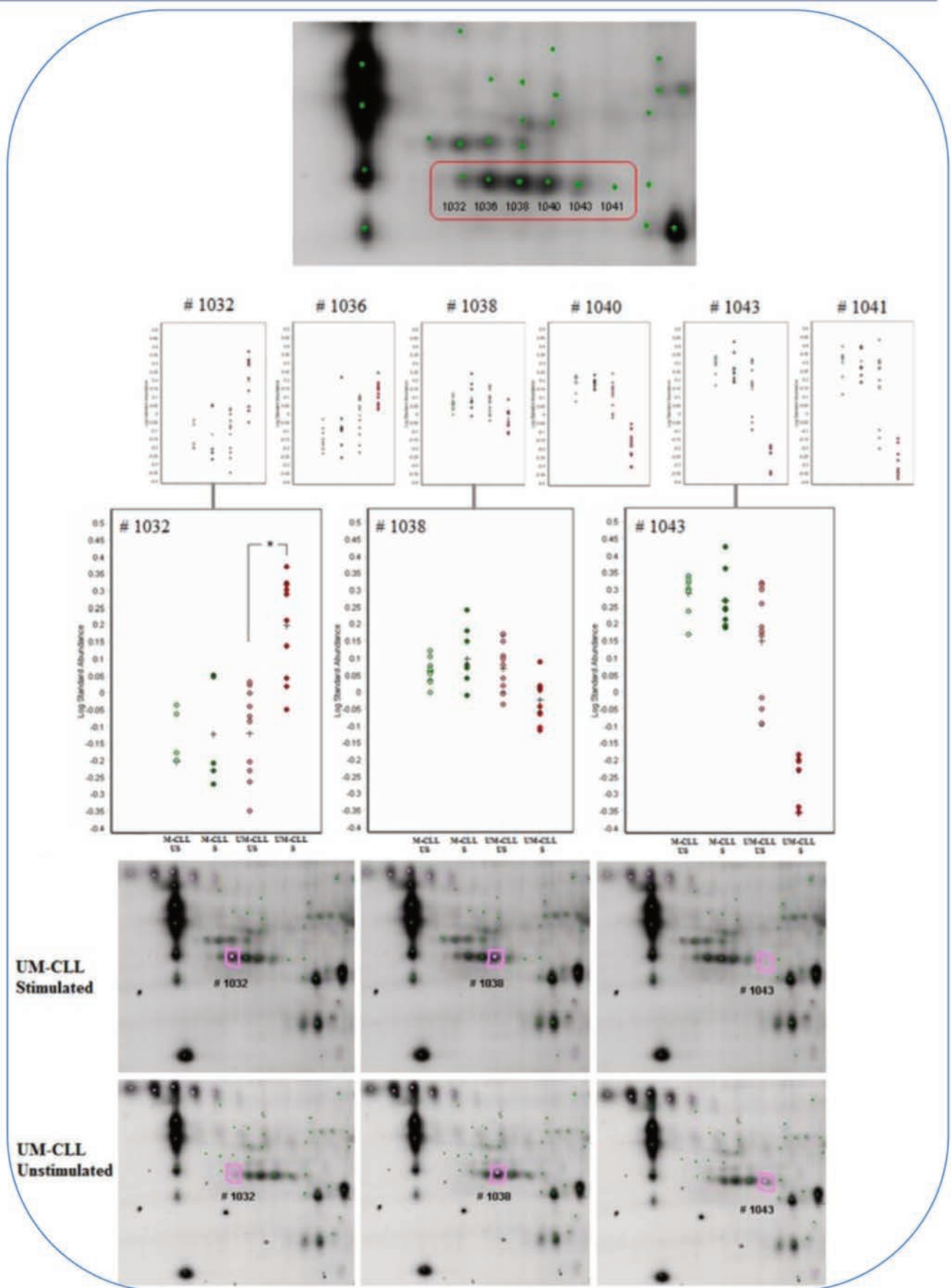


Figure 24 : Profil évocateur de phosphorylation de la *Lymphocyte-specific protein 1* après stimulation du BCR des cellules de LLC de profil agressif

E. Validations par Western-Blot

L'objectif des validations par Western-Blot est double :

- confirmer les données d'expression issues de la technologie d'E2D DIGE
- valider la reproductibilité de ces résultats sur une seconde cohorte de patients.

Nous avons choisi de valider les diminutions d'expression après stimulation du BCR de deux protéines, l'*UV excision repair protein RAD23 homolog B* et la *Programmed death cell protein 4*. Nous avons réalisé un Western-Blot pour les 19 patients de cette étude et l'évaluation de l'expression protéique s'est faite par mesure semi-quantitative et relative par rapport à l'expression d'actine. Les moyennes d'expression relative sont significativement différentes entre les groupes non stimulés et stimulés des échantillons issus des cellules de LLC de profil agressif à gènes *IGVH* non mutés ainsi que ceux issus du patient M3 (Figure 25), alors qu'il n'existe pas de différence pour les 5 LLC de profil indolent (gènes *IGVH* mutés et absence de réponse au test fonctionnel d'apoptose).

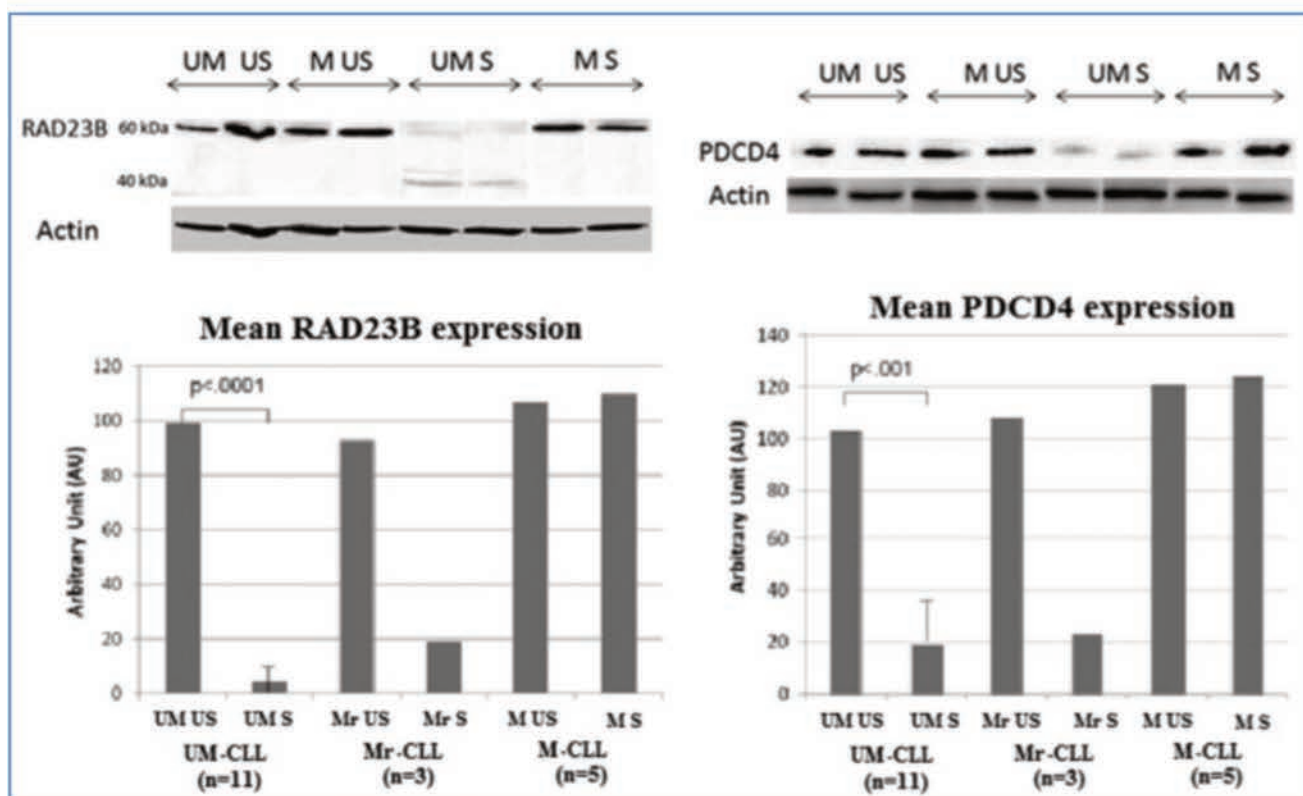


Figure 25 : Validation des différences d'expression des protéines *UV excision repair protein RAD23 homolog B* et *Programmed death cell protein 4* par Western-Blot

De façon intéressante, le recrutement de 5 nouveaux patients porteurs d'une LLC à gènes *IGVH* mutés a conduit à mettre en évidence dans 2 cas supplémentaires (en plus du patient M3) des cellules répondeuses à la stimulation du BCR en termes d'apoptose.

Dans ces 2 cas et dans celui du patient M3, les protéines *UV excision repair protein RAD23 homolog B* et *Programmed death cell protein 4* ont un profil d'expression similaire à celui des cellules de LLC de profil agressif à gènes *IGVH* non mutés.

La figure 26 illustre le profil d'expression de la protéine *UV excision repair protein RAD23 homolog B* pour les 19 patients : il existe une diminution de l'expression après stimulation du BCR dans les 11 échantillons issus de LLC à gènes *IGVH* non mutés et dans 3 échantillons issus de LLC à *IGVH* mutés, ceux pour lesquels était constatée une réponse à la stimulation du BCR en termes de marquage par l'annexine V.

De plus, ces analyses de Western-Blot ont permis de mettre en évidence, dans les échantillons stimulés de ces 14 patients, une bande correspondant à une protéine de plus petite taille, de l'ordre de 40 kDa, suggérant un clivage, après stimulation du BCR, de la protéine de 60 kDa *UV excision repair protein RAD23 homolog B*.

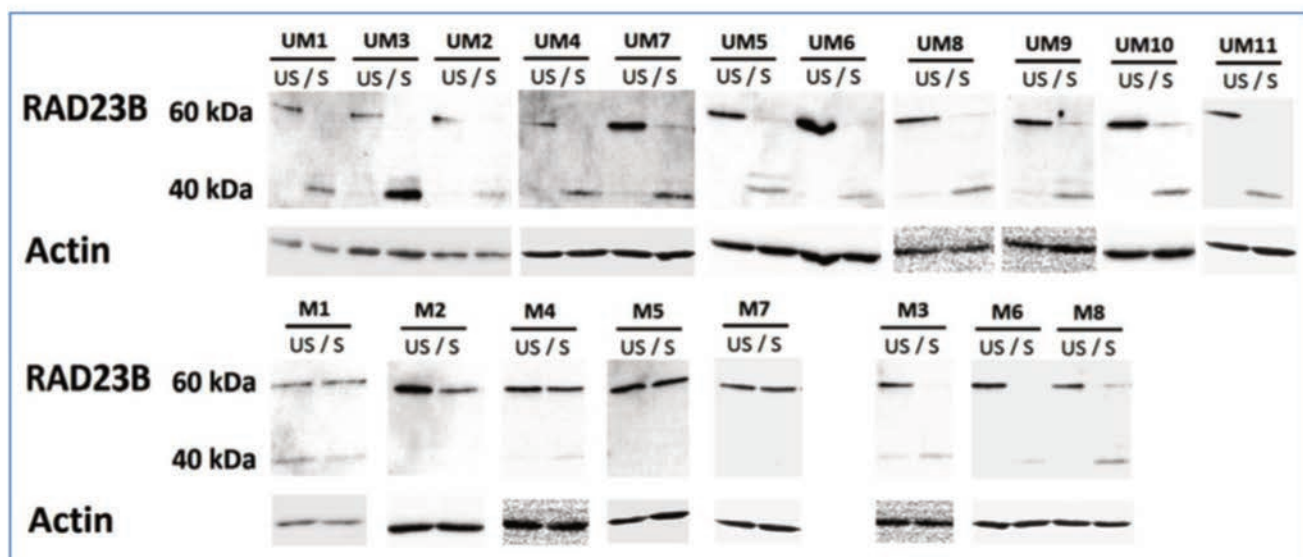


Figure 26 : Diminution de l'expression de RAD23B après stimulation du BCR de LLC de profil agressif et intermédiaire

E. Description d'un sous-type intermédiaire de LLC

Des résultats étonnants ont été constatés pour le patient M3.

Tout d'abord nous avons mis en évidence que ces cellules, de profil théorique indolent, avec absence d'expression de ZAP-70 et gènes *IGVH* mutés, répondaient à la stimulation du BCR en termes d'apoptose avec un marquage par l'annexine V de 46 % des cellules.

D'autre part, l'analyse protéomique non supervisée de type ACP a objectivé que les échantillons issus du patient M3 se regroupaient avec les échantillons issus de cellules de LLC de profil agressif à gènes *IGVH* non mutés.

Ces échantillons ont été exclus de l'analyse statistique mais une étude descriptive de leur profil d'expression a été réalisée. La figure 27 présente les profils d'expression des échantillons M3 pour 4 protéines : *Hematopoietic lineage cell-specific protein 1*, *Lymphocyte-specific protein 1*, *UV excision repair protein RAD23 homolog B* et *Programmed death cell protein 4*. De façon intéressante, les échantillons M3 partagent des profils d'expression communs avec les échantillons de profil indolent : absence de phosphorylation de *Hematopoietic lineage cell-specific protein 1* en dehors de toute stimulation (représentée sur la figure par l'absence de diminution de l'isoforme basique #434), absence de phosphorylation après stimulation du BCR de la *Lymphocyte-specific protein 1* se traduisant par l'absence de diminution de l'isoforme #1038 (Figure 24), ces protéines étant toutes deux associées à la voie de signalisation du BCR. Ces échantillons M3 partagent par ailleurs des profils d'expression communs avec les échantillons issus de LLC de profil agressif à gènes *IGVH* non mutés : diminution de l'expression des protéines *UV excision repair protein RAD23 homolog B* et *Programmed death cell protein 4* après stimulation du BCR.

La stimulation d'autres cellules à gènes *IGVH* mutés pour réaliser les analyses de validation a permis de constater que les échantillons issus des patients M6 et M8 possédaient également les caractéristiques de ce sous-type intermédiaire de LLC : réponse apoptotique à la stimulation du BCR, diminution de l'expression des protéines *UV excision repair protein RAD23 homolog B* et *Programmed death cell protein 4* après stimulation du BCR.

Ces données suggèrent l'hétérogénéité du groupe de LLC à gènes *IGVH* mutés : environ un tiers ont des caractéristiques biologiques d'agressivité qui permettent de définir ce sous-type intermédiaire de LLC.

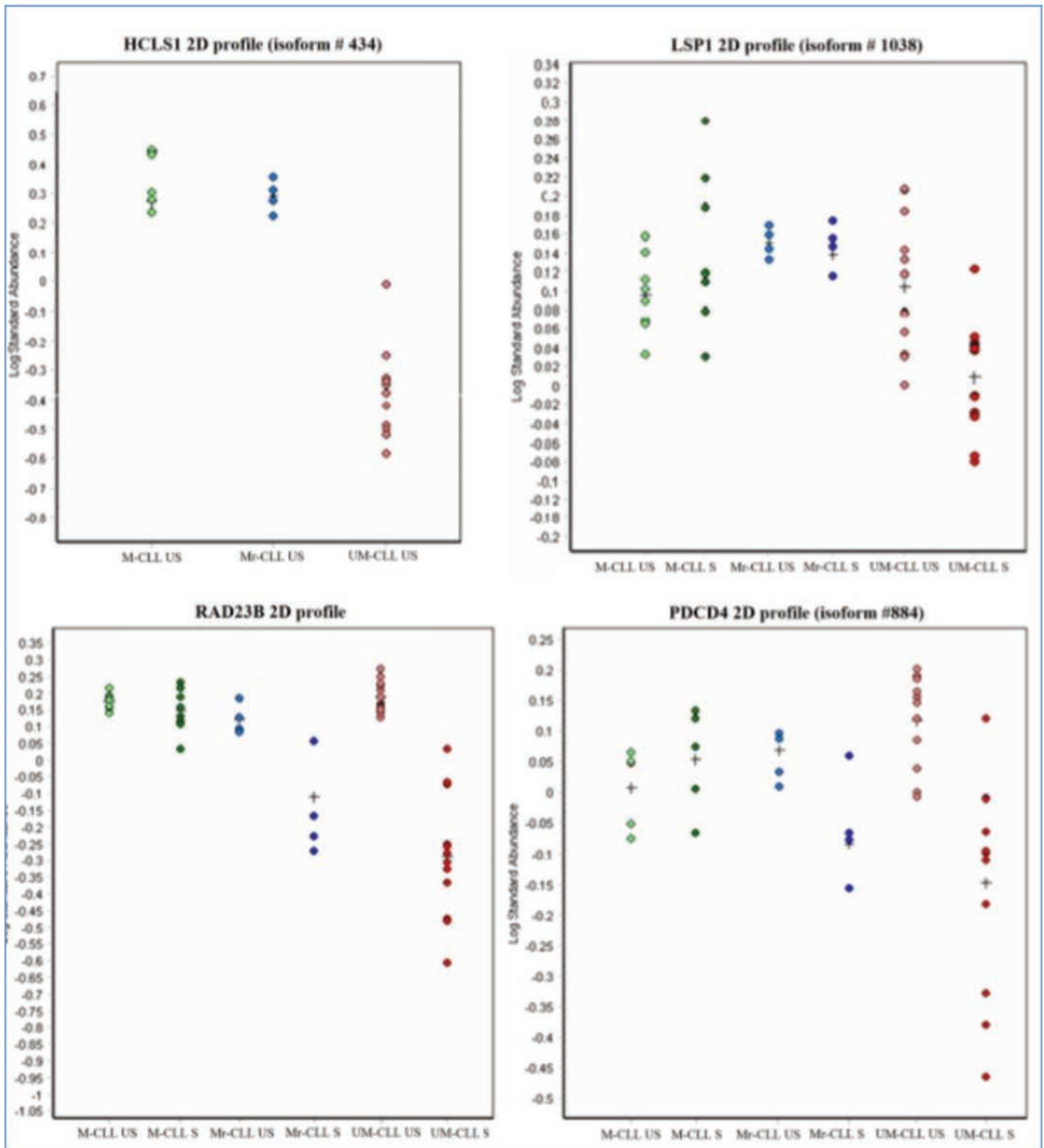


Figure 27 : Analyse descriptive des profils d'expression des échantillons M3 d'une LLC de sous-type intermédiaire (gènes *IGVH* mutés mais réponse à la stimulation du BCR)

II. Chapitre 2 : Apport de la protéomique à l'étude de la macroglobulinémie de Waldenström

Vingt-huit échantillons ont été utilisés pour réaliser cette étude protéomique. Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau 16.

Echantillon	Origine des cellules	Age	Sexe	Diagnostic	Utilisation
WM1_BM	Moelle	79	H	MW (IgM kappa) avec trisomie 4	E2D - qPCR
WM1_B	Sang	79	H	MW (IgM kappa) avec trisomie 4	E2D
WM2_B	Sang	66	H	MW (IgM kappa)	E2D
WM3_BM	Moelle	72	H	MW (IgM kappa)	E2D
WM4_B	Sang	58	H	MW (IgM kappa)	WB
WM5_BM	Moelle	59	F	MW (IgM kappa) à caryotype normal	WB
WM6_BM	Moelle	59	H	MW (IgM kappa)	WB
WM7_BM	Moelle	63	F	MW (IgM lambda)	WB
WM8_BM	Moelle	64	H	MW (IgM kappa)	qPCR
WM9_BM	Moelle	51	H	MW (IgM lambda) à caryotype normal	qPCR
WM10_BM	Moelle	32	H	MW (IgM kappa)	qPCR
MZL1_B	Sang	61	F	LZM (IgM kappa)	E2D
MZL2_B	Sang	57	F	LZM (IgM lambda) avec trisomies 3 et 18	E2D
MZL2_BM	Moelle	57	F	LZM (IgM lambda) avec trisomies 3 et 18	E2D - WB
MZL3_BM	Moelle	59	F	LZM (IgM kappa)	WB - qPCR
MZL4_B	Sang	64	F	LZM (IgM kappa) à caryotype normal	WB - qPCR
CLL1	Sang	89	H	LLC (<i>IGVH</i> non mutés) avec del11q	E2D
CLL2	Sang	67	F	LLC (<i>IGVH</i> non mutés) avec del13q et del17p	E2D
CLL3	Sang	64	H	LLC (<i>IGVH</i> mutés) à caryotype normal	E2D
CLL4	Sang	77	H	LLC avec del13q	WB
CLL5	Sang	78	H	LLC (<i>IGVH</i> mutés) avec trisomie 12	WB
CLL6	Sang	54	H	LLC (<i>IGVH</i> non mutés) avec del16q et del17p	qPCR
CLL7	Sang	52	H	LLC (<i>IGVH</i> mutés) à caryotype normal	qPCR
CLL8	Sang	78	H	LLC	qPCR
CLL9	Sang	79	F	LLC avec del13q	qPCR
CLL10	Sang	72	H	LLC	qPCR
MCL1_BM	Moelle	65	H	LCM avec t(11;14)	qPCR
MCL2_B	Sang	57	H	LCM avec t(11;14)	qPCR

Tableau 16 : Caractéristiques des échantillons inclus dans l'étude protéomique MW

Une analyse en E2D-DIGE a été réalisée pour comparer les profils d'expression de 3 échantillons issus de MW, 3 échantillons issus de LZM et 4 échantillons issus de LLC. Initialement, 2 extraits protéiques supplémentaires avaient été inclus dans ce travail, issus de patients présentant un syndrome lymphoprolifératif frontière entre MW et LZM. Devant l'absence de diagnostic de certitude, la recherche de mutation de *MYD88* n'étant pas possible au moment de ce travail, ces 2 échantillons supplémentaires ont été exclus de l'analyse.

A. Mise en évidence d'une signature protéomique spécifique de la maladie de Waldenström

L'analyse en composantes principales de l'image globale du protéome des 3 échantillons de MW, des 3 échantillons de LZM et des 4 échantillons de LLC est présentée dans la figure 27. Cette analyse met en évidence que les échantillons issus de MW se regroupent de façon distincte de ceux issus de LZM et de LLC.

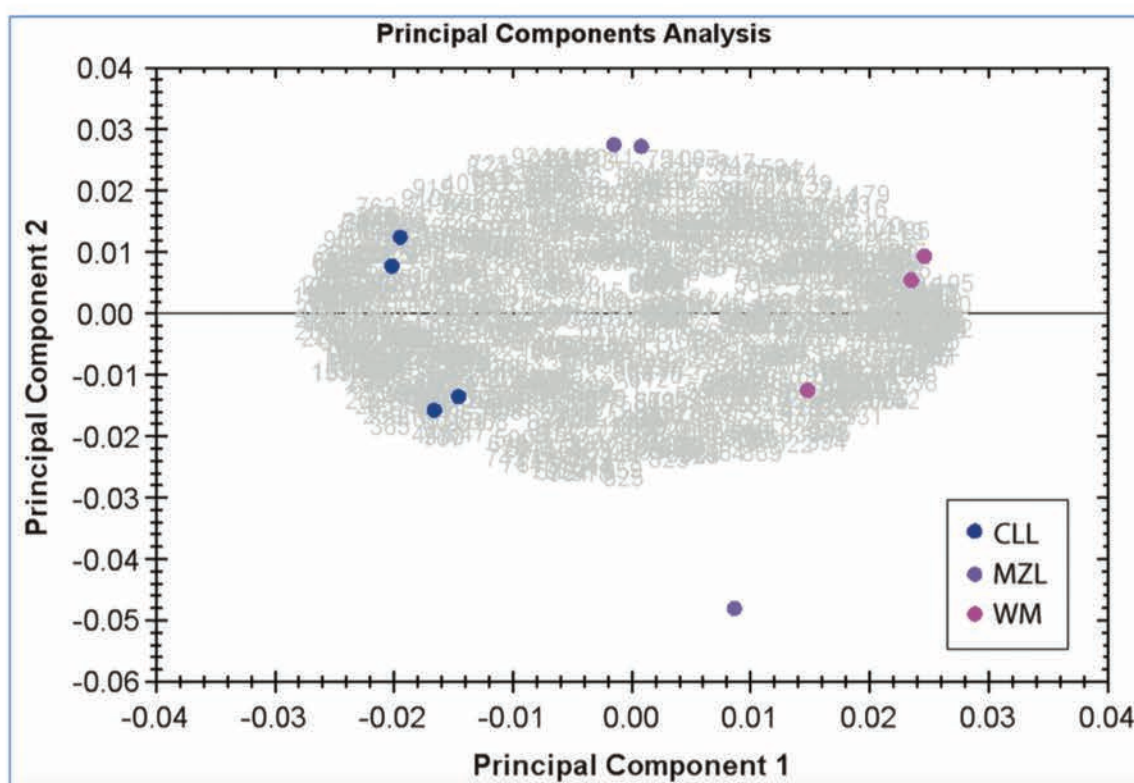


Figure 28 : Analyse en composantes principales du protéome de MW en comparaison avec des LZM et des LLC

En effet, le contenu protéique des cellules diffère entre les MW et les LZM d'une part, et les MW et les LLC d'autre part. Le tableau 16 présente les principaux polypeptides différemment exprimés entre les échantillons de MW, LZM et LLC. Parmi les 1051 spots polypeptidiques analysés, 356 ont une expression différentielle entre les groupes, mais seulement 22 ont été retenus comme significativement différents, avec un ratio de plus de 2,5 (Tableau 17).

Numéro Uniprot	MW vs LLC	MW vs LZM	Protéine	Gène	q-value	Couverture de séquence	Nombre de peptides	Fonctions
Q96G03	14	3,3	Phosphoglucomutase 2	<i>PGM2</i>	0,001	10 %	5	Activité catalytique, métabolisme énergétique
P08133	14	3	Annexin A6	<i>ANXA6</i>	0,0006	36 %	23	Communication cellulaire, transduction du signal
P61978	5,8	1,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	<i>HNRNPK</i>	0,001	41 %	15	Régulation du métabolisme des acides nucléiques
P06396	5,2	1,2	Gelsolin	<i>GSN</i>	0,006	22 %	12	Cytosquelette, croissance cellulaire
P20700	4,8	1,7	Lamin-B1	<i>LMNB1</i>	0,009	32 %	21	Molécule structurale, croissance cellulaire
P06396	4,4	1,6	Gelsolin	<i>GSN</i>	0,01	26 %	16	Cytosquelette, croissance cellulaire
P31150	3,9	2	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	<i>GDI1</i>	0,006	27 %	8	Communication cellulaire, transduction du signal
Q8TBC4	3,4	3,4	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	<i>UBA3</i>	0,01	21 %	8	Activité protéase, métabolisme protéique
P08133	3,3	2,8	Annexin A6	<i>ANXA6</i>	0,004	36 %	24	Communication cellulaire, transduction du signal
P06396	3,3	-1	Gelsolin	<i>GSN</i>	0,02	26 %	15	Cytosquelette, croissance cellulaire
Q9GZZ9	2,5	1,5	Ubiquitin activating enzyme E1 domain containing 1	<i>UBA5</i>	0,006	19 %	5	Métabolisme protéique
P14866	-2,5	-1,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	<i>HNRNPL</i>	0,006	12 %	5	Régulation du métabolisme des acides nucléiques
Q04760	-2,6	1,6	Lactoylglutathione lyase	<i>GLO1</i>	0,005	26 %	7	Activité lyase, métabolisme énergétique
O76003	-2,9	2,6	Glutaredoxin-3	<i>GLRX3</i>	0,0002	22 %	6	Inconnue
Q8WXX5	-3	-2,3	Dna J homolog subfamily C member 9	<i>DNAJC9</i>	0,02	43 %	13	Protéine chaperonne, métabolisme protéique
P13489	-3,1	1,1	Ribonuclease inhibitor	<i>RNH1</i>	0,002	15 %	6	Régulation du métabolisme des acides nucléiques
P13639	-3,5	-1,6	Elongation factor 2	<i>EEF2</i>	0,003	18 %	14	
P13639	-4	-2,1	Elongation factor 2	<i>EEF2</i>	0,01	3 %	2	
P26038	-4,5	-2,5	Moesin	<i>MSN</i>	0,03	23	13	Cytosquelette, croissance cellulaire
P12956	-5,6	-3,4	X-ray repair cross-complementing protein 6	<i>XRCC6</i>	0,04	7 %	5	Régulation du métabolisme des acides nucléiques
P12956	-7,4	-3,3	X-ray repair cross-complementing protein 6	<i>XRCC6</i>	0,04	41 %	23	
P30041	-12	-4,4	Peroxiredoxin-6	<i>PRDX6</i>	0,02	46 %	10	Métabolisme énergétique

Tableau 17 : Spots polypeptidiques différentiellement exprimés entre les échantillons de MW, LZM et LLC

Onze spots polypeptidiques correspondant à 8 protéines ont une expression augmentée dans la MW par comparaison aux échantillons de LLC ou de LZM. L'expression de 9 protéines (soit 11 spots polypeptidiques) est en revanche diminuée dans la MW par rapport à la LLC ou au LZM. La plupart de ces protéines sont des molécules structurales du cytosquelette telles la *Gelsolin*, la *Moesin*, la *Lamin-B1* ou ont un rôle dans le métabolisme énergétique ou protéique.

Les protéines les plus différenciellement exprimées sont la *Phosphoglucomutase 2* et l'*Annexin A6* (augmentées dans la MW), ainsi que la *X-ray repair cross-complementing protein 6* ou K70 et la *Peroxiredoxin-6* (diminuées dans les échantillons issus de MW).

A noter enfin qu'il n'a pas été observé de différence d'expression protéique entre les échantillons de moelle et de sang dans notre étude.

B. Existence d'une sous-expression de Ku70/XRCC6 dans la maladie de Waldenström

La protéine Ku70 (*X-ray repair cross-complementing protein 6*) étant un des constituants du complexe NHEJ impliqué notamment dans le mécanisme de *switch* isotypique (défectueux dans la MW), nous avons choisi d'étudier de façon plus approfondie l'expression de cette protéine particulière.

La figure 29 illustre, via des représentations en 2 et 3 dimensions, la sous-expression d'une isoforme de Ku70 dans les échantillons de MW par rapport à ceux issus de LZM ou de LLC, mise en évidence grâce à la technologie E2D-DIGE. Les 2 isoformes de Ku70 ont le même profil d'expression, sans argument pour une modification post-traductionnelle.

Nous avons souhaité valider ces résultats par Western-Blot, et la figure 30 confirme l'existence d'une nette diminution de l'expression de Ku70 dans 4 échantillons issus de patients supplémentaires.

Afin de déterminer si cette diminution d'expression protéique était liée à une diminution du transcrit de *XRCC6* ou à une régulation post-transcriptionnelle, nous avons mesuré, par PCR quantitative en temps réel, l'expression de *XRCC6* au niveau de l'ARN de cellules de MW en comparaison à d'autres hémopathies lymphoïdes B. Ces analyses objectivent une diminution significative de l'expression du transcrit de *XRCC6* dans la MW, comme le représente la figure 31.

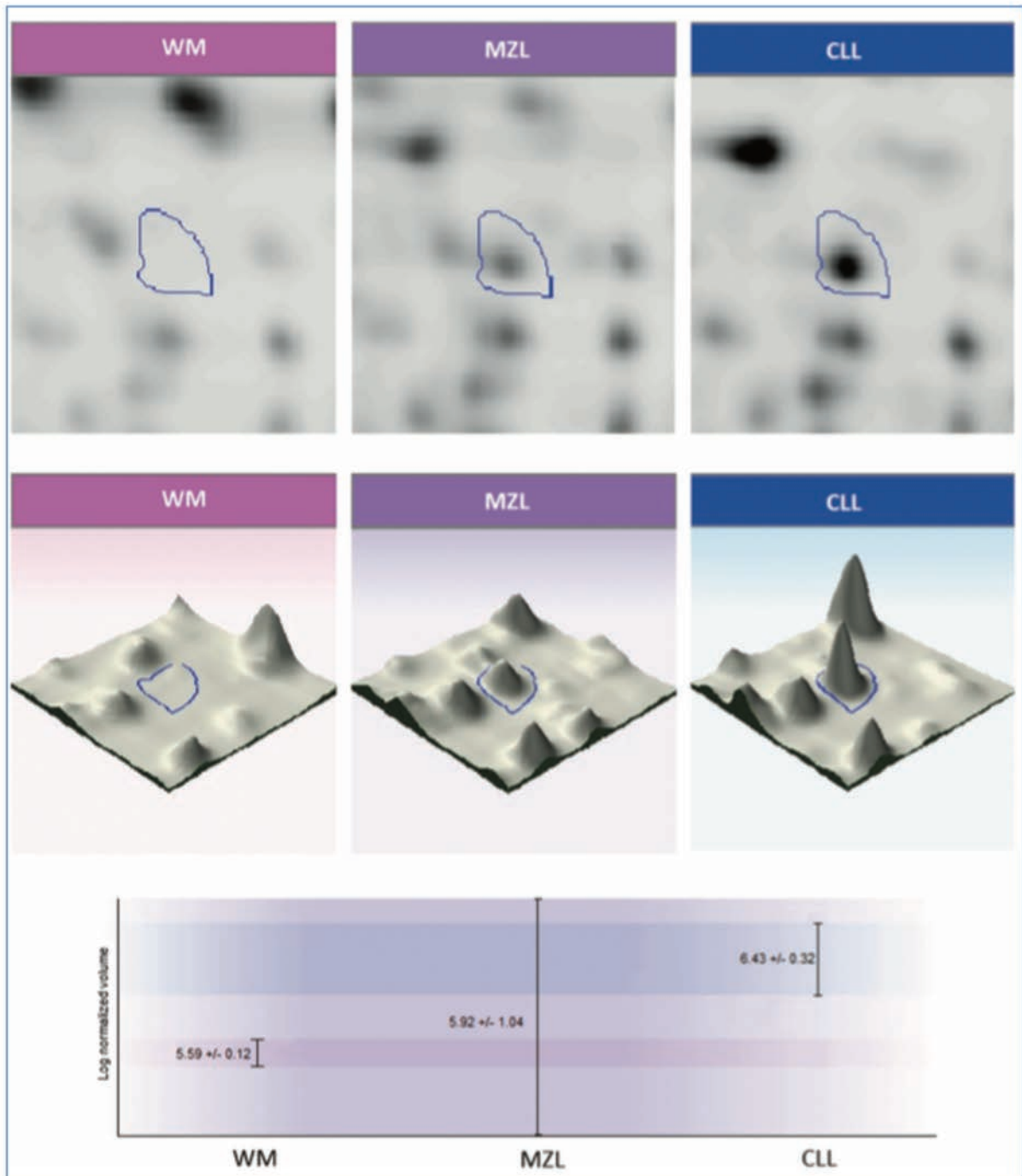


Figure 29 : Profil protéomique E2D-DIGE de Ku70 dans les MW en comparaison avec des LZM et des LLC

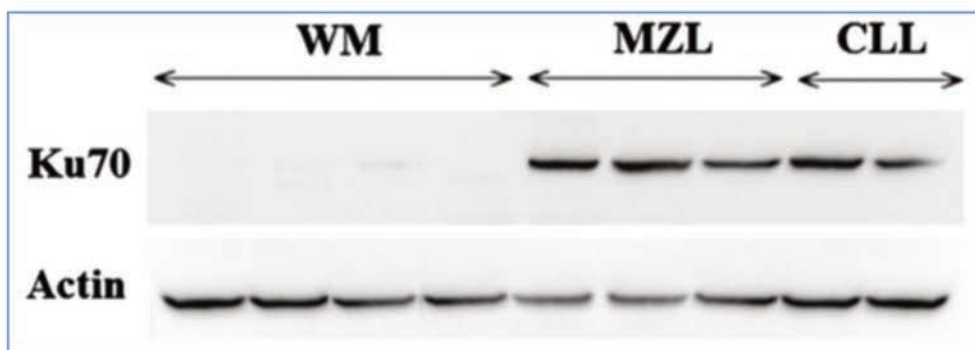


Figure 30 : Diminution de l'expression de la protéine Ku70 dans les MW par rapport aux LZM et aux LLC

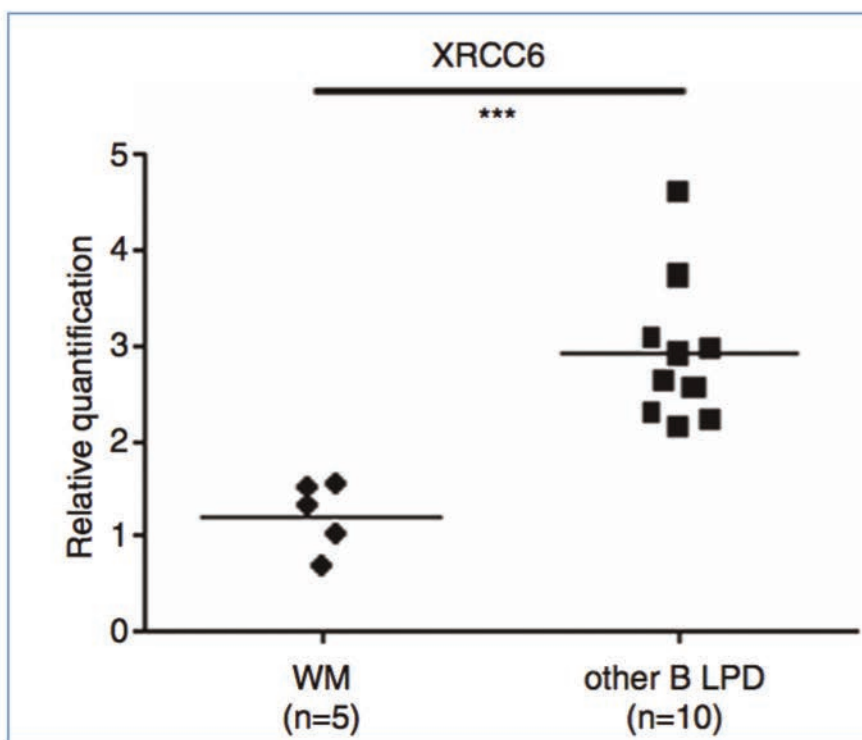


Figure 31 : Diminution de l'expression de l'ARN de XRCC6 dans les MW par rapport à d'autres hémopathies lymphoïdes B

DISCUSSION - PERSPECTIVES

I. Apport d'une technologie de type E2D-DIGE dans les hémopathies lymphoïdes B

Depuis les premières études protéomiques réalisées dans les années 1970, les progrès technologiques, particulièrement en E2D, avaient déjà permis des comparaisons des profils protéomiques de cellules de LLC, en relation avec les anomalies cytogénétiques²⁹⁴ ou le statut mutationnel *IGVH*^{295,296}. Tilmann Voss et son équipe ont démontré en 2001 une corrélation entre les profils protéomiques et les données cliniques : le pronostic défavorable des patients présentant une LLC avec del(11q) ou une del(17p) en comparaison avec ceux ayant une LLC avec del(13q) a été associé à une expression augmentée d'HSP 27 (*Heat-Shock Protein 27*), et à une expression diminuée de la *thioredoxin peroxidase* et de la *protein disulfite isomerase*²⁹⁴. De façon intéressante, ces enzymes sont impliquées dans la résistance aux drogues. L'équipe de Duncan Cochran a utilisé une technique d'E2D avec coloration argentique pour mettre en évidence en 2003 que la nucléophosmine était exprimée uniquement dans les LLC à gènes *IGVH* mutés et que les niveaux d'expression de trois protéines, la *F-actin-capping protein subunit*, la protéine 14-3-3 et la *laminin-binding protein precursor*, étaient augmentés significativement dans les LLC à gènes *IGVH* mutés comparativement aux LLC à gènes *IGVH* non mutés²⁹⁵. Enfin, l'équipe italienne a réalisé une étude protéomique en E2D classique également, rapportée par Cristina Scielzo en 2005 dans *The Journal of Clinical Investigation*. Ce travail met en évidence principalement une différence d'expression de la protéine HCLS1 ou HS1 (*Haematopoietic Lineage Cell-Specific Protein 1*)²⁹⁶. En effet, la plus grande partie de cette protéine est constitutivement phosphorylée dans les échantillons de LLC à gènes *IGVH* non mutés, contrairement aux échantillons à gènes *IGVH* mutés. HCLS1, une protéine exprimée principalement dans les cellules hématopoïétiques, est phosphorylée sur ses résidus tyrosine sous l'effet d'une stimulation du BCR et se lie à plusieurs protéines du cytosquelette à la fois dans les cellules B normales et les cellules de LLC. Plus récemment, la même équipe a montré son rôle central dans la régulation de la migration cellulaire et du *homing* des cellules de LLC³⁰⁵.

Pour explorer d'autres protéines potentiellement modulées par la stimulation du BCR, nous avons étudié la cinétique des profils d'expression protéique à différents temps après stimulation dans deux sous-types de LLC, comparant des échantillons à gènes *IGVH* mutés et ZAP-70 négatifs, et d'autres à gènes *IGVH* non mutés et ZAP-70 positifs. Nous avons choisi une stimulation forte et courte, utilisant une anti-IgM humaine de type F(ab')₂ biotinylée, afin de définir un T0 précis et pour être dans les mêmes conditions expérimentales que pour l'étude transcriptomique précédemment réalisée⁶⁴. Il est communément démontré que l'activation d'une signalisation soutenue, prolongée, de la voie du BCR conduit à une survie cellulaire des cellules de LLC, alors qu'une stimulation courte par anti-IgM soluble induit une apoptose⁶³. Du fait du choix de comparaisons multiples (2 types de LLC, échantillons stimulés et non stimulés, 4 temps de cinétique aboutissant à 16 échantillons par patient), le plan expérimental

de cette étude en E2D-DIGE n'a pu inclure que 3 patients dans chaque groupe (3 UM et 3 M), soit 48 échantillons à analyser. Néanmoins, l'utilisation de méthodes statistiques particulières permettant de réduire le taux de faux positifs (FDR) et la confirmation en Western-Blot de certains profils d'expression dans une plus grande cohorte ont permis de valider les résultats initiaux.

L'analyse non supervisée en composantes principales démontre la capacité de la protéomique à distinguer les deux sous-types de LLC, à gènes *IGVH* mutés et non mutés, sur l'image globale du protéome, alors que les études de profils d'expression génique concluaient à un profil d'expression commun entre les deux sous-types, avec un faible nombre de gènes différentiellement exprimés^{18,19}. Parmi les différentes protéines exprimées différemment entre les échantillons non stimulés à gènes *IGVH* mutés et non mutés, nous avons pu mettre en évidence que HCLS1 est présente principalement sous forme d'isoformes acides phosphorylées dans les échantillons à gènes *IGVH* non mutés, alors que les isoformes basiques non phosphorylées sont prédominantes dans les LLC à gènes *IGVH* mutés. Ces résultats sont concordants avec ceux du travail de Scielzo *et al*, et nous avons pu identifier, en utilisant des conditions expérimentales légèrement différentes (gels de 24 cm et gradient de pI entre 4 et 7, versus gels de 18 cm et gradient de pI entre 3 et 10), 4 isoformes différentes de HCLS1 selon le statut de phosphorylation.

Un autre exemple de protéine différentiellement exprimée en dehors de toute stimulation est la protéine PDCD4 (Annexe 1, Tableau 5 du manuscrit) qui est légèrement diminuée dans les échantillons non stimulés de LLC à gènes *IGVH* non mutés. PDCD4 est une protéine suppresseur de tumeur inhibant la transformation cancéreuse, la progression tumorale et la traduction protéique. La perte de son expression constitue un facteur pronostique indépendant d'évolution péjorative dans les cancers solides, et notamment dans le cancer colo-rectal³⁰⁶. Les principales autres protéines différentiellement exprimées entre les échantillons à gènes *IGVH* mutés et non mutés sont des molécules impliquées dans la transduction du signal, la régulation de la réponse immunitaire, le métabolisme protéique, la croissance cellulaire et l'apoptose.

Après stimulation, l'ACP sépare les échantillons stimulés et non stimulés seulement dans le sous-type de LLC à gènes *IGVH* non mutés, et les analyses statistiques confirment le plus grand nombre de protéines différentiellement exprimées entre les échantillons US et S dans ce sous-type (25 spots polypeptidiques différentiels versus 6 dans le groupe de LLC à gènes *IGVH* mutés). Ces résultats s'inscrivent dans la logique des données de la littérature qui suggèrent que les cellules de LLC à gènes *IGVH* non mutés sont plus sensibles à la stimulation anti-IgM que celles à gènes *IGVH* mutés^{44,45}. Une des protéines intéressantes dont l'expression augmente après stimulation du BCR des cellules à gènes *IGVH* non mutés est HNRNPK, protéine qui joue un rôle dans la maturation des ARN messagers, et dont l'implication dans la voie de signalisation du BCR a été démontrée dans une lignée de cellules B, Ramos³⁰⁷. Une autre protéine impliquée dans la voie de signalisation du BCR est LSP1 dont l'expression est modifiée après stimulation uniquement dans les échantillons à gènes *IGVH* non mutés. LSP1 est une

protéine du cytosquelette liant l'actine F, connue pour être un substrat de la PKC dans les cellules de LLC³⁰⁸. La surexpression de LSP1 phosphorylée dans les cellules de LLC par rapport aux cellules B normales s'explique par une augmentation d'activité kinase de la PKC dans ces cellules. Nos résultats suggèrent que LSP1 est phosphorylée dans les cellules de LLC uniquement dans les échantillons à gènes *IGVH* non mutés. D'autres protéines apparaissent diminuées après stimulation du BCR. C'est tout d'abord le cas de la protéine suppresseur de tumeur PDCD4, dont l'expression est diminuée après stimulation dans les cellules à gènes *IGVH* non mutés et celles à gènes mutés mais répondant en termes d'apoptose à la stimulation. A noter que PDCD4 est régulée négativement par un microARN, miR-21³⁰⁹, décrit comme largement surexprimé dans la LLC³¹⁰ et impliqué dans les mécanismes de résistance à la fludarabine³¹¹. Par ailleurs, la protéine la plus modulée après stimulation du BCR est RAD23B, protéine qui joue un rôle important à la fois dans la réparation de l'ADN et l'activation de p53³¹². Nos données mettent en évidence une diminution importante de l'expression de l'isoforme #929 de RAD23B après stimulation dans les échantillons de LLC à gènes *IGVH* non mutés et les expériences de validation par Western-Blot apportent un complément d'information, en révélant l'apparition d'une bande de plus petite taille, suggérant un clivage de RAD23B après stimulation. Ce phénomène a par ailleurs déjà été décrit dans une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt³¹³. La stimulation de cellules BL60 avec un anti-IgM F(ab')₂ induit en effet la modification de 12 protéines appelées *apoptosis-associated proteins*, parmi lesquelles RAD23B mais aussi LSP1, HNRPA1, lamine et actine. Le clivage de certaines de ces protéines (mais pas RAD23B) peut être inhibé par un inhibiteur sélectif irréversible de la caspase 3. Ces données permettent de formuler l'hypothèse que la présence d'une isoforme de plus petite taille de RAD23B est liée à un clivage de la protéine entière pendant le mécanisme d'apoptose déclenché par la stimulation par anti-IgM.

Un autre résultat important de ce travail découle des observations faites au sujet des cellules du patient particulier M3. Si nous avons initialement craint une erreur dans les expérimentations (statut mutationnel erroné ? anomalie dans la procédure de stimulation ?), l'obtention des mêmes résultats après nouvelles manipulations et pour d'autres cellules issues d'autres patients utilisés pour les techniques de Western-Blot a permis de confirmer l'existence d'un sous-type intermédiaire de cellules de LLC combinant un statut indolent *IGVH* muté et des caractéristiques d'agressivité concernant le profil protéomique. Un travail de l'équipe de Florence Cymbalista a également identifié un groupe de patients porteurs d'une LLC cliniquement évolutive, dont les cellules étaient ZAP-70 négatives et porteuses de gènes *IGVH* mutés, qui répondaient à la stimulation *in vitro* par anti-IgM. Dans cette étude, 9 des 38 LLC à gènes *IGVH* mutés correspondaient à cette description⁶¹. Dans notre travail et dans cette étude, tous les cas non répondeurs à la stimulation étaient des cellules à gènes *IGVH* mutés. Le groupe des cellules *IGVH* non mutés est très homogène, toutes étant répondeuses à la stimulation. Un nombre non négligeable de cas de LLC à gènes *IGVH* mutés sont également répondeurs à l'activation du BCR. Une étude plus approfondie des protéines associées à cette réponse et à l'agressivité cellulaire pourrait permettre de mieux comprendre la biologie de ce sous-type intermédiaire de LLC.

La MW avait été précédemment explorée par des techniques de profil d'expression génique, mais n'avait pas fait l'objet d'études protéomiques globales et comparatives. Nous avons pu présenter ici la première étude protéomique utilisant l'E2D concernant cette hémopathie lymphoïde B rare et de physiopathologie encore mal connue, même si une mutation récurrente de *MYD88* a depuis été découverte.

Ce travail permet de mettre en évidence, outre une importante sous-expression de Ku70, 17 protéines dont l'expression est significativement différente par rapport à des cellules de LLC ou de LZM. Ces protéines différentielles sont impliquées dans le métabolisme glucidique, la communication cellulaire, le métabolisme protéique, la régulation de la traduction ou de la liaison des acides nucléiques. La protéine phosphoglucomutase 2 apparaît très surexprimée dans les échantillons de MW comparativement à ceux de LLC ou LZM. A l'inverse, la glutaredoxine 3, la lactoyl glutathione lyase et la peroxiredoxine 6 ont une expression largement diminuée dans la MW. La lactoyl glutathione lyase appartient au complexe glyoxalase, qui catalyse la conversion de méthylglyoxal en D-lactate et qui a été impliquée dans des mécanismes de résistance aux drogues anti-tumorales³¹⁴. Les peroxiredoxines constituent une famille d'enzymes anti-oxydantes et sont décrites comme des protéines suppresseurs de tumeurs chez la souris³¹⁵. La peroxiredoxine est une enzyme qui possède des activités peroxydase et phospholipase A2, avec un rôle décrit dans l'apoptose induite par la voie du TNF et par le stress oxydatif³¹⁶.

Les perspectives liées aux résultats impliquant des protéines du cytosquelette et impliquant Ku70 sont détaillées ci-après.

II. Perspectives

A. Expression et régulation de *PDCD4* dans la LLC

Nos résultats mettent en évidence une diminution d'expression protéique de *PDCD4* après stimulation du BCR dans les formes *IGVH* UM de LLC.

Le gène codant pour la protéine *PDCD4* a été cloné et séquencé en 1995³¹⁷ et il a été montré que les conditions de culture cellulaire conduisant à une apoptose induisaient une forte augmentation de la transcription de ce gène. L'existence de deux isoformes de *PDCD4* a été prouvée en 2002, et une étude de la séquence peptidique a mis en évidence que la protéine possédait deux séquences d'export nucléaire (*NES Nuclear Export Sequence*), de multiples sites de phosphorylation de kinases et deux domaines d'interaction avec des facteurs d'initiation de la traduction (*eIF eukaryotic Initiation Factor*) appelés domaines MA3³¹⁸. Le rôle de *PDCD4* reste mal connu, notamment en ce qui concerne son implication dans le phénomène d'apoptose mais de nombreux éléments suggèrent que cette protéine agit comme un facteur suppresseur de tumeur, via plusieurs mécanismes :

- action comme un inhibiteur de la traduction, d'une part en interagissant physiquement avec *eIF4A*, ce qui inhibe son activité hélicase, et d'autre part en se fixant sur *eIF4G* via son domaine MA3 ce qui empêche l'interaction *eIF4G/eIF4A*^{318,319}

- rôle d'inhibition de la prolifération cellulaire par inhibition du cycle cellulaire en induisant une surexpression de la protéine *p21Waf1/Cip1* (inhibiteur de *Cdk cycline dependent kinase*), ce qui réprime la transcription du facteur de progression du cycle cellulaire *CDK1/cdc2*³²⁰

Ces mécanismes d'action dépendent de la localisation cellulaire de *PDCD4*. Si son activité dans le noyau est de réguler l'expression transcriptionnelle, la redistribution dans le cytoplasme de *PDCD4* dans certaines conditions expérimentales est associée à une action régulatrice de la traduction des protéines. La phosphorylation de *PDCD4* pourrait influencer sur sa localisation car la phosphorylation par la kinase Akt (ou PKB) entraîne sa translocation dans le noyau³²¹, et sur sa régulation car la phosphorylation par la voie PI3K/mTOR/S6K1 conduit à son ubiquitinylation et sa dégradation dans le protéasome³²².

Plusieurs études ont également abordé l'existence de modifications de la protéine *PDCD4* dans la LLC. Une étude de la signalisation *CXCL12/CXCR4* permet de mettre en évidence une phosphorylation de *PDCD4* après activation de *CXCR4*³²³. Cette phosphorylation de *PDCD4* conduit probablement à sa dégradation, diminuant son activité suppresseur de tumeur. Dans un autre travail analysant un sous-type particulier de LLC à gènes *IGVH* mutés mais de pronostic péjoratif, utilisant préférentiellement le gène *V3-23*³²⁴, il est montré une diminution de l'expression de plusieurs facteurs suppresseurs de tumeurs, et notamment celle de *PDCD4*. L'hypothèse avancée est une régulation négative de *PDCD4* par deux microARN, les *miR-15a* et *miR-16a*.

Nous avons poursuivi l'étude de *PDCD4* dans la LLC dans deux directions.

- Tout d'abord, nous avons analysé l'expression transcriptionnelle de *PDCD4* à l'état basal et après stimulation. Des résultats préliminaires mettent en évidence une diminution modérée de l'expression transcriptionnelle de *PDCD4* dans les échantillons de LLC à gènes *IGVH* non mutés (UM)

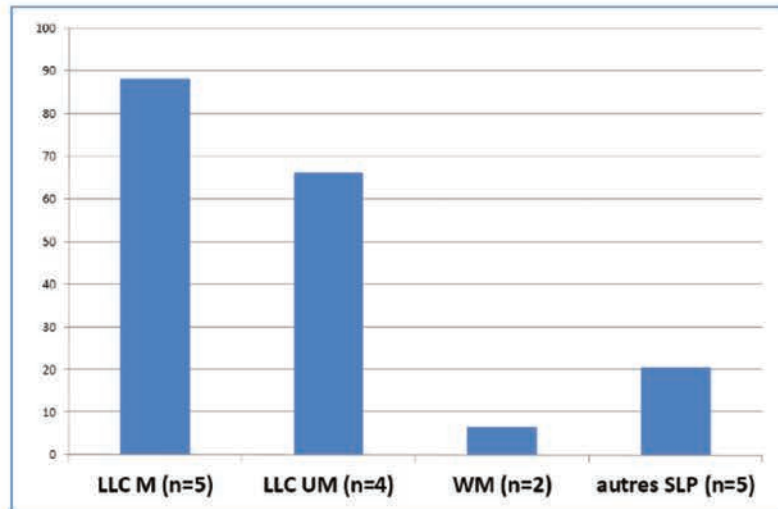


Figure 32 : Expression transcriptionnelle de *PDCD4* relative à celle de la β -actine en dehors de toute stimulation (données non publiées)

- Sur l'hypothèse que la stimulation du BCR entraîne une phosphorylation sur sérines (signal d'une ubiquitylation en vue d'une dégradation protéique par le protéasome), nous avons étudié la variation des isoformes protéiques phosphorylées de *PDCD4* (phosphoS67 et phosphoS457) après stimulation par anti-IgM. Nous n'avons pas mis en évidence de phosphorylation sur la sérine 67. En revanche, de premiers résultats suggèrent une phosphorylation sur la sérine 457 précocément après stimulation du BCR, et méritent d'être confirmés.

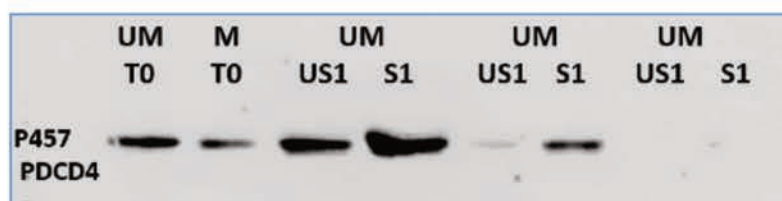


Figure 33 : Données préliminaires d'expression protéique de *PDCD4* phosphorylée sur S457 après stimulation

Une dernière hypothèse que nous souhaiterions vérifier est celle du rôle régulateur d'un microARN non codant, miR-21. Nous envisagerions pour cela de comparer le niveau d'expression de miR-21 dans les formes à gènes *IGVH* mutés et non mutés et d'étudier l'expression de *PDCD4* en présence d'un anti-miR-21, de façon à déterminer si cet ARN non codant joue un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de *PDCD4* dans la LLC.

B. Rôle des molécules du cytosquelette dans la LLC et la MW

Nous avons mis en évidence dans ces travaux que de multiples protéines du cytosquelette étaient dérégulées dans les formes agressives de LLC (notamment après activation du BCR) et dans la MW.

Nous avons pu montrer une phosphorylation de plusieurs protéines telles la lamine, la plastine ou la vimentine après stimulation du BCR des LLC. Cette activation du cytosquelette a récemment été impliquée dans la migration cellulaire et le homing, et une autre protéine phosphorylée après stimulation, HCLS1, a été démontrée comme ayant un rôle central dans ces mécanismes³⁰⁵.

La gelsoline est une protéine liant l'actine, qui est un régulateur majeur de l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine^{325,326}. L'expression de la gelsoline a été décrite comme étant augmentée dans des cellules de leucémie aiguë résistantes à la vincristine, alors que la moesine est diminuée dans ces mêmes cellules³²⁷. La moesine, dont l'expression est diminuée dans la MW dans notre étude, appartient à la famille des protéines ERM agissant comme des liens entre les membranes plasmiques et les filaments d'actine, avec un rôle dans les fonctions de reconnaissance cellulaire, de signalisation et de migration cellulaire.

C. Mécanismes de la sous-expression de XRCC6 / Ku70 dans la MW

Nous avons donc montré que la MW avait un profil protéomique spécifique, permettant de la distinguer des autres SLP. L'étude des protéines différentiellement exprimées a révélé, sur un faible nombre de patients, une diminution de l'expression de la protéine Ku70 (codée par le gène *XRCC6* et appartenant au complexe NHEJ) dans les lymphocytes B tumoraux de la MW par rapport à ceux d'autres SLP. Nous avons également mis en évidence par PCR quantitative une diminution de l'expression transcriptionnelle de *XRCC6*.

L'hétérodimère Ku (Ku70/Ku86) a initialement été découvert comme un auto-antigène dans le contexte de maladies auto-immunes³²⁸. Les gènes codant pour ces protéines sont situés dans les régions 22q13 et 2q33-35³²⁹. Ku est une sous-unité liant l'ADN d'une protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK), qui est une sérine-thréonine kinase. Ku lie des fragments d'ADN double brin et recrute la sous-unité catalytique de la DNA-PK³³⁰. Le complexe de réparation de l'ADN NHEJ utilise ce système de la DNA-PK, et a un rôle dans le développement lymphoïde, notamment dans les étapes de recombinaison VDJ et de la commutation isotypique. En pathologie, l'activité DNA-PK et l'augmentation de l'expression de Ku70 et Ku86 ont été décrites comme corrélées à la résistance de drogues notamment dans le contexte de la LLC³³¹. D'autre part, des défauts mineurs de la voie du NHEJ ont été par ailleurs associés à une prédisposition au développement de leucémies³³². Des déficits immunitaires avec des anomalies de réparation de l'ADN et des polymorphismes génétiques de composants du NHEJ

ont été associés à une susceptibilité de développer des hémopathies lymphoïdes, suggérant qu'une anomalie du complexe NHEJ pourrait favoriser la lymphomagenèse. Néanmoins, aucune mutation ou délétion de Ku86 n'a été observée dans la LLC ou la LAL³³³. Des analyses par PCR quantitative ont mis en évidence une diminution de l'expression de *XRCC6* dans des hémopathies lymphoïdes³³⁴, mais la MW n'a pas été étudiée dans ce travail.

La faible expression de *XRCC6* pourrait être liée à des mécanismes génétiques ou épigénétiques, ayant été décrits comme impliqués dans la MW³³⁵, ou à un plus large phénomène de régulation transcriptionnelle négative, par exemple via Blimp1³³⁶, qui est un répresseur transcriptionnel impliqué dans la différenciation terminale des cellules B en plasmocytes.

Nous souhaitons désormais par conséquent analyser les mécanismes sous-tendant potentiellement la sous-expression de *XRCC6* / Ku70 dans la MW. Est-elle liée à une mutation dans le gène *XRCC6* ou de son promoteur ? Est-elle associée à une diminution d'expression des autres molécules du NHEJ (Ku80/*XRCC5*, *XRCC4*, DNA ligase IV/*LIG4*, NBN, *MRE11A*, *RAD50*) ? Est-elle présente dans toutes les cellules de MW ? Est-elle en lien avec la présence des mutations L265P de *MYD88* et S338X de *CXCR4* ?

Ce projet, rédigé avec l'aide de la Direction de la Recherche de l'Innovation du CHU de Nancy, a obtenu un financement de la Fondation pour la Recherche Médicale, et son résumé est présenté en Annexe 3.

En conclusion, ce travail nous a permis de confirmer certaines données déjà connues et de mettre en évidence de nouvelles protéines différemment exprimées entre des sous-types de pathologies ou entre des états d'activation différents. La protéomique permet d'aborder différemment l'étude de la LLC et de la MW et apporte des données complémentaires à celles fournies par les études génomiques, comme nous avons pu le suggérer dans le contexte de la LLC en comparant les résultats transcriptomiques et protéomiques (Annexe 1). Cela permet d'avancer un peu plus dans la compréhension de ces pathologies et surtout de formuler de nouvelles hypothèses et poser de nouvelles questions.

REFERENCES

1. Piller, G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol* **112**, 282–92 (2001).
2. Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H. & Isaacson, P. G. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* **112**, 4384–4399 (2008).
3. Jaffe, E., Harris, N., Stein, H. & Vardiman, J. *World health organization classification of tumors*. (Lyon : IARC Press, 2001).
4. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. in (IARC Press, 2008).
5. Harris, N. L. *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361–1392 (1994).
6. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J. Clin. Pathol.* **42**, 567–584 (1989).
7. Schmidt PM, Cornu P, Angelillo-Scherrer A. Bases physiopathologiques en Hématologie générale - Un aide-mémoire d'Hématologie - Version 15.0, 2013. (2013).
8. Baba, Y., Pelayo, R. & Kincade, P. W. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol.* **25**, 645–649 (2004).
9. Welinder, E., Ahsberg, J. & Sigvardsson, M. B-lymphocyte commitment: identifying the point of no return. *Semin. Immunol.* **23**, 335–340 (2011).
10. Chu, P. G. & Arber, D. A. CD79: a review. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM Off. Publ. Soc. Appl. Immunohistochem.* **9**, 97–106 (2001).
11. Plonquet, A. Différenciation lymphocytaire B normale. *Rev. Francoph. Lab.* **2013**, 27–35 (2013).
12. Hendriks, R. W. & Middendorp, S. The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *Trends Immunol.* **25**, 249–256 (2004).
13. Eclache, V. & Baran-Marszak, F. Intérêt de la cytogénétique et de la biologie moléculaire pour le diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs B. *Rev. Francoph. Lab.* **2013**, 49–59 (2013).
14. Schatz, D. G. & Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 251–263 (2011).
15. Kuppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* **5**, 251–62 (2005).
16. Chaudhuri, J. & Alt, F. W. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 541–552 (2004).
17. Baumgarth, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 34–46 (2011).
18. Klein, U. *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1625–1638 (2001).
19. Rosenwald, A. *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation

- genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **194**, 1639–1647 (2001).
20. Chiorazzi, N. & Ferrarini, M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 841–894 (2003).
21. Chiorazzi, N. & Ferrarini, M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* **117**, 1781–1791 (2011).
22. Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H. & Stilgenbauer, S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 37–50 (2010).
23. Kikushige, Y. *et al.* Self-Renewing Hematopoietic Stem Cell Is the Primary Target in Pathogenesis of Human Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* **20**, 246–259 (2011).
24. Damm, F. *et al.* Acquired Initiating Mutations in Early Hematopoietic Cells of CLL Patients. *Cancer Discov.* **4**, 1088–1101 (2014).
25. Babbage, G. *et al.* IgM-expressing Waldenstrom’s macroglobulinemia tumor cells reveal a potential for isotype switch events in vivo. *Leukemia* **21**, 827–830 (2007).
26. Ackroyd, S., O’Connor, S. J. M. & Owen, R. G. Rarity of IgH translocations in Waldenström macroglobulinemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **163**, 77–80 (2005).
27. Sahota, S. S. *et al.* Typical Waldenstrom macroglobulinemia is derived from a B-cell arrested after cessation of somatic mutation but prior to isotype switch events. *Blood* **100**, 1505–7 (2002).
28. Kriangkum, J., Taylor, B. J., Reiman, T., Belch, A. R. & Pilarski, L. M. Origins of Waldenstrom’s macroglobulinemia: does it arise from an unusual B-cell precursor? *Clin Lymphoma* **5**, 217–9 (2005).
29. Gachard, N. *et al.* IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia* **27**, 183–189 (2013).
30. Kriangkum, J. *et al.* Impaired class switch recombination (CSR) in Waldenstrom macroglobulinemia (WM) despite apparently normal CSR machinery. *Blood* **107**, 2920–7 (2006).
31. Janz, S. Waldenström Macroglobulinemia: Clinical and Immunological Aspects, Natural History, Cell of Origin, and Emerging Mouse Models. *ISRN Hematol.* **2013**, (2013).
32. Zhu, D., Oscier, D. G. & Stevenson, F. K. Splenic lymphoma with villous lymphocytes involves B cells with extensively mutated Ig heavy chain variable region genes. *Blood* **85**, 1603–1607 (1995).
33. Algara, P. *et al.* Analysis of the IgV(H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood* **99**, 1299–1304 (2002).
34. Traverse-Glehen, A. *et al.* Analysis of VH genes in marginal zone lymphoma reveals marked heterogeneity between splenic and nodal tumors and suggests the existence of clonal selection. *Haematologica* **90**, 470–478 (2005).
35. Schamel, W. W. & Reth, M. Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* **13**, 5–14 (2000).

36. Gauld, S. B., Dal Porto, J. M. & Cambier, J. C. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science* **296**, 1641–1642 (2002).
37. Young, R. M. & Staudt, L. M. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 229–243 (2013).
38. Dighiero, G., Bodega, E., Mayzner, R. & Binet, J. L. Individual cell-by-cell quantitation of lymphocyte surface membrane Ig in normal and CLL lymphocyte and during ontogeny of mouse B lymphocytes by immunoperoxidase assay. *Blood* **55**, 93–100 (1980).
39. Zomas, A. P. *et al.* Expression of the immunoglobulin-associated protein B29 in B cell disorders with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Leukemia* **10**, 1966–1970 (1996).
40. Allsup, D. J. *et al.* B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* **65**, 7328–7337 (2005).
41. Woyach, J. A., Johnson, A. J. & Byrd, J. C. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* **120**, 1175–1184 (2012).
42. Lankester, A. C. *et al.* Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **86**, 1090–1097 (1995).
43. Semichon, M., Merle-Béral, H., Lang, V. & Bismuth, G. Normal Syk protein level but abnormal tyrosine phosphorylation in B-CLL cells. *Leukemia* **11**, 1921–1928 (1997).
44. Chen, L. *et al.* Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 4609–4614 (2002).
45. Lanham, S. *et al.* Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **101**, 1087–1093 (2003).
46. Le Roy, C. *et al.* The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356–365 (2012).
47. Cesano, A. *et al.* Association between B-cell receptor responsiveness and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from single cell network profiling studies. *Haematologica* **98**, 626–634 (2013).
48. Leleu, X. *et al.* The Akt pathway regulates survival and homing in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* **110**, 4417–4426 (2007).
49. Sacco, A., Roccaro, A. & Ghobrial, I. M. Role of dual PI3/Akt and mTOR inhibition in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Oncotarget* **1**, 578–582 (2010).
50. Treon, S. P. *et al.* MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 826–833 (2012).
51. Poulain, S. *et al.* MYD88 L265P Mutation in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **120**, 1307 (2012).
52. Poulain, S. *et al.* Genomic studies have identified multiple mechanisms of genetic changes in

- Waldenström macroglobulinemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **13**, 202–204 (2013).
53. Arcaini, L. *et al.* Splenic and nodal marginal zone lymphomas are indolent disorders at high hepatitis C virus seroprevalence with distinct presenting features but similar morphologic and phenotypic profiles. *Cancer* **100**, 107–115 (2004).
54. Suarez, F., Lortholary, O., Hermine, O. & Lécuit, M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* **107**, 3034–3044 (2006).
55. Morse, H. C., 3rd *et al.* Cells of the marginal zone--origins, function and neoplasia. *Leuk. Res.* **25**, 169–178 (2001).
56. Hermine, O. *et al.* Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 89–94 (2002).
57. Kelaidi, C. *et al.* Response to antiviral treatment in hepatitis C virus-associated marginal zone lymphomas. *Leukemia* **18**, 1711–1716 (2004).
58. Matsuuchi, L. & Gold, M. R. New views of BCR structure and organization. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 270–277 (2001).
59. Guarini, A. *et al.* BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* **112**, 782–792 (2008).
60. Muzio, M. *et al.* Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* **112**, 188–195 (2008).
61. Deglesne, P.-A. *et al.* Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res.* **66**, 7158–7166 (2006).
62. Zupo, S. *et al.* CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* **88**, 1365–1374 (1996).
63. Petlickovski, A. *et al.* Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **105**, 4820–4827 (2005).
64. Vallat, L. D., Park, Y., Li, C. & Gribben, J. G. Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells. *Blood* **109**, 3989–3997 (2007).
65. Dighiero, G. & Hamblin, T. J. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* **371**, 1017–1029 (2008).
66. Osorio, L. M., Jondal, M. & Aguilar-Santelises, M. Regulation of B-CLL apoptosis through membrane receptors and Bcl-2 family proteins. *Leuk. Lymphoma* **30**, 247–256 (1998).
67. Olsson, A. *et al.* Sensitization to TRAIL-induced apoptosis and modulation of FLICE-inhibitory protein in B chronic lymphocytic leukemia by actinomycin D. *Leukemia* **15**, 1868–1877 (2001).

68. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15524–15529 (2002).
69. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13944–13949 (2005).
70. Pekarsky, Y. *et al.* Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.* **66**, 11590–11593 (2006).
71. Damle, R. N. *et al.* B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* **99**, 4087–4093 (2002).
72. Damle, R. N. *et al.* Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* **103**, 375–382 (2004).
73. Messmer, B. T. *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* **115**, 755–764 (2005).
74. Klein, U. *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* **17**, 28–40 (2010).
75. Schmid, C. & Isaacson, P. G. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology* **24**, 445–451 (1994).
76. Granziero, L. *et al.* Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **97**, 2777–2783 (2001).
77. Ghia, P. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1403–1413 (2002).
78. Burger, J. A. *et al.* Functional Evidence from Deuterated Water Labeling That the Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib Blocks Leukemia Cell Proliferation and Trafficking and Promotes Leukemia Cell Death in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and small Lymphocytic Lymphoma. *Blood* **124**, 326–326 (2014).
79. Ghia, P. *et al.* Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **294**, 135–145 (2005).
80. Smit, L. A. *et al.* Differential Noxa/Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity. *Blood* **109**, 1660–1668 (2007).
81. Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., Foroni, L. & Hoffbrand, A. V. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br. J. Haematol.* **92**, 97–103 (1996).
82. 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* **91**, 2387–2396 (1998).

83. Tsukada, N., Burger, J. A., Zvaifler, N. J. & Kipps, T. J. Distinctive features of 'nurselike' cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **99**, 1030–1037 (2002).
84. Burger, J. A. *et al.* Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* **96**, 2655–2663 (2000).
85. Nishio, M. *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* **106**, 1012–1020 (2005).
86. Burger, J. A. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2011**, 96–103 (2011).
87. Pedersen, I. M. *et al.* Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* **100**, 1795–1801 (2002).
88. Vlad, A. *et al.* Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res.* **69**, 6387–6395 (2009).
89. Till, K. J., Lin, K., Zuzel, M. & Cawley, J. C. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* **99**, 2977–2984 (2002).
90. Chen, M., Bittencourt, M. de C., Feugier, P., Faure, G. C. & Béné, M. C. Active Toll-like receptor-7 triggering of chronic lymphocytic leukemia B-cells by imiquimod. *Leuk. Lymphoma* **53**, 739–742 (2012).
91. Riches, J. C. *et al.* T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* **121**, 1612–1621 (2013).
92. McClanahan, F., Calore, F., Zanesi, N., Gribben, J. G. & Croce, C. M. Aberrant PD-L1 Expression in CLL As a Result of Adaptive Immune Resistance Mediated By Tumor-Secreted Circulating miRNA Binding to Toll-like Receptor 7. *Blood* **124**, 716–716 (2014).
93. Hanna, B. *et al.* Immune Checkpoint Blockade with Anti-PD-L1 Prevents Immune Dysfunction and CLL Development in the TCL1 Adoptive Transfer Mouse Model. *Blood* **124**, 717–717 (2014).
94. Mizuno, H. *et al.* Mast cells promote the growth of Hodgkin's lymphoma cell tumor by modifying the tumor microenvironment that can be perturbed by bortezomib. *Leukemia* **26**, 2269–2276 (2012).
95. Tournilhac, O. *et al.* Mast cells in Waldenstrom's macroglobulinemia support lymphoplasmacytic cell growth through CD154/CD40 signaling. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **17**, 1275–1282 (2006).
96. San Miguel, J. F. *et al.* Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin. Oncol.* **30**, 187–195 (2003).
97. Levy, Y. *et al.* Interleukin 6 dependence of spontaneous in vitro differentiation of B cells from

- patients with IgM gammopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 3309–3313 (1990).
98. Rajkumar, S. V., Hayman, S. & Greipp, P. R. Angiogenesis in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin. Oncol.* **30**, 262–264 (2003).
99. Tournilhac, O. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Is a Growth and Survival Factor in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **104**, 4892 (2004).
100. Elswa, S. F. *et al.* Comprehensive analysis of tumor microenvironment cytokines in Waldenstrom macroglobulinemia identifies CCL5 as a novel modulator of IL-6 activity. *Blood* **118**, 5540–5549 (2011).
101. Ansell, S. M. PD-1 Is Expressed on B-Cells in Waldenstrom Macroglobulinemia and Promotes Malignant Cell Viability and Proliferation. *Blood* **124**, 3015–3015 (2014).
102. Phillips, J. A., Mehta, K., Fernandez, C. & Raveché, E. S. The NZB mouse as a model for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* **52**, 437–443 (1992).
103. Scaglione, B. J. *et al.* Murine models of chronic lymphocytic leukaemia: role of microRNA-16 in the New Zealand Black mouse model. *Br. J. Haematol.* **139**, 645–657 (2007).
104. Gorgun, G. *et al.* E(mu)-TCL1 mice represent a model for immunotherapeutic reversal of chronic lymphocytic leukemia-induced T-cell dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 6250–6255 (2009).
105. Shukla, V., Ma, S., Hardy, R. R., Joshi, S. S. & Lu, R. A role for IRF4 in the development of CLL. *Blood* (2013). doi:10.1182/blood-2013-03-492769
106. al-Katib, A. *et al.* Propagation of Waldenström's macroglobulinemia cells in vitro and in severe combined immune deficient mice: utility as a preclinical drug screening model. *Blood* **81**, 3034–3042 (1993).
107. Tassone, P. *et al.* A SCID-hu in vivo model of human Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **106**, 1341–1345 (2005).
108. Tsingotjidou, A. S. *et al.* Establishment of an animal model for Waldenström's macroglobulinemia. *Exp. Hematol.* **37**, 469–476 (2009).
109. Chitta, K. S. *et al.* Development and characterization of a novel human Waldenström macroglobulinemia cell line: RPCI-WM1, Roswell Park Cancer Institute - Waldenström Macroglobulinemia 1. *Leuk. Lymphoma* **54**, 387–396 (2013).
110. Matutes, E. *et al.* The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* **8**, 1640–1645 (1994).
111. Sant, M. *et al.* Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* **116**, 3724–3734 (2010).
112. Wu, S.-J. *et al.* The incidence of chronic lymphocytic leukemia in Taiwan, 1986-2005: a distinct increasing trend with birth-cohort effect. *Blood* **116**, 4430–4435 (2010).
113. Clarke, C. A. *et al.* Lymphoid malignancies in U.S. Asians: incidence rate differences by

- birthplace and acculturation. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **20**, 1064–1077 (2011).
114. Goldin, L. R., Slager, S. L. & Caporaso, N. E. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 350–355 (2010).
115. Rebora, P., Lee, M., Czene, K., Valsecchi, M. G. & Reilly, M. High risks of familial chronic lymphatic leukemia for specific relatives: signposts for genetic discovery? *Leukemia* **26**, 2419–2421 (2012).
116. Moreno, C. *et al.* Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance. *Blood* **116**, 4771–4776 (2010).
117. Zent, C. S. *et al.* Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: changes in clinical presentation and prognosis. *Leuk. Lymphoma* **50**, 1261–1268 (2009).
118. Visco, C. *et al.* Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia at disease presentation in the modern treatment era: is stage C always stage C? *Leuk. Lymphoma* (2013). doi:10.3109/10428194.2013.834054
119. Visco, C. *et al.* Autoimmune hemolytic anemia in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with IgVH status. *Haematologica* **95**, 1230–1232 (2010).
120. Hallek, M. *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* **111**, 5446–5456 (2008).
121. Rossi, D. & Gaidano, G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol. Oncol.* **27**, 1–10 (2009).
122. Rossi, D. *et al.* Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br. J. Haematol.* **142**, 202–215 (2008).
123. Fan, L. *et al.* Richter transformation in 16 of 149 Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **53**, 1749–1756 (2012).
124. Rossi, D. *et al.* The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* **117**, 3391–3401 (2011).
125. HEINIVAARA, O. Smudge cells in lymphocytic leukemia. *Ann. Med. Intern. Fenn.* **48**, 69–75 (1959).
126. Moreau, E. J. *et al.* Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am. J. Clin. Pathol.* **108**, 378–382 (1997).
127. Rawstron, A. C. *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **359**, 575–583 (2008).
128. Landgren, O. *et al.* B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 659–667 (2009).
129. Shanafelt, T. D. *et al.* Survival of patients with clinically identified monoclonal B-cell

- lymphocytosis (MBL) relative to the age- and sex-matched general population. *Leukemia* **26**, 373–376 (2012).
130. Döhner, H. *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1910–1916 (2000).
131. Juliusson, G. *et al.* Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N. Engl. J. Med.* **323**, 720–724 (1990).
132. Haferlach, C., Dicker, F., Schnittger, S., Kern, W. & Haferlach, T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* **21**, 2442–2451 (2007).
133. Haferlach, C., Dicker, F., Schnittger, S., Kern, W. & Haferlach, T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* **21**, 2442–2451 (2007).
134. Jain, P. & O'Brien, S. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol. Williston Park N* **26**, 1146–1152 (2012).
135. Cuneo, A. *et al.* Late appearance of the 11q22.3-23.1 deletion involving the ATM locus in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Clinico-biological significance. *Haematologica* **87**, 44–51 (2002).
136. Döhner, H. *et al.* 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* **89**, 2516–2522 (1997).
137. Athanasiadou, A. *et al.* Clinical, immunophenotypic, and molecular profiling of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia and comparison with other karyotypic subgroups defined by cytogenetic analysis. *Cancer Genet. Cytogenet.* **168**, 109–119 (2006).
138. Criel, A. *et al.* Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br. J. Haematol.* **97**, 383–391 (1997).
139. Matutes, E. *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.* **92**, 382–388 (1996).
140. Döhner, H. *et al.* p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* **85**, 1580–1589 (1995).
141. Carter, A., Lin, K., Sherrington, P. D. & Pettitt, A. R. Detection of p53 dysfunction by flow cytometry in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **127**, 425–428 (2004).
142. Gonzalez, D. *et al.* Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 2223–2229 (2011).
143. Te Raa, G. D. *et al.* Overview of available p53 function tests in relation to TP53 and ATM gene

- alterations and chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **54**, 1849–1853 (2013).
144. Greipp, P. T. *et al.* Patients with chronic lymphocytic leukaemia and clonal deletion of both 17p13.1 and 11q22.3 have a very poor prognosis. *Br. J. Haematol.* **163**, 326–333 (2013).
145. Cuneo, A. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* **18**, 476–483 (2004).
146. Cavazzini, F. *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.* **142**, 529–537 (2008).
147. Stilgenbauer, S. *et al.* Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* **92**, 1242–1245 (2007).
148. Marinelli, M. *et al.* Identification of molecular and functional patterns of p53 alterations in chronic lymphocytic leukemia patients in different phases of the disease. *Haematologica* **98**, 371–375 (2013).
149. Puente, X. S. *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **475**, 101–105 (2011).
150. Wang, L. *et al.* SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2497–2506 (2011).
151. Rosati, E. *et al.* Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* **113**, 856–865 (2009).
152. Rossi, D. *et al.* Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **119**, 521–529 (2012).
153. Villamor, N. *et al.* NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* **27**, 1100–1106 (2013).
154. Balatti, V. *et al.* NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* **119**, 329–331 (2012).
155. Balatti, V. *et al.* Trisomy 12 CLLs progress through NOTCH1 mutations. *Leukemia* **27**, 740–743 (2013).
156. Rossi, D. *et al.* Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br. J. Haematol.* **158**, 426–429 (2012).
157. Rossi, D. *et al.* Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* **118**, 6904–6908 (2011).
158. Oscier, D. G. *et al.* The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* **121**, 468–475 (2013).

159. Onaindia, A. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells in lymph nodes show frequent NOTCH1 activation. *Haematologica* **100**, e200–e203 (2015).
160. Pekarsky, Y. & Croce, C. M. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ.* **22**, 6–11 (2015).
161. Rossi, S. *et al.* microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood* **116**, 945–952 (2010).
162. Dal Bo, M. *et al.* The SIRT1/TP53 axis is activated upon B-cell receptor triggering via &i>miR-132</i> up-regulation in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* **6**, 19102–19117 (2015).
163. Huskova, H. *et al.* Oncogenic microRNA-155 and its target PU.1: an integrative gene expression study in six of the most prevalent lymphomas. *Int. J. Hematol.* **102**, 441–450 (2015).
164. Rai, K. R. *et al.* Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **46**, 219–234 (1975).
165. Binet, J. L. *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* **48**, 198–206 (1981).
166. Letestu, R. *et al.* Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood* **116**, 4588–4590 (2010).
167. Molica, S. & Alberti, A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **60**, 2712–2716 (1987).
168. Montserrat, E., Sanchez-Bisono, J., Viñolas, N. & Rozman, C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br. J. Haematol.* **62**, 567–575 (1986).
169. Vallespí, T., Montserrat, E. & Sanz, M. A. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtypes. A multivariate survival analysis in 146 patients. *Br. J. Haematol.* **77**, 478–485 (1991).
170. Oscier, D. G. *et al.* Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br. J. Haematol.* **98**, 934–939 (1997).
171. Nowakowski, G. S. *et al.* Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 1844–1849 (2009).
172. Johansson, P. *et al.* Percentage of smudge cells determined on routine blood smears is a novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* **34**, 892–898 (2010).
173. 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.* **37**, 614–618 (2013).
174. Extermann, M., Overcash, J., Lyman, G. H., Parr, J. & Balducci, L. Comorbidity and functional status are independent in older cancer patients. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **16**, 1582–1587 (1998).
175. Baumann, T. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia in the elderly: clinico-biological features,

- outcomes, and proposal of a prognostic model. *Haematologica* **99**, 1599–1604 (2014).
176. Martell, R. E. *et al.* Analysis of age, estimated creatinine clearance and pretreatment hematologic parameters as predictors of fludarabine toxicity in patients treated for chronic lymphocytic leukemia: a CALGB (9011) coordinated intergroup study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **50**, 37–45 (2002).
177. Strati, P. *et al.* Prognostic impact of renal insufficiency (RI) at diagnosis in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 7084 (2015).
178. Böttcher, S. *et al.* Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 980–988 (2012).
179. Raponi, S. *et al.* Minimal residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia patients. A comparative analysis of flow cytometry and ASO IgH RQ-PCR. *Br. J. Haematol.* **166**, 360–368 (2014).
180. Damle, R. N. *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1840–1847 (1999).
181. Ibrahim, S. *et al.* CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**, 181–186 (2001).
182. Crespo, M. *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1764–1775 (2003).
183. Rassenti, L. Z. *et al.* ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **351**, 893–901 (2004).
184. Orchard, J. A. *et al.* ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* **363**, 105–111 (2004).
185. Hamblin, T. J. *et al.* Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* **95**, 2455–2457 (2000).
186. Reinisch, W. *et al.* Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **12**, 2146–2152 (1994).
187. Sarfati, M. *et al.* Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **88**, 4259–4264 (1996).
188. Hallek, M. *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* **22**, 439–447 (1996).
189. Pflug, N. *et al.* Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **124**, 49–62 (2014).
190. Kutsch, N. *et al.* The international Prognostic Index for patients with CLL (CLL-IPI): An

- international meta-analysis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 7002 (2015).
191. Altman, S. J., Haut, A., Cartwright, G. E. & Wintrobe, M. M. Early experience with p-(N, N-di-2-chloroethyl)-aminophenylbutyric acid (CB 1348), a new chemotherapeutic agent effective in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **9**, 512–517 (1956).
192. Rai, K. R. *et al.* Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1750–1757 (2000).
193. Eichhorst, B. F. *et al.* Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **107**, 885–891 (2006).
194. Flinn, I. W. *et al.* Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25**, 793–798 (2007).
195. Knauf, W. U. *et al.* Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 4378–4384 (2009).
196. Hallek, M. *et al.* Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* **376**, 1164–1174 (2010).
197. Foon, K. A. *et al.* Chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine and cyclophosphamide and high dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 498–503 (2009).
198. Goede, V. *et al.* Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1101–1110 (2014).
199. Cheson, B. D. Ofatumumab, a novel anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 3525–3530 (2010).
200. Wierda, W. G. *et al.* Ofatumumab is active in patients with fludarabine-refractory CLL irrespective of prior rituximab: results from the phase 2 international study. *Blood* **118**, 5126–5129 (2011).
201. Byrd, J. C. *et al.* Phase 1/2 study of lumiliximab combined with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **115**, 489–495 (2010).
202. Leonard, J. P. *et al.* Durable complete responses from therapy with combined epratuzumab and rituximab: final results from an international multicenter, phase 2 study in recurrent, indolent, non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* **113**, 2714–2723 (2008).
203. Lin, T. S. *et al.* A phase I/II dose escalation study of apolizumab (Hu1D10) using a stepped-up dosing schedule in patients with chronic lymphocytic leukemia and acute leukemia. *Leuk. Lymphoma* **50**, 1958–1963 (2009).

204. Byrd, J. C. *et al.* Phase I study of the anti-CD40 humanized monoclonal antibody lincatuzumab (HCD122) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **53**, 2136–2142 (2012).
205. Beckwith, K. A. *et al.* A Transgenic Mouse Model of Aggressive B-Cell Malignancy for Evaluating Anti-Human CD37 Therapeutics. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **120**, 188 (2012).
206. Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C. H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **365**, 725–733 (2011).
207. Porter, D. L. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells Directed Against CD19 Induce Durable Responses and Transient Cytokine Release Syndrome in Relapsed, Refractory CLL and ALL. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **120**, 717 (2012).
208. Cymbalista, F. LLC : physiopathologie, diagnostic et approche thérapeutique. *Httpwwwem-Premiumcomdatarevues1773035X0043045261* (2013). at <<http://www.em-premium.com.bases-doc.univ-lorraine.fr/article/806498>>
209. Bruton, O. C. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* **9**, 722–728 (1952).
210. Byrd, J. C. *et al.* Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 213–223 (2014).
211. Burger, J. A. *et al.* Safety and activity of ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **15**, 1090–1099 (2014).
212. Jaglowski, S. M. *et al.* Safety and activity of BTK inhibitor ibrutinib combined with ofatumumab in chronic lymphocytic leukemia: a phase 1b/2 study. *Blood* **126**, 842–850 (2015).
213. Hoellenriegel, J. *et al.* The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **118**, 3603–3612 (2011).
214. Brown, J. R. *et al.* Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **123**, 3390–3397 (2014).
215. Furman, R. R. *et al.* Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **370**, 997–1007 (2014).
216. Buggins, A. G. S. & Pepper, C. J. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk. Res.* **34**, 837–842 (2010).
217. Roberts, A. W. *et al.* Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 488–496 (2012).
218. Souers, A. J. *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **19**, 202–208 (2013).
219. Hoellenriegel, J. *et al.* Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia* **26**, 1576–1583 (2012).
220. Zent, C. S. *et al.* The treatment of recurrent/refractory chronic lymphocytic leukemia/small

lymphocytic lymphoma (CLL) with everolimus results in clinical responses and mobilization of CLL cells into the circulation. *Cancer* **116**, 2201–2207 (2010).

221. Wendtner, C.-M. *et al.* Final results of a multicenter phase 1 study of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **53**, 417–423 (2012).

222. Chanan-Khan, A. *et al.* Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 5343–5349 (2006).

223. Chen, C. I. *et al.* Single-agent lenalidomide in the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 1175–1181 (2011).

224. Chen, C. *et al.* Long-Term Follow-up of a Phase 2 Study of Single Agent Lenalidomide in Previously Untreated, Symptomatic Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *ASH Annu. Meet. Abstr.* **120**, 718 (2012).

225. Strati, P. *et al.* Lenalidomide induces long-lasting responses in elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **122**, 734–737 (2013).

226. Badoux, X. C. *et al.* Phase II study of lenalidomide and rituximab as salvage therapy for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 584–591 (2013).

227. Sylvan, S. E. *et al.* Phase I study of lenalidomide and alemtuzumab in refractory chronic lymphocytic leukaemia: maintaining immune functions during therapy-induced immunosuppression. *Br. J. Haematol.* **159**, 608–612 (2012).

228. Ferrajoli, A. *et al.* Combination of Ofatumumab and Lenalidomide in Patients with Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results of a Phase II Trial. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **120**, 720 (2012).

229. Ramsay, A. G. & Gribben, J. G. Immune dysfunction in chronic lymphocytic leukemia T cells and lenalidomide as an immunomodulatory drug. *Haematologica* **94**, 1198–1202 (2009).

230. Dighiero, G. *et al.* Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1506–1514 (1998).

231. Cymbalista, F. *et al.* Early Versus Deferred Treatment With Combined Fludarabine, Cyclophosphamide and Rituximab (FCR) Improves Event-Free Survival In Patients With High-Risk Binet Stage A Chronic Lymphocytic Leukemia – First Results Of a Randomized German-French Cooperative Phase III Trial. *Blood* **122**, 524–524 (2013).

232. Waldenström, J. Incipient myelomatosis or essential hyperglobulinemia with fibrinogenopenia - a new syndrome ? *Acta Med Scand* **117**, 216–47 (1944).

233. Owen, R. G. *et al.* Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin. Oncol.* **30**, 110–115 (2003).

234. Groves, F. D., Travis, L. B., Devesa, S. S., Ries, L. A. & Fraumeni, J. F., Jr. Waldenström's macroglobulinemia: incidence patterns in the United States, 1988-1994. *Cancer* **82**, 1078–1081 (1998).
235. Herrinton, L. J. & Weiss, N. S. Incidence of Waldenström's macroglobulinemia. *Blood* **82**, 3148–3150 (1993).
236. Seligmann, M., Danon, F., Mihaesco, C. & Fudenberg, H. H. Immunoglobulin abnormalities in families of patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Am. J. Med.* **43**, 66–83 (1967).
237. Treon, S. P. *et al.* Characterization of familial Waldenström's macroglobulinemia. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **17**, 488–494 (2006).
238. Kristinsson, S. Y. *et al.* Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia patients: a population-based study in Sweden. *Blood* **112**, 3052–3056 (2008).
239. McMaster, M. L. *et al.* Long-term evaluation of three multiple-case Waldenström macroglobulinemia families. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 5063–5069 (2007).
240. Blattner, W. A. *et al.* Waldenström's macroglobulinemia and autoimmune disease in a family. *Ann. Intern. Med.* **93**, 830–832 (1980).
241. Kyle, R. A. *et al.* A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.* **346**, 564–569 (2002).
242. Morra, E. *et al.* Prognostic factors for transformation in asymptomatic immunoglobulin m monoclonal gammopathies. *Clin. Lymphoma* **5**, 265–269 (2005).
243. Baldini, L. *et al.* Immunoglobulin M monoclonal gammopathies of undetermined significance and indolent Waldenström's macroglobulinemia recognize the same determinants of evolution into symptomatic lymphoid disorders: proposal for a common prognostic scoring system. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 4662–4668 (2005).
244. Owen, R. G. *et al.* Clinicopathological correlates of IgM paraproteinemias. *Clin. Lymphoma* **1**, 39–43; discussion 44–45 (2000).
245. Avet-Loiseau, H. *et al.* Translocation t(11;14)(q13;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and nonsecretory multiple myeloma variants. *Blood* **101**, 1570–1571 (2003).
246. Feyler, S. *et al.* IgM myeloma: a rare entity characterized by a CD20-CD56-CD117-immunophenotype and the t(11;14). *Br. J. Haematol.* **140**, 547–551 (2008).
247. Ocio, E. M. *et al.* Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenström's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma. *Clin. Lymphoma* **5**, 241–245 (2005).
248. Willenbacher, W., Willenbacher, E., Brunner, A. & Manzl, C. Improved accuracy of discrimination between IgM multiple myeloma and Waldenström macroglobulinaemia by testing for MYD88 L265P mutations. *Br. J. Haematol.* **161**, 902–904 (2013).
249. Jiménez, C. *et al.* MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to,

- Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia* (2013). doi:10.1038/leu.2013.62
250. Dicker, F., Schnittger, S., Haferlach, T., Kern, W. & Schoch, C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* **108**, 3152–3160 (2006).
251. Braggio, E. *et al.* Genomic analysis of marginal zone and lymphoplasmacytic lymphomas identified common and disease-specific abnormalities. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **25**, 651–660 (2012).
252. Mohamed, A. N., Bentley, G., Bonnett, M. L., Zonder, J. & Al-Katib, A. Chromosome aberrations in a series of 120 multiple myeloma cases with abnormal karyotypes. *Am. J. Hematol.* **82**, 1080–1087 (2007).
253. Braggio, E. *et al.* Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenström's macroglobulinemia. *Cancer Res.* **69**, 3579–3588 (2009).
254. Schop, R. F. J. *et al.* 6q deletion discriminates Waldenström macroglobulinemia from IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Cancer Genet. Cytogenet.* **169**, 150–153 (2006).
255. Ocio, E. M. *et al.* 6q deletion in Waldenström macroglobulinemia is associated with features of adverse prognosis. *Br. J. Haematol.* **136**, 80–86 (2007).
256. McMaster, M. L. & Caporaso, N. Waldenström macroglobulinaemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance: emerging understanding of a potential precursor condition. *Br. J. Haematol.* **139**, 663–671 (2007).
257. Martín-Jiménez, P. *et al.* Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenström's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* **92**, 635–642 (2007).
258. Kriangkum, J. *et al.* Clonotypic IgM V/D/J sequence analysis in Waldenström macroglobulinemia suggests an unusual B-cell origin and an expansion of polyclonal B cells in peripheral blood. *Blood* **104**, 2134–42 (2004).
259. Walsh, S. H. *et al.* Lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström's macroglobulinemia derives from an extensively hypermutated B cell that lacks ongoing somatic hypermutation. *Leuk. Res.* **29**, 729–734 (2005).
260. Martín-Jiménez, P. *et al.* Functional class switch recombination may occur 'in vivo' in Waldenström macroglobulinaemia. *Br. J. Haematol.* **136**, 114–116 (2007).
261. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* **327**, 291–295 (2010).
262. Jiang, Z. *et al.* Details of Toll-like receptor:adapter interaction revealed by germ-line

- mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10961–10966 (2006).
263. Yan, Q. *et al.* BCR and TLR signaling pathways are recurrently targeted by genetic changes in splenic marginal zone lymphomas. *Haematologica* **97**, 595–598 (2012).
264. Traverse-Glehen, A., Baseggio, L., Salles, G., Felman, P. & Berger, F. Splenic marginal zone B-cell lymphoma: a distinct clinicopathological and molecular entity. Recent advances in ontogeny and classification. *Curr. Opin. Oncol.* **23**, 441–448 (2011).
265. Thieblemont, C. *et al.* Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol.* **4**, 95–103 (2003).
266. Baseggio, L. *et al.* CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* **95**, 604–612 (2010).
267. Salido, M. *et al.* Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood* **116**, 1479–1488 (2010).
268. Callet-Bauchu, E. *et al.* Cytogenetic analysis delineates a spectrum of chromosomal changes that can distinguish non-MALT marginal zone B-cell lymphomas among mature B-cell entities: a description of 103 cases. *Leukemia* **19**, 1818–1823 (2005).
269. Rinaldi, A. *et al.* Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome. *Blood* **117**, 1595–1604 (2011).
270. Rossi, D. *et al.* The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J. Exp. Med.* **209**, 1537–1551 (2012).
271. Kiel, M. J. *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J. Exp. Med.* **209**, 1553–1565 (2012).
272. Leblond, V., Tournilhac, O. & Morel, P. Waldenström's macroglobulinemia: prognostic factors and recent therapeutic advances. *Clin. Exp. Med.* **3**, 187–198 (2004).
273. Morel, P. *et al.* International prognostic scoring system for Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* **113**, 4163–4170 (2009).
274. Leleu, X. *et al.* Novel M-component based biomarkers in Waldenström's macroglobulinemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **11**, 164–167 (2011).
275. Dimopoulos, M. A. *et al.* Treatment recommendations for patients with Waldenström macroglobulinemia (WM) and related disorders: IWWM-7 consensus. *Blood* **124**, 1404–1411 (2014).
276. Treon, S. P. How I treat Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **126**, 721–732 (2015).
277. Treon, S. P. *et al.* Ibrutinib in Previously Treated Waldenström's Macroglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1430–1440 (2015).
278. Wilkins, M. R. *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome

- should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 19–50 (1996).
279. Tyers, M. & Mann, M. From genomics to proteomics. *Nature* **422**, 193–197 (2003).
280. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1720–1730 (1999).
281. EDMAN, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* **22**, 475 (1949).
282. Mann, M., Hendrickson, R. C. & Pandey, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 437–473 (2001).
283. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71 (1989).
284. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301 (1988).
285. O’Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021 (1975).
286. Santoni, V., Molloy, M. & Rabilloud, T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21**, 1054–1070 (2000).
287. Mujumdar, S. R., Mujumdar, R. B., Grant, C. M. & Waggoner, A. S. Cyanine-labeling reagents: sulfobenzindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug. Chem.* **7**, 356–362 (1996).
288. Unlü, M., Morgan, M. E. & Minden, J. S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071–2077 (1997).
289. Andersson, L. C., Wasastjerna, C. & Gahmberg, C. G. Different surface glycoprotein patterns on human T-, B- and leukemic-lymphocytes. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **17**, 40–46 (1976).
290. Hirsch, F. W., Bröckl, C., Bross, K. J. & Dölken, G. Characterization of lymphoid cells by two-dimensional mini gel electrophoresis of proteins. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **105**, 166–172 (1983).
291. Willard-Gallo, K. E., Humblet, Y. & Symann, M. Leukocyte membrane proteins in chronic lymphocytic leukemia, as studied by two-dimensional gel electrophoresis. *Clin. Chem.* **30**, 2069–2077 (1984).
292. Wu, Z. W., Mackie, M. J. & Maddy, A. H. The analysis of the variation of the surface proteins of leukemic lymphocytes of B-chronic lymphocytic leukemia patients by high performance liquid chromatography. *Leukemia* **4**, 851–855 (1990).
293. Saunders, F. K. *et al.* 2D-gel analysis of proteins in chronic lymphocytic leukemia cells and normal B-lymphocytes. *Leuk. Res.* **17**, 223–230 (1993).
294. Voss, T., Ahorn, H., Haberl, P., Döhner, H. & Wilgenbus, K. Correlation of clinical data with proteomics profiles in 24 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **91**, 180–186 (2001).
295. Cochran, D. A. E. *et al.* Proteomic analysis of chronic lymphocytic leukemia subtypes with

- mutated or unmutated Ig V(H) genes. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2**, 1331–1341 (2003).
296. Scielzo, C. *et al.* HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses. *J. Clin. Invest.* **115**, 1644–1650 (2005).
297. Chng, W. J. *et al.* Gene-expression profiling of Waldenstrom macroglobulinemia reveals a phenotype more similar to chronic lymphocytic leukemia than multiple myeloma. *Blood* **108**, 2755–63 (2006).
298. Gutierrez, N. C. *et al.* Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenstrom's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* **21**, 541–9 (2007).
299. Hatjiharissi, E. *et al.* Proteomic Analysis of Waldenstrom Macroglobulinemia. *Cancer Res.* **67**, 3777–3784 (2007).
300. Fujii, N. *et al.* Serum cytokine concentrations and acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: concurrent measurement of ten cytokines and their respective ratios using cytometric bead array. *Int J Mol Med* **17**, 881–5 (2006).
301. Gez, S., Crossett, B. & Christopherson, R. I. Differentially expressed cytosolic proteins in human leukemia and lymphoma cell lines correlate with lineages and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1774**, 1173–1183 (2007).
302. Salonen, J. M., Valmu, L., Rönholm, G., Kalkkinen, N. & Vihinen, M. Proteome analysis of B-cell maturation. *Proteomics* **6**, 5152–5168 (2006).
303. Kruger, N. J. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **32**, 9–15 (1994).
304. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
305. Scielzo, C. *et al.* HS1 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells. *Blood* **116**, 3537–3546 (2010).
306. Mudduluru, G. *et al.* Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. *Cancer* **110**, 1697–1707 (2007).
307. Jeon, H.-K., Ahn, J.-H., Choe, J., Park, J. H. & Lee, T. H. Anti-IgM induces up-regulation and tyrosine-phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K proteins (hnRNP K) in a Ramos B cell line. *Immunol. Lett.* **98**, 303–310 (2005).
308. Carballo, E., Colomer, D., Vives-Corróns, J. L., Blackshear, P. J. & Gil, J. Characterization and purification of a protein kinase C substrate in human B cells. Identification as lymphocyte-specific protein 1 (LSP1). *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156**, 1709–1713 (1996).
309. Asangani, I. A. *et al.* MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor

- suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* **27**, 2128–2136 (2008).
310. Fulci, V. *et al.* Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **109**, 4944–4951 (2007).
311. Ferracin, M. *et al.* MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Mol. Cancer* **9**, 123 (2010).
312. Brignone, C., Bradley, K. E., Kisselev, A. F. & Grossman, S. R. A post-ubiquitination role for MDM2 and hHR23A in the p53 degradation pathway. *Oncogene* **23**, 4121–4129 (2004).
313. Brockstedt, E. *et al.* Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J. Biol. Chem.* **273**, 28057–28064 (1998).
314. Sakamoto, H. *et al.* Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood* **95**, 3214–8 (2000).
315. Neumann, C. A. *et al.* Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* **424**, 561–5 (2003).
316. Kim, S. Y., Chun, E. & Lee, K. Y. Phospholipase A(2) of peroxiredoxin 6 has a critical role in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Cell Death Differ* (2011). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21415860>
317. Shibahara, K. *et al.* Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death. *Gene* **166**, 297–301 (1995).
318. Göke, A. *et al.* DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 78–82 (2002).
319. Yang, H.-S. *et al.* The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 26–37 (2003).
320. Göke, R., Barth, P., Schmidt, A., Samans, B. & Lankat-Buttgereit, B. Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21(Waf1/Cip1). *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C1541–1546 (2004).
321. Palamarchuk, A. *et al.* Akt phosphorylates and regulates Pcd4 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* **65**, 11282–11286 (2005).
322. Dorrello, N. V. *et al.* S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* **314**, 467–471 (2006).
323. O’Hayre, M. *et al.* Elucidating the CXCL12/CXCR4 signaling network in chronic lymphocytic leukemia through phosphoproteomics analysis. *PLoS One* **5**, e11716 (2010).
324. Bomben, R. *et al.* Expression of mutated IGHV3-23 genes in chronic lymphocytic leukemia identifies a disease subset with peculiar clinical and biological features. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am.*

- Assoc. Cancer Res.* **16**, 620–628 (2010).
325. Asch, H. L. *et al.* Widespread loss of gelsolin in breast cancers of humans, mice, and rats. *Cancer Res* **56**, 4841–5 (1996).
326. Ohtsu, M. *et al.* Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *EMBO J* **16**, 4650–6 (1997).
327. Verrills, N. M. *et al.* Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemia--an in vivo study. *Proteomics* **6**, 1681–94 (2006).
328. Mimori, T. *et al.* Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* **68**, 611–20 (1981).
329. Cai, Q. Q. *et al.* Chromosomal location and expression of the genes coding for Ku p70 and p80 in human cell lines and normal tissues. *Cytogenet Cell Genet* **65**, 221–7 (1994).
330. Gottlieb, T. M. & Jackson, S. P. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**, 131–42 (1993).
331. Muller, C., Christodoulopoulos, G., Salles, B. & Panasci, L. DNA-Dependent protein kinase activity correlates with clinical and in vitro sensitivity of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to nitrogen mustards. *Blood* **92**, 2213–9 (1998).
332. Riballo, E. *et al.* Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol* **9**, 699–702 (1999).
333. Chen, T. Y., Chen, J. S., Su, W. C., Wu, M. S. & Tsao, C. J. Expression of DNA repair gene Ku80 in lymphoid neoplasm. *Eur J Haematol* **74**, 481–8 (2005).
334. Roddam, P. L. *et al.* Non-homologous end-joining gene profiling reveals distinct expression patterns associated with lymphoma and multiple myeloma. *Br J Haematol* **149**, 258–62 (2010).
335. Sacco, A. *et al.* Epigenetic modifications as key regulators of Waldenstrom's Macroglobulinemia biology. *J Hematol Oncol* **3**, 38 (2010).
336. Shaffer, A. L. *et al.* Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17**, 51–62 (2002).

ANNEXES

Annexe 1 : Premier article : A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia

Aurore Perrot, Cédric Pionneau, Sophie Nadaud, Frédéric Davi, Véronique Leblond, Frédéric Jacob, Hélène Merle-Béral, Raoul Herbrecht, Marie-Christine Béné, John Gribben, Seiamak Bahram, Laurent Vallat. *Blood* 2011;118(4):e1-e15.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on July 29, 2011. For personal use only.

LYMPHOID NEOPLASIA

e-Blood

A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia

Aurore Perrot,^{1,3} Cédric Pionneau,^{4,5} Sophie Nadaud,^{5,6} Frédéric Davi,^{5,7} Véronique Leblond,^{5,7} Frédéric Jacob,^{5,7} Hélène Merle-Béral,^{5,7} Raoul Herbrecht,⁸ Marie-Christine Béné,³ John G. Gribben,⁹ Seiamak Bahram,^{1,2} and Laurent Vallat^{1,2}

¹Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire Humaine, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ²Laboratoire Central d'Immunologie, Plateau Technique de Biologie, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ³Laboratoire d'Immunologie, EA RHEM 4369, Faculté de Médecine, Nancy-Université, Vandœuvre-lès-Nancy, France; ⁴Inserm, Plateforme post-génomique de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ⁵Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; ⁶Inserm UMRS 956, Génétique, pharmacologie et physiopathologie des maladies transmissibles, Paris, France; ⁷Service d'Hématologie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ⁸Service d'Oncologie et d'Hématologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; and ⁹Barts Institute of Cancer, Barts and the London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, United Kingdom

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by a highly variable clinical course with 2 extreme subsets: indolent, ZAP70⁻ and mutated immunoglobulin heavy chain gene (M-CLL); and aggressive, ZAP70⁺ and unmutated immunoglobulin heavy chain (UM-CLL). Given the long-term suspicion of antigenic stimulation as a *primum movens* in the disease, the role of the B-cell receptor has been extensively studied in various experimental settings; albeit scarcely in a comparative dynamic proteomic approach. Here

we use a quantitative 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis technology to compare 48 proteomic profiles of the 2 CLL subsets before and after anti-IgM ligation. Differentially expressed proteins were subsequently identified by mass spectrometry. We show that unstimulated M- and UM-CLL cells display distinct proteomic profiles. Furthermore, anti-IgM stimulation induces a specific proteomic response, more pronounced in the more aggressive CLL. Statistical analyses demonstrate several sig-

nificant protein variations according to stimulation conditions. Finally, we identify an intermediate form of M-CLL cells, with an indolent profile (ZAP70⁻) but sharing aggressive proteomic profiles alike UM-CLL cells. Collectively, this first quantitative and dynamic proteome analysis of CLL further dissects the complex molecular pathway after B-cell receptor stimulation and depicts distinct proteomic profiles, which could lead to novel molecular stratification of the disease. (*Blood*. 2011;118(4):e1-e15)

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most frequent form of adult leukemia in Western countries, is characterized by a highly variable clinical course. B-CLL patients can be segregated into 1 of 2 major subsets on the basis of whether or not the immunoglobulin variable heavy chain gene (*IGVH*) accumulates somatic mutations.¹ Indeed, patients with unmutated (UM) CLL cells have a more aggressive clinical course than those with mutated (M) CLL cells.^{2,3}

Gene expression profiling of isolated CLL B cells had revealed that a set of genes is differentially expressed in these 2 subgroups.^{4,5} One of these genes encodes the ζ -associated protein of 70 kDa (ZAP70), a CD3-associated protein tyrosine kinase with a critical role in T-cell receptor (TCR) signaling and early B-cell development. ZAP70 is indeed expressed by UM-CLL, but not M-CLL, cells.^{5,6} This could render UM-CLL cells more sensitive to ligation of the B-cell receptor (BCR) complex.^{7,8} BCR signaling in normal B cells, on antigen recognition, triggers activation pathways inducing (depending on the microenvironment) proliferation, survival, differentiation, anergy, or apoptosis.⁹ Accordingly, a model has been proposed for CLL, suggesting that ZAP70⁺ UM-CLL cells would be more competent than ZAP70⁻ M-CLL cells in responding to proliferation and/or survival signals from

repeated encounters with presently unknown self-antigens or environmental antigens.

In vitro, BCR cross-linking with anti-IgM antibodies mimics antigen recognition and is followed by calcium mobilization¹⁰ and phosphorylation of a number of tyrosine-kinases (including ZAP70 when present), leading *in fine* to the activation of specific genes. In vitro experiments of BCR ligation in CLL cells with F(ab')₂ were shown to be followed by NF- κ B and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase activation (the mutational status of CLL cells was not described in this work).¹¹ More recent studies have indicated that UM-CLL cells are indeed more sensitive to BCR triggering than M-CLL cells and that the expression of ZAP70 is directly involved in this process.¹² It should be noted, however, that the ultimate cellular response to IgM ligation is also dependent on the nature of the cross-linking agent/protocol (ie, immobilized anti-IgM ligation leads to cell proliferation/survival, whereas soluble anti-IgM cross-linking leads to cell apoptosis).¹³

Temporal changes in gene expression early after strong BCR cross-linking in normal B cells, M-CLL cells, and UM-CLL cells have been previously investigated by us.¹⁴ The results of this study underscored the fact that aggressive UM-CLL cells engaged a specific genetic program within hours of stimulation with increased

Submitted February 21, 2011; accepted May 3, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, May 20, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-02-335125.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge

payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2011 by The American Society of Hematology

expression of genes involved in cell-cycle regulation, proliferation, or apoptosis.

To complement our understanding of the different behavior of M- and UM-CLL cells in response to *in vitro* soluble anti-IgM triggering of BCR-dependent pathways, we developed a functional proteomic approach using the more recent 2-dimensional fluorescence-differential gel electrophoresis (2D-DIGE) technology,^{15,16} well adapted for multiple quantitative comparisons, coupled to mass spectrometry. We report here that, although the 2 CLL subsets can be distinguished at baseline by the global image of the proteome, ZAP70⁺ UM-CLL is particularly affected by significant changes of proteomic profile on BCR ligation. Further identification of proteins differentially expressed between the 2 groups at baseline and after stimulation led to the identification of several prime candidates potentially involved in CLL pathophysiology.

Methods

Patients and B-cell selection

B cells were purified from peripheral blood samples obtained from untreated CLL patients. All samples were drawn and used according to the institutional review board-approved protocol of each participating hospital. Cells collected from 6 patients were used for 2D-DIGE analysis: 3 had aggressive characteristics (UM *IGVH* and ZAP70⁺) and 3 indolent features (M-*IGVH* and ZAP70⁻). Protein extracts from 13 other untreated patients were used for Western blot (WB) validation of candidate proteins. Informed consent was obtained for each patient in accordance with the Declaration of Helsinki. B cells were negatively selected using the RosetteSep B-cell enrichment cocktail (StemCell Technologies) followed by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Tumor cells were resuspended in RPMI 1640 medium and allowed to settle for 2 hours at 37°C/5% CO₂ before stimulation.

BCR ligation and response analysis

B cells resuspended at a concentration of 10⁷/mL were divided in two. The first half was used as control (unstimulated [US], receiving no antibody), whereas the second underwent anti-IgM stimulation (stimulated [S] cells). The latter was achieved using biotinylated goat F(ab')₂ anti-human IgM (Southern Biotechnology) at 20 μg/mL, cross-linked with 20 μg/mL avidin (Sigma-Aldrich) on ice during 5 minutes and then incubated at 37°C for 15 minutes, as adapted from Chen et al.⁷ The amount and duration of anti-IgM ligation had been determined previously¹⁴ to induce a brief but sustained stimulation in all cells at once. After stimulation, cells were washed, resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Fisher Bioblock Scientific), and incubated at 37°C/5% CO₂ for up to 7 hours. Collection time points (1, 2, 4, and 7 hours) were established after a 2D-gel silver-stained pilot study (data not shown). At each collection time point, aliquots of US and S cells were washed and frozen as dry pellets for subsequent protein extractions. The degree of B-cell apoptosis after BCR ligation was evaluated by flow cytometry through FITC-annexin V binding. Concomitant labeling with propidium iodide allowed to measure cell death. Briefly, 1 × 10⁵ S or US cells were stained with 5 μL FITC-annexin V and 10 μL propidium iodide (BD Biosciences) and analyzed on an FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter). The percentage of cells undergoing apoptosis 6 hours after stimulation was assessed by comparing annexin V-propidium iodide staining of stimulated versus unstimulated cells. A cut-off point of 20% was set to define responders versus nonresponders.

2D-DIGE

Tumor cells isolated from the 6 patients were used for 2D-DIGE analysis. For each patient, 8 different samples were submitted to DIGE (ie, 4 US and 4 S samples corresponding to the 4 time points of cell harvesting). Migrations for 2D-DIGE were performed according to the following

procedure for a total of 48 samples (24 M and 24 UM), corresponding to 24 2D-DIGE gels. It is noteworthy that such 2D-DIGE experiments can overlap up to 48 protein extracts previously mixed to form an internal standard. The use of > 48 extracts induces a risk of dilution for the less abundant proteins or shedding for major proteins. For each sample, total proteins were extracted in isoelectric focusing-specific lysis buffer containing 7M urea, 2M thiourea, 1% 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propanesulfonate (CHAPS), 10% isopropanol, 10% isobutanol, 0.5% Triton X-100, 0.5% SB 3-10, 30mM Tris, 65mM dithiothreitol, 0.5% IPG buffer 3-10, and 30mM spermine. After centrifugation at 16 000g for 30 minutes at 4°C, proteins were precipitated with the Perfect-Focus Kit from G-Biosciences (Agro-Bio) and resuspended in buffer containing 7M urea, 2M thiourea, 1% CHAPS, 10% isopropanol, 10% isobutanol, 0.5% Triton X-100, 0.5% SB 3-10, and 30mM Tris. The total protein concentration of each sample was established using the Bradford Assay (Protein Assay, Bio-Rad) with BSA as standard. All protein extracts (50 μg per sample) were labeled using fluorescent Cy dyes, as per the manufacturer's instructions for minimal labeling (GE Healthcare). The internal standard (pool) used for comparisons between the 24 2D gels was a mixture of identical amounts of the 48 protein samples tested, labeled with Cy2. Cy3 and Cy5 were alternatively used to label S and US protein extracts according to the dye switch method. For each gel, the 3 labeled protein extracts, expected to comigrate, were mixed to a strip's rehydration buffer containing 7M urea, 2M thiourea, 1% CHAPS, 10% isopropanol, 10% isobutanol, 0.5% Triton X-100, 0.5% SB 3-10, 40mM dithiothreitol, and 0.5% IPG buffer 4-7 for a total volume of 460 μL. The rehydration of a 24-cm Immobiline, pH 4 to 7 DryStrip (GE Healthcare) was achieved in the dark during 16 hours. Isoelectric focusing was then performed at 20°C for a total of 85 000 Vh using the Ettan II IPGphor system (GE Healthcare). After migration, the strips were equilibrated in SDS-containing buffer (reduction and alkylation) before being loaded onto SDS polyacrylamide gels for separation according to molecular weight using an Ettan DALT 6 Electrophoresis System (GE Healthcare). After migration, DIGE gels were scanned using an Ettan DIGE Imager (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Image analysis and statistical calculations were performed using DeCyder, Version 6.5 software (GE Healthcare). All standard/sample gel images were processed using the Differential In-gel Analysis software module to detect, normalize, and quantify protein spots. Cy2 images of internal standards were used to normalize gels by calculating the standardized abundance of each spot as the ratio of both Cy3 and Cy5 signals to that of Cy2. Gel-to-gel matching of the standard maps from each gel, and statistical analyses were performed using the Biologic Variation Analysis software module. Statistical analyses were performed with the Extended Data Analysis (EDA, Version 1.0 module). First, data were filtered to retain only spots that were present in > 75% of the gels. Then, statistical tests (*t* test) and principal component and hierarchical cluster analyses were performed. For *t* test, a *P* value of < .05 was considered significant. The threshold chosen to appreciate variations was a 1.4-fold change (FC). Data were exported from EDA using the XML Toolbox module. Significant Analysis of Microarray (SAM) was performed on the exported data to estimate False Discovery Rate (FDR) for multiple testing. The normalized log ratio values were used to compare protein expression between groups. Statistical analyses was performed with Multiple experiment Viewer (www.tigr.org) or with Excel software using SAM.¹⁷ Differentially expressed proteins between US and S groups (at each time point with 3 biologic replicates/group for UM and or M, 2-class paired statistical analysis) were selected with SAM using a threshold of 5% for the FDR. Differentially expressed proteins between US UM and M groups (at each time point with 3 biologic replicates/group, 2-class unpaired statistical analysis) were selected with SAM using a threshold of 5% for the FDR. Time course analyses were also performed using SAM on UM paired data and M paired data to find differentially expressed proteins between unstimulated and stimulated groups, and on US unpaired data to find differentially expressed proteins between unstimulated UM and M groups.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on July 29, 2011. For personal use only.

BLOOD, 28 JULY 2011 • VOLUME 118, NUMBER 4

ADVANCED CLL PROTEOMICS e3

Protein identification

Analytical gels were stained with SYPRO Ruby (Invitrogen) and used for robotized spot picking (EXQuest spot cutter, Bio-Rad). Gel plugs were washed twice with 25mM ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile and then dehydrated in 100% acetonitrile, before being subjected to overnight in-gel trypsin digestion. Briefly, each spot was digested with a solution containing 50mM ammonium bicarbonate, 10% acetonitrile, and 20 ng/μL trypsin (G-Biosciences) on ice during 1 hour, then overnight at 37°C. The supernatants were collected and gel plugs were incubated in 0.1% trifluoroacetic acid, 50% acetonitrile in an ultrasonic bath during 10 minutes to extract residual peptides. The new supernatants were pooled to the former. Peptides were dried completely in a vacuum centrifuge and then resuspended in 0.1% trifluoroacetic acid, 50% acetonitrile, to be analyzed by mass spectrometry (MS or MS/MS). Peptides were spotted onto a matrix-assisted laser desorption/ionization plate with matrix solution (50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid, α-cyano-4-hydroxycinnamic acid at saturation) 4 times diluted in 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid, and analyzed by MS using an Autoflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics). This instrument was operated in positive ion mode and externally calibrated in the peptide mass range of 700 to 3200 m/z. MS/MS analysis was performed using the Ultimate 3000 nano LC system (Dionex) coupled to an Esquire HCTultra nESI-IT-MS (Bruker Daltonics). A search for protein identity was carried out with MASCOT (www.matrixscience.com). Confident matches were defined by the MASCOT score and statistical significance ($P < .05$), the number of matching peptides and the percentage of total amino acid sequence covered by matching peptides.

WB analysis

Immunoblotting was carried out according to standard procedures using the following primary antibodies: PDCD4, β-actin (Sigma-Aldrich), and RAD23B (Santa Cruz Biotechnology). Cell lysates were prepared by incubating purified B-cell pellets on ice for 30 minutes in 200 μL of a lysis buffer containing 150mM NaCl, 50mM Tris, pH 8, 1% NP40, 10% glycerol, 0.5mM ethylenediaminetetraacetic acid, and protease inhibitor Complete 1X (Roche Diagnostics). The samples were then centrifuged at 4°C for 30 minutes at 16 000g. Samples containing 50 μg of protein were mixed with Laemmli buffer 1× and boiled for 5 minutes. Protein extracts were separated on 10% SDS-PAGEs and then transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C Extra, GE Healthcare). Nonspecific binding sites were blocked for 1 hour in 5% milk in T-TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% Tween-20). The membranes were then probed with primary antibodies (for PDCD4 and RAD23B) overnight at 4°C. After thorough washing in T-TBS, incubation was carried out for 1 hour in the presence of horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG or horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Bio-Rad). All immunoblots were revealed by enhanced chemiluminescence using the Super Signal West Pico Substrate (Pierce Biotechnology). Data were quantified by scanning-densitometry using the Chemi-Start and Bio1D-Advanced software Version 12.10 (Vilber-Lourmat).

Results

The molecular pathogenesis of CLL remains largely enigmatic. The central role of BCR, through recognition of yet to be identified cognate and/or foreign antigen(s), is however widely acknowledged. Having recently performed a transcriptomic analysis of CLL on BCR ligation,¹⁴ we aim here to conduct a similar experiment by proteomic analysis of UM and M-CLL patients on stimulation or not of the BCR taking advantage of the highly sensitive 2D-DIGE.

Quantitative proteomic analysis at baseline and after BCR ligation

Tumor cells of 6 CLL patients selected according to their *IGVH* status and *ZAP70* expression were used for 2D-DIGE analysis: 3 patients shared biologically indolent CLL characteristics, including M *IGVH* and the absence of *ZAP70* expression (patients M1, M2, and M3), whereas 3 carried aggressive CLL features, including UM *IGVH* and *ZAP70* expression (patients UM1, UM2, and UM3). Clinical and biologic characteristics of these 6 patients are shown in Table 1. B cells from 13 additional patients, segregated according to their *IGVH* status (supplemental Table 1; see the Supplemental Materials link at the top of the article), were used later for WB validations. Stereotyped BCR analyses were also performed for all patients according to Murray et al.¹⁸

BCR ligation was performed by a biotinylated goat anti-human IgM F(ab')₂. The protocol adapted from Chen et al⁷ and previously used in our gene-expression profiling was selected over other cross-linking agents, such as membrane-bound antibodies (which induce proliferation/survival) as it has the advantage of being brief but strong. Hence, aliquots of the selected CLL cells were stimulated with F(ab')₂ anti-IgM and tested for apoptosis using annexin V and propidium iodide staining by flow cytometry up to 6 hours after stimulation. Flow cytometry patterns allowed to distinguish between responders and nonresponders as previously described.¹⁴ All *ZAP70*⁺ UM-CLL cells belonged to the responder group, as shown in Table 1. Two M-CLL cells were nonresponders, whereas cells from 1 M patient (#M3) were unexpectedly observed to be responder albeit being *ZAP70*⁻.

Quantitative proteomic analysis in 2D-DIGE was performed for the 48 protein extracts obtained from the 24 *ZAP70*⁻ M-CLL samples, 12 US and 12 S, and the 24 *ZAP70*⁺ UM-CLL samples, corresponding to 24 2D gels as described in "2D-DIGE." The 24 Cy2-labeled images of the internal standard (exemplified in Figure 1A) allowed to match all gel images for polypeptide spots alignment and were used for normalization. DeCyder

Table 1. Clinical and biologic characteristics of the CLL patients used in 2D-DIGE experiments

Patient no.	Age, y	Sex	Binet stage	Rai stage	Matutes†	<i>IGVH</i>	<i>ZAP70</i>	Cytogenetics	CD38	Lymphocyte doubling time, years	BCR response
UM1	89	Male	A	0	5	100%/V1-69/subset 9*	Positive	del11q	Positive	> 1	Yes (25%)
UM2	68	Male	A	0	5	100%/V3-21	Positive	t(6;11;14)	Positive	> 1	Yes (60.4%)
UM3	67	Female	A	III	5	100%/V1-69	Positive	del13q/del17p	Positive	< 1	Yes (42.6%)
M1	64	Male	A	0	5	94.7%/V4-59	Negative	Normal	Negative	> 1	No (12.6%)
M2	76	Male	A	0	4	97.4%/V5-51	Negative	NA	Negative	> 1	No (2%)
M3	65	Male	A	0	5	90.2%/V4-34	Negative	del13q	Negative	> 1	Yes (46.2%)

NA indicates not available.

*Analysis of stereotyped BCR and subset definition according to Murray et al.¹⁸

†Immunophenotyping scoring system for CLL diagnosis (Matutes scores of 4 or 5 for typical CLL according to Matutes et al³⁴).

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on July 29, 2011. For personal use only.

e4 PERROT et al

BLOOD, 28 JULY 2011 • VOLUME 118, NUMBER 4

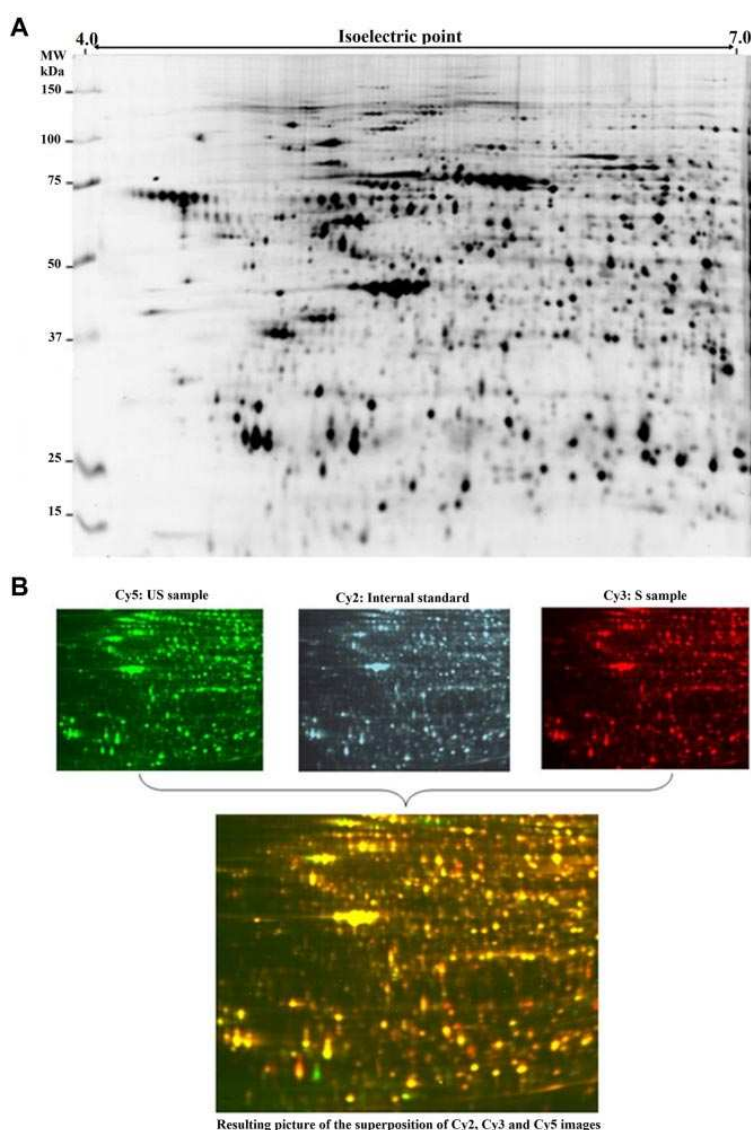


Figure 1. 2D-DIGE gel images. (A) Representative 2D image (scanned using an Ettan DIGE Imager, GE Healthcare) of a Cy2-labeled mixture of the 48 protein extracts (50 μ g of each). The total number of polypeptide spots observed and matched is 928 (only polypeptide spots present in at least 75% of analytical images were retained). (B) False-colored representation of 2D images issued from a single gel: Cy3 and Cy5 images correspond to analytical samples and Cy2 to the internal standard. Superimposition of the 3 images colored by ImageMaster 2D Platinum Version 6.0 software (GE Healthcare) allows to represent overexpressed polypeptide spots in red and overexpressed polypeptide spots in US samples in green.

analysis of the 72 images (24 Cy2-labeled for internal standard and 48 Cy3- or Cy5-labeled images corresponding to patients samples) led to the detection and quantification of 1873 polypeptide spots, with an average of 1328 matched spots. Of them, 928 polypeptide spots ranging between 15 and 150 kDa, with an isoelectric point between 4 and 7, present in at least 75% of the 48 analytical images, were retained for further analyses.

Figure 1B summarizes the 2D-DIGE principle of comigration of 3 protein extracts (2 analytical samples and 1 internal standard) on each gel. The merged image obtained by superimposing Cy2, Cy3, and Cy5 patterns allows to show how quantitative comparisons could be made using the Cy2-labeled internal standard. Green spots on the merged image represent proteins increased in the Cy5-labeled sample, whereas red spots identify proteins increased in the Cy3-labeled sample.

Proteomes of UM- and M-CLL cells are constitutively different

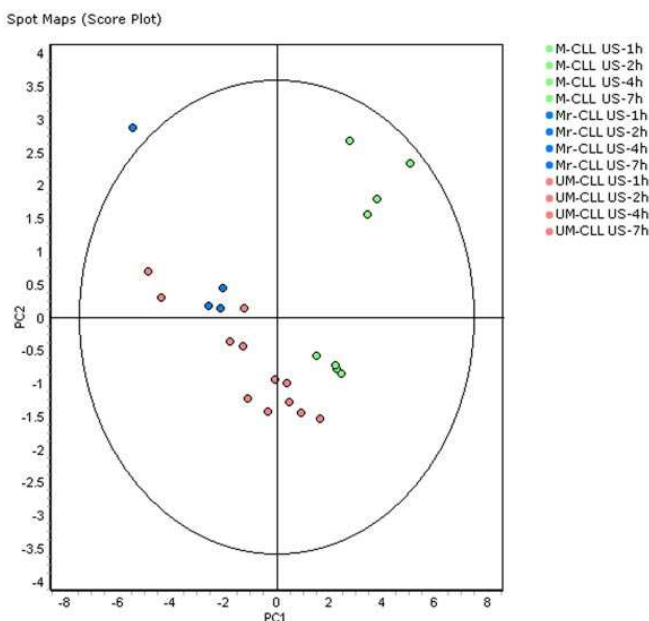
Multivariate analyses of protein expression data were first performed using the DeCyder EDA statistical analysis module. Principal component analysis (PCA) was used as an explorative tool to investigate the clustering of all US/S M- and UM-CLL samples. Each data point in the PCA plot represents an individual sample/condition and PCA performed a multivariate analysis down to the 2 most significant sources of variation (PC1 and PC2) between samples, based on global expression patterns from the subset of features present in each sample. The score plots of PC1 and PC2 are shown in Figure 2 for the 24 US samples and in Figure 3 for all US and S samples. PCA analysis demonstrated that US-CLL samples segregated into 2 groups, distinguishing baseline M-CLL and UM-CLL cells (Figure 2), except for 1 patient whose cells (although correctly identified as ZAP70⁻ and with mutated *IGVH*) clustered with aggressive (ZAP70⁺ and with unmutated

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on July 29, 2011. For personal use only.

BLOOD, 28 JULY 2011 • VOLUME 118, NUMBER 4

ADVANCED CLL PROTEOMICS e5

Figure 2. PCA on samples without BCR activation distinguishes M-CLL and UM-CLL cells. PCA as a score plot of a spot map of the 24 US samples (12 M-CLL and 12 UM-CLL) color-coded according to the legend, projected onto the first 2 principal components. PC1 axis segregated most M-CLL and UM-CLL samples; #M3 patient samples colored in blue provided from M-responder-CLL (Mr) cells and segregated like UM-CLL samples. The oval englobes a 95% statistical confidence perimeter.



IGVH) cells. Interestingly, this patient (#M3 in Table 1) was the same for whom isolated B cells responded to BCR ligation. Samples obtained from this particular patient are represented in blue in PCA Figures 2 and 3.

Differentially expressed polypeptide spots between baseline US M- and UM-CLL groups are presented in Table 2. Among the 26 proteins with $FC > 1.4$ and $P < .05$ selected in EDA, 6 spots corresponding to 5 unique proteins were finally retained after SAM-determined FDR application, eliminating potentially false positives. Some of the redundancies appeared to be the result of posttranslational modifications that created charge-related isoforms

having different isoelectric points but nearly identical molecular masses. For example, spots #434 and #436 meet these criteria: the hematopoietic lineage cell-specific protein (HCLS1) has 1 acidic isoform (#436, isoelectric point 4.87) increased in UM-CLL cells compared with M-CLL cells, and 1 basic isoform (#434, isoelectric point 4.92) decreased in UM-CLL cells, suggesting a different phosphorylation status of HCLS1 between the 2 CLL subsets. Regarding other differentially modulated proteins, 4 were increased in UM-CLL cells: respectively, DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1 (POLR2E), cAMP-dependent protein kinase type I- α regulatory subunit (PRKAR1A),

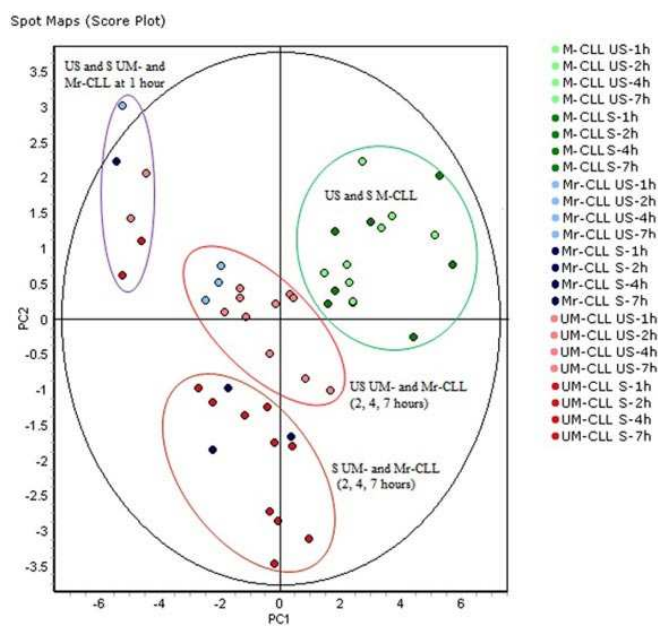


Figure 3. PCA of all samples differentiates US and S samples only in UM-CLL and Mr-CLL (M responder CLL) cells. PCA of all 48 samples (24 M-CLL and 24 UM-CLL) and color-coded according to the legend, projected onto the first 2 principal components. Ellipses highlight M-CLL samples (US and S samples indiscriminately), US UM- and Mr-CLL samples except at time 1 hour, S UM- and Mr-CLL samples except at 1 hour, and UM- and Mr-CLL samples at 1 hour (US and S indiscriminately). PCA analysis demonstrated that M-CLL and UM-CLL cells formed 2 distinct groups and that US and S samples at 2, 4, and 7 hours can be differentiated only in UM-CLL and Mr-CLL samples.

Table 2. Most differentially expressed peptides between UM-CLL and M-CLL cells without BCR stimulation

Spot no.*	Fold change†	Accession no.‡	Protein name§	Gene	t test¶	q value¶	Mascot score#	Sequence cover, %#	No. of peptides matched#	Theoretical (pI/MW**)	Observed (pI/MW††)	Function‡‡
434	-6.2§§	P14317	Hematopoietic lineage cell-specific protein	<i>HCLS1</i>	< .0006	< .01	179	11	5	4.74/54 079	4.92/90 256	Cell communication, signal transduction
1953	1.8	P19388	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	<i>POLR2E</i>	< .005	< .01	157	42	9	5.69/24 551	5.93/22 545	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
1155	1.7	P10644	cAMP-dependent protein kinase type I- α -regulatory subunit	<i>PRKAR1A</i>	< .009	< .01	137	32	10	5.27/42 981	5.32/56 202	Cell communication, signal transduction
1676	2.2	P10768	S-formylglutathione hydrolase	<i>ESD</i>	< .009	< .01	70	6	2	6.54/31 442	6.62/34 028	Hydrolase activity, metabolism, energy pathways
1686	2.7	P10768	S-formylglutathione hydrolase	<i>ESD</i>	< .005	< .01	81	24	5	6.54/31 956	6.64/33 048	Hydrolase activity, metabolism energy pathways
436	2.1	P14317	Hematopoietic lineage cell-specific protein	<i>HCLS1</i>	< .03	< .01	65	19	7	4.74/54 079	4.87/90 045	Cell communication, signal transduction

*Spot numbers refer to Master gel spots.

†FC was calculated using DeCyder Version 6.5 software: negative FC indicates that the polypeptide spot is underexpressed in UM-CLL cells compared with M-CLL cells; and positive FC, the spot is overexpressed in UM-CLL versus M-CLL cells.

‡Accession number in UniProt database (www.uniprot.org).

§Full protein name recommended by UniProt consortium.

||Gene names according to HUGO gene nomenclature.

¶P value from t test was calculated using DeCyder Version 6.5 software; q-value was calculated using SAM.

#Mascot score indicates the confidence of protein identification using the Mascot search engine (www.matrixscience.com), depending on amino acid sequence coverage (in %) and on the number of matched peptides used for identification in the Swiss-Prot database (www.expasy.org/sprot).

**Theoretic isoelectric point (pI) and molecular weight obtained from the Mascot database.

††Observed molecular weight and pI calculated by DeCyder Version 6.5 software, according to location in the gel.

‡‡Protein function and biologic process were assigned in accordance with the Human Protein Reference Database (www.hprd.org).

§§Protein isoforms down-regulated in UM-CLL cells.

|||Protein isoforms up-regulated in UM-CLL cells.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on July 29, 2011. For personal use only.

BLOOD, 28 JULY 2011 • VOLUME 118, NUMBER 4

ADVANCED CLL PROTEOMICS e7

Table 3. Most differentially expressed peptides between US and S M-CLL cells

Spot no.*	Fold change†	Accession no.‡	Protein name§	Gene	t test¶	q value	Mascot score#	Sequence cover, %##	No. of peptides matched#	Theoretical (pI/MW††)	Observed (pI/MW††)	Function‡‡
1903	1.65\$	P30084	Enoyl CoA hydratase, mitochondrial	ECHS1	.02	< .01	441	36	9	8.34/31.823	5.84/24.268	Catalytic activity, metabolism, energy pathways
1926	1.65\$	O75489	NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3	NDUFS3	.02	< .01	143	45	12	6.99/30.337	5.68/23.542	Catalytic activity, metabolism, energy pathways
1873	1.65\$	P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	RANBP1	.04	< .01	177	14	5	5.19/23.179	5.28/24.843	Cell communication, signal transduction
1861	1.95\$	Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1	.02	< .01	125	50	12	5.78/28.876	5.68/25.194	Ubiquitin-specific protease activity, protein metabolism
1933	2.75\$	Q9GZP4	UPF0424 protein C1orf128	C1orf128	.02	< .01	101	23	3	5.47/24.391	5.65/23.432	Unknown
1851	2.75\$	P21964	Catechol O-methyltransferase	COMT	.02	< .01	186	19	3	5.26/30.037	5.34/25.550	Metabolism, energy pathways

*Spot numbers refer to Master gel spots.

†FC was calculated using DeCyder Version 6.5 software; negative FC indicates that the polypeptide spot is underexpressed in S samples compared with US; and positive FC, the spot is overexpressed in S M-CLL cells.

‡Accession number in UniProt database (www.uniprot.org).

§Full protein name recommended by UniProt consortium.

||Gene names according to HUGO gene nomenclature.

¶P value from t test was calculated using DeCyder Version 6.5 software; q-value was calculated using SAM.

#Mascot score indicates the confidence of protein identification using the Mascot search engine (www.matrixscience.com), depending on amino acid sequence coverage (in %) and on the number of matched peptides used for identification in the Swiss-Prot database (www.expasy.org/sprot).

**Theoretical isoelectric point (pI) and molecular weight obtained from the Mascot database.

††Observed molecular weight and pI calculated by DeCyder Version 6.5 software, according to location in the gel.

##Protein function and biologic process were assigned in accordance with the Human Protein Reference Database (www.hprd.org).

\$\$\$Protein isoforms up-regulated in S M-CLL cells.

and 2 isoforms of S-formylglutathione hydrolase. One protein appeared decreased in UM-CLL cells compared with M-CLL cells, namely, the basic isoform of HCLS1. It might be noteworthy that most of the protein was present in more acidic forms in the UM-CLL subset compared with the M-CLL counterpart.

A specific proteomic response of UM-CLL cells after BCR ligation

To study the effects of BCR stimulation in both M-CLL and UM-CLL subsets, PCA analysis with all US and S samples was performed (Figure 3). This analysis highlighted that M-CLL and UM-CLL cells segregated in 4 distinct groups (with the exception of patient M3): (1) US and S M-CLL samples were all grouped in the upper right quadrant of the PCA analysis; (2) all US and S UM-CLL samples obtained at 1 hour after stimulation clustered on the left, suggesting minimal variations induced by stimulation in the first hour of the kinetics; (3) baseline US UM- and M3-CLL samples clustered together; and (4) S UM- and M3-CLL samples are clearly separated at the bottom. In short, PCA of all samples differentiated US and S samples only for UM- and M3-CLL cells. Another representation of multivariate analysis is a 2-dimensional hierarchical clustering of the 16 M-CLL samples (M3 patient samples excluded) and 24 UM-CLL samples presented in supplemental Figure 1. M-CLL samples clustered according to time, without separation between US and S samples, although UM-CLL samples clustered according to US or S status (except for 1-hour samples clustering together).

This finding was confirmed by the results of statistical calculations analyzing differentially expressed polypeptide spots between US and S samples in both M- and UM-CLL. Indeed, only 6 polypeptide spots (of 25 spots, after SAM-determined FDR application) were found increased in S M-CLL samples compared with US cells (Table 3). Despite their relative smaller number compared with S versus US UM-CLL, S versus US M-CLL did show indeed significant differences in the following polypeptides: enoyl coA hydratase ECHS1, NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3 (NDUFS3), ran-specific GTPase-activating protein (RANBP1), proteasome activator complex subunit 1 (PSME1), UPF0424 protein C1orf128, and catechol O-methyltransferase (COMT).

Conversely, 13 polypeptide spots were significantly increased and 12 others significantly decreased in S UM-CLL cells compared with their US counterparts (Table 4). Among the 13 proteins overexpressed after BCR stimulation, the largest variation between US and S samples was observed for cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 (DYNC1I2), COMT, and HNRPK (FC of 4.1, 3.4, and 2.9, respectively). Among the 12 proteins that decreased after stimulation, the most significant were UV excision repair protein (RAD23B), lamin B2 (LMNB2), and PDCD4 (FC at -4.2, -2.8, and -2.5, respectively). The profiles of each differentially expressed protein were examined more precisely. An example of gel images and DeCyder 2D and 3D representations is shown in Figure 4 for RAD23B.

Moreover, as described in the preceding paragraph, 2D-DIGE experiments allow to distinguish different isoforms of a protein, allowing to study such posttranslational modifications as phosphorylations: the addition of 1 or several negatively charged phosphate groups to a protein decreases its isoelectric point without affecting its mass, allowing for easy detection in 2D gels (Table 5; Figure 5). Among all polypeptide spots identified in multiple forms, most of them are indeed affected by posttranslational modifications: phosphorylation of 1 amino acid residue corresponds in 2D approach to

Table 4. Most differentially expressed peptides between US and S UM-CLL cells

Spot no.*	Fold change†	Accession no.‡	Protein name§	Gene	t test¶	q value¶	Sequence cover, %	No. of peptides matched#	No. of peptides matched#	Theoretical (pI/MW**)	Observed (pI/MW††)	Function‡‡
929	-4.2§§	P54727	UV excision repair protein RAD23 homolog B	<i>RAD23B</i>	< .0002	< .01	201	30	10	4.79/43 202	4.90/66 512	DNA binding, regulation of nucleobase, nucleoside, and nucleic acid metabolism
814	-2.8§§	Q03252	Lamin-B2	<i>LMNB2</i>	< .00005	< .01	189	39	26	5.29/67 762	5.51/72 102	Structural molecule activity, cell growth, and/or maintenance
884	-2.5§§	Q53EL6	Programmed cell death protein 4	<i>PDCD4</i>	< .04	< .01	424	28	11	5.07/52 088	4.97/67 848	Apoptosis
1292	-1.8§§	P36507	Dual-specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	<i>MAP2K2</i>	< .002	< .01	63	20	7	6.12/44 681	6.4/48 729	Protein threonine-tyrosine kinase activity, cell communication, signal transduction
557	-1.7§§	Q14005	Pro-IL 16	<i>IL16</i>	< .007	< .01	92	5	4	8.34/142976	5.82/84 930	Cytokine activity, immune response
1428	-1.7§§	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	<i>HNRNPC</i>	< .002	< .01	185	23	13	4.95/33 707	5.07/43 198	RNA binding, regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide, and nucleic acid metabolism
590	-1.6§§	P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75-kDa subunit	<i>NDUFS1</i>	< .05	< .01	136	35	17	5.89/80 443	5.48/83 258	Oxidoreductase activity, metabolism, energy pathways
905	-1.5§§	Q9NYB0	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	<i>TERF2IP</i>	< .03	< .02	62	31	9	4.64/44 404	4.75/67 059	DNA binding, cell communication, signal transduction
1559	-1.5§§	P37837	Transaldolase	<i>TALDO1</i>	< .05	< .02	243	21	8	6.36/37 688	6.32/38 340	Transferase activity, transferring aldehyde or ketonic groups, metabolism, energy pathways
2099	-1.4§§	Q9Y5 × 3	Sorting nexin-5	<i>SNX5</i>	< .006	< .01	138	45	14	6.31/47 072	6.64/53 508	Transporter activity
620	-1.4§§	Q9Y5 × 1	Sorting nexin-9	<i>SNX9</i>	< .05	< .02	438	20	9	5.40/66 949	5.59/81 524	Receptor signaling complex scaffold activity, cell communication, signal transduction
568	-1.4§§	P42331	Rho-GTPase-activating protein 25	<i>ARHGAP25</i>	< .03	< .05	308	16	10	5.83/72 955	5.46/75 000	GTPase activator activity
433	1.4	P14317	Hematopoietic lineage cell-specific protein	<i>HCLS1</i>	< .01	< .01	48	4	2	4.74/54 079	4.85/90 151	Cell communication, signal transduction
1893	1.4	P52566	Rho-GDP-dissociation inhibitor 2	<i>ARHGDI2</i>	< .006	< .01	70	47	7	5.1/23 031	5.11/24 297	Receptor signaling complex scaffold activity, cell communication, signal transduction

*Spot numbers refer to Master gel spots.

†FC was calculated using DeCyder Version 6.5 software; negative FC indicates that the polypeptide spot is underexpressed in S samples compared with US; and positive FC, the spot is overexpressed in S UM-CLL cells.

‡Accession number in UniProt database (www.uniprot.org).

§Full protein name recommended by UniProt consortium.

||Gene names according to HUGO gene nomenclature.

¶P value from t test was calculated using DeCyder Version 6.5 software; q-value was calculated using SAM.

#Mascot score indicates the confidence of protein identification using the Mascot search engine (www.matrixscience.com), depending on amino acid sequence coverage (in %) and on the number of matched peptides used for identification in the Swiss-Prot database (www.expasy.org/sprot).

**Theoretic isoelectric point (pI) and molecular weight obtained from the Mascot database.

††Observed molecular weight and pI calculated by DeCyder Version 6.5 software, according to location in the gel.

‡‡Protein function and biologic process were assigned in accordance with the Human Protein Reference Database (www.hprd.org).

§§Protein isoforms down-regulated in S UM-CLL cells.

|||Protein isoforms up-regulated in S UM-CLL cells.

Table 4. Most differentially expressed peptides between US and S UM-CLL cells (continued)

Spot no.*	Fold change†	Accession no.‡	Protein name§	Gene	t test¶	q value¶	Sequence cover, %	No. of peptides matched#	No. of peptides matched#	Theoretical (pI/MW**)	Observed (pI/MW††)	Function‡‡
773	1.5	P13796	Plastin-2	<i>LCP1</i>	< .02	NA	251	14	9	5.2/70 815	5.27/74 590	Calcium ion binding, cell communication, signal transduction
977	1.5	P08670	Vimentin	<i>VIM</i>	< .05	< .03	155	36	14	5.06/53 676	5.0/64 219	Structural constituent of cytoskeleton, cell growth and/or maintenance
1920	1.6	Q6IBC3	Cathepsin H	<i>CTSH</i>	< .04	< .01	155	12	6	8.38/37 980	6.02/23 763	Cysteine-type peptidase activity, protein metabolism
1366	1.6	P11310	Medium-chain specific acyl-coA des-hydrogenase, mitochondrial	<i>ACADM</i>	< .002	< .01	76	26	10	8.61/47 015	6.62/45 546	Catalytic activity, metabolism, energy pathways
742	2	P20700	Lamin-B1	<i>LMNB1</i>	< .03	< .01	432	25	14	5.11/66 653	5.1/76 355	Structural molecule activity, cell growth, and/or maintenance
1926	2.1	O75489	NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3	<i>NDUFS3</i>	< .03	< .01	143	45	12	6.99/30 337	5.68/23 542	Catalytic activity, metabolism, energy pathways
1032	2.1	P33241	Lymphocyte-specific protein 1	<i>LSP1</i>	< .007	< .01	174	18	4	4.69/37 397	4.56/61 787	Calcium ion binding, cell communication, signal transduction
1861	2.2	Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	<i>PSME1</i>	< .01	< .01	125	50	12	5.78/28 876	5.68/25 194	Ubiquitin-specific protease activity, protein metabolism
857	2.9	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	<i>HNRNPK</i>	< .0002	< .01	127	32	11	5.39/51 230	5.47/70 107	Ribonucleoprotein, regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide, and nucleic acid metabolism
1851	3.4	P21964	Catechol O-methyltransferase	<i>COMT</i>	< .004	< .01	186	19	3	5.26/30 037	5.34/25 550	Metabolism, energy pathways
541	4.1	Q13409	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	<i>DYNC1I2</i>	< .02	< .01	235	9	5	5.08/71 811	5.26/85 329	Motor activity, cell growth, and/or maintenance

*Spot numbers refer to Master gel spots.

†FC was calculated using DeCyder Version 6.5 software: negative FC indicates that the polypeptide spot is underexpressed in S samples compared with US; and positive FC, the spot is overexpressed in S UM-CLL cells.

‡Accession number in UniProt database (www.uniprot.org).

§Full protein name recommended by UniProt consortium.

||Gene names according to HUGO gene nomenclature.

¶P value from t test was calculated using DeCyder Version 6.5 software; q-value was calculated using SAM.

#Mascot score indicates the confidence of protein identification using the Mascot search engine (www.matrixscience.com), depending on amino acid sequence coverage (in %) and on the number of matched peptides used for identification in the Swiss-Prot database (www.expasy.org/sprot).

**Theoretic isoelectric point (pI) and molecular weight obtained from the Mascot database.

††Observed molecular weight and pI calculated by DeCyder Version 6.5 software, according to location in the gel.

‡‡Protein function and biologic process were assigned in accordance with the Human Protein Reference Database (www.hprd.org).

§§Protein isoforms down-regulated in S UM-CLL cells.

|||Protein isoforms up-regulated in S UM-CLL cells.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on July 29, 2011. For personal use only.

e10 PERROT et al

BLOOD, 28 JULY 2011 • VOLUME 118, NUMBER 4

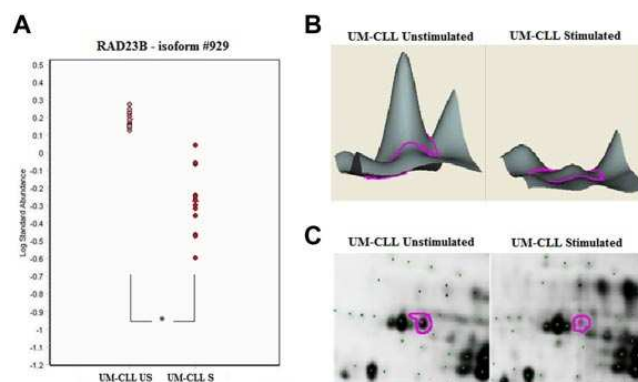


Figure 4. Example of 2D DIGE analysis of RAD23B protein expression. DIGE spots were analyzed with Decyder software Version 6.5 (GE Healthcare). (A) Statistical analysis of spot #929: significant decrease of RAD23B expression after BCR activation only in the UM-CLL subset. * $P < .0001$. (B) Decyder 3D representation of the RAD23B volume ratios difference between UM-CLL samples at baseline and after stimulation. (C) Focus of the RAD23B protein (spot #929) on US/S UM-CLL samples 2D gel images (scanned using an Ettan DIGE Imager, GE Healthcare).

an increase of 1 or several acid isoforms associated with a decrease of 1 or several basic isoforms. We studied the variation of the different isoforms of proteins with multiple identifications and found that several of them underwent such phosphorylations after anti-IgM stimulation in UM-CLL cells (Table 5). These proteins are mostly cytoskeleton-associated proteins, such as lamin B1, lamin B2, vimentin, and plastin 2, but also proteins involved downstream the BCR pathway, such as HCLS1 or LSP1.^{19,20} For 1 protein (HCLS1), we observed, specifically in UM-CLL cells, a constitutive phosphorylation status (before in vitro stimulation), enhanced after anti-IgM activation. An example of posttranslational modifications of the LSP1 protein after anti-IgM stimulation in UM-CLL cells is presented in Figure 5.

RAD23B and PDCD4 were retained for WB validations (Figure 6). WB experiments validated a significant decrease of RAD23B and PDCD4 expression after stimulation in UM-CLL cells. These WB experiments also validated the absence of any effect for BCR stimulation on M-CLL cells, except for the M3 patient and 2 of the 5 other M-CLL patients included. Interestingly, we observed in RAD23B WB experiments the appearance in S samples of a shorter band (40 kDa), suggesting a cleavage of the RAD23B 60 kDa-protein after anti-IgM stimulation, in UM-CLL cells only. Similar data for all patients are provided in supplemental Figure 2.

Description of an intermediate CLL subset

Intriguing data were indeed obtained for patient M3 (Table 1). This patient, initially included on the basis of his ZAP70⁻ M-CLL cells, surprisingly responded to BCR ligation according to our apoptosis assay. Indeed, proteomic results showed that cells from this patient clustered with UM-CLL samples. 2D-DIGE data and WB experiments confirmed that cells from this patient expressed a hybrid proteomic profile, sharing some features of ZAP70⁺ UM-CLL cells (including decreased RAD23 or PDCD4) and some of ZAP70⁻ M-CLL cells, such as increased HCLS1, whereas no modification of LSP1 after stimulation (downstream of BCR pathway; Figure 7). This specific patient's clinical features were therefore revisited and evidenced a more aggressive clinical symptomatology, including severe hyperleukocytosis having necessitated the initiation of a chemo-immunotherapy, whereas the other M-CLL patients did not need such therapy. Accordingly, the 3 UM patients had an aggressive clinical course, and all required treatment initiation within 2 years after sample collection for this study, patient UM3 actually having already died of disease progression. WB validations with cells from 13 other CLL patients reinforced this notion of intermediate form of CLL. Indeed, 2 of the 5 additional M-CLL

patients whose cells were used for WB validations shared a proteomic response to BCR stimulation similar to that observed for patient M3 (PDCD4 and RAD23B WB profiles, Figure 6B). Inversely, all 8 additional UM-CLL patients had a typical aggressive profile for PDCD4 and RAD23B as did the 3 patients used for 2D experiments. These data collectively suggest that, unlike UM-CLL cases, which share a similar response profile, M-CLL cells could be dichotomized into bona fide M-CLL indolent versus aggressive profiles. It should be noted, however, that our categorization at this point is made purely on the basis of biologic information (ie, *IGVH* mutations, ZAP70 status, response vs nonresponse to BCR ligation, and finally the proteomic profile) and not based on the clinical phenotype of individual patients.

Gene expression profiling and proteomics comparisons

We finally compared our proteomic results with our previously published transcriptomics data on BCR-stimulated CLL cells.¹⁴ The time points selected for collecting mRNA in that study were 1 hour, 1 hour 30 minutes, 3 hours 30 minutes, and 6 hours 30 minutes; so 30 minutes shorter than time points chosen for protein collection. All the cell preparation and BCR stimulation conditions were otherwise identical. We first checked for the expression value of all the probe sets potentially coding for the various modulated proteins in M- and UM-CLL samples at baseline and after BCR stimulation (supplemental Tables 2-4). We then reanalyzed these expression data using the same methods applied in the present study. At baseline, none of the RNA coding for the modulated proteins between M- and UM-CLL samples was statistically differentially modulated (supplemental Table 2). After BCR stimulation, only 1 RNA of 6 was modulated after BCR stimulation in M-CLL cells (supplemental Table 3), whereas 11 of 25 (44%) RNA were modulated in UM-CLL (supplemental Table 4). Kinetics of the various RNA and corresponding proteins were also variable. For some RNA, kinetics were identical (either up- or down-modulated), reflecting the potential involvement of these RNA and proteins in the genetic program induced by the BCR stimulation. For others, discordant kinetics between RNA and protein could potentially reflect more complicated regulation processes as already described.²¹

Discussion

Since initial studies of the proteome content of CLL in the 1970s,²² progress in proteomic techniques, and especially in 2D electrophoresis, have allowed proteomic profiles comparisons of different

Table 5. Description of posttranslational modifications in UM-CLL cells after anti-IgM stimulation in proteins with multiple isoforms identified

Gene name	Protein name	No. of isoforms identified	Significant statistical variation in US samples vs M-CLL cells	Isoform variation profile after stimulation in UM-CLL cells	Significant statistical variation after stimulation in UM-CLL cells	Biologic hypothesis in UM-CLL cells
<i>LMNB1</i>	Lamin-B1	6	—	4 increased (acid) 2 decreased (basic)	More acidic isoform increased	Constitutive phosphorylation enhanced after anti-IgM stimulation
<i>LMNB2</i>	Lamin-B2	2	—	2 decreased	1 basic isoform decreased	Decreased LMNB2 amount after anti-IgM stimulation
<i>LCP1</i>	Plastin-2	3	—	1 increased (acid) 2 decreased (basic)	More acidic isoform increased	Phosphorylation after anti-IgM stimulation
<i>VIM</i>	Vimentin	5	—	3 increased (acid) 2 decreased (basic)	More acidic isoform increased	Phosphorylation after anti-IgM stimulation
<i>HCLS1</i>	Hematopoietic lineage cell-specific protein	4	More basic isoform decreased	1 increased (acid) 1 decreased (basic) 2 no modified	More acidic isoform increased	Constitutive phosphorylation enhanced after anti-IgM stimulation
<i>LSP1</i>	Lymphocyte-specific protein 1	6	—	2 increased (acid) 4 decreased (basic)	More acidic isoform increased	Phosphorylation after anti-IgM stimulation
<i>DYNC1I2</i>	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	3	—	2 isoforms (acid) increased 1 isoform (basic) decreased	More acidic isoform increased	Phosphorylation after anti-IgM stimulation
<i>HNRNPK</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	9	1 isoform increased 1 isoform decreased	5 increased 4 decreased	1 isoform increased	Phosphorylation after anti-IgM stimulation
<i>HNRNPC</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	4	—	1 isoform decreased 3 no modified	1 isoform decreased	—
<i>ESD</i>	S-formylglutathione hydrolase	2	2 isoforms increased	—	—	Constitutive increase of ESD amount
<i>TALDO1</i>	Transaldolase	4	—	3 decreased 1 no modified	1 isoform decreased	Decreased amount of transaldolase after anti-IgM stimulation
<i>HSPD1</i>	60-kDa heat shock protein; mitochondrial	4	1 isoform increased	1 isoform increased 2 no modified 1 decreased	—	—
<i>PDCD4</i>	Programmed cell death protein 4	3	1 isoform decreased	3 isoforms decreased	1 isoform decreased	Decreased PDCD4 amount at baseline and more after anti-IgM activation
<i>PSME1</i>	Proteasome activator complex subunit 1	3	—	2 isoforms increased 1 no modified	1 isoform increased	Increased amount of PSME1 after anti-IgM stimulation

— indicates not applicable.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on July 29, 2011. For personal use only.

e12 PERROT et al

BLOOD, 28 JULY 2011 • VOLUME 118, NUMBER 4

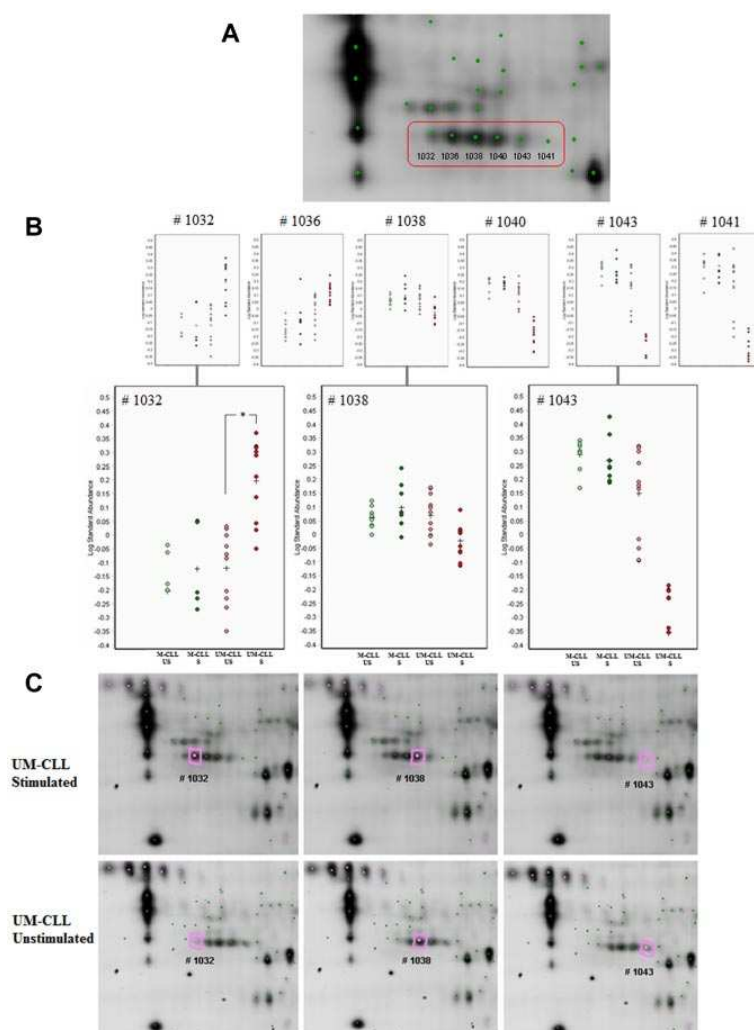


Figure 5. Example of 2D-DIGE analysis (using DeCyder software v6.5, GE Healthcare) of multiple isoforms of LSP1. (A) Focus of the 6 identified isoforms of LSP1 on 2D gel image. (B) Statistical analysis (3 UM-CLL vs 2M-CLL patient, #M3 patient excluded) of the 6 polypeptide spots identified as LSP1 with focus on 3 isoforms #1032, #1038, and #1043: #1032 acid isoform is significantly increased after anti-IgM stimulation in UM-CLL samples ($*P < .0003$), #1038 isoform presents no significant modification, and #1043 basic isoform is marginally decreased after anti-IgM stimulation. Such changes (increase of acid isoform and decrease of basic isoform) in 2D electrophoresis suggest a phosphorylation mechanism. (C) Focus of LSP1 isoforms on US/S UM-CLL samples 2D gel images (scanned using an Ethan DIGE Imager, GE Healthcare).

CLL subtypes, segregated by cytogenetic abnormalities²³ or *IGVH* mutational status with ever-growing resolution.^{19,24} Voss et al demonstrated a correlation between large-scale protein expression profiles and clinical data.²³ The shorter survival time of CLL patients with del(11q22-q23) or del(17p13), compared with patients with del(13q14), was shown to be associated with increased levels of heat-shock protein 27 and decreased levels of thioredoxin peroxidase 2 or protein disulfide isomerase.²³ Of interest, these enzymes may be associated with altered drug resistance.²³ Cochran et al, using 2D electrophoresis with silver staining, showed that nucleophosmin was translated in M-CLL cells only and that levels of F-actin-capping protein subunit, 14-3-3 protein and laminin-binding protein precursor were significantly increased in M-CLL but not UM-CLL.²⁴ In 2005, Scielzo et al evidenced, using the same technology, that M- and UM-CLL patients differed in the expression of hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HCLS1).¹⁹ Most of the HCLS1 protein was constitutively phosphorylated in UM-CLL patients, although this was the case for only a fraction of M-CLL patients.¹⁹ HCLS1, a protein mainly expressed in hematopoietic cells, is tyrosine phosphorylated on IgM cross-linking in B cells and binds to several cytoskeleton proteins and

adapters in both normal B cells and CLL cells. Recently, its central role in the regulation of B-CLL cell trafficking and homing has been demonstrated.²⁵

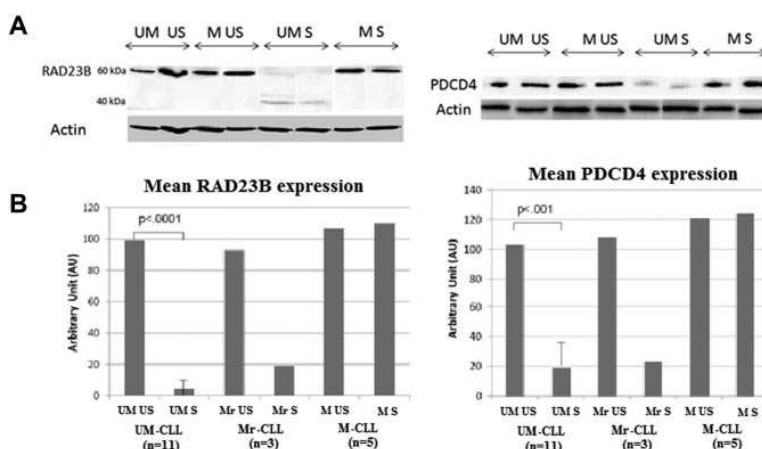
To investigate other proteins possibly modulated on BCR cross-linking, we studied temporal modifications of proteomic profiles before and at different time points after anti-IgM BCR ligation in both ZAP70⁻ M-CLL and ZAP70⁺ UM-CLL subsets using the novel 2D-DIGE technology. We chose a brief and soluble BCR stimulation, using biotinylated goat F(ab')₂ anti-human IgM, for setting a punctual T0 in all stimulated cells. It should be noted that, whereas sustained BCR signaling actually promotes the survival of B CLL cells, stimulation with soluble anti-IgM leads to the induction of apoptosis.²⁶ Because of the choice of multiple comparisons (M- and UM-CLL, US and S, with 4 time points for each patient and each condition), this 2D-DIGE study could and did include only 3 patients in each subset (3 UM and 3 M-CLL). As time course analyses using SAM were too restrictive, with very few proteins under the 5% FDR threshold, results from statistical tests at each time point were used and grouped to generate the tables of differentially expressed proteins. Nevertheless, WB analyses of protein

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on July 29, 2011. For personal use only.

BLOOD, 28 JULY 2011 • VOLUME 118, NUMBER 4

ADVANCED CLL PROTEOMICS e13

Figure 6. WB validations of PDCD4 and RAD23B profiles. (A) WB results of PDCD4 (~50 kDa) and RAD23B (60 kDa) expression in US and S samples from UM- and M-CLL cells. Actin bands were used as loading controls. (B) RAD23B and PDCD4 expression levels in US and S UM-CLL (n = 11), Mr-CLL (M-responder-CLL; n = 3), and M-CLL (n = 5) samples.



expression levels in a larger cohort of patients did validate the initial results.

Unsupervised PCA analysis showed the ability of this technology to distinguish M- and UM-CLL subsets using the global proteomic image at baseline, whereas gene expression profiling studies demonstrated that these 2 subtypes share a common gene expression profile, with a restricted number of genes differentially expressed.^{4,5} Among differentially expressed proteins between US M- and UM-CLL cells, HCLS1 was demonstrated to be present mostly in its phosphorylated (acid) form in UM-CLL cells, although its basic (unphosphorylated) form was predominant in M-CLL cells. This is consistent with the results of Scielzo et al.¹⁹ Another example is the down-regulation of PDCD4 in UM-CLL cells. PDCD4 is a tumor suppressor protein inhibiting neoplastic transformation, tumor progression, and translation; loss of its expression constitutes an independent prognostic factor of poor outcome in solid tumors, especially colorectal cancer.²⁷ Other proteins constitutively differentially expressed between M- and UM-CLL cells are mainly involved in signal transduction, immune response regulation, protein metabolism, cell growth or maintenance, and apoptosis.

After stimulation, PCA allowed to segregate US and S samples only in the UM-CLL subset, and statistical analysis confirmed that UM-CLL cells display more significant changes of proteomic profiles after BCR activation (only 6 polypeptide spot ratios were significantly different between US and S samples in M-CLL cells compared with 25 spots in UM-CLL cells). This observation is consistent with the literature suggesting that UM-CLL cells are more sensitive to anti-IgM activation than M-CLL cells.^{7,8} One of the proteins of interest up-regulated after anti-IgM stimulation in UM-CLL cells is HNRPK, which plays a role in pre-mRNA processing and whose involvement in the BCR signaling pathway was recently described in a functional proteomic study in the B-cell line Ramos.²⁸ Another protein involved downstream of the BCR pathway is LSP1, which was shown modified after BCR activation only in UM-CLL samples. LSP1 is an F-actin-binding cytoskeletal protein shown as being a protein kinase C substrate in B-CLL cells.²⁰ It has been suggested that LSP1 could be overexpressed in CLL cells compared with normal B lymphocytes since protein kinase C-dependent phosphorylation of LSP1 is more prominent in CLL cells. Our results suggest that LSP1 is phosphorylated after anti-IgM stimulation only in the UM-CLL subset. The comparison of US and S proteomic profiles allowed also to demonstrate that the amount of the tumor suppressor PDCD4 decreased after anti-IgM stimulation in UM-CLL cells (and in M-responding CLL cells). It has been recently demonstrated that *PDCD4* was negatively

regulated by the microRNA miR-21.²⁹ Interestingly, Fulci et al have shown that miR-21 was dramatically overexpressed in patients with CLL,³⁰ and a recent study suggested that miR-21 could be involved in the establishment of fludarabine resistance in CLL.³¹ It could therefore be hypothesized that *PDCD4* could also be regulated by miR-21 in UM but not M-CLL cells, therefore distinguishing the aggressiveness of these 2 subsets. Finally, the major changes between US and S UM-CLL samples interested RAD23B, a protein that plays an important role in both DNA repair and activation and function of p53.³² 2D-DIGE experiments showed that the #929 isoform of RAD23B decreased after anti-IgM stimulation in UM-CLL cells, and WB validations revealed in parallel the emergence of a shorter isoform, suggesting a cleavage of RAD23B after stimulation, as previously described in a human Burkitt lymphoma cell line.³³ Indeed, Brockstedt et al³³ have shown that the stimulation of BL60 cells with an anti-IgM F(ab)2 induced modifications for 12 proteins called apoptosis-associated proteins (including RAD23B but also LSP1, HNRPA1, lamin, and actin). Cleavage of some of these proteins (not RAD23B) is moreover inhibited by a selective irreversible inhibitor of caspase 3.³³ It could be hypothesized that the presence of a shorter isoform of RAD23B in stimulated UM-CLL samples in our WB experiments is also related to a cleavage of the full protein during anti-IgM-induced apoptosis.

Finally, this study hints to the existence of intermediate CLL stages as suggested by the perhaps serendipitous patient M3. What could have been indeed categorized as an erroneous observation was indeed confirmed in WB experiments, which identified among additional 13 patients, 2 further M-CLL cases with "aggressive" RAD23B and PDCD4 proteomic profiles, such as UM-CLL cells. Deglesne et al had also identified a group of clinically progressive CLL patients exhibiting mutated *IGVH* and lack of ZAP70 expression that responded to in vitro anti-IgM stimulation (19 of 38 M-CLL).¹³ Accordingly, all nonresponder cases were also *IGVH* mutated both in this study and in theirs. Therefore, if UM-CLL cells seem to all share the same aggressiveness, the M-CLL subset appears to be more heterogeneous, with a significant number of cases displaying biologic characteristics suggestive of a possible progression to cell-activation pathways usually used by UM-CLL alone. The differentiating proteins observed here therefore deserve further exploration in this context.

In conclusion, the 2D-DIGE proteomic approach was validated here as a method to study proteome modifications after anti-IgM stimulation of CLL cells. The validity of proteomic observations in

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on July 29, 2011. For personal use only.

e14 PERROT et al

BLOOD, 28 JULY 2011 • VOLUME 118, NUMBER 4

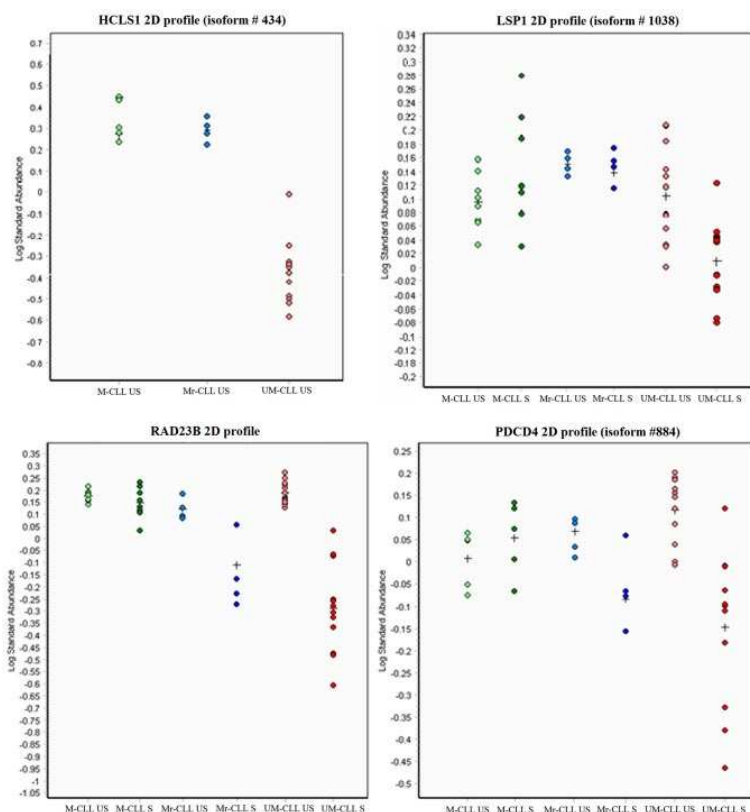


Figure 7. Proteomic profiles of #M3 patient cells (in blue). #M3 patient cells share some characteristics of ZAP70⁻ M-CLL cells, such as HCLS1 and LSP1 profiles, but also some features of aggressive responders ZAP70⁺ UM-CLL cells, such as decrease of RAD23B and PDCD4 after anti-IgM activation. Points corresponded to expression levels of HCLS1, LSP1, PDCD4, or RAD23 proteins in US or S M-CLL, Mr-CLL (#M3 patient), and UM-CLL cells.

a necessarily limited series of samples was confirmed on a larger cohort of patients by WB experiments for 2 proteins: PDCD4 and RAD23B. Moreover, this technology allowed to investigate post-translational modifications, such as phosphorylation after cell stimulation. Most importantly, this study brings out that proteomic profiles of M-CLL and UM-CLL cells, somewhat distinct at baseline segregate even more after BCR ligation, proteomic patterns changes after stimulation being selectively seen in aggressive ZAP70⁺ UM-CLL samples. Further studies are nevertheless needed to better identify possible targets for diagnosis/prognosis and/or therapeutic targets and explore what appear to be novel intermediate M-CLL stages.

Acknowledgments

The authors thank Manuel Chapelle (Plateforme Protéomique/Spectrométrie de masse, Institut Jacques Monod, Paris, France) for allowing us to use the EXQuest spot cutter; Estelle Zink (Hématologie biologique, Strasbourg, France), Hervé Roudot, Fanny Baran-Marszak, and Florence Cymbalista (Hématologie biologique, Hôpital Avicenne, Bobigny, France) for *IGVH* status assessment of the CLL cells used for WB validations; Béatrice Uring-Lambert (Immunologie cellulaire, Strasbourg, France) for help in flow cytometry; and Laurent Miguët (Hématologie biologique, Strasbourg, France), Ali Dalloul (EA RHEM, Faculté de Médecine, Nancy), Iozo Delic (CEA, Fontenay aux Roses), and Christine Carapito (Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, France) for critical reading of the manuscript and helpful suggestions.

This work was supported by the Ligue régionale Alsace contre le Cancer, the Association pour la Recherche contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and Agence Nationale pour la Recherche. A.P. was supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

Authorship

Contribution: A.P. performed experiments, analyzed data, and wrote the initial version of the manuscript; C.P. designed the 2D-DIGE study, performed experiments (especially with regards to mass spectrometry), analyzed data, and reviewed the manuscript; S.N. performed specific statistical calculations; F.D. and H.M.-B. performed the *IGVH* status of the CLL cells used for 2D-DIGE experiments and critically reviewed the manuscript; V.L. and R.H. included CLL patients and critically reviewed the manuscript; F.J. performed a 2D preliminary study using silver staining; M.-C.B. critically reviewed the data and the manuscript; L.V. designed and supervised the study; L.V. and S.B. analyzed data and critically reviewed and wrote parts of the manuscript; and J.G.G. made contributions in the initial design of the study.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Seiamak Bahram, Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire Humaine, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg Cedex, France; e-mail: siamak@unistra.fr.

References

- Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998;102(8):1515-1525.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-1854.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-1847.
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194(11):1625-1638.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194(11):1639-1647.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764-1775.
- Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(13):4609-4614.
- Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101(3):1087-1093.
- Nihiro H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):945-956.
- Michel F, Merle-Beral H, Legac E, Michel A, Debre P, Bismuth G. Defective calcium response in B-chronic lymphocytic leukemia cells: alteration of early protein tyrosine phosphorylation and of the mechanism responsible for cell calcium influx. *J Immunol*. 1993;150(8):3624-3633.
- Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, et al. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood*. 2001;98(10):3050-3057.
- Chen L, Appar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(5):2036-2041.
- Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res*. 2006;66(14):7158-7166.
- Vallat LD, Park Y, Li C, Gribben JG. Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells. *Blood*. 2007;109(9):3989-3997.
- Van den Bergh G, Arckens L. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr Opin Biotechnol*. 2004;15(1):38-43.
- Alban A, David SO, Björkstén L, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003;3(1):36-44.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(9):5116-5121.
- Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008;111(3):1524-1533.
- Scielzo C, Ghia P, Conti A, et al. HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1644-1650.
- Carballo E, Colomer D, Vives-Corrons JL, Blackshear PJ, Gil J. Characterization and purification of a protein kinase C substrate in human B cells: identification as lymphocyte-specific protein 1 (LSP1). *J Immunol*. 1996;156(5):1709-1713.
- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*. 2003;4(9):117.
- Andersson LC, Wasastjerna C, Gahrberg CG. Different surface glycoprotein patterns on human T-, B- and leukemic-lymphocytes. *Int J Cancer*. 1976;17(1):40-46.
- Voss T, Ahorn H, Haberl P, Dohner H, Wilgenbus K. Correlation of clinical data with proteomics profiles in 24 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*. 2001;91(2):180-186.
- Cochran DA, Evans CA, Blinco D, et al. Proteomic analysis of chronic lymphocytic leukemia subtypes with mutated or unmutated Ig V(H) genes. *Mol Cell Proteomics*. 2003;2(12):1331-1341.
- Scielzo C, Bertilaccio MT, Simonetti G, et al. HS1 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells. *Blood*. 2010;116(18):3537-3546.
- Petlickovski A, Laurenti L, Li X, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005;105(12):4820-4827.
- Mudduluru G, Medved F, Grobholz R, et al. Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. *Cancer*. 2007;110(8):1697-1707.
- Jeon HK, Ahn JH, Choe J, Park JH, Lee TH. Anti-IgM induces up-regulation and tyrosine-phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K proteins (hnRNP K) in a Ramos B cell line. *Immunol Lett*. 2005;98(2):303-310.
- Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008;27(15):2128-2136.
- Fulci V, Chiaretti S, Gondoni M, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;109(11):4944-4951.
- Ferracin M, Zagatti B, Rizzotto L, et al. MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer*. 2010;9:123.
- Brignone C, Bradley KE, Kisselev AF, Grossman SR. A post-ubiquitination role for MDM2 and hHR23A in the p53 degradation pathway. *Oncogene*. 2004;23(23):4121-4129.
- Brockstedt E, Rickers A, Kostka S, et al. Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line: cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J Biol Chem*. 1998;273(43):28057-28064.
- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8(10):1640-1645.

Table S1. Patients' characteristics of the validation cohort

Patient	Age	Sex	Binet stage	Rai stage	Matutes	IGVH	ZAP70	Cytogenetics	CD38	Lymphocyte doubling time	BCR response
UM4	50	M	B	I	5	100% / V6-1	positive	normal	positive	< 1 year	*
UM5	61	F	A	0	5	100% / V1-69	*	normal	negative	< 1 year	*
UM6	49	F	A	0	5	99.3% / V3-48	*	normal	positive	> 1 year	*
UM7	74	M	B	II	5	99.6% / V3-73	*	monosomy 17	positive	> 1 year	Yes (58.3%)
UM8	52	M	A	0	4	100% / V1-69 / subset 7**	*	del13q / del11q	*	> 1 year	Yes (22.9%)
UM9	69	M	A	0	4	99.6% / V3-30-3	*	normal	positive	> 1 year	Yes (23%)
UM10	73	M	A	0	4	100% / V2-5	*	trisomy 12	positive	> 1 year	Yes (24.7%)
UM11	54	M	A	I	3	98.5% / V3-21 / subset 2**	*	normal	negative	> 1 year	Yes (21.4%)
M4	70	M	A	0	4	94.5% / V4-34	*	del13q	negative	> 1 year	No (3%)
M5	71	M	A	0	5	95.4% / V4-34 / subset 4**	*	del13q	*	> 1 year	*
M6	53	F	A	0	5	95.6% / V3-72	*	del13q	negative	> 1 year	Yes (22.6%)
M7	52	M	A	0	4	86.9% / V1-3	*	del17p / del6q	*	< 1 year	No (6%)
M8	72	F	A	I	5	93.2% / V3-74	*	del13q / del18q / del22q	positive	> 1 year	Yes (20.4%)

* Data not available.

** Analysis of stereotyped BCR and subsets' definition according to Murray *et al.*¹⁸

Table S2. Comparison between proteome and transcriptome at baseline: most differentially expressed proteins between UM-CLL and M-CLL at baseline, without BCR stimulation, and corresponding RNA expression

Protein				Gene			
Spot # ^a	Access number ^b	Protein name ^c	Protein FC ^d	Gene FC ^e	Gene Symbol ^f	Probe Set ID ^g	Gene Title ^h
1686	P10768	S-formylglutathione hydrolase	2,7	ns	<i>ESD</i>	209009_at/215096_s_at/228162_at/240808_at	esterase D
436	P14317	Hematopoietic lineage cell-specific protein	2,1	ns	<i>HCLSI</i>	202957_at	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1
1676	P10768	S-formylglutathione hydrolase	2	ns	<i>ESD</i>	209009_at/215096_s_at/228162_at/240808_at	esterase D
1953	P19388	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	1,8	ns	<i>POLR2E</i>	213887_s_at/217854_s_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25kDa
1155	P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	1,7	ns	<i>PRKARIA</i>	200603_at/200604_s_at/200605_s_at/242482_at	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
434	P14317	Hematopoietic lineage cell-specific protein	-6,2	ns	<i>HCLSI</i>	202957_at	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1

^a Spot numbers refer to Master's gel spots.

^b Accession number in UniProt database (<http://uniprot.org>).

^c Full protein name recommended by UniProt consortium.

^d Fold change (FC) was calculated using DeCyder[®] version 6.5 software, positive FC signifying that polypeptidic spot is up-regulated in UM-CLL cells as compared to M-CLL cells.

^e Average Fold Change of expression between UM- and M-CLL cells (ns : non significant).

^f Gene symbol according to HUGO Gene Nomenclature.

^g Probe set ID according to Affymetrix HG-HU 133+2.0 microarray.

^h Gene title according to HUGO Gene Nomenclature.

Table S3. Comparison between proteome and transcriptome after BCR stimulation: most differentially expressed proteins between BCR stimulated and unstimulated M-CLL cells, and corresponding RNA expression

Protein				Gene			
Spot # ^a	Access number ^b	Protein name ^c	Protein FC ^d	Gene FC ^e	Gene Symbol ^f	Probe Set ID ^g	Gene Title ^h
1851	P21964	Catechol O-methyltransferase	2,7	ns	<i>COMT</i>	208817_at/208818_s_at/213981_at/216204_at	catechol-O-methyltransferase
1933	Q9GZP4	UPF0424 protein C1orf128	2,7	ns	<i>C1orf128</i>	223123_s_at/223124_s_at/229856_s_at	chromosome 1 open reading frame 128
1861	Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	1,9	ns	<i>PSME1</i>	200814_at	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)
1873	P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	1,6	2,1	<i>RANBP1</i>	202482_x_at/202483_s_at/221915_s_at	RAN binding protein 1
1926	O75489	NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfure protein 3	1,6	ns	<i>NDUFS3</i>	201740_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
1903	P30084	Enoyl CoA hydratase, mitochondrial	1,6	ns	<i>ECHS1</i>	201135_at	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial

^a Spot numbers refer to Master's gel spots.

^b Accession number in UniProt database (<http://uniprot.org>).

^c Full protein name recommended by UniProt consortium.

^d Fold Change (FC) was calculated using DeCyder[®] version 6.5 software, positive FC signifying that polypeptidic spot is up-regulated in stimulated M-CLL cells as compared to unstimulated M-CLL cells.

^e Average Fold Change of expression between stimulated M-CLL cells and unstimulated M-CLL cells (ns : non significant).

^f Gene symbol according to HUGO Gene Nomenclature.

^g Probe set ID according to Affymetrix HG-HU 133+2.0 microarray.

^h Gene title according to HUGO Gene Nomenclature.

Table S4. Comparison between proteome and transcriptome after BCR stimulation: most differentially expressed proteins between BCR stimulated and unstimulated UM-CLL cells, and corresponding RNA expression

Protein				Gene			
Spot # ^a	Access number ^b	Protein name ^c	Protein FC ^d	Gene FC ^e	Gene Symbol ^f	Probe Set ID ^g	Gene Title ^h
541	Q13409	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	4,1	ns	<i>DYNCL12</i>	211684_s_at	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2
1851	P21964	Catechol O-methyltransferase	3,4	ns	<i>COMT</i>	208817_at/208818_s_at/213981_at/216204_at	catechol-O-methyltransferase
857	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2,9	1,6	<i>HNRNPK</i>	200097_s_at/200775_s_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
1861	Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	2,2	-1,5	<i>PSME1</i>	200814_at	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)
1032	P33241	Lymphocyte-specific protein 1	2,1	-5,9	<i>LSP1</i>	203523_at	lymphocyte-specific protein 1
1926	O75489	NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3	2,1	ns	<i>NDUFS3</i>	201740_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa
742	P20700	Lamin-B1	2	ns	<i>LMNB1</i>	203276_at	lamin B1
1366	P11310	Medium-chain specific acyl-coA deshydrogenase; mitochondrial	1,6	ns	<i>ACADM</i>	202502_at	acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain
1920	Q6IBC3	Cathepsin H	1,6	ns	<i>CTSH</i>	202295_s_at	cathepsin H
977	P08670	Vimentin	1,5	ns	<i>VIM</i>	1555938_x_at/201426_s_at	Vimentin
773	P13796	Plastin-2	1,5	5,2	<i>LCPI</i>	208885_at	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
1893	P52566	Rho-GDP-dissociation inhibitor 2	1,4	-6,25	<i>ARHGDI2</i>	1555811_at/1555812_a_at/201288_at	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
433	P14317	Hematopoietic lineage cell-specific protein	1,4	ns	<i>HCLSI</i>	202957_at	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1
568	P42331	Rho-GTPase-activating protein 25	-1.4	1,9	<i>ARHGAP25</i>	1555076_at/204882_at/38149_at	Rho GTPase activating protein 25
2099	Q9Y5X3	Sorting nexin-5	-1.4	2	<i>SNX5</i>	217792_at/222417_s_at/223666_at/229980_s_at/229981_at/238433_at	sorting nexin 5
620	Q9Y5X1	Sorting nexin-9	-1.4	5,3	<i>SNX9</i>	223027_at/223028_s_at	sorting nexin 9
1292	P36507	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	-1.8	ns	<i>MAP2K2</i>	202424_at/213487_at/213490_s_at	mitogen-activated protein kinase kinase 2
1559	P37837	Transaldolase	-1.5	ns	<i>TALDO1</i>	201463_s_at	transaldolase 1
905	Q9NYB0	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	-1.5	ns	<i>TERF2IP</i>	201174_s_at	telomeric repeat binding factor 2, interacting protein
590	P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	-1.6	ns	<i>NDUFS1</i>	203039_s_at/229647_at/235321_at/236356_at/239268_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa
1428	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	-1.7	2,2	<i>HNRNPC</i>	200014_s_at/200751_s_at/212626_x_at/214737_x_at/227110_at/235500_at/216302_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)
557	Q14005	Pro-interleukin 16	-1.7	-2,5	<i>IL16</i>	1555016_at/209827_s_at/209828_s_at	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)
884	Q53EL6	Programmed cell death protein 4	-2.5	ns	<i>PDCD4</i>	1557166_at/202730_s_at/202731_at/212593_s_at/212594_at	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)
814	Q03252	Lamin-B2	-2.8	ns	<i>LMNB2</i>	216952_s_at	lamin B2
929	P54727	UV excision repair protein RAD23 homolog B	-4.2	2,3	<i>RAD23B</i>	201222_s_at/201223_s_at/214422_at/223598_at	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)

Annexe 2 : Second article : A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia

Aurore Perrot, Cédric Pionneau, Nabih Azar, Claude Baillou, François Lemoine, Véronique Leblond, Hélène Merle-Béral, Marie-Christine Béné, Raoul Herbrecht, Seiamak Bahram, Laurent Vallat. *Blood Cancer J* 2012 Sep 7;2:e88.



ORIGINAL ARTICLE

Waldenström's macroglobulinemia harbors a unique proteome where Ku70 is severely underexpressed as compared with other B-lymphoproliferative disorders

A Perrot^{1,2,3}, C Pionneau^{4,5}, N Azar⁶, C Baillou^{5,7}, FM Lemoine^{5,7}, V Leblond^{5,6}, H Merle-Béral^{5,6}, M-C Béné³, R Herbrecht⁸, S Bahram^{1,2,9} and L Vallat^{1,2,9}

Waldenström's macroglobulinemia (WM) is a clonal B-cell lymphoproliferative disorder (LPD) of post-germinal center nature. Despite the fact that the precise molecular pathway(s) leading to WM remain(s) to be elucidated, a hallmark of the disease is the absence of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination. Using two-dimensional gel electrophoresis, we compared proteomic profiles of WM cells with that of other LPDs. We were able to demonstrate that WM constitutes a unique proteomic entity as compared with chronic lymphocytic leukemia and marginal zone lymphoma. Statistical comparisons of protein expression levels revealed that a few proteins are distinctly expressed in WM in comparison with other LPDs. In particular we observed a major downregulation of the double strand repair protein Ku70 (*XRCC6*); confirmed at both the protein and RNA levels in an independent cohort of patients. Hence, we define a distinctive proteomic profile for WM where the downregulation of Ku70—a component of the non homologous end-joining pathway—might be relevant in disease pathophysiology.

Blood Cancer Journal (2012) 2, e88; doi:10.1038/bcj.2012.35; published online 7 September 2012

Keywords: Waldenström macroglobulinemia; proteomics; 2D-electrophoresis; *XRCC6*

INTRODUCTION

Waldenström's macroglobulinemia (WM)—alternatively designated as lymphoplasmacytic lymphoma—is an uncommon B-cell lymphoproliferative disorder (LPD) characterized primarily by a lymphoplasmacytic infiltration of the bone marrow and by an immunoglobulin M monoclonal gammopathy.^{1,2}

Although the precise molecular path(s) leading to WM remain largely unknown, there is clear evidence for the post-germinal center nature of the WM clonal cells, as the *IGH* (immunoglobulin heavy chain gene) is almost always subjected to somatic hypermutation;^{3,4} although without the presence of any intracлонаl variation.^{5,6} Moreover and in contrast to immunoglobulin M multiple myeloma (MM) and chronic lymphocytic leukemia (CLL), post-switch clonotypic immunoglobulins are undetectable in WM B cells, suggesting therefore that absence of isotype switching;^{5,6} although the latter could be achieved *in vitro* in response to appropriate stimuli for example, CD40-ligand and IL-4.⁷ Immunoglobulin class switching requires a functional activation-induced cytidine deaminase⁸ and uses the robust non homologous end-joining (NHEJ) pathway.⁹ The Ku (Ku70/Ku80) heterodimer is a key factor in this pathway, acting as a scaffold for the recruitment of NHEJ core or such processing factors as the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) and the *XRCC4*/ligase IV complex.^{10,11}

To progress in the understanding of molecular pathway(s) underlying the advent of the disease, gene-expression profiling of WM cells has been previously performed; revealing a homogeneous expression profile, more similar to that of CLL than that of MM.¹² A small set of genes was thereafter identified to be distinctly expressed in WM. They include interleukin-6 (IL6) and genes of the mitogen-activated protein kinase pathway. Upregulation of IL6 in WM was confirmed by an independent study.¹³ Aiming to compare WM cells with B-cell morphology and those with plasma cell morphology, this work concluded that B cells and plasma cells from WM patients exhibit distinct patterns of gene expression as compared with B cells and plasma cells from patients with CLL and MM.¹³

Few proteomic studies have been performed in WM. These include a proteomic analysis of signaling pathways performed in WM and MM samples, before and after treatment with a proteasome inhibitor.¹⁴ Clustering analysis allowed to identify proteins that were expressed by either of these disorders but not both, indicating differences in cellular responses to proteasome inhibition.¹⁴ Hatjiharissi *et al.*¹⁵ on the other hand compared—using an antibody-based protein microarray method—the patterns of protein expression between untreated WM cells and normal bone marrow controls. These analyses identified upregulation of proteins of the Ras and Rho family, as well as of

¹Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire Humaine, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie. Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg Cedex, France; ²Laboratoire Central d'Immunologie, Plateau Technique de Biologie, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg Cedex, France; ³EA RHEM 4369, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de médecine, Nancy-Université, Vandœuvre-lès-Nancy, France; ⁴INSERM, Plateforme post-génomique de la Pitié-Salpêtrière (P3S), Paris, France; ⁵Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; ⁶Service d'Hématologie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ⁷UMR CNRS 7211, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ⁸Service d'Oncologie et d'Hématologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France and ⁹Laboratoire d'Excellence (LabEx) TRANSPLANTE, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie. Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg Cedex, France. Correspondence: Professor S Bahram, Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire Humaine, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg Cedex, France.

E-mail: siamak@unistra.fr

Received 28 March 2012; revised 16 July 2012; accepted 7 August 2012



cyclin-dependent kinases, apoptosis regulators and histone deacetylases.¹⁵ Moreover, high expression of the heat shock protein HSP90 was observed in cells from symptomatic WM patients.¹⁵

Here, we aimed to perform a comprehensive proteomic analysis of WM versus closely linked diseases with likely overlapping pathophysiologies. Similarly to our recent work in CLL¹⁶ and using a two-dimensional gel electrophoresis (2D-E) approach,¹⁷ we compared WM with marginal zone lymphoma (MZL) and CLL. Three notable lessons were learnt in this study: (1) in contrast to observations using gene-expression profiling and limited proteomic analyses where WM is quasi indistinguishable from CLL, MM or normal B cells, we demonstrate a—statistically significant—distinct proteomic content for WM versus other LPDs; (2) we establish the existence for WM, of 17 majorly differentially expressed proteins in the same comparative analyses; (3) among the latter, we identify Ku70, part of the Ku heterodimer, and directly involved in class switch recombination, as one of the most differentially underexpressed proteins in WM cells as compared with other B-cell LPDs.

PATIENTS AND METHODS

Patients and B-cell selection

Twenty six untreated patients with LPD (10 WM, 4 MZL, 10 CLL and 2 mantle cell lymphoma; MCL), were enrolled in this study. Peripheral blood and/or bone marrow were obtained for each patient after informed consent in accordance with the Helsinki Declaration. Clinical and biological features of all patients are provided in Table 1. Cells corresponding to 3 WM, 3 MZL and 4 CLL samples were used for 2D-E analysis, whereas those from, respectively, 9 (4 WM, 3 MZL and 2 CLL) and 14 (5 WM, 2 MZL, 5 CLL and 2 MCL) untreated patients were used for western blot and quantitative RT-PCR experiments. B cells—for all LPDs with the exception

of WM and MZL used in 2D-E—were purified by negative selection using the Rosettesep B-cell enrichment cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) followed by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Saclay, France). B cells from whole blood or bone marrow of WM and MZL patients analyzed in 2D-E were sorted by flow cytometry (FACSARIA II, Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) using anti-CD19 monoclonal antibody (CD19-PerCP Cy5.5, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), kappa or lambda monotypy (kappa-FITC/lambda-PE, Dako) and the immunophenotypic characteristics of the malignant clone (CD79b for the MZL2 patient) (CD79b-APC, BD Biosciences). The purity of samples isolated by rosette and flow cytometry sorting cells was >95%; often >97%.

2D-ELECTROPHORESIS (2D-E)

Ten samples were used in 2D-E analysis. For each cell suspension, total proteins were extracted in iso-electric focusing-specific lysis buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 1% CHAPS, 10% isopropanol, 10% isobutanol, 0.5% Triton X100, 0.5% SB3-10, 30 mM Tris, 65 mM DTT, 0.5% IPG buffer 3–10 and 30 mM spermine. After centrifugation at 16 000 *g* for 30 min at 4 °C, proteins were precipitated with the Perfect-Focus Kit from G-Biosciences (Maryland, Heights, MO, USA) and resuspended in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 1% CHAPS, 10% isopropanol, 10% isobutanol, 0.5% Triton X100, 0.5% SB3-10 and 30 mM Tris. The total protein concentration of each sample was established using the Bradford assay (Protein Assay, Bio-rad, Ivry sur Seine, France) with bovine serum albumin as standard. All protein extracts (50 µg per sample) were labeled using fluorescent Cyanine (Cy) dyes, as per the manufacturer's instructions for minimal labeling (GE Healthcare). Cy3 and Cy5 were alternatively used to label protein extracts according to the dye switch method. For each gel, two labeled protein extracts—expected to

Table 1. Patients' characteristics

Samples	Origin	Experiments	Patient's age	Patient's sex	Diagnosis	Cytogenetics
WM1_BM	Bone marrow	2D-E and qPCR	79	M	WM (IgM kappa)	Trisomy 4
WM1_B	Blood	2D-E				
WM2_B	Blood	2D-E	66	M	WM (IgM kappa)	Undetermined
WM3_BM	Bone marrow	WB	72	M	WM (IgM kappa)	Undetermined
WM4_B	Blood	WB	58	M	WM (IgM kappa)	Undetermined
WM5_BM	Bone marrow	WB	59	F	WM (IgM kappa)	Normal
WM6_BM	Bone marrow	WB	59	M	WM (IgM kappa)	Undetermined
WM7_BM	Bone marrow	qPCR	63	F	WM (IgM lambda)	Undetermined
WM8_BM	Bone marrow	qPCR	64	M	WM (IgM kappa)	Undetermined
WM9_BM	Bone marrow	qPCR	51	M	WM (IgM lambda)	Normal
WM10_BM	Bone marrow	qPCR	32	M	WM (IgM kappa)	Undetermined
MZL1_B	Blood	2D-E	61	F	MZL (IgM kappa)	Undetermined
MZL2_B	Blood	2D-E	57	F	MZL (IgM lambda)	Trisomy 18 and 3
MZL2_BM	Bone marrow	2D-E and WB				
MZL3_BM	Bone marrow	WB and qPCR	59	F	MZL (IgM kappa)	Undetermined
MZL4_B	Blood	WB and qPCR	64	F	MZL (IgM kappa)	Normal
CLL1	Blood	2D-E	89	M	CLL (IGH unmutated)	Deletion 11q
CLL1'	Blood	2D-E				
CLL2	Blood	2D-E	67	F	CLL (IGH unmutated)	Deletions 13q and 17p
CLL3	Blood	2D-E	64	M	CLL (IGH mutated)	Normal
CLL4	Blood	WB	77	M	CLL (IGH undetermined)	Deletion 13q
CLL5	Blood	WB	78	M	CLL (IGH mutated)	Trisomy 12
CLL6	Blood	qPCR	54	M	CLL (IGH unmutated)	Deletions 16q and 17p
CLL7	Blood	qPCR	52	M	CLL (IGH mutated)	Normal
CLL8	Blood	qPCR	78	M	CLL (IGH undetermined)	Undetermined
CLL9	Blood	qPCR	79	F	CLL (IGH undetermined)	Deletion 13q
CLL10	Blood	qPCR	72	M	CLL (IGH undetermined)	Undetermined
MCL1_BM	Bone marrow	qPCR	65	M	MCL	t(11;14)
MCL2_B	Blood	qPCR	57	M	MCL	t(11;14)

Abbreviations: CLL, chronic lymphocytic leukemia; IGH, immunoglobulin heavy chain gene; IgM, immunoglobulin M; MCL, mantle cell lymphoma; MZL, marginal zone lymphoma; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; WB: western-blot; WM, Waldenström's macroglobulinemia; 2D-E, two-dimensional electrophoresis.

co-migrate—were mixed to a strip's rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 1% CHAPS, 10% isopropanol, 10% isobutanol, 0.5% Triton X100, 0.5% SB3-10, 40 mM DTT and 0.5% IPG buffer 4–7 for a total volume of 460 μ l. Rehydration of a 24 cm Immobiline pH 4–7 DryStrip (GE Healthcare) was achieved in the dark during 16 h. Iso-electric focusing was then performed at 20 °C for a total of 85 000 Vh using the Ettan II IPGphor system (GE Healthcare). After migration, the strips were equilibrated in SDS containing buffer (reduction and alkylation) before being loaded onto SDS polyacrylamide gels for separation according to molecular weight using an Ettan DALT Six Electrophoresis System (GE Healthcare). After migration, 2D-E gels were scanned using an Ettan DIGE Imager (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Image analysis and statistical calculations were performed using the Progenesis SameSpots software (NonLinear Dynamics, Newcastle, UK) and the 'Multiple stains per gel without internal standards' comparison method. All sample gel images were first aligned. Spots were then automatically detected and filtered to eliminate non-protein spots. Statistical analyses (analysis of variance and principal component analyses) were performed on normalized spots data. For multigroup analysis of variance test, a *q*-value (a FDR corrected *P*-value) of <0.05 was considered significant. The threshold chosen to appreciate variations was a 2.5-fold change when comparing WM versus CLL groups.

Protein identification

Analytical gels were stained with SYPRO Ruby (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) and used for robotized spot picking (EXQuest spot cutter, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Gel plugs were washed twice with 25 mM ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile then dehydrated in 100% acetonitrile, before being subjected to overnight in-gel trypsin digestion. Briefly, each spot was incubated in a solution containing 50 mM ammonium bicarbonate, 10% acetonitrile and 20 μ g/ml trypsin (G-Biosciences) on ice during 1 h, then overnight at 37 °C. The supernatants were collected and gel plugs were incubated in 0.1% TFA 50% acetonitrile in an ultrasonic bath during 10 min to extract residual peptides. The new supernatants were pooled with the former. Peptides were dried completely in a vacuum centrifuge then resuspended in 0.1% TFA 50% acetonitrile, to be analyzed by mass spectrometry (MS or MS/MS). Peptides were spotted onto a MALDI plate with matrix solution (50% acetonitrile, 0.1% TFA, HCCA at saturation) diluted four-fold in 50% acetonitrile, 0.1% TFA and analyzed by MS using an Autoflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). This instrument was operated in positive ion mode and externally calibrated in the peptide mass range of 700–3200 m/z. MS/MS analysis was performed using the Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex, Voisin le Bretonneux, France) coupled to an Esquire HCTUltra nESI-MS (Bruker Daltonics). A search for protein identity was carried out with MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Confident matches were defined by the MASCOT score and statistical significance ($P < 0.05$), the number of matching peptides and the percentage of total amino acid sequences covered by matching peptides.

Western-blot analysis

Cell lysates were prepared by incubating purified B-cell pellets on ice for 30 min in 200 μ l of a lysis buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH8, 1% NP40, 10% glycerol, 0.5 mM EDTA and protease inhibitor Complete 1X (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The samples were then centrifuged at 4 °C for 30 min at 16 000 *g*. Samples containing 50 μ g of protein were mixed with Laemmli buffer 1X and boiled for 5 min. Protein extracts were separated on 10% SDS-PAGE, then transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Nonspecific binding sites were blocked for 1 h in 5% milk in T-TBS

(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% Tween-20). The membranes were then probed with anti-Ku (p70) (clone N3H10, Kamiya Biomedical, Seattle, WA, USA) during 3 h at room temperature. After thorough washing in T-TBS, incubation was carried out for 1 h in the presence of horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). All immunoblots were revealed by enhanced chemiluminescence using the Super Signal West Pico Substrate (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). Data were acquired by scanning-densitometry using a Chemi-Start (Vilber-Lourmat, Marne-La-Vallée, France).

Quantitative real-time RT-PCR

A quantitative real-time RT-PCR amplification of *XRCC6* (encoding Ku70) was performed as a second validation test. This was achieved for 14 subjects, respectively, 5 WM and 9 others B LPD including MZL ($n = 2$), MCL ($n = 2$) and CLL ($n = 5$). Briefly, total RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and treated with DNase (Qiagen). cDNA was synthesized using Improm II reverse transcriptase (Promega, Lyon, France) and random hexadeoxynucleotide primers (Promega). The relative gene expression of *XRCC6* was determined by concomitant amplification of *GUSB* (beta-D glucuronidase) as a reference gene using a LightCycler 480 (Roche). Assays were performed in duplicate using 5 μ l of cDNA, 1X Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) and 1X TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for *XRCC6* and *GUSB* in a total volume of 25 μ l. LightCycler 480 Software (Roche) was used to calculate the relative gene expression of *XRCC6* ($2^{-\Delta\Delta CT}$ method).

RESULTS

Here we present a first comprehensive 2D-E analysis of WM versus other LPDs.

WM is a unique proteomic entity

Quantitative proteomic analysis by 2D-E was performed for 10 protein extracts obtained from B cells isolated from peripheral blood and/or bone marrow of 2 WM (3 samples), 2 MZL (3 samples) and 3 CLL (4 samples) patients. The inclusion of blood and bone marrow cells from the same patients (WM1 and MZL2) was aimed to foresee the extent to which cell origin/developmental stage might have any influence in proteomic profile in a same individual.

Multivariate analysis of protein expression was first performed using a principal component analysis. Used as an explorative tool to investigate the clustering of all WM, MZL and CLL samples, principal component analysis analysis demonstrated that WM clustered distinctly from MZL and CLL (Figure 1). Hence, the protein content of WM cells is significantly different from those of MZL or CLL. Of note, one WM and one MZL patient segregated quite differently in principal component analysis, although without overlapping with other LPDs, and the 'stray' WM patient still was nearest to the other two (Figure 1).

Several proteins are differentially expressed in WM as compared with MZL and CLL

Among the 1051 polypeptide spots analyzed within different samples, 356 showed a differential expression. Most differentially expressed polypeptide spots (with a 2.5-fold change) between WM and CLL samples, and between WM and MZL samples, as identified by mass spectrometry, are presented in Table 2. The first highlight from this analysis is that the detected differentially expressed proteins are not—for the vast majority—among the candidate genes/proteins, which would have expected to be critical in WM—that is, in direct connection with leukomogenesis,

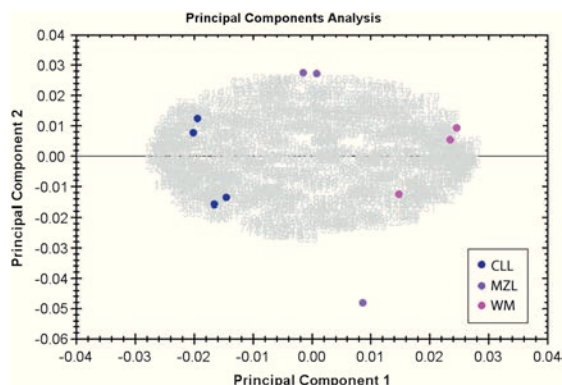


Figure 1. Principal component analysis (PCA) distinguishes WM, MZL and CLL cells. PCA as a 'score plot' of a spot map of the 10 protein extracts (3 WM, 3 MZL and 4 CLL) color-coded according to the legend, projected onto the first two principal components. The PC1 and PC2 axes segregate WM samples (pink spots) from both MZL (purple spots) and CLL (blue spots) groups.

immune-related loci and so on—but are rather confined to ubiquitously expressed structural/housekeeping proteins for example, cytoskeleton, metabolism. Remarkably the vast majority of these proteins show a similar expression pattern that is, up/downregulation in WM vs CLL or MZL hinting again to the fact that WM harbors a distinct proteome entity versus these two other closely considered LPDs. A few notable distinctly expressed proteins are the following: phosphoglucosyltransferase-2 and annexin A6, which were strongly overexpressed, especially when comparing WM and CLL; conversely, peroxiredoxin and Ku70 (X-ray repair cross-complementing protein 6), showed the strongest downregulation in WM compared with CLL. The same trend, although less pronounced, was observed between WM and MZL. Several components of the cytoskeleton were also differentially expressed in WM cells, namely moesin, gelsolin and lamin-B1. Ku70 proteomic profile was examined more thoroughly: 2D and 3D representations together with statistical expression data are shown in Figure 2. No variation of the proteomic content between blood and bone marrow cells, neither for WM nor MZL was noted for this protein.

Lower expression of Ku70 (XRCC6) protein and gene expression in WM cells by comparison with other LPDs

Ku70 was—for obvious reasons of its direct implication in immunoglobulin class switching—the candidate protein retained for validation on a larger cohort of patients. First, western blot experiments performed on 9 untreated patients (whose characteristics are summarized in Table 1) clearly confirmed a much lower expression that is, quasi absence of Ku70 in WM as compared with MZL and CLL (Figure 3). Second, in order to investigate whether the quantitative defect of Ku70 protein was related to a lack of XRCC6 RNA transcript or to a post-translational process, gene expression of XRCC6 was assessed using quantitative RT-PCR (using GUSB as reference gene) in 14 patients with WM or other lymphoid malignancies. XRCC6 expression was found to be significantly lower in WM cells as compared with other LPDs including MZL, CLL and MCL (Figure 4); thus suggesting that the observed protein downregulation was due to a transcriptional shut down.

DISCUSSION

WM, a rare, distinct, B LPD, is defined by lymphoplasmacytic infiltration of the bone marrow and a monoclonal immunoglobulin

M paraproteinemia, respectively, ascertained by bone marrow biopsy and serum protein immunoelectrophoresis/immunofixation. However, before performing the latter tests in order to reach diagnostic certitude, there is/are at present no unique non-invasive diagnostic biomarker(s) available helping to guide the clinician in an often diversity of nonspecific early symptoms for example, fatigue, anemia, thrombocytopenia, hepatosplenomegaly and lymphadenopathy.

Array technology, especially transcriptome analysis, has been widely used in clonal hematological malignancies.^{18,19} WM has not escaped this trend, as mentioned earlier. Proteome analysis—more cumbersome presently—has been less widely used and in case of WM has been performed in only two reports with self-imposed limitations/biases. Here, we present a first comprehensive 2D-E analysis of WM, as compared with other LPDs. This study yielded more significant differences for 17 proteins (Table 2). Besides, the possibly critical downregulation of Ku70, a few other modifications of housekeeping/structural proteins were observed. These include molecules involved in glucose metabolism, redox balance, cell communication, protein metabolism, regulation of translation or nucleic acid binding. Phosphoglucosyltransferase-2 appears to be selectively overexpressed in WM compared with CLL and MZL.^{20,21} Inversely, glutaredoxin-3 (GLRX3), lactoylglutathione lyase (GLO1) and peroxiredoxin-6 (PRDX6) appeared to be underexpressed in WM cells as compared with CLL and MZL cells.²² GLO1 belongs to the glyoxalase complex, which catalyzes the conversion of methylglyoxal to D-lactate.²³ Peroxiredoxins are a ubiquitous family of antioxidant enzymes that functions as tumor suppressor to certain haematopoietic cancers in mice.²⁴ PRDX6, the most underexpressed protein in WM in our study, is a bifunctional enzyme having both peroxidase and phospholipase A2 activities, with roles in oxidative stress-induced and TNF-induced apoptosis.²⁵

Cytoskeleton proteins also appeared to be differentially expressed in WM. Gelsolin is an actin-binding protein that is a key regulator of actin filament assembly and disassembly.^{26,27} Gelsolin has been reported increased in vincristine (an antimicrotubule agent)-resistant acute leukemia, whilst moesin was decreased in the same cells.²⁸ Moesin, which expression was decreased in WM in our study, is a member of the ERM protein family, which appears to function as cross-linker between plasma membranes and actin-based cytoskeletons for cell–cell recognition, signaling and cell movement phenomena. Finally, we observed that several isoforms of annexin A6, a calcium-dependent membrane-binding protein, were upregulated in WM cells.²⁹

Again, perhaps the most notable alteration observed in our study was the silencing of Ku70 in WM cells. This was further confirmed by western blot and mRNA analysis in a second cohort of patients, strengthening the consistency of this anomaly. The Ku (Ku70/Ku86) heterodimer was first discovered as an auto-antigen in patients with autoimmune disorders.³⁰ The genes encoding these proteins are located on chromosomes 22q13 and 2q33-35.³¹ Ku is the DNA-targeting subunit of a DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), which is a serine/threonine kinase consisting of a 465-kDa catalytic subunit (DNA-PKcs) and the heterodimeric Ku regulatory complex. The latter binds to DNA double-stranded ends and other discontinuities in the DNA³² and recruits the DNA-PKcs of the complex.³³ Classical NHEJ involves the DNA-PK complex, essential for lymphoid development, especially VDJ recombination and Ig switching. Indeed Ku70^{-/-} mice lack B-cell maturation and the absence of Ku70 confers hypersensitivity to ionizing radiation and deficiency in DNA double-stranded breaks repair,³⁴ translating in an extreme radiosensitivity and specific VDJ recombination defects,³⁵⁻³⁷ as well as high levels of chromosomal aberrations.^{38,39} In man, DNA-PK activity and increased expression of both Ku70 and Ku86 have been shown to correlate with resistance to therapeutic molecules notably in

Table 2. Most differentially expressed proteins between WM, CLL and MZL cells

Spot no. ^a	FC ^b WM vs CLL	FC ^b WM vs MZL	Access number ^c	Protein name ^d	Gene ^e	q-value ANOVA ^f	MASCOT score ^g	Sequence cover % ^g	No. of peptides matched ^g	Theoretical pI/MW ^h	Observed pI/MW ⁱ	Function ^j
685	14	3.3	Q96G03	Phosphoglucomutase-2	<i>PGM2</i>	0.001	235	10%	5	6.28/68283	6.35/79175	Catalytic activity, metabolism, energy pathways
653	14	3	P08133	Annexin A6	<i>ANXA6</i>	0.0006	722	36%	23	5.42/75873	5.57/76803	Calcium ion binding, cell communication, signal transduction
769	5.8	1.6	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	<i>HNRNPK</i>	0.001	100	41%	15	5.39/50976	5.24/71014	Ribonucleoprotein, regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
476	5.2	1.2	P06396	Gelsolin	<i>GSN</i>	0.006	94	22%	12	5.9/80641	5.82/91105	Structural constituent of cytoskeleton, cell growth and/or maintenance
709	4.8	1.7	P20700	Lamin-B1	<i>LMNB1</i>	0.009	152	32%	21	5.11/66408	5.3/75379	Structural molecule activity, cell growth and/or maintenance
478	4.4	1.6	P06396	Gelsolin	<i>GSN</i>	0.01	450	26%	16	5.9/80641	5.74/91105	Structural constituent of cytoskeleton, cell growth and/or maintenance
811	3.9	2	P31150	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	<i>GDI1</i>	0.006	68	27%	8	5.0/50583	5.05/68326	GTPase activator activity, cell communication, signal transduction
1017	3.4	3.4	Q8TBC4	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	<i>UBA3</i>	0.01	75	21%	8	5.3/51852	5.38/55484	Ubiquitin-specific protease activity, protein metabolism
678	3.3	2.8	P08133	Annexin A6	<i>ANXA6</i>	0.004	722	36%	24	5.42/75873	5.57/76803	Calcium ion binding, cell communication, signal transduction
482	3.3	-1	P06396	Gelsolin	<i>GSN</i>	0.02	138	26%	15	5.9/80641	5.91/90785	Structural constituent of cytoskeleton, cell growth and/or maintenance
928	2.5	1.5	Q9GZZ9	Ubiquitin activating enzyme E1 domain containing 1	<i>UBA5</i>	0.006	149	19%	5	4.79/45291	4.89/59448	Protein binding, protein metabolism
798	-2.5	-1.6	P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	<i>HNRNPL</i>	0.006	268	12%	5	8.46/64133	6.83/70435	RNA binding, regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
1673	-2.6	1.6	Q04760	Lactoylglutathione lyase	<i>GLO1</i>	0.005	66	26%	7	5.12/20778	5.01/22387	Lyase activity, metabolism, energy pathways
1291	-2.9	2.6	O76003	Glutaredoxin-3	<i>GLRX3</i>	0.0002	251	22%	6	5.31/37432	5.53/41031	Molecular function unknown, biological process unknown
1465	-3	-2.3	Q8WXX5	DnaJ homolog subfamily C member 9	<i>DNAJC9</i>	0.02	460	43%	13	5.58/29910	5.85/31685	Chaperone activity, protein metabolism
1046	-3.1	1.1	P13489	Ribonuclease inhibitor	<i>RNH1</i>	0.002	322	15%	6	4.71/49973	4.71/53948	Translation regulator activity, regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
463	-3.5	-1.6	P13639	Elongation factor 2	<i>EEF2</i>	0.003	571	18%	14	6.41/95338	6.75/96931	Translation regulator activity, protein metabolism, translation
462	-4	-2.1	P13639	Elongation factor 2	<i>EEF2</i>	0.01	99	3%	2	6.41/95338	6.83/96704	Translation regulator activity, protein metabolism, translation
651	-4.5	-2.5	P26038	Moesin	<i>MSN</i>	0.03	720	23%	13	6.09/67820	6.41/82098	Structural constituent of cytoskeleton, cell growth and/or maintenance
713	-5.6	-3.4	P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	<i>XRCC6</i>	0.04	114	7%	5	6.23/69843	6.47/77798	DNA binding, regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
712	-7.4	-3.3	P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	<i>XRCC6</i>	0.04	225	41%	23	6.23/69843	6.57/77344	DNA binding, regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
1	-12	-4.4	P30041	Peroxiredoxin-6	<i>PRDX6</i>	0.02	438	46%	10	6.0/25035	6.44/25730	Peroxidase activity, metabolism, energy pathways

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; CLL, chronic lymphocytic leukemia; FC, fold change; MW, molecular weight; MZL, marginal zone lymphoma; WM, Waldenström's macroglobulinemia. ^aSpot numbers refer to ID spots. ^bFC was calculated using Progenesis SameSpots software; negative FC signifying that polypeptide spot is underexpressed in WM samples as compared with CLL or MZL cells, and positive FC signifying that spot is overexpressed in WM cells. ^cAccession number in the UniProt database (<http://uniprot.org>). ^dFull protein name recommended by the UniProt consortium. ^eGene names according to HUGO Gene Nomenclature. ^fq-value from multigroup ANOVA was calculated using Progenesis SameSpots software. ^gMASCOT score indicates the confidence of protein identification using the Mascot search engine (<http://www.matrixscience.com>), depending on amino acid sequence coverage (in %) and on number of matched peptides used for identification in the Swiss-Prot database (<http://expasy.org/sprot/>). ^hTheoretical pI and molecular weight obtained from the Mascot database. ⁱObserved molecular weight and pI calculated by DeCyder version 6.5 software, according to location in the gel. ^jProtein function and biological process were assigned in accordance with the Human Protein Reference Database (<http://hprd.org>).

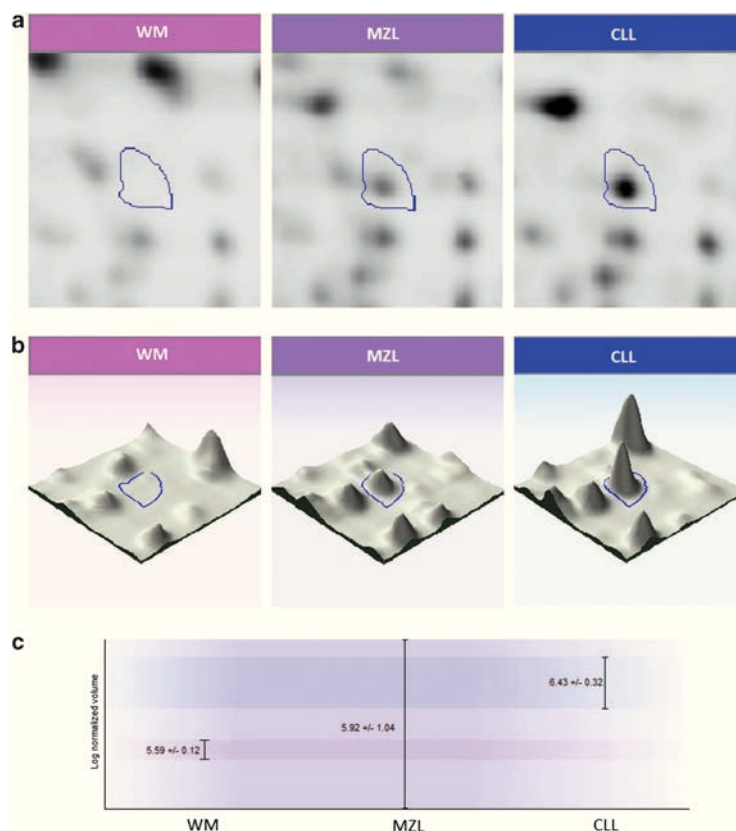


Figure 2. 2D-E analysis of Ku70 protein expression. Spots were analyzed with Progenesis SameSpots (NonLinear Dynamics). (a) Representative focus of the Ku70 protein (spot no. 712) on WM, MZL and CLL samples 2D-gel images. (b) 3D-representation of the Ku70 volume ratios difference between WM, MZL and CLL samples. (c) Statistical analysis of spot no. 712: significant decrease of Ku70 expression in WM cells as compared with CLL cells ($*P < 0.05$).

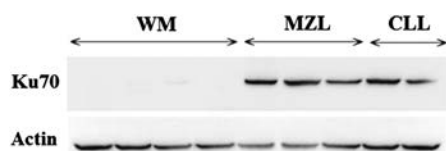


Figure 3. Western-blot validation of the Ku70 2D-E profile. Western blot results of Ku70 expression in samples from WM, MZL and CLL cells. Actin was used as loading control.

the context of CLL.⁴⁰ Minor defects in the NHEJ pathway moreover have been shown to confer predisposition to leukemia.⁴¹ Most LPDs arise via transformation of post-germinal center B cells with chromosomal mutations.⁴² Immunodeficiencies with both abnormal DNA repair⁴³ and genetic polymorphisms of NHEJ components^{44,45} have been associated to an increased susceptibility to the development of lymphoid malignancies, suggesting that an aberrant NHEJ pathway could lead to lymphomagenesis. However, when investigated, no mutation or deletion of Ku86 has been observed in CLL or acute lymphoblastic leukemia cells.⁴⁶ Acute lymphoblastic leukemia cells were found to express high levels of DNA-PKcs, Ku86 and Ku70 protein, whereas CLL cells displayed a lower expression of DNA-PKcs and

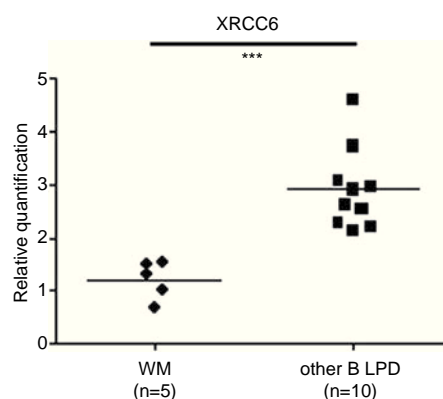


Figure 4. Quantitative real-time PCR validation for *XRCC6*. Relative gene-expression quantification for *XRCC6* (Ku70) and *GUSB* (beta-D glucuronidase) as reference gene, in WM and other B LPD (MZL, MCL and CLL) samples ($**P < 0.001$ by Student's *t*-test).

Ku86 but not Ku70.⁴⁷ By quantitative RT-PCR in several types of LPD (not including WM), a lower expression of Ku70-encoding *XRCC6* gene was observed compared with reactive lymph nodes.⁴⁸

Lower expression of Ku70 transcripts by quantitative RT-PCR could be the result of at least two phenomena: (a) genetic (point mutation etc.) or epigenetic (promoter methylation, microRNA etc.) mechanisms; recently described as key regulators in WM biology;⁴⁹ (b) as part of a larger transcriptional downregulation that is, expression of BLIMP1—a transcriptional repressor — involved in terminal differentiation of B cells to plasma cells has been shown to shut down immunoglobulin class switching through inhibition of activation-induced cytidine deaminase, Ku70, Ku86, DNA-PKcs and STAT6.⁵⁰

In conclusion, this is a comprehensive proteomic analysis of the WM cells in comparison with that of two other B LPDs. This study shows that WM harbors a unique proteome with regards to CLL and MZL cells. A rather limited set of proteins were found to be differentially expressed with no 'usual suspects' being part of this list where the majority of proteins were rather housekeeping/ structural proteins. The confirmation of the downregulation of Ku70—part of the Ku heterodimer, a critical factor in class switch recombination (lacking in WM)—and its mechanisms need to be further investigated in model systems.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Izo Delic (CEA, Fontenay-aux-roses, France) and Ali Dalloul (EA RHEM, Nancy, France) for helpful advice and Manuel Chapelle (Plateforme Protéomique/ Spectrométrie de masse, Institut Jacques Monod, Paris, France) for allowing us to use the EXQuest spot cutter. AP was supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. This work was supported by the Ligue régionale Alsace contre le Cancer, the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and Agence Nationale pour la Recherche (ANR) and the Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTE; a member of the Strasbourg University 'Initiative in Excellence' (IDEX).

REFERENCES

- Dimopoulos MA, Kyle RA, Anagnostopoulos A, Treon SP. Diagnosis and management of Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 1564–1577.
- Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML *et al.* Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; **30**: 110–115.
- Wagner SD, Martinelli V, Luzzatto L. Similar patterns of V kappa gene usage but different degrees of somatic mutation in hairy cell leukemia, prolymphocytic leukemia, Waldenstrom's macroglobulinemia, and myeloma. *Blood* 1994; **83**: 3647–3653.
- Kriangkum J, Taylor BJ, Reiman T, Belch AR, Pilarski LM. Origins of Waldenstrom's macroglobulinemia: does it arise from an unusual B-cell precursor? *Clin Lymphoma* 2005; **5**: 217–219.
- Kriangkum J, Taylor BJ, Treon SP, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM. Clonotypic IgM V/D/J sequence analysis in Waldenstrom macroglobulinemia suggests an unusual B-cell origin and an expansion of polyclonal B cells in peripheral blood. *Blood* 2004; **104**: 2134–2142.
- Sahota SS, Forconi F, Ottensmeier CH, Provan D, Oscier DG, Hamblin TJ *et al.* Typical Waldenstrom macroglobulinemia is derived from a B-cell arrested after cessation of somatic mutation but prior to isotype switch events. *Blood* 2002; **100**: 1505–1507.
- Kriangkum J, Taylor BJ, Strachan E, Mant MJ, Reiman T, Belch AR *et al.* Impaired class switch recombination (CSR) in Waldenstrom macroglobulinemia (WM) despite apparently normal CSR machinery. *Blood* 2006; **107**: 2920–2927.
- Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000; **102**: 553–563.
- Yan CT, Boboila C, Souza EK, Franco S, Hickernell TR, Murphy M *et al.* IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 2007; **449**: 478–482.
- Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA. Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 2996–3003.

Proteomics of WM vs other LPDs

A Perrot *et al*

- Mari PO, Florea BI, Persengiev SP, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Modesti M *et al.* Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 18597–18602.
- Chng WJ, Schop RF, Price-Troska T, Ghobrial I, Kay N, Jelinek DF *et al.* Gene-expression profiling of Waldenstrom macroglobulinemia reveals a phenotype more similar to chronic lymphocytic leukemia than multiple myeloma. *Blood* 2006; **108**: 2755–2763.
- Gutierrez NC, Ocio EM, de Las Rivas J, Maiso P, Delgado M, Ferminan E *et al.* Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenstrom's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* 2007; **21**: 541–549.
- Mitsiades CS, Mitsiades N, Treon SP, Anderson KC. Proteomic analyses in Waldenstrom's macroglobulinemia and other plasma cell dyscrasias. *Semin Oncol* 2003; **30**: 156–160.
- Hatjiharissi E, Ngo H, Leontovich AA, Leleu X, Timm M, Melhem M *et al.* Proteomic analysis of waldenstrom macroglobulinemia. *Cancer Res* 2007; **67**: 3777–3784.
- Perrot A, Pionneau C, Nadaud S, Davi F, Leblond V, Jacob F *et al.* A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; **118**: e1–e15.
- Van den Bergh G, Arckens L. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr Opin Biotechnol* 2004; **15**: 38–43.
- Margalit O, Somech R, Amariglio N, Rechavi G. Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications. *Blood Rev* 2005; **19**: 223–234.
- Seto M. Genomic profiles in B cell lymphoma. *Int J Hematol* 2010; **92**: 238–245.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; **123**: 309–314.
- Kubota K. From tumor biology to clinical PET: a review of positron emission tomography (PET) in oncology. *Ann Nucl Med* 2001; **15**: 471–486.
- Cheng NH, Zhang W, Chen WQ, Jin J, Cui X, Butte NF *et al.* A mammalian monothiol glutaredoxin, Grx3, is critical for cell cycle progression during embryogenesis. *FEBS J* 2011; **278**: 2525–2539.
- Sakamoto H, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Hashimoto Y, Naito M *et al.* Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood* 2000; **95**: 3214–3218.
- Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL *et al.* Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 2003; **424**: 561–565.
- Kim SY, Chun E, Lee KY. Phospholipase A(2) of peroxiredoxin 6 has a critical role in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 1573–1583.
- Asch HL, Head K, Dong Y, Natoli F, Winston JS, Connolly JL *et al.* Widespread loss of gelsolin in breast cancers of humans, mice, and rats. *Cancer Res* 1996; **56**: 4841–4845.
- Ohtsu M, Sakai N, Fujita H, Kashiwagi M, Gasa S, Shimizu S *et al.* Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *EMBO J* 1997; **16**: 4650–4656.
- Verrills NM, Liaw TY, Hood BD, Lock RB, Kavallaris M. Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemia—an in vivo study. *Proteomics* 2006; **6**: 1681–1694.
- Enrich C, Rentero C, de Muga SV, Reverter M, Mulay P, Wood P *et al.* Annexin A6-Linking Ca(2+) signaling with cholesterol transport. *Biochem Biophys Acta* 2011; **1813**: 935–947.
- Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 1981; **68**: 611–620.
- Cai QQ, Plet A, Imbert J, Lafage-Pochitaloff M, Cerdan C, Blanchard JM. Chromosomal location and expression of the genes coding for Ku p70 and p80 in human cell lines and normal tissues. *Cytogenet Cell Genet* 1994; **65**: 221–227.
- Blier PR, Griffith AJ, Craft J, Hardin JA. Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J Biol Chem* 1993; **268**: 7594–7601.
- Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 1993; **72**: 131–142.
- Ouyang H, Nussenzweig A, Kurimasa A, Soares VC, Li X, Cordon-Cardo C *et al.* Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination in vivo. *J Exp Med* 1997; **186**: 921–929.
- Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestley A, Demengeot J, Mizuta R *et al.* Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 1994; **265**: 1442–1445.
- Zhu C, Bogue MA, Lim DS, Hasty P, Roth DB. Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* 1996; **86**: 379–389.



- 37 Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8076–8081.
- 38 Ferguson DO, Sekiguchi JM, Chang S, Frank KM, Gao Y, DePinho RA *et al*. The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6630–6633.
- 39 Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE *et al*. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 2000; **404**: 510–514.
- 40 Muller C, Christodouloupolos G, Salles B, Panasci L. DNA-Dependent protein kinase activity correlates with clinical and in vitro sensitivity of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to nitrogen mustards. *Blood* 1998; **92**: 2213–2219.
- 41 Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B *et al*. Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol* 1999; **9**: 699–702.
- 42 Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 251–262.
- 43 Moshous D, Pannetier C, Chasseval Rd R, Deist FI F, Cavazzana-Calvo M, Romana S *et al*. Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *J Clin Invest* 2003; **111**: 381–387.
- 44 Roddam PL, Rollinson S, O'Driscoll M, Jeggo PA, Jack A, Morgan GJ. Genetic variants of NHEJ DNA ligase IV can affect the risk of developing multiple myeloma, a tumour characterised by aberrant class switch recombination. *J Med Genet* 2002; **39**: 900–905.
- 45 Hill DA, Wang SS, Cerhan JR, Davis S, Cozen W, Severson RK *et al*. Risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes. *Blood* 2006; **108**: 3161–3167.
- 46 Chen TY, Chen JS, Su WC, Wu MS, Tsao CJ. Expression of DNA repair gene Ku80 in lymphoid neoplasm. *Eur J Haematol* 2005; **74**: 481–488.
- 47 Holgersson A, Erdal H, Nilsson A, Lewensohn R, Kanter L. Expression of DNA-PKcs and Ku86, but not Ku70, differs between lymphoid malignancies. *Exp Mol Pathol* 2004; **77**: 1–6.
- 48 Roddam PL, Allan JM, Dring AM, Worrillow LJ, Davies FE, Morgan GJ. Non-homologous end-joining gene profiling reveals distinct expression patterns associated with lymphoma and multiple myeloma. *Br J Haematol* 2010; **149**: 258–262.
- 49 Sacco A, Issa GC, Zhang Y, Liu Y, Maiso P, Ghobrial IM *et al*. Epigenetic modifications as key regulators of Waldenstrom's Macroglobulinemia biology. *J Hematol Oncol* 2010; **3**: 38.
- 50 Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A *et al*. Blimp1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002; **17**: 51–62.



This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Annexe 3 : Projet d'étude de Ku70 dans la maladie de Waldenström

**CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL UNIVERSITAIRE**

DIRECTION DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Protocole de Recherche Clinique**PROTOCOLE HORS PRODUIT DE SANTE
(HPS)**

N°ID RCB: 2015-A01516-43

CODE PROMOTEUR : PSS 2014/WAL-KU - PERROT/VS

Comparaison du niveau d'expression de la protéine Ku70 et des différentes molécules du complexe NHEJ chez des patients atteints de la maladie de Waldenström, chez des patients atteints d'autres syndromes lymphoprolifératifs et chez des sujets sains (étude pilote WAL-KU)

Version N°1.1 du 10/11/2015

Promoteur :

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy
Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny
54035 NANCY Cedex

Responsable de la recherche agissant pour le compte du promoteur / et autorisé à signer le protocole et ses modifications éventuelles au nom du promoteur :

Mr El Mehdi SIAGHY
Direction de la Recherche et de l'Innovation
Tour Drouet - 6ème étage
Hôpitaux de Brabois
Rue du Morvan
54511 VANDOEUVRE-Lès-NANCY

Investigateur principal/coordonnateur :

Nom : PERROT Aurore
Adresse : Service Hématologie CHRU Nancy - Hôpitaux de Brabois - Rue du Morvan
54511 VANDOEUVRE-Lès-NANCY
Tél : 03.83.15.32.82
Mail : au.perrot@chu-nancy.fr

WAL-KU

**PRINCIPAUX CORRESPONDANTS
(1 contact / services associés ou structures associées)****INVESTIGATEUR PRINCIPAL/COORDONNATEUR**

Nom : Aurore PERROT

Adresse : Service Hématologie - Pôle Spécialités Médicales - Hôpitaux de Brabois - Rue du Morvan - 54511 VANDOEUVRE-Lès-NANCY

Tél : 03.83.15.32.82

Mail : au.perrot@chu-nancy.fr

METHODOLOGIE

Nom du contact: Cédric BAUMANN

Adresse : Plateforme d'Aide à la Recherche Clinique - Unité ESPRI-BioBase- Pôle S2R- Hôpitaux de Brabois - Hôpitaux de Brabois - Rue du Morvan 54511 VANDOEUVRE-Lès-NANCY

Mail : c.baumann@chu-nancy.fr

BIOLOGIE

Nom du contact: Marc MULLER

Adresse : Service de Génétique - Pôle Biologie - Hôpitaux de Brabois - Rue du Morvan - 54511 VANDOEUVRE-Lès-NANCY

Tél : 03.83.15.37.70

Mail : m.muller@chu-nancy.fr

VIGILANCE DE L'ESSAI

Nom : Nadine PETITPAIN/Julien SCALA-BERTOLA

Adresse : Centre Régional de Pharmacovigilance de Lorraine CHRU Nancy - Hôpital Central

Tél : 03 83 85 27 61

Mail : n.petitpain@chu-nancy.fr ; j.scala-bertola@chu-nancy.fr

1. RESUME DU PROTOCOLE

TITRE	Comparaison du niveau d'expression de la protéine Ku70 et des différentes molécules du complexe NHEJ chez des patients atteints de la maladie de Waldenström, chez des patients atteints d'autres syndromes lymphoprolifératifs et chez des sujets sains (étude pilote) - Etude WAL-KU
PROMOTEUR	Centre hospitalier Régional Universitaire de Nancy
INVESTIGATEUR COORDINATEUR	Dr Aurore Perrot (Service Hématologie) CHRU de Nancy Service Hématologie Hôpitaux de Brabois, Avenue du Morvan 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy Tél : 03 83 15 32 82 Fax : 03 83 15 35 58 e-mail : au.perrot@chu-nancy.fr
VERSION DU PROTOCOLE	Version 1.1 du 10/11/2015
Nb DE CENTRES	Un centre
TYPE D'ETUDE	Recherche biomédicale avec collection biologique portant sur patients et volontaires sains.
JUSTIFICATION / CONTEXTE	<p>La maladie de Waldenström (MW) est une maladie rare dont la physiopathologie reste à l'heure actuelle mal comprise, même si une mutation récurrente (mutation L265P du gène MYD88) a été récemment décrite. Contrairement à d'autres syndromes lymphoprolifératifs (SLP), il existe dans cette pathologie un défaut de commutation isotypique, mécanisme impliquant AID et le complexe NHEJ. A l'aide d'une technologie d'électrophorèse bidimensionnelle, notre équipe a montré que la MW avait un profil protéomique spécifique, et qu'une des protéines différentiellement exprimées est la protéine Ku70 (codée par le gène XRCC6 et appartenant au complexe NHEJ).</p> <p>L'hypothèse principale est que le niveau d'expression de Ku70 et du transcrit de XRCC6 est diminué dans la MW liée à une modification génétique (mutation, délétion du gène) ou épigénétique (de type méthylation du promoteur du gène) comparativement à son niveau d'expression chez des sujets sains ou des patients atteints d'autres SLP.</p>
OBJECTIF PRINCIPAL	<p>Objectif principal</p> <p>Comparer le niveau moyen d'expression de la protéine Ku70/XRCC6 dans les lymphocytes B mesuré chez des patients atteints de la MW, chez des patients atteints d'autres SLP (leucémie lymphoïde chronique (LLC), lymphome de la zone marginale (LZM), myélome multiple (MM)) et chez des sujets sains (indemnes de la MW et d'autres SLP), appariés sur l'âge (+/- 5 ans) et le sexe</p>

OBJECTIFS SECONDAIRES		<p>Objectifs secondaires</p> <ul style="list-style-type: none"> - Comparer la fréquence des mutations de <i>XRCC6</i> et/ou des anomalies de son promoteur (mutation, délétion, méthylation) entre des patients atteints de la MW, des patients atteints d'autres SLP (LLC, LZM, MM) et des sujets sains (indemnes de la MW et d'autres SLP). - Comparer les niveaux moyens d'expression des autres molécules partenaires du complexe NHEJ (<i>Ku80/XRCC5</i>, <i>XRCC4</i>, <i>DNA ligase IV/LIG4</i>, <i>NBN</i>, <i>MRE11A</i>, <i>RAD50</i>) mesuré chez des patients atteints de la MW, chez des patients atteints d'autres SLP (LLC, LZM, MM) et chez des sujets sains (indemnes de la MW et d'autres SLP). - Comparer, chez les patients atteints de MW, les niveaux moyens d'expression des molécules du NHEJ en fonction de la présence d'anomalies récurrentes telles que les mutations L265P de <i>MYD88</i> et S338X de <i>CXCR4</i>.
CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL		<p>Critère d'évaluation principal</p> <p>Niveau d'expression transcriptionnel (quantification relative exprimée en ratio d'expression par rapport à un gène de référence) et protéique (analyse semi-quantitative par rapport à l'expression d'une protéine de référence) de <i>Ku70/XRCC6</i> mesuré par PCR quantitative et Western-Blot (évalué en aveugle du diagnostic clinique)</p>
CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES		<p>Critères d'évaluation secondaires</p> <ul style="list-style-type: none"> - Présence d'une mutation ponctuelle ou d'une délétion du gène ou du promoteur de <i>XRCC6</i> - Présence d'une anomalie de type méthylation du gène ou du promoteur de <i>XRCC6</i> - Niveau moyen d'expression des autres molécules du complexe NHEJ (<i>Ku80/XRCC5</i>, <i>XRCC4</i>, <i>DNA ligase IV/LIG4</i>, <i>NBN</i>, <i>MRE11A</i>, <i>RAD50</i>) dans la MW et dans les autres SLP - Niveau d'expression des molécules du NHEJ (dans les sous-groupes de MW avec mutations L265P de <i>MYD88</i> et S338X de <i>CXCR4</i>).
METHODOLOGIE / SCHEMA DE L'ETUDE		Etude clinico-biologique monocentrique menée en ouvert à visées descriptive et comparative transversale
NOMBRE TOTAL DE SUJETS		80 sujets (60 patients + 20 volontaires sains)
PATIENTS	NOMBRE	<p>60 patients au total</p> <ul style="list-style-type: none"> - 20 patients atteints de MW (n=20) - 40 patients atteints d'un autre SLP
	CRITERES D'INCLUSION	<p>Critères d'inclusion généraux</p> <ul style="list-style-type: none"> - Patient de plus de 18 ans, affilié à la sécurité sociale - Patient ayant donné son consentement libre, éclairé, écrit

		<p>Critères d'inclusion spécifiques au groupe «MW »</p> <ul style="list-style-type: none"> - Patient possédant un diagnostic d'une MW selon les critères OMS (sur la base des résultats d'une électrophorèse des protéines sériques, d'un myélogramme avec immunophénotypage, d'analyses cytogénétiques comprenant un caryotype et la recherche de la mutation L265P de MYD88). <p>Critères d'inclusion spécifiques au groupe «autres SLP »</p> <ul style="list-style-type: none"> - Patient possédant un diagnostic d'un autre SLP selon les critères diagnostiques habituels (immunophénotypage des lymphocytes circulants avec score de Matutes > 3 pour la LLC ; immunophénotypage, analyse cytogénétique des lymphocytes et biopsie ostéo-médullaire pour le LZM, électrophorèse des protéines sériques, immunofixation et myélogramme pour le MM).
	CRITERES DE NON-INCLUSION	<p>Liste des critères de non-inclusion</p> <ul style="list-style-type: none"> - Femme en âge de procréer ne disposant pas d'un moyen de contraception efficace - Femme enceinte ou allaitant - Patient ayant eu un traitement antérieur par immunochimiothérapie pour un syndrome lymphoprolifératif
	MODALITES DE RECRUTEMENT	Les patients atteints de MW (n=20) ou d'un autre SLP (n=40) seront recrutés au sein du service d'hématologie du CHRU de Nancy.
TEMOINS (LE CAS ECHEANT)	NOMBRE	20
	CRITERES D'INCLUSION	<p>Critères d'inclusion spécifiques au groupe «sujets sains »</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sujet de plus de 18 ans, affilié à la sécurité sociale - Sujet ayant donné son consentement libre, éclairé, écrit - Absence de maladie hématologique connue
	CRITERES DE NON-INCLUSION	<p>Critères de non-inclusion</p> <ul style="list-style-type: none"> - Femme en âge de procréer ne disposant pas d'un moyen de contraception efficace - Femme enceinte ou allaitant - Sujet ayant eu un traitement antérieur par immunochimiothérapie pour un syndrome lymphoprolifératif - Mise en évidence d'une monotypie kappa ou lambda sur les lymphocytes B
	MODALITES DE RECRUTEMENT	Les sujets volontaires sains (n=20) seront recrutés par voie d'affichage dans l'enceinte CHRU de Nancy – Hôpitaux de Brabois et par diffusion au personnel du CHRU de Nancy via un article dans l'Info Hebdo (journal hebdomadaire en version électronique).

DES PERSONNES SPECIALEMENT PROTEGEES, SONT-ELLES CONCERNEES PAR VOTRE RECHERCHE ? <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	Si oui précisez : <input type="checkbox"/> Mineurs <input type="checkbox"/> Majeurs protégés <input type="checkbox"/> Femmes enceintes ou allaitant <input type="checkbox"/> Personnes en situation d'urgence vitale <input type="checkbox"/> Personnes séjournant dans un établissement sanitaire / social <input type="checkbox"/> Personnes privées de liberté
PERIODE D'INTERDICTION ET D'EXCLUSION	Pas d'interdiction de participer simultanément à une autre recherche
INDEMNITES	Dédommagement transports
DUREES DE L'ETUDE	Durée de la période d'inclusion : 18 mois Durée de participation du patient (y compris la période de suivi) : 1 jour Durée totale (temps d'analyse des données compris) :24 mois
PROCEDURES D'INVESTIGATION DIFFERENCES PAR RAPPORT A LA PRISE EN CHARGE HABITUELLE	Pour les patients : Lors de la consultation initiale pour prise en charge diagnostique et thérapeutique d'un syndrome lymphoprolifératif, le bilan à visée diagnostique comporte : - un examen clinique - des examens biologiques sanguins - des examens biologiques médullaires - une imagerie : un scanner cervico-thoraco-abdomino-pelvien si indiqué cliniquement Lors de la consultation ou l'hospitalisation initiale pour prise en charge d'un SLP, l'étude sera proposée au patient par l'investigateur coordonnateur ou un investigateur associé. Si le patient accepte de participer, les prélèvements à visée de recherche seront réalisés en même temps que les prélèvements à visée diagnostique (1 tube supplémentaire de 6 mL pour le sang et de 3 mL pour la moelle) Pour les sujets sains : Pour les sujets sains (indemnes de MW ou d'un autre SLP), un examen médical et un prélèvement sanguin de 12 mL environ seront réalisés. Le caractère polyclonal des lymphocytes B sera vérifié par cytométrie en flux, par l'absence de mise en évidence de monotypie kappa ou lambda afin de valider un critère de non-inclusion
ACTES NECESSITANT DE LA LOGISTIQUE	Transport de prélèvements
EVALUATION DES BENEFICES ET DES RQUES LIES A LA RECHERCHE	Il n'y a pas de bénéfice individuel attendu pour un patient. Il n'y a pas de risque supplémentaire à celui des examens pour le diagnostic. Le seul inconfort auquel un patient est astreint est une augmentation du nombre de tubes prélevés lors de l'examen sanguin et/ou médullaire réalisé(s) dans le cadre du diagnostic. Une anesthésie locale et éventuellement l'utilisation d'un gaz de type protoxyde d'azote seront systématiquement proposés en cas de prélèvement médullaire. Pour les témoins, le risque est celui d'un prélèvement sanguin de 12 mL.

ANALYSE STATISTIQUE	<p>Analyse statistique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analyse descriptive des paramètres socio-démographiques et clinico-biologiques par la moyenne +/- écart-type, la médiane, les valeurs min et max pour les variables continues et des pourcentages pour les variables catégorielles, dans les 3 groupes de participants. - Vérification de la qualité de l'appariement par une comparaison de l'âge et du sexe entre les groupes. - Analyse des critères continus (critères d'évaluation principal et secondaires) : analyse de variance paramétrique ou non paramétrique (après vérifications des conditions d'application) complétée par des tests de comparaison multiples (Bonferroni). Bien qu'il s'agisse d'une étude pilote menée sur des échantillons de taille modeste, nous n'excluons pas d'appliquer un modèle de régression linéaire multivarié. - Analyse des critères qualitatifs (critères d'évaluation secondaires) : test du Chi2. - Un calcul de puissance a posteriori sera systématiquement effectué pour affiner l'interprétation des tests statistiques. - Le seuil de significativité sera fixé à 5%. L'analyse statistique sera réalisée sous SAS v9.4. <p>Justification du nombre de sujets</p> <p>En situation exploratoire et en l'absence de données publiées, la taille des échantillons dans cette étude pilote est définie de façon pragmatique et dans un souci de faisabilité. , Nous prévoyons d'inclure 20 patients atteints de MW, 40 patients atteints d'un autre SLP et 20 sujets sains, tous appariés sur l'âge (+/- 5 ans) et le sexe. Comme mentionné plus haut, un calcul de puissance a posteriori sera utile pour interpréter le résultat des tests statistiques.</p>
RETOMBÉES ATTENDUES	<p>Les résultats obtenus permettront d'alimenter les hypothèses testées et offriront des estimations des niveaux d'expression des protéines étudiées dans les trois groupes étudiés (MW, autres SLP et sujets sains).</p> <p>La perspective de cette étude est la planification d'une étude de plus grande envergure, multicentrique, dont l'objectif principal serait de déterminer une valeur seuil permettant de discriminer la MW des autres SLP.</p> <p>Les résultats permettront aussi de mieux appréhender la physiopathologie de la MW débouchant éventuellement sur de nouvelles perspectives thérapeutiques.</p>
FINANCEMENT DES SURCOUTS LIÉS À L'ETUDE	<p>Surcouts liés à l'étude pris en charge par la Fondation de Recherche Médical « FRM-legs orientés Nancy 2014)</p>

Apport d'une approche protéomique dans l'étude des mécanismes d'activation de néoplasies lymphoïdes B

La LLC est caractérisée par une forte hétérogénéité de présentation clinico-biologique avec description de formes indolentes (IGVH mutés, ZAP-70-) et de formes agressives (IGVH non mutés, ZAP-70+). Le BCR et les voies de signalisation en aval ont fait l'objet d'une étude transcriptionnelle de la réponse à une forte stimulation du BCR, que nous avons poursuivi par une approche protéomique. La MW est un syndrome lymphoprolifératif chronique dont la physiopathologie reste actuellement mal comprise même si une mutation récurrente a été récemment décrite. Nous avons pu montrer que l'analyse globale de 48 profils protéomiques permettait de distinguer les cellules de LLC M et UM avant toute stimulation. Parmi les protéines différenciellement exprimées, on peut citer notamment la protéine HCLS1, dont le rôle a déjà été exploré dans la LLC. De plus, la stimulation du BCR induit une réponse protéomique spécifique dans les cellules de LLC agressives, correspondant à des variations d'expression de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, la régulation de la réponse immunologique, le métabolisme protéique, la croissance cellulaire et l'apoptose. La diminution d'expression de 2 protéines, RAD23B et PDCD4, après stimulation du BCR de cellules de LLC agressives a été confirmée par Western-Blot chez 19 patients. Cette technologie DIGE permettant également l'étude de différents isoformes protéiques (et notamment d'isoformes de phosphorylation), nous avons observé des modifications d'état de phosphorylation de plusieurs impliquées dans le cytosquelette après stimulation du BCR (lamines, vimentine...). Une étude protéomique par électrophorèse bidimensionnelle E2D DIGE sur des cellules primaires de sang et de moelle issues de patients porteurs de MW non préalablement traités, en comparaison à d'autres syndromes lymphoprolifératifs tels les lymphomes de la zone marginale (LZM) ou la LLC, a permis de mettre en évidence un profil protéomique spécifique des cellules de MW. Parmi les spots polypeptidiques différenciellement exprimés, est à souligner la sous-expression de la protéine Ku70 chez les patients porteurs de MW par rapport aux autres lymphoproliférations. La confirmation de cette sous-expression de Ku70 a été validée au niveau transcriptionnel par PCR classique et au niveau protéique par Western-Blot dans une plus grande cohorte de patients. La mise en évidence de ces protéines d'intérêt dans l'agressivité et la physiopathologie de ces néoplasies lymphoïdes ouvrent la voie à de nouvelles études portant sur la régulation de ces molécules.

Mots-clés : Leucémie lymphoïde chronique, Maladie de Waldenström, Protéomique, Récepteur à l'antigène, Réparation de l'ADN

Proteomics approach to study B cell lymphoid neoplasms

CLL is characterized by a strong heterogeneity of clinical and biological presentation with indolent forms (mutated IgVH, ZAP-70-) and aggressive forms (unmutated IgVH, ZAP-70 +). BCR and the downstream signaling pathways have been the subject of a study of the transcriptional response to a strong stimulation of the BCR. We continued with a proteomic approach. WM is a chronic lymphoproliferative disorder whose pathophysiology remains poorly understood, although a recurrent mutation has recently been described. We have shown that the overall 48 proteomic profiles analysis allowed to distinguish between CLL cells M and UM before stimulation. Among the differentially expressed proteins include HCLS1 including protein, whose role has already been explored in CLL. Furthermore, stimulation of the BCR induces a specific response in proteomics aggressive LLC cells, corresponding to protein expression changes involved in cellular signaling, regulation of the immune response, protein metabolism, cell growth and apoptosis. The decrease in expression of two proteins, and RAD23B PDCD4 after stimulation aggressive cells was confirmed by Western blotting in 19 patients. This DIGE technology also allows the study of different protein isoforms (especially phosphorylation isoforms), we observed phosphorylation state changes more involved in the cytoskeleton after stimulation of RCC (rolled, vimentin). A proteomic study by two-dimensional electrophoresis E2D DIGE on primary cells of blood and marrow from carriers MW previously untreated patients, in comparison to other lymphoproliferative disorders such as marginal zone lymphoma (MZL) or CLL, helped to highlight a specific proteomic profile of cell MW. Among the spots differentially expressed polypeptide is to highlight the under-expression of Ku70 protein in patients MW compared with other lymphoproliferative disorders. The confirmation of this under-expression of Ku70 was confirmed at the transcriptional level by conventional PCR and at the protein level by Western blotting in a larger cohort of patients. We were able to highlight specific proteomic profiles aggressive forms and identification of differently expressed proteins allowed to identify new proteins involved in aggressiveness and pathophysiology of diseases, opening the way for new studies will focus on the regulation of these molecules of interest.

Key words: Chronic lymphocytic leukemia, Waldenström macroglobulinemia, Proteomics, B-cell receptor, DNA repair